

NANOPARTİKÜLLER KULLANARAK RF İLE HİPERTERMİ

HYPERTHERMIA USING RF WITH NANOPARTICLES

BEHZAD NASSERI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak Hazırlanmıştır.

2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda**
YÜKSEK LISANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye (Danışman) Prof. Dr. Erhan Pişkin

Üye Prof. Dr. Ayşe Kevser Özden

Üye Doç. Dr. İbrahim Vargel

Üye Doç. Dr. Mustafa Türk

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ... /... / ... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nca .../.../... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Nanopartiküller Kullanarak RF ile Hipertermi

Behzad Nasseri

ÖZ

Kanser günümüzde insanoğlunun karşı karşıya bulunduğu ancak tanı ve tedavisinde henüz önemli bir başarı sağlanamayan çok önemli bir hastalık grubudur (Greenlee, Hill Harmon et al. 2009).

İstatistiklere göre 2008 yılında dünyada yaklaşık 12.7 milyon yeni kanser vakası görülmüş olup, 7.6 milyon kansere bağlı ölüm bildirilmiştir. Yeni kanser vakalarının % 56' sı ve kansere bağlı ölümlerin % 64' ü ekonomik olarak gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Halihazırda cerrahi, kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi yöntemleri uygulanmakta olup, ancak sayılan yöntemlerin çok sayıda yan etkileri olduğundan dolayı bu yöntemlerin kullanılmasını kısıtlamaktadır. Hipertermi olarak adlandırılan kanser tedavi yöntemleri daha az zararlı oldukları için önem arz etmektedir. Bu yöntemde kanser bölgesinin sıcaklığı vücudun normal sıcaklığına göre 5°C artırıldığında, kanser hücreleri hasar görür, ve tümör ablasyonu gerçekleşir. Nanoteknoloji alanlarının gelişmesi, biyomedikal tanı ve tedavi yöntemlerinde yararlar sunmaktadır. Bunlardan radyofrekans (RF) dalgaları ile manyetik ve altın bazlı nanopartiküllerin "özellik soğurma oranı" (SAR) mekanizmasını ile oluşan RF hipertermisi büyük öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında, sentezlenen farklı şekil ve türde nanopartiküllerin RF hipertermisine olan etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda, anten modüllü 144.000 MHz ve 200 watt RF jeneratörü, sentezlenen nanopartiküller ve in-vitro çalışmalarında olan hücre hatlarına uygulanmış olup sıcaklık artışı kızılötesi termal kamera ile gözlenmiştir.

Öncül deneylerde RF dalgaları farklı RF güçlerinde (180, 120 ve 80w) ve yoğunluklarda (30, 15, 5 ppm) nanopartikül çözeltilerine uygulanmıştır. Bu etkileşme sonucu, nanopartikül çözeltilerinin hipertermi ile sıcaklık artışı gözlenmiştir. Aynı RF ile nanopartiküllerin etkileşimi, fibroblast ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarına

uygulanmıştır. Etkileşme sonucu, hipertermik sıcaklıktan kaynaklanan hücre canlılığı, apoptoz ve nekroz sonuçları her iki hücre tipi için değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre en yüksek sıcaklık artışları manyetik nanopartikül çözeltisinde, en yüksek RF gücünde (180W) ve en yoğun çözeltilerde (30ppm), 44 °C olarak gözlenmiştir. İn-vitro deneylerinde, maksimum hücre apoptoz ve nekroz 15 ppm nanoaprtiküll çözeltisinde, en yüksek RF gücündende (180W), MCF-7 hücre hattında %62±7 apoptoz değeri ile gözlenmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen değerlere göre, manyetik nanopartiküller için 180W RF gücü ve 30 ppm derişimde maksimum hipertermik sıcaklık artışı sağlamıştır. İn-vitro deney sonuçlarına göre en yüksek apoptoz değerleri, nanopartiküllerin 15 ppm yoğunluğunda olduğu çözeltide elde edilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Radyofrekans, RF, Manyetit, Altın kaplı manyetit nanopartikül, Altın nanorod, , Kanser, Hipertermi

Danışman: Prof. Dr. Erhan Pişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü ve Biyomühendislik Anabilim Dalı.

Eş-danışman: Yrd. Doç. Dr. İsmail Cengiz Koçum Başkent Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

Hyperthermia Using RF With Nanoparticles

Behzad Nasser

ABSTRACT

Cancer is a one of the most important diseases of human being. Although a lot of progress have been achieved in the diagnosis and treatment of cancer, their current levels are not fully satisfying (Greenlee, Hill Harmon et al. 2009). According to the statistics, approximately 12.7 million new cases of cancer was diagnosed worldwide in 2008. During the same period 7.6 million cancer-related deaths were reported. From this total, %56 of new cancer cases and %64 of cancer deaths occurred in economically developed countries. Presently classical cancer treatment methods include surgery, chemotherapy and radiotherapy. The applications of these modalities have been limited due to their side effects. Recently, hyperthermic techniques of cancer treatment have gained a great importance due to lower unwanted harmful effects.

In standard hyperthermia, an increase in body temperature of up to 5°C above normal level leads to the death of cancerous cells via “tumor ablation”.

Developments in nanotechnology have made new insights into their use in biomedical diagnostic and therapeutic applications. Radiofrequency (RF) induction of hyperthermia in magnetic or gold-based nanoparticles using “Specific Absorption Rate”(SAR) mechanism has become a promising technic in the treatment of cancer.

In this dissertation, the effects of nanoparticles of different structure and size on RF hyperthermia have been investigated. An antenna type RF generator module of 144.000 MHz and 200 watt has been used as the source of energy. The RF waves produced were applied to a diverse range of nanoparticles. The effect of hyperthermia were studied in cell lines in in-vitro settings. The resultant temperature rise was detected by the infrared thermal camera.

In primary experiments, RF was implemented in different RF powers (180, 120 and 80w) and on different nanoparticle solutions (30, 15, 5ppm). The resultant increase of temperature in the nanoparticle solution was detected by thermal camera. The same setting was implemented in the fibroblastic and breast cancer cell (MCF-7) lines. Viability, apoptosis and necrosis were evaluated for both cell lines.

According to the results, it was observed that the highest temperature, 44 °C, was attained with the highest RF power (180W) in the magnetic nanoparticles at the highest concentration (30 ppm).

In contrast, in MCF-7 cell lines, the maximum cell apoptosis was observed at 180 W RF power and 15 ppm concentration. At the end of experiment, 62 ± 7 % of the cells showed apoptotic changes.

In conclusion, maximum rise in temperature was reached at 180 W RF power and 30 ppm nanoparticle concentration in magnetic nanoparticles. On the contrary, highest level of apoptosis was attained with the same particle type and RF power but at a lower, 15 ppm nanoparticle, concentration.

Key Words: Radiofrequency, RF, Magnetit, Gold coated magnetit nanoparticle, Gold nanorod, Cancer, Hyperthermia

Advisor: Prof. Erhan Piskin, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

Co-Advisor: Assist. Prof. Ismail Cengiz Kocum, Baskent University, Biomedical Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile bu çalışmanın planlanması ve gerçekleştirilmesinde değerli emekleri bulunan ve her daim yol gösteren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Erhan Pişkin ve eş danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail Cengiz Koçum'a;

Jürimde olabilmek için bana zaman ayıran Sayın Prof. Dr. Tülin Kutsal, Sayın Prof. Dr. Kevser Özden, Sayın Doç. Dr. İbrahim Vargel ve Sayın Doç. Dr. Mustafa Türk'e;

Tezimin bütün aşamalarında bana yardımcı olan iyi dostlarım Dr. Ayfer Çalış, Dr. Oğulcan A. Evirgen, Araz Norouzi, Mehmet Yılmaz ve Bakiye'ye ve değerli arkadaşım Kouros Salimi'ye;

İn-vitro aşamalarında yardımcı olan dostum Esra'ya;

RF jeneratörü yapılmasının bir bölümünde yardımcı olmalarından dolayı Mikrotek şirketi ekibi ve Ramazan ve Murat'a;

Başladığımdan beri, bilimsel alanlarda yardımcı olan Ağbim, Doç. Dr. Erdinç Naseri'ye.

Hayatım boyunca zor günlerimde yanımda olan ve varlığını esirgemeyen ve beni gönülden destekleyen en değerli insan, Canım Annem'e;

Tecrübeleriyle en iyi yol gösteren, aynı zamanda güçlenmeyi ondan öğrendiğim insan Babam'a;

Her zaman canı gönülden beni dinleyen ve hayat tecrübesi ile tüm insanlara sevgi gösteren, yardımcı olan ve elinden geleni yapan prensesim, Canım Ablam Vahide'ye;

Sonsuz Teşekkürlerimle....

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanserin biyolojisi.....	3
2.1.2. Meme kanseri:.....	4
2.1.3. Kanserin tedavi yöntemleri	5
2.1.3.1. İnvaziv yöntemler	6
2.1.3.2. Non-invaziv yöntemeler	6
2.1.4. Kanserin standart tedavi yöntemleri	6
2.1.5. Kanserin özel tedavi yöntemleri.....	6
2.1.6. Kanser tedavisinde kullanılan standart yöntemlerin yan etkileri	7
2.1.6.1. Cerrahi	7
2.1.6.2. Kemoterapi.....	7
2.1.6.3. Radyoterapi.....	8
2.2. Nanoteknoloji Alanı ve Biyomedikalde Uygulamaları.....	9
2.2.1. Tek domainli partiküller	11
2.2.1.1. Süperparamanyetizma	11
2.2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller ve özellikleri	12
2.2.2.1. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin fiziksel özellikleri, biyomedikal kullanım alanları ve etkiliyen mekanizmalar	12
2.2.3. Altın kaplı manyetik nanopartiküller ve biyomedikal uygulama alanları	16
2.2.4. Altın nanopartiküller, fonksiyonel özellikleri ve etkileyen mekanizmalar	17
2.2.5. Altın nanopartiküllerin biyomedikalde uygulama alanları	18
2.2.6. Altın nanorodlar ve sentez metodları, fiziksel özellikleri ve biyomedikal uygulama alanları	18

2.2.7. Sentezlenen nanoparçacıkların (SPIONs, Au@SPIONs, AuNPs, AuNRs) karakterizasyonu	19
2.3. Elektromanyetik Spektrumu	19
2.3.1. Radyofrekans	20
2.3.1.1. Radyofrekans dalgaların fiziksel özellikleri	21
2.3.2. Radyofrekans dalgalarına bağlı “Özgül Soğurma Oranı” (SAR) mekanizması	22
2.3.3. Radyofrekans dalgaların biyolojik sistemlerine olan etkileri.....	23
2.3.4. Radyofrekans dalgaların bileşenleri ve fiziksel parametreleri.....	23
2.3.5. İyonize ve non-iyonize dalgalar	24
2.3.6. Radyo frekans dalgaların biyomedikal alanlarda kullanımı.....	24
2.3.7. Radyo frekans ablasyonu	25
2.3.7.1. İnvaziv radyofrekans ablasyonu	26
2.3.7.2. Noninvaziv radyofrekans ablasyonu (NIRFA)	27
2.3.8. Elektromanyetik tayfındaki olan dalgaların penetrasyon özellikleri.....	27
2.4. Kanser Tedavisinde Tümör Ablasyonu ve Nanoteknoloji	30
2.4.1. Hipertermi.....	30
2.4.1.1. Hiperterminin enerji şekillerde bağlı terapotik modaliteleri	31
2.4.1.2. Non-invaziv hipertermi.....	32
2.4.1.3. İnvaziv hipertermi	33
2.4.2. Hiperterminin uygulanan bölgeye yönelik kategorileri	33
2.4.3. Konvansiyonel hipertermi yöntemlerinin dezavantajları, komplikasyonları ve yan etkileri	35
2.4.4. ”Heat Shock Protein” hücre ölümü mekanizması	36
2.5. Elektromanyetik Dalgalar ile Nanopartiküllerin Etkileşme Mekanizmaları ve Kanserin Tedavi Yöntemlerinde Farklı Uygulama Türleri.....	37
2.5.1.1. Fototermal tedavi (PTT) yöntemi	37
2.5.1.2. Kanser tedavi yöntemlerinden “Fotodinamik tedavisi” (PDT)	38
2.5.1.3. Manyetit nanopartiküllerin manyetik alnadaki olan etkileşme mekanizması	39
2.5.1.4. Düşük frekans radyoferekans dalgaları ile nanopartiküllerin etkileşme mekanizması	40
2.5.1.5. “Yüzey Plasmon Rezonans” (SPR) mekanizması ve “Plasmonik Fototermal Tedavi” (PPTT) yönteminde kullanımı	42

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	44
3.1. Manyetit Nanopartiküllerin (SPIONs) Sentezi	44
3.1.1. SPIONs'lerin sentezinde kullanılan malzemeler	44
3.1.1.1. SPIONs'lerin altın ile kaplaması	46
3.1.1.2. Manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında kullanılan maddeler	46
3.1.1.3. Manyetik nanopartiküllerin altın ile kaplama metodu	46
3.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezi	47
3.2.1. Altın nanopartiküllerin sentezindeki kullanılan malzemeler	47
3.2.2. Altın nanopartiküllerin sentez metodu	48
3.3. Altın Nanorodların Sentezi.....	48
3.3.1. Altın nanorodların sentezindeki kullanılan malzemeler.....	49
3.3.1.1. Altın nanorodların sentez metodu.....	49
3.3.1.2. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu	49
3.4. Endüktif Modüllü Radyofrekans Üreteç (0-300w, 13.56MHz)	50
3.5. Endüktif Modüllü RF Üreteç (0-30w, 13.56MHz) Kombinasyonu.....	52
3.6. Kapasitif Modüllü RF (0-30w, 13.56MHz) Jeneratörü	54
3.7. Anten Modüllü RF (0-200w) Jeneratörünün Tasarımı ve Yapılması.....	55
3.8. Biyolojik Sistemlerdeki Sıcak Kabin Simülasyonu	56
3.9. RF Uygulanan Nanopartiküllerin Sıcaklık Artışı Değerlendirmesi.....	56
3.10. İn-vitro Deneplerinde Kullanılan Nanopartikül Çözeltilerin Hazırlaması ve Seçilen Derişimler	57
3.11. İn-vitro Deneplerinde RF Uygulanmış Hücre Hatları.....	57
3.11.1. Materyaller.....	57
3.11.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasallar	57
3.11.2. Metod	58
3.11.2.1. MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin kültürde çoğaltılması	58
3.11.2.2. WST metodu ile sitotoksitenin tesbiti.....	58
3.11.2.3. İkili boyama metodu ile apoptozun ve nekrozun belirlenmesi	59
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	60
4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	60
4.1.1.1. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsünden elde edilen boyut ve boy dağılım grafiği	62
4.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	63

4.2.1. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin (Au@SPIONs) UV/VIS absorbans değerlerinin incelemesi.....	64
4.2.2. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüleri	65
4.2.2.1. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntülerinden elde edilen boy dağılımı grafiği.....	66
4.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	67
4.3.1. Altın nanopartiküllerin UV/VIS absorbans değerleri.....	67
4.3.2. Altın nanopartiküllerin (AuNPs) Zeta-sizer cihazı ile boyut dağılımı incelemesi	68
4.4. Altın Nanorodların (AuNRs) Karakterizasyonu	69
4.4.1. Altın nanorodların (AuNRs) Zeta-sizer cihazı ile boyut dağılımı belirlemesi ..	69
4.4.2. Altın nanorodların (AuNRs) UV/VIS spektrasından elde edilen absorbans değerleri	70
4.5. Endüktif Modüllü RF Dalgaları ile Çeşitli Nanopartiküllerin Etkileşimi ve Sıcaklık Artışının Gözlenmesi.....	71
4.6. RF Uygulanan Çeşitli Nanopartiküllerin Sıcaklık Artışı İncelemesi ve Sonuçların Tartışılması.....	72
4.7. 46µg/ml Derişimdeki Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Çözeltisine RF uygulaması ve Sıcaklık Artışının Gözlenmesi.....	72
4.8. 49µg/ml Derişimdeki Altın Nanopartikül Çözeltinin RF Uygulaması ve Elde Edilen Sıcaklık Artışının İncelenmesi.....	73
4.9. 120 Watt Gücünde RF Uygulanmış 80 µg/ml Derişimli Altın Nanorod Çözeltinin Sıcaklık Artışı İncelenmesi	73
4.10. 6400 µg/ml derişimde olan Manyetit Nanopartiküllerin RF Uygulaması ve Sıcaklık Değerlerinin İncelenmesi	74
4.11. Farklı Nanopartikül Stok Çözeltilerinin Anten Modüllü RF Dalgaları ile Etkileşimi ve Sıcaklık Analizi	75
4.11.1.1. 30µg/ml yoğunluktaki çeşitli nanopartikül çözeltilere farklı güçlerde RF uygulaması ve sıcaklık değerlendirmesi.....	77
4.11.1.2. Farklı güçlerdeki anten modüllü RF dalgaları İle 15µg/ml yoğunluktaki çeşitli nanopartikül çözeltilerinin etkileşimi ve sıcaklık analizi.....	81
4.11.1.3. Farklı güçlerdeki anten modüllü RF dalgaları İle 5µg/ml derişimli nanopartikül çözeltilerinin etkileşimi ve sıcaklık artışlarının değerlendirilmesi	85
4.12. İn-vitro Deneylerinde RF Uygulanmış Hücre Hatlarının Canlılık, Apoptoz ve Nekroz Sonuçları.....	89
4.12.1. Toksisite sonuçları.....	89
4.12.2. Apoptotik ve nekrotik etkisi	94

5. SONUÇLAR.....	103
6. REFERANSLAR	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Meme kanseri	5
Şekil 2 (A) Normal meme hücresi (B) İnvaziv meme kanser hücresi (C) Non-invaziv meme kanseri hücresi	5
Şekil 3 Biyomedikal bilimler devrim nanoteknoloji şematik gösterimi	10
Şekil 4 İlaç salınım sistemindeli olan ilaç taşıyan manyetik nanopartiküllerin fonksiyonu	15
Şekil 5 Biyomedikal amaçlı bazı frekansların kas dokusuna penetrasyon derinliğine yönelik grafik	29
Şekil 6 Hiperterminin farklı uygulama yöntemleri.....	36
Şekil 7 "Heat Shock Protein" Tümör yok edilme sıcaklık derecesi.....	37
Şekil 8 "Jule" modeline göre, RF uygulanmış altın nanopartiküllerin sıcaklık artışı görüntüsü	42
Şekil 9 Demir oksit süperparamanyetik nanopartikül (SPIONs) sentezi için reaksiyon kombinasyonu	45
Şekil 10 Endüktif modüllü RF jeneratörü (0-300w, 13.56MHz) kombinasyonu	51
Şekil 11 Endüktif modüllü RF jeneratörü.....	53
Şekil 12 Endüktif modüllü RF jeneratöründeki kullanılan kriyostat ünitesi	53
Şekil 13 Endüktif RF jeneratörünün bobin görüntüsü	54
Şekil 14 Kapasitif modüllü RF jeneratörü	55
Şekil 15 Anten modüllü RF jeneratörü	55
Şekil 16 Zeta-sizer cihazından elde edilen manyetit nanopartiküllerin boy ve boy dağılım grafiği.....	61
Şekil 17 Manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüsü	62
Şekil 18 Manyetit nanopartiküllerin TEM görüntülerinden elde edilen boy dağılım grafiği	63
Şekil 19 Zeta-sizer cihazından elde edilen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boy ve boy dağılım grafiği	64
Şekil 20 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin UV/VIS absorbans verilerinin grafiği... ..	65
Şekil 21 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüleri	66
Şekil 22 TEM görüntülerinden sonuçlanan Au@SPIONs'ların boyutlarına yönelik sayı grafiği	67
Şekil 23 Altın nanopartiküllerinin uv/vis spektrumu.....	68
Şekil 24 Altın nanopartiküllerin Zeta-sizer ile elde edilen boy ve boy dağılım sonuçları	69

Şekil 25 Zeta-sizer ile altın nanorodların elde edilen boy ve boy dağılım grafiği	70
Şekil 26 Altın nanorodların UV/VIS absorbands spektrası.....	71
Şekil 27 RF uygulanmış altın kaplı manyetit nanopartiküllerin sıcaklık artışı ve termal kamera ile görüntüleri (46µg/ml Au@SPIONs çözelti, 120 watt RF gücü) a) 1dk b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk i) 40dk j) 45dk l) 50dk.....	72
Şekil 28 120 watt gücünde RF uygulanmış 49 µg/ml yoğunluğundaki altın nanopartikül çözeltisinin termal kamerayla elde edilen sıcaklık artış görüntüleri a)1 dk. b) 5 dk c) 10dk d)15 dk e) 20 dk f) 25 dk g) 30 dk	73
Şekil 29 80 µg/ml yoğunluğundaki olan AuNRs çözeltisi ile 120w'lık RF uygulaması ardından sıcaklık artışı incelenmesi a) 1dk. b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk.....	74
Şekil 30 120 watt gücünde RF uygulanmış 6400 µg/ml yoğunluğundaki manyetit nanopartikül çözeltisinin termal kamera ile sıcaklık artışı görüntüleri a) 1dk b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk i) 40dk j) 45dk	75
Şekil 31 Nanopartikül çözeltilerin RF uygulaması ve sıcaklık artışının incelenmesi ..	76
Şekil 32 Stok nanopartiküllerin 120w RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışının incelenmesi	76
Şekil 33 30µg/ml yoğunlukta olan farklı nanopartiküllerin 180W RF uygulaması ve sıcaklık artışının değerlendirmesi	78
Şekil 34 Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi.....	79
Şekil 35 Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 80W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi.....	80
Şekil 36 Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 180W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi.....	82
Şekil 37 Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF uygulamasının zamana bağlı sıcaklık artışı	83
Şekil 38 15 µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 80W gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı	84
Şekil 39 5 µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 180W gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı	86
Şekil 40 5µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 120w gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı	87
Şekil 41 5 µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 80W gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı	88
Şekil 42 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin ışık mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, B) RF uygulanmış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, C) RF uygulanmamış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile	

etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri. Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200 µm. 90

Şekil 43 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin Floresan mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri,B) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri,C) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri. Oklar apoptoza uğramış hücrelerden birkaçını göstermektedir Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200µm. 97

Şekil 44 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin Floresan mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, B) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, C) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri. Oklar nekroza uğramış hücrelerden birkaçını göstermektedir Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200µm. 98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1 Küresel partiküllerin maksimum tek domain boyu	11
Çizelge 2 Radyo spektrumun farklı frekanslardaki dalgaları.....	20
Çizelge 3 RF dalganın frekansına göre dokulara penetrasyonu (cm) (Lin and Michaelson 1987; Polk and Postow 1996)	28
Çizelge 4 Dokuların dielektrik sabiti (ϵ_r) ve iletkenliklerinin (σ) Frekansa göre değişimi (ϵ_r / σ) (Polk and Postow 1996)	29
Çizelge 5 WST ile elde edilmiş 80 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin % canlılık oranları	91
Çizelge 6 WST ile elde edilmiş 120 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin % canlılık oranları	91
Çizelge 7 WST ile elde edilmiş 180w RF dalgaları ile MCF-7 hücrelerinin etkileşimi ve % canlılık oranları.....	92
Çizelge 8 WST ile elde edilmiş RF uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin nanopartiküllerle etkileşimi ve % canlılık oranları	92
Çizelge 9 WST ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları	93
Çizelge 10 WST ile elde edilmiş 120 watt RF ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları	93
Çizelge 11 WST ile elde edilmiş 180 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları	94
Çizelge 12 WST ile elde edilmiş Sadece nanopartiküllerle etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları	94
Çizelge 13 İkili boyama ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları.....	99
Çizelge 14 İkili boyama ile elde edilmiş 120 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları	99
Çizelge 15 İkili boyama ile elde edilmiş 180 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları	100
Çizelge 16 İkili boyama ile elde edilmiş RF uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları.....	100
Çizelge 17 İkili boyama ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları	101
Çizelge 18 İkili boyama ile elde edilmiş 120 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları	101

Çizelge 19 İkili boyama ile elde edilmiş 180 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları	102
Çizelge 20 İkili boyama ile elde edilmiş RF uygulanmamış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgNO₃: Gümüş Nitrat

AMF: Alternatif Manyetik Alan

ANSI: American National Standards Institute

Au@SPIONs: Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül

AuNRs: Altın Nanorod

AuNPs: Altın Nanopartikül

CHPP: Aralıksız Peritoniyel Perfüzyon Hipertermisi

CTAB: Heksadesiltrimetilamonyum Bromür

DLS: Dinamik Işık Saçılması

EM: Elektromanyetik

EMR: Elektro Manyetik Radyasyon

FCC: Federal Communication Commission

IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu

IRFA: İnvaziv Radyofrekans Ablasyon

MAGNETİT: Manyetit (süpreparamanyetik demir oksit)

MCF-7: Meme Kanseri Hücre Hattı (Michigan Cancer Foundation – 7)

MFH: Magnetic Fluid Hyperthermia

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

NIRFA: Non-invaziv Radyofrekans Ablasyon

NR: Nanorod

NP: Nanopartikül

OCT: Optical Coherence Tomography

PDT: Fotodinamik Tedavisi

PTT: Fototermal Tedavisi

PPTT: Plasmonik Fototermal Tedavisi

RF: Radyofrekans ($3 \text{ kHz} < f < 300 \text{ GHz}$)

RFA: Radyofrekans Ablasyon

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SPIONs: Süperparamanyeitt Demir Oksit Nanopartiküller

SPR: Yüzey Plasmon Rezonans

SAR: Özgül Soğurma Oranı

TEM: Transmisyon Elektronik Mikroskop

TK: Telekomünikasyon Kurumu

TMAOH: Tetrametil amonyum hidroksit

UV: Mor Ötesi Dalgaları

VCM: Vibrating Sample Magnetometer

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanserin tanı ve tedavisinde büyük ilerlemeler katledilmesine rağmen insanoğlunun en öldürücü ikinci hastalığı olarak hükmünü sürdürmektedir (Weir, Thun et al. 2003). Kanser tedavisinde “cerrahi eksizyon”, “kemoterapi” ve “radyoterapi” ya da bunların birlikte kullanıldığı tedavi protokolleri mevcut olmakla beraber, bu yöntemlerin hemen hemen hepsinin önemli yan etkileri bulunmaktadır.

Nanoteknoloji ve ürünü olan nanopartiküller günümüz dünyasında yadsınamayacak öneme sahiptirler. Hayatın pek çok alanında tanıklık ettiğimiz bu nano cisimler sağlık bilimlerinde de oldukça yaygın bir kullanıma erişmeye başlamıştır. Özellikle tanı ve tedavi amacıyla kullanıldıkları gibi ve yeni uygulamalara da ilgi hızla artmaktadır (Chatterjee, Haik et al. 2003; Ferrari 2005). Bununla birlikte altın nanopartikülleri de biyomekal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Dreaden, Alkilany et al. 2011).

Son yıllarda hipertermi metodu kanser tedavisinde umut vaat eden yöntemlerin başında gelmektedir. Diğer tedavi yöntemlerinde sıklıkla görülen yan etkiler özellikle non-invaziv hipertermi tedavisinde daha az olduğundan bu alana olan ilgi gün geçtikçe giderek artmaktadır. Non-invaziv hipertermi ile kanserli dokular vücut ısısından daha yüksek sıcaklıkta ısıtılarak seçici bir şekilde anormal hücrelerin yok edilmesi sağlanmaktadır.

Manyetit ve altın nanopartiküller transdüser özelliğinde davranıp, 350-400 kHz elektromanyetik enerjiyi absorblayarak ısıya dönüştürmektedir (Lu, Yao et al. 2006). Radyofrekansı (RF) kullanılarak bu nanopartiküllerin titreşimi ile ısı ortaya çıkarması yöntemi özellikle kanser tedavisinde son yıllarda göze çarpmaktadır.

Non-invaziv hipertermi tedavisinde termal etkiyi yaratmak için kullanılan güç kaynaklarında biri ise RF güç kaynaklarıdır. Bu yöntemde değişik güç ve frekansta, yüksek güç üretebilme özelliği olan RF jeneratörleri kullanılmaktadır. Manyetit ve altın nanopartiküller bu yöntemde “Özgül Soğurma Oranı (Specific Absorption Ratio-SAR)” mekanizması ile uyarılmaktadır. Böylelikle RF dalgalarının enerjisi enerji absorbanı

ve titreşim neticesiyle ısıya dönüşmektedir. Böylelikle hipertermi için gerekli ortam sağlanmaktadır yani kanserli dokularda ortam ısı normalin çok daha yüksek seviyesine çıkmakta ve tedavinin daha etkin olması sağlanmaktadır (Kanzius, Steinbrink et al. 2009).

Sunulan tez çalışmasında kanser tedavisinde kullanılan hipertermi yöntemi araştırılmıştır. Budoğrultu'da, radyofrekans dalgaların etkisiyle , nanopartikül çözeltilerinin sıcaklık değerlerindeki artışlar gözlenmiştir. Elde edilen hipertermik sıcaklık artışı SAR mekanizmasından faydalanmaktadır. İn-vitro çalışmalarında, L929 (Fibroblast) ve MCF-7 (meme kanseri) hücre hatlarını kullanarak hipertermik sıcaklık artışı sonucunda hücre canlılığı, apoptotik ve nekrotik hücre ölümleri değerlendirilmiştir. Farklı RF güçlerinde ve nanopartikül çözelti yoğunluklarında elde edilen in-vitro sonuçlar elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir hastalık grubudur. Bütün gelişmelere karşın, kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra kanser, hala ölümlerin en sık ikinci nedenidir (Foye and Sengupta 1995). Kanser, kendini göstermesi, gelişimi ve sonuçları açısından bir hastadan diğerine çok değişken olan, karmaşık bir hastalıktır. Kanser, heterojenlik ve çeşitlilik hücresel ve moleküler düzeyde kendini gösterir. Yaşla birlikte, tanısının yapılması riskli olduğundan, çoğu zaman kanser orta yaşlı veya yaşlı erişkinlerde görülür (Siegel, Naishadham et al. 2012).

2.1.1. Kanserin biyolojisi

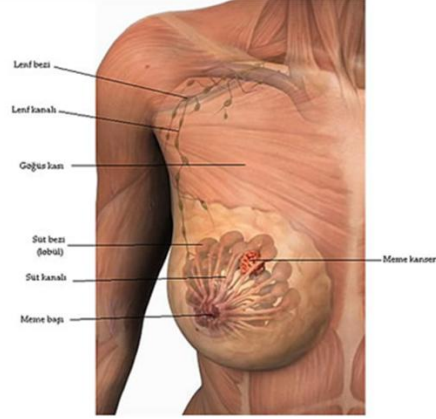
Kanserin moleküler temelinde DNA dizilimindeki mutasyon adı verilen değişikliklerin hücre çoğalmasını kontrolsüz ve düzensiz yapması yatmaktadır (Herceg and Hainaut 2007). Çoğu zaman bu değişiklikler tek bir baz çifti değişikliği olabilmekle beraber kimi zaman da genetik bilgiyi taşıyan bu moleküllerin yapısında uzun segmentleri içeren büyük değişiklikler olabilir. Yapılan bu basit değişiklik kodonun kontrol ettiği bir protein molekülünün yapı taşlarının değişmesine veya değişik yapı taşlarının bir birleriyle üç boyutlu ilişkilerinin farklılaşmasına neden olmaktadır. Hasıl olan söz konusu proteinin aktivitesi bu değişiklik sonucunda dramatik bir biçimde değişebilir. Normal halde de insan vücudundaki milyarlar hücreden kimileri genetik değişim göstermektedirler fakat vücuttaki kontrol mekanizmaları böyle değişikliğe uğramış hücreleri bularak yokderek kanser hücre lineajını kesintiye uğratır. Kanserin başlayabilmesi için aşağıdaki üç kontrol mekanizmasından biri veya birden fazlası çalışmıyor olması gerekmektedir. Birincisi, hücrelerin ancak doğru sinyali aldıklarında bölünmeleridir. Bu kuralı ihlal etmek için, hücre, bir hormon ya da büyüme faktörü ile uyandırıldığında normal olarak

aktif hale geçen devreleri açarak hücre bölünmesini kalıcı olarak aktif hale getirmelidir. İkinci kural, hücrelerin DNA replikasyonu için gergin ya da yanlış koşullarla karşılaştığında, genlerin hasar görebileceği koşullarda DNA replikasyonu başlatmak yerine, kendi kendini imha etme programlarını aktif hale getirmeleridir. Üç numaralı kural, normal hücrelerin sadece sınırlı belli sayıda bölünmeleri kuralıdır. Tümör gelişimi bir dizi moleküler ve morfolojik değişiklikleri içerir. Hanahan ve Weinberg hücre fizyolojisindeki değişiklikleri 5 grupta özetlemiştir (Hanahan and Weinberg 2000).

- Büyümede kendi kendine yeterlilik
- Büyüme inhibisyonuna duyarsızlık
- Programlı hücre ölümünden kurtulma
- Sınırsız replikatif potansiyel
- Devam eden anjiogenez

2.1.2. Meme kanseri:

Şekil 1 ve Şekil 2' de ifade edildiği üzere, meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %25-%30` unu oluşturmaktadır. Kansere bağlı mortalitenin %18' ini oluşturarak akciğer kanserlerinden sonra ikinci sırada yer alır (Parkin, Bray et al. 2001). Meme kanseri 30 yaşından önce nadirdir. Bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir tırmanış gösterir. Bu artış menapoz sonrasında da yavaş eğimle yükselmeye devam eder (Hoover 1996). Meme kanseri gelişiminde çeşitli faktörlerin olduğu belirlenmiştir. Yüksek global insidansa karşılık meme kanser mortalitesindeki azalma özellikle sanayileşmiş ülkelerde dikkat çekicidir (Jemal, Siegel et al. 2008; Jemal, Siegel et al. 2009).



Şekil 1 Meme kanseri



Şekil 2 (A) Normal meme hücresi (B) İnvaziv meme kanser hücresi (C) Non-İnvaziv meme kanseri hücresi

2.1.3. Kanserin tedavi yöntemleri

Günümüzde tümörel hastalıklara yönelik tanı ve tedavi uygulamaları oldukça yoğun ilgi çekmektedir (Jemal, Siegel et al. 2008; Siegel, Ward et al. 2011). Kansere tedavisinde standart yöntemlerinden sayılan “cerrahi eksizyon”, “kemoterapi” ve “radyoterapi” ya da bunların birlikte kullanıldığı tedavi protokolleri söz konusudur. Bu yöntemlerin hemen hemen hepsinin önemli yan etkileri vardır

2.1.3.1. İnvaziv yöntemler

Genelde medikal tedavi yöntemlerinin içinde ve özellikle bahsi geçen kanser tedavisinde, vücut bariyerlerini (Cilt, Mukoza, Konjonktiva, Kornea) aşan tedavilere invaziv yöntemler denilir.

2.1.3.2. Non-invaziv yöntemeler

Kanser tedavisindeki uygulamalarında vücut bariyerlerinin (Cilt, Mukoza, Konjonktiva, Kornea) aşılmadığı durumlar ise non-invaziv yöntemi olarak adlandırılır. Bu yöntemlerin en yaygın olanları kemoterapi, gen tedavisi, odaklanmış dalgalar ile hipertermi yöntemleridir.

2.1.4. Kanserın standart tedavi yöntemleri

- Cerrahi
- Kemoterapi
- Rayoterapi

2.1.5. Kanserın özel tedavi yöntemleri

- Hipertermi
- İmmünoterapi
- Gen tedavi

2.1.6. Kanser tedavisinde kullanılan standart yöntemlerin yan etkileri

2.1.6.1. Cerrahi

Tümörlerin tedavisinde cerrahi her ne kadar standart ve genel yöntem olarak bilinse de, bu yöntemin kendine has yan etkileri bulunmaktadır. Söz edilen dezavantajların bazıları şöyledir:

- Cerrahi sırasında anestezi ve neticede ölüm riski
- Cerrahi sonrası uzun bakım süresi
- Kanser hücrelerinin başka dokulara yayılması ve bunun sonucunda tümörün tamamıyla yok olmaması (Day, Morton et al. 2009).

2.1.6.2. Kemoterapi

Kanser hastalıklarında, kemoterapi ilaçla tedavi demektir. Bu tedavi ile vücutta bulunan istenmeyen hücrelerin öldürülmesi planlanır. Kemoterapik ilaçlar bazen tek bazen birkaç ilacın bir arada olduğu kürler şeklinde uygulanır. Her hastanın kemoterapi protokolü diğerinden farklıdır ve hastaya özeldir. Bu ilaçlar, kan yoluyla etki edip ancak, zararlı hücreleri öldürürken normal hücrelere de zarar verip, yan etkilere yol açar. Sözü geçen ilaçlar, hızlı bölünen hücreleri daha çok etkiler örneğin saç, gastrointestinal sistemi, kemik iliği gibi sistemler. Ancak etkilenme kişiden kişiye farklılık gösterebilir.

Söz edilen yan etkilerin bazıları şöyledir (Selwood 2009);

Lezzet alterasyonu, anemi ve hematolojik sorunlar, Apeptit değişiklikleri, kanama problemleri, kabızlık, diyare ve bulantı, deri yan etkileri, Anoreksi/Kilo kaybı, saç dökülmesi, aşırı yorgunluk, bağışıklık sistemi sorunları ve viral enfeksiyonlar, hafıza değişiklikleri, ağız ve boğaz kuruması, aşırı ağrı, bulantı ve kusma gibi yan etkiler.

2.1.6.3. Radyoterapi

Radyasyon parçacık demetleri ve dalgalar yolu ile taşınan özel bir enerji tipidir. Radyoaktif kaynaklardan ya da özel cihazlardan (örneğin lineer hızlandırıcı) elde edilir. Eğer radyasyon yüksek dozlarda uygulanabilirse kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde de kullanılabilir. Tümöre ya da bedenin hastalıklı olduğu alana radyasyon verilmesi için özel araçlar gerekebilir. Bazı durumlarda cerrahiden önce tümörü küçültmek için radyasyonu kullanabilir. Cerrahi sonrası ise radyasyon tedavisi kalmış olabilecek kanser hücrelerinin gelişmesini durdurmak için kullanılabilir. Bazı durumlarda ve olanakları uygun ise cerrahi ile radyasyon tedavisini aynı anda kullanmak istenmektedir. Bu işleme intraoperatif radyoterapi denir. Bazı durumlarda da kanseri yok etmek için cerrahi yerine radyasyon ile birlikte antikanser ilaçlar kullanılabilir. Radyasyon tedavisi iki biçimde verilir; eksternal (beden dışından) ve internal (beden içi) uygulamalar. Bazı hastalara ikisi birden ardı sıra bir biçimde de uygulanabilir. Radyasyon tedavisinde kullanılan ısınlar birçok kaynaktan elde edilir. Radyoterapinin yan etkileri hastadan hastaya farklılıklar gösterir. Yan etkiler genellikle tedavi dozu ve tedavi edilen bölge ile ilgili olarak üç kategoriye sınıflandırılır (Meek 2000; Nieder, Milas et al. 2000).

- Akut yan etkiler

Kusma ve bulantı, epiteliyal yüzeylerin zarar görmesi, ağız ve boğaz kuruması, bağırsak rahatsızlıkları, ödem, kısırlık

- Geç görünen yan etkiler

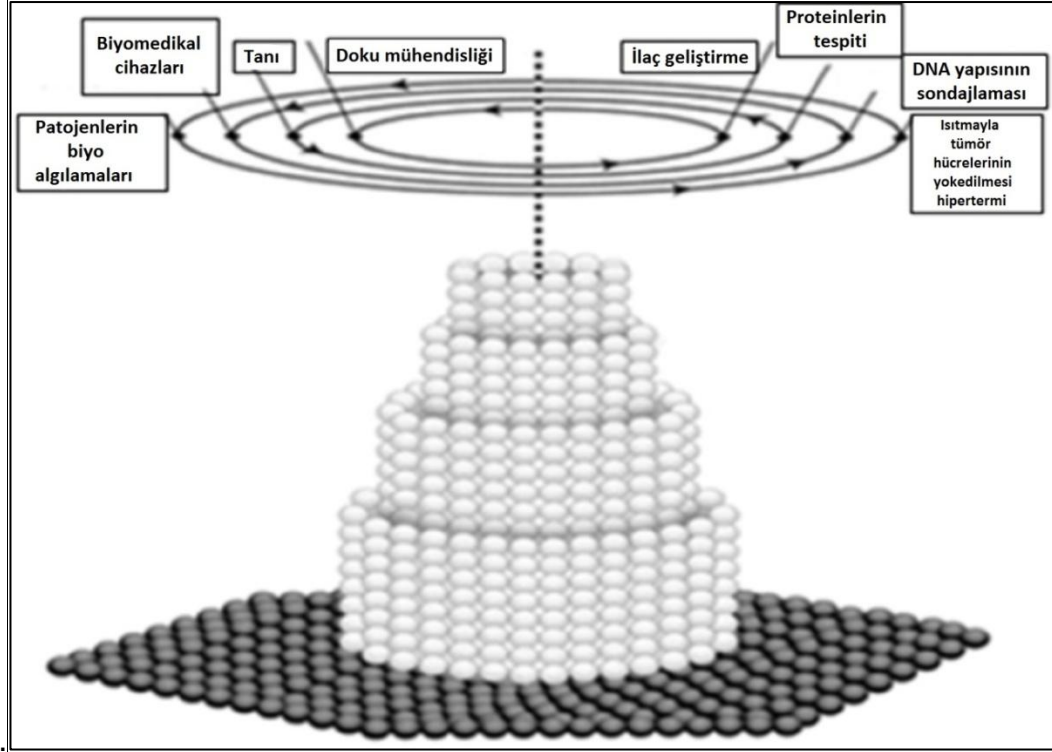
Fibroz, saç dökülmesi, tükürük ve gözyaşının kuruması, lenfödem, sekonder kanser, kalp hastalıkları, bilişsel gerileme, radyasyon proktitler.

- Kümülatif yan etkiler

Üreme üzere etkiler, solunum sistemi üzere etkiler, hipofiz sistemi üzere etkiler

2.2. Nanoteknoloji Alanı ve Biyomedikalde Uygulamaları

Her atomun yaklaşık 1 Angstrom (Å) ya da 10^{-10} metre boyutunda olduğu düşünülürse, bir nanometre boyutundaki bir yapı (nm) birkaç atomun bir araya gelmesi sonucu oluşan molekül ya da atom kümeleriyle elde edilebilir. Nanoteknoloji nano miktarlardaki malzemeler ve nano düzeyde olan cihazlarla çalışmayı gerektiren yeni bir bilim alanıdır. Bir nanometre yaklaşık bir kıl çapının 1/80,000 kadardır. Nanoteknoloji moleküler düzeyde bir maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerini yönetir (Ernest and Shetty 2005). Bilimsel araştırmalar, nanometre ölçeğinde olan malzemelerin kendi özelliklerinin boyutuna ve şekline bağlı halde olduğunu gösterir. Bu ölçekte, atomların çoğu hala yüzeyde bulunmakta olup bir tabaka ile yüzeyden kaldırılabilir. Proteinlerin çoğu yaklaşık, 10 nm boyutundadırlar (Eustis and El-Sayed 2006). Şekil 3'de anlatıldığı gibi nanoteknolojinin günümüzde bilimsel çalışmalarında büyük rol oynadığı alanlardan en önemlileri olarak fizik, kimya, tıp alanları sayılmaktadır. 21. yüzyılın en çok umut veren teknolojilerden ikisi biyoteknoloji ve nanoteknolojidir. Nanobiyoteknoloji, biyoteknoloji ve nanoteknoloji birliğidir. Bu melez disiplinde, amaç, taklit atomik ölçekli makineleri veya moleküler düzeyde biyolojik sistemleri bir araya getirmektir (Ernest and Shetty 2005). Bu teknolojinin yenilikler yaratması ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda önemli bir rol oynaması beklenmektedir. İlaç salınım ve gen terapisiyle birlikte aynı zamanda moleküler görüntüleme biyolojik ve biyosensörler bu uygulamalardan sayılmaktadır. Nanoteknolojinin biyomedikal alanında olan kullanım alanlarından kanser tedavisinde nanopatiküller Hedefe özgül ilaç tedavisi ve patolojilerin erken tanı yöntemleri, nanoteknoloji alanında öncelikli araştırma dallarından bir kısmı olarak tanınmaktadır (Ernest and Shetty 2005).



Şekil 3 Biyomedikal bilimler devrim nanoteknoloji şematik gösterimi

Nanoteknolojinin biyomedikal uygulama alanlarından bazıları şöyledir;

- Tanı
- İlaç ve gen salınım sistemleri
- Doku mühendisliği
- Sıcaklık artışıyla tümör yok etme yöntemi (Hipertermi)
- Biyosensörler
- Biyomoleküller ve hücrelerin ayırma ve saflaştırması
- Nanobiyomotörler
- Floresan biyolojik belirteçler

Nanoteknolojinin uygulama alanlarından sayılan Hipertermi bölüm 3'te ayrıntılı olarak incelenecektir.

2.2.1. Tek domainli partiküller

Partiküller domain adı verilen manyetik birimler içeren küçük bölgeler içerirler. Bir domain boyu yaklaşık 0.05 ile 0.5 μm arasında ve her bir maddenin kendine özgü özelliklerine bağlıdır. Ayrı domainler arası manyetik momentumunun dönme yönünü belirleyen birbirine komşu iki domain arasındaki sınır, domain duvarı olarak adlandırılır. Domain duvarı birkaç angstrom (Å) kalınlığındadır. Çizelge 1'de de görüldüğü gibi bir partikülün boyu küçüldükçe partikül başına düşen manyetik domainlerin sayısı bir domain duvarı oluşturmak için uygun olmayan limitlere kadar düşmektedir (Odabas 2006).

Çizelge 1 Küresel partiküllerin maksimum tek domain boyu

Materyaller	DC (nm)
Fe	14
Co	70
Ni	55
Fe_3O_4	128
$g\text{-Fe}_2\text{O}_3$	166

2.2.1.1. Süperparamanyetizma

Partikül boyu azaldıkça, bir partikülün içerdiği domain sayısı da azalır ve multi domainden tek domainli yapılara geçiş olur. Genel olarak multi domain partiküllerde domain duvarlarından manyetik momentlerin dönmesi kolaylıkla gerçekleştiğinden mıknatıslığı gidermek için gereken manyetik alan şiddeti tek domainlilere göre daha

küçüktür. Bu durum tek domainli partiküllerin manyetokristalin yapısı ve şekli anisotropisi ile ilişkilidir. Bu sebeple tek domainli parçacıklar genelde manyetik kayıt ortamlarında kullanılırlar. Bir partikül yeterince küçük olduğunda ise süperparamanyetik özellik sergiler ve manyetik momentleri termal değişimler ile hiçbir yönlendirme göstermez. Bu olgu, bireysel parçacıkların manyetik davranışına hakim olan sınırlı boyutundan ve yüzey etkilerinden süregelir (Batlle and Labarta 2002).

2.2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller ve özellikleri

Demir oksit nanopartiküller, kullanım alanlarına göre, “Manyetit”, “Magemit”, “Hematit” olarak sınıflandırılır. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPIONs) özellikle tek domainli 5-20 nm arasındaki olan biyoyumlu “Magemit” γ - Fe_2O_3 ve “Manyetit” Fe_3O_4 partikül adlandırılırlar. Bu manyetik nanopartiküller, homojen ferroakışkan süspansiyon olarak adlandırılan çözeltiler yapabilirler (Babincova, Babinec et al. 2001; Wang, Hussain et al. 2011). Nano boyutta olan partiküller, atom ve kütle boyutlarında, fiziksel ve kimyasal özellikleri farklıdır (Babes, Denizot et al. 1999). Manyetit nanopartiküller tek domainli olduklarına rağmen manyetik alanlarda çalışabilmeleri mümkündür (Goya, Berquo et al. 2003). Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin benzersiz biyoyumluluk, manyetik, fiziksel, kimyasal, termal ve mekaniksel mezoskopik özelliklerinden dolayı bu nanoparçacıklar biyomedikal uygulamalarda önem arz etmektedir (Reimer and Weissleder 1996; Häfeli, Schütt et al. 1997; Arbab, Bashaw et al. 2003; Pankhurst, Connolly et al. 2003). Manyetit nanopartiküllerin ilgi çekme nedenlerinden biri de, bu nanopartiküllerin kolaylıkla çeşitli sentez yöntemleriyle üretilibilmeleridir (Majewski and Thierry 2007).

2.2.2.1. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin fiziksel özellikleri, biyomedikal kullanım alanları ve etkiliyen mekanizmalar

Parçacıkların büyüklüklerine göre değişik kullanım alanları mevcuttur, örnek vermek gerekirse: 10-100 μ m aralığında hücre çalışmalarında, 20-450nm aralığında viyoloji çalışmalarında, 5-50nm aralığında olan proteinler çalışmalarında ve 2nm çapta ve 10-

100nm boyut aralıklarında olan gen çalışmalarında kullanılabilir. Manyetik nanopartiküllerin, "Coulomb" yasasına uyum sağlamaları ve manyetik alan tarafından etkileşimleri diğer bazı özelliklerinden sayılmaktadır. Bu özellikten dolayı tanı ve tedavide ilaç salınım sistemlerinde, manyetik görüntüleme (MRI) ve manyetik akışkanlar hipertermisi (MFH) (Phillips 2005) gibi farklı alanlarda kullanılabilir. Süperparamanyetik nanopartiküller vücudun belli bölgelerinde yoğunlaşarak yapılarına entgre edilmiş radyoaktif moleküller veya ilaç salınım paketlerini istenilen vücut bölgesine ulaştırabilirler. EM dalgaların adı geçen partiküller tarafında çevre dokulara nazaran daha yüksek oranda emilmeleri gerek partikülleri gerekse çevresindeki doku ısıtarak hipertermi tedavisinin temelini oluşturur. Sıcaklığını derecesine göre komşu doku hücrelerinde direkt ısı hasarı (heat burst) veya ısı şoku (heat shock) mekanizması vasıtasıyla hücre ölümü gerçekleşir. (Pankhurst, Connolly et al.2003).

- **İn-vitro uygulama alanları**

Demir oksit manyetik nanopartiküllerin biyomedikalde in-vitro uygulama alanları:

- Ayırm/seçme ve Manyeto relaxometri

- **İn-vivo uygulama alanları:**

- Tedavi amaçlı uygulama alanları

- Hipertermi
- İlaç hedefleme ve salınım sistemleri

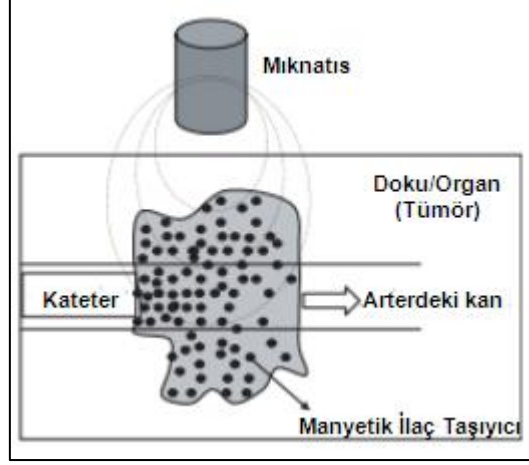
- **Hipertermi**

İnsan vücudu kendi normal sıcaklığını 37°C korur. Sağlıklı hücreler 42°C üstündeki sıcaklıklarda da yaşayabilirler. "National Cancer Institute" 'ne göre, kanser tedavi yöntemlerinden adı geçen hipertemide, kanser bölgesinin sıcaklığı 42-45°C'ye yükseldiği takdirde kanser hücreleri ölmeye başlarlar (Phillips 2005). Bu tedavi

yönteminde, tümör bölgesinin sıcaklığı 41-43°C uzun sürede de tutularak kanser hücrelerinin ölümü hedeflenmektedir (Jordan, Scholz et al. 1999; Ahlers, Kerner et al. 2003; Hergt, Hiergeist et al. 2004).

- **İlaç hedefleme ve salınım sistemi**

Araştırmalara göre, belli büyüklüğün altındaki manyetik nanopartiküller vasküler sistemlerin içinden geçerek vücudun tüm bölgelerine ulaşabilirler. Bu nanopartiküller manyetik alan uygulandığında, vücut içinde belli bir noktaya yoğun şekilde toplanabilirler. Manyetik nanopartiküller, vücuttaki hasta doku ve organlara ilaç ve antikor taşıma konusunda yoğun ilgi görmektedirler (Goodwin, Peterson et al. 1999). Şekil 4' de görüldüğü gibi İlaç salınım sistemlerindeki kullanılan manyetik nanopartiküllerin pozisyonu, nanopartiküller (kanda süspansyon şeklindeki) ile uygulanan manyetik alanın çekim gücü faktörüyle belirlenir. Uygulanan manyetik alanın gücü, kanın arterlerdeki lineer akış hızından (10 cms^{-1}) veya kapillerlerdeki lineer akış hızından (0.05 cms^{-1}) geçtiğinde, nanopartiküller hedef dokunun endotelial hücreleri tarafından tutulmaya başlarlar (Coroiu 1999).



Şekil 4 İlaç salınım sistemindeli olan ilaç taşıyan manyetik nanopartiküllerin fonksiyonu

- Teşhis amaçlı uygulama alanları
 - Nükleer manyetik rezonans görüntüleme ajanları (NMR)
 - Manyetik rezonans görüntüleme ajanları (MRI)
- **NMR**

Klinik tanı yöntemlerinde, NMR görüntüleme tekniğinin geliştirilmesi, manyeto ilaç denilen yeni bir ilaç jenerasyonunun yapılmasına yol açtı (Tartaj, del Puerto Morales et al. 2003). Bu ilaçların hastalara enjeksiyon nedenleri 1) normal veya hastalıklı dokular arasındaki görüntü kontrastını artırmak amaçlı 2) kan ya da organ fonksiyonlarındaki kan akımının durumunu göstermek (Coroiu 1999).

- **MRI**

MRI görüntülemeye iyi görüntü çekmek için bu ilaçlar kontrast ajanları olarak kullanılmaktadır.

Manyetik nanopartiküllerin diğer uygulama alanları:

- ✓ Ayırma işlemleri: Etiketli hücreler ya da diğer biyolojik malzemelerin manyetik ayırma işlemlerinde kullanılmaları, hücre-, DNA-, protein-, ayırma işlemleri, RNA işlemlerindeki kullanılmaları
- ✓ Ferroakışkanlarda viskozite ayarlama ajanı olarak
- ✓ Sensörler’de yüksek hassasiyet uygulamalarda
- ✓ “Self assembling” mekanizmalarında (Eustis and El-Sayed 2006).

Bunlar ve bunlara benzer örnekler, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPIONs) fiziksel özelliklerine bağlı çok sayıda biyomedikal süreçte kullanılabilirliğini göstermektedir.

2.2.3. Altın kaplı manyetit nanopartiküller ve biyomedikal uygulama alanları

Altın kaplı manyetit nanopartiküller (Au@SPIONs), çekirdek/kabuk yapıya sahipler. Bu nanopartiküllerin benzersiz optik, elektirik ve katalitik özellikleri taşıdıkları için önem arzeder (Majetich and Jin 1999). Sözü geçen nanopartiküller bariz manyetik özelliklerinden faydalanarak geniş alanda medikal teşhis yöntemlerinden sayılan manyetik rezonans görüntüleme (MRI), kontrollü ilaç salınım sistemlerinde, altın kaplı manyetit nanopartiküllere fonksiyonel grupları bağlamak için ve özgül biyolojik hedefleme ve ayırma işlemlerinde, katalitik ve optik uygulamalarda örneğin fototermal, fotodinamik ablasyonlarında, kanser tedavi yöntemlerinde hipertermide çok önem arzetmekte ve sıklıkla kullanılmaktadırlar (Melancon, Lu et al. 2009).

Altın kaplı nanopartiküller’de dielektrik çekirdek bir kabuk (genelde altın) ile kaplanmaktadır. Söz edilen nanopartiküllerin optik ve kimyasal özellikleri, çekirdek ve kabuğun bağıntılı ebadlarıyla değişmektedir, buna göre nanopartiküllerin rezonansa gelen bölgeler, yakın uv’dan orta kızılötesi kadar tayf aralığını kapsar. Altın nanopartiküllerin geniş rezonans spektrumu çoklu sayıda biyokimyasal maddeleri etkileyerek, optik etki göstermektedirler. Aynı zamanda bu nanopartiküllerin kabuk/çekirdek oranlarına ve nanopartikülün boyutu onların optik saçılma özelliklerini

etkiler, Altın kaplı nanopartiküller, optik saçılma özelliğine sahip oldukları için, optik uyumlu tomografi'de (OCT) ve yakın kızılötesi spektrasını (NIR) kullanarak, tümörlerin termal tedavisinde (hipertermi) kullanılmaktadır (Loo, Hirsch et al. 2004).

2.2.4. Altın nanopartiküller, fonksiyonel özellikleri ve etkileyen mekanizmalar

Altın ilk kere 5000 yıl önce Bugaristanda bulunmuştur. Bulgulara göre Mısırlılar altını terapatik uygulamalarda kullanıldığı ve hastalıkların tedavisinde tavsiye edildiği tespit edilmiştir. 1857 yılında, Faraday ilk kere altın nanopartiküller ile ilgili bir bilimsel araştırma raporu açıklamıştır. Altın nanopartiküller (AuNPs) genelde 1-120 nm aralığında bulunur (Boisselier and Astruc 2009). 1951 yılında bilim adamı Turkevitch tarafından sunulan yöntemde altının Au^{3+} formu sodyum sitrat ile indirgenmiştir ve Au atomlarına sentezi, hala altın nanopartiküllerin sentezinde öncül yöntemlerden sayılmaktadır (Turkevich, Stevenson et al. 1951). Altın nanopartikülleri çok sayıda maddeler ile stabil kalma özelliğine sahiptir. Bu maddeler arasında ligandlar, sürfektanlar (yüzey aktif maddeler), polimerler, dendrimerler ve biyomoleküller sayılabilir (Daniel and Astruc 2004). Son yıllarda, koloidal altın nanopartiküllere olan ilgi artmıştır. Bunun nedeni, adı geçen partiküllerin kolaylıkla istenilen şekil ve boyutta üretilebilmeleridir. Ayrıca altın'ın biyolojik sistemler ile uyum sağlaması, bu ilginin başlıca nedenlerindedir. Öte yandan altın partiküller nerdeyse bağlanan hiçbir molekülün kimyasal özelliklerini değiştirmemekte olup, ideal adresli taşıma sistemlerinde kullanılmaktadır (Olorundare, Simmons et al. 1992; Albrecht and Beesley 1993). Altın nanopartiküller yüzey plasmon rezonans prensibinden yola çıkarak yüzeyel lezyonlarda, optik enerjiyi absorbe ederek termal ablasyonlara neden olmaktadır. Aynı etki elektromanyetik spektrumun yakın kızılötesi (NIR) spektrumunda da ortaya çıkmaktadır (Gobin, Lee et al. 2007). Yapılan son çalışmalar, altın nanopartiküller, kısa dalga boylarındaki RF dalgalarına maruz kaldıklarında sıcaklık artışıyla birlikte kanserli hücreleri öldürebilmesinde başarıyla kullanılabilirliğini göstermiştir (Curley, Cherukuri et al. 2008; Gannon, Patra et al. 2008).

2.2.5. Altın nanopartiküllerin biyomedikalde uygulama alanları

Altın nanopartiküller, çok sayıda fonksiyonel gruplara bağlanarak hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Altın nanopartiküller ilaç salım ve gen tedavi yöntemlerinde nontoksik taşıyıcı oldukları için uygulanabilmektedir. Hipertermik sitotoksik ve odaklandırılmış radyasyona bağlı hücre ölümü, altın nanopartiküllerin bağlandığı tümör hücrelerinin yok olmasına sebep olduğunda, bu nanopartiküllerin fototermal tedavi ve radyoterapide hücre hassasiyetlendirici olarak kullanılabildiğini göstermektedir (F Jiao, Y Zhou et al. 2011). Proteinler ve onun altyapıları, nükleik asitler ve küçük moleküllü ilaçlar, altın nanopartiküllere bağlanarak altın nanopartikül bazlı nano ilaçlar oluşturabilmektedir (Ghosh, Han et al. 2008). Özellikle peptid ve protein moleküllerine bağlanma, altın ile sülfür molekülleri arasındaki kovalent bağ sonucunda oluşur (Chanda, Kattumuri et al. 2010). Başka bir deyişle, biyolojik sistemlerde altın nanopartiküllerin geniş kullanım alanı bulması, bu nanopartiküllerin yüksek duyarlılık faktörün sonucudur. Nanopartiküllerin fonksiyonel gruplara bağlanması çeşitli hücre tiplerin hedefleme alanlarında, biyogörüntüleme, gen tedavisinde ve kanser tedavisinde adı geçen hipertermi gibi farklı uygulama yöntemleri (PTT, PPTT, RF Hipertermi) mevcuttur (Tiwari, Vig et al. 2011).

2.2.6. Altın nanorodlar ve sentez metodları, fiziksel özellikleri ve biyomedikal uygulama alanları

Rod şeklinde olan altın nanopartikülleri anizotropik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler. Altın nanorodların absorpsiyon profilleri, iki absorpsiyon bantını kapsamaktadır: birincisi kısa eksen yönündeki olan ışık absorpsiyonu (Enine) ikincisi uzun eksen yönündeki olan ışık absorpsiyonu (Boylamsal). Nanorodların uzunluğu arttıkça plasmon frekans pozisyonu değişebilir ve ekstinksiyon katsayısı bir artış ile birlikte uzunlamasına kırmızı banta doğru kayabilir. Altın nanorodlar çeşitli yöntemlerle sentezlenebilmektedir. Bu sentez yöntemlerinden biri, iki aşamalı öncül çözeltisindeki altın çekirdeğin oluşma mekanizması ve büyüme çözeltisinin ilerleme yöntemidir. Elektrokimyasal metotlar da altın nanorodların diğer bir sentez yöntemleri arasındadır.

Bu yöntemde altın nanorodların büyümesi elektrolitik çözelti içinde ve iki elektrodun arasındaki olan 3(mili Amper) ortamda gerçekleşir. Diğer bir yöntemde ise nanorodlar fotokimyasal olarak altın tuzu çözeltisinde UV ışığı altında sentezlenir.

Altın nanopartiküller biyomedikal çalışmalarda hastalıkların tanı ve tedavisinde geniş alanda kullanılmaktadırlar. Altın nanorodlar biyoyumlu oldukları için, tanıyıcı (Antibadiler, Proteinler vb.) moleküllere bağlanarak hastalıkların tanı ve tedavisinde ilaç taşıyıcı ajanları olarak kullanılmaktadırlar. Bu nanopartiküller ilaç salınım sistemlerinde de uygulanmaktadır. Nanorodlar en/boy oranı (Aspect Ratio) özelliğinden faydalanarak kanser tedavisindeki fototermal tedavide (PTT), fotodinamik ablasyon metodunda ve modern yöntemlerden sayılan hipertermide kullanılmaktadırlar (Stone, Jackson et al. 2011).

2.2.7. Sentezlenen nanoparçacıkların (SPIONs, Au@SPIONs, AuNPs, AuNRs) karakterizasyonu

Sentezlenen manyetit, altın kaplı manyetit nanopartiküllerin, altın nanopartiküllerin ve altın nanorodların boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihazın ölçüm yöntemi Dinamik Işık Saçılması (DLS) mekanizmasıdır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir.

2.3. Elektromanyetik Spektrumu

Elektromanyetik teyfi, ışımının dalga teorisine göre, uzayda ya da maddesel bir ortamda yayılan bir elektrik ve manyetik alanın birlikte oluşturduğu kabul edilen dalgalara verilen addır. Gözlerimizin gördüğü ışık, elektromanyetik dalganın gerçek bir parçasıdır. Renklerin her biri gerçekten ışığın farklı dalgaboylarına karşılık gelmektedir. Elektromanyetik dalgalar, sadece dalgaboylarına göre değil, aynı zamanda frekans ve enerjilerine göre de tanımlanmaktadır. Bu üç nicelik aşağıda verilen matematiksel ifadelerle birbirlerine bağlıdır.

$$E=hf=ch/\lambda$$

Bu denklemde, E dalganın enerjisi, h Plank katsayısı (6.626×10^{-34} js), f daldanın frekansı, c ışık hızı ve λ dalganın boyudur. Bir elektromanyetik spektrumunun en uzun dalgaboyundan en kısa dalgaboyuna sırasıyla ifade edersek, radyo dalgaları, mikrodalga, kızılötesi, görünür bölge, morötesi, x-ışınları ve gamma-ışınları biçiminde sıralanmaktadır.

2.3.1. Radyofrekans

Radyofrekans (RF), elektromanyetik spektrumunun radyo dalgaları bölümünün içindeki, elektrik ve manyetik birimler içeren dalgalardır. Radyo frekans için frekans spektrumu kuramsal olarak sonsuz sayılabilir. Yani her frekansta RF sinyali olabilir, Ancak, uygulamada frekans yükseldikçe bu sinyalleri üretmek güçleşmekte, ayrıca gerek atmosfer ve gerekse kabloların sınırlayıcı etkileri sebebiyle bu spektrumun sadece bir bölümünden yararlanılmaktadır. Genellikle, antenden yayınlanan RF dalga olarak, kablodaki RF ise sinyal olarak nitelendirilir. Çizelge 2'de açıklanıldığı şekliyle, radyofrekans spektrumun, çeşitli dalga boylarındaki adlandırmaları ayrıntılı olarak gelmektedir (Sirav Aral 2008).

Çizelge 2 Radyo spektrumun farklı frekanslardaki dalgaları

Radyo spektrumu										
ELF	SLF	ULF	VLF	LF	MF	HF	VHF	UHF	SHF	EHF
3 Hz	30 Hz	300 Hz	3 kHz	30 kHz	300 kHz	3 MHz	30 MHz	300 MHz	3 GHz	30 GHz
30 Hz	300 Hz	3 kHz	30 kHz	300 kHz	3 MHz	30 MHz	300 MHz	3 GHz	30 GHz	300 GHz
Elektromanyetik spektrum										
← yüksek frekans uzun dalgaboyu →										
Gamma ışınları • Röntgen ışınları • Morötesi • Görünür ışık • Kızılötesi • Terahertz ışınımı • Mikrodalga • Radyo dalgaları										
Görünür ışık	Mor • Çivit mavisi • Mavi • Yeşil • Sarı • Turuncu • Kırmızı									
Mikrodalgalar	W bandı • V bandı • Q bandı • K _a bandı • K bandı • K _u bandı • X bandı • S bandı • C bandı • L bandı									
Radyo dalgaları	EHF • SHF • UHF • VHF • HF • MF • LF • VLF • ULF • SLF • ELF									
Dalgaboyu tipleri	Mikrodalga • Kısa dalga • Orta dalga • Uzun dalga									

RF hızı boşlukta ışık hızına eşittir, $C= 3 \times 10^8$ m/sn

Madde içinde ise hız, maddenin dielektrik özelliğine veya manyetik geçirgenliğine bağlı olarak biraz daha düşük olabilir.

$$v = c / (\mu_b \cdot \epsilon_b)^{1/2}$$

Bu denklemde v ışığın madde içindeki hızı, c ışık vakumdaki hızı (3×10^8 m/sn), ϵ_b ve μ_b bağıl dielektrik katsayısını ve manyetik geçirgenliği göstermektedir. Yayıncılıkta kullanılan kablolarda genellikle RF boşluktakinin %70-80'ne kadar bir hıza sahiptir. Kablo üreticileri bu faktörü veya dielektrik bağıl katsayısını verirler.

2.3.1.1. Radyofrekans dalgaların fiziksel özellikleri

Radyofrekans alanların frekansları çeşitli kaynaklara göre 3kHz – 300GHz aralığında değişmektedir (Wilson and Hawkes 1989; AG 1998; Ahlbom, Bergqvist et al. 1998; IEEE 1999). Bu frekans değerlerine karşılık gelen dalga boyları sırasıyla 100m ve 1 mm'dir. Elektromanyetik spektrumdaki her dalganın enerjisi vardır ve basit enerji formülü ile hesaplanabilir, buna göre elektromanyetik dalgaların enerjisi, gönderilen dalgalın frekansı ve "Plank sabitinin" çarpmasından edle edilmektedir (Wilson and Hawkes 1989).

300 GHz'in altında RF aralığındaki frekansların enerjileri biyolojik yapılarda iyonlaşmaya neden olan enerjiden (1 eV) çok düşük olduğundan RF radyasyon non-İyonize radyasyondur. Dalgalar ışık hızı ($c = 3 \times 10^8$ m/sn) ile hareket ederler. Frekansı f olan bir dalga için tam bir dalganın oluştuğu uzaklık dalga boyu (λ) olarak tanımlanır. Frekans ve dalga boyu arasındaki ilişki; $\lambda = c/f$ 'dir. Buradaki c ortamdaki ışık hızıdır. Yüksek miktarda su içeren biyolojik (Lin 1997) ortamda, ortamın yoğunluğundan (n) dolayı elektromanyetik dalganın dalga boyu havadaki dalga

boyuna göre uzar. Bu nedenle, dalga ışık hızıyla hareket edemeyince ($v=c/n$), frekansı da azalır (Matthes 1996).

2.3.2. Radyofrekans dalgalarına bağlı “Özgül Soğurma Oranı” (SAR) mekanizması

Tüm maddeler, Elektromanyetik Radyasyon (EMR) dalgalarını soğurma özelliğine sahiptir. Soğurma sırasında soğurulan dalganın enerjisi ısı enerjisine dönüşüp sıcaklık artışına neden olur. Kilogram başına Watt cinsinden ifade edilen ve sıcaklık artmasına neden olan bu dalga soğurulmasının oranı, Özgül Soğurma Oranı (SAR Specific Absorbtion Rate) katsayısı diye adlandırılır. Başka bir deyişle özgül soğurma oranı, radyofrekans'a maruz kalan biyolojik sistemlerde depolanan enerji miktarının ölçüsüdür. Deneysel olarak insan vücudunda 1 kg dokunun ısısını 1 derece arttıran enerji miktarı 4 watt olarak hesaplanmıştır. Bundan dolayı SAR değeri 4 watt/kg enerji yaratan RF dalgalarına biyolojik etki eşiği denmekle beraber sıcaklık ve özgül enerji soğurumu aşağıdaki gibi tanımlanmıştır.

$$dT = S_A / (c \times 4180)$$

Bu denklemde $dT(^{\circ}C)$ sıcaklık artışı, S_A özgül enerji soğurumu (j/kg), C dalganın geçen ortamının özgül ısı kapasitesi (insan için 0.85)'dir. (Joule = P x t, Watt. sn). Öte yandan SAR başka şekilde de hesaplanabilir. Bu denklemler aşağıda belirtilmiştir (Meltz 2003).

$$SAR = C \cdot dT/dt$$

$$SAR = \sigma E^2 / \rho \quad SAR = J^2 / \sigma \rho$$

Yukarıdaki denklemlerde, C dalga geçen ortamın özgül ısı kapasitesi, dt zaman aralığı, δ dalga geçen ortamın iletkenliği, ρ ortam yoğunluğu, E uygulanan dalganın şiddeti dir.

Biyolojik yapılarda elektromanyetik enerjinin soğurulmasını etkileyen önemli bir parametre de elektrik alan vektörünün uzaydaki konumudur. Elektromanyetik alanların polarizasyonu doğrusal (lineer), dairesel, elips şeklinde ya da gelişigüzel olabilir. Dalga lineer polarize ise elektrik alan vektörünün yapısı hareket boyunca değişmez (Matthes 1996). Alan ve dalga yapıları kaynaktan uzaklığa ve ortamdaki objelere bağlıdır. Bazı objelerin dielektrik özelliklerine bağlı olarak elektromanyetik dalgalar yansiyabilir, kırılabilir, saçılabilir ya da soğurulabilir. Yansıyan ya da saçılan dalgalar bölgesel alan şiddetini artırabilir. Kaynaktan uzaklaştıkça RF alanlar “düzlem dalga – plane wave” olarak tanımlanır ve bu dalgalarda şu özellikler görülür (Sante 1999; Odabas 2006; Sirav Aral 2008).

2.3.3. Radyofrekans dalgaların biyolojik sistemlerine olan etkileri

RF dalgaları canlı dokuların kimyasal, yapısal, metabolik ve fizyolojik mekanizmalarını etkileyebilir. Hücre bileşenlerinin tümü bu etkilere açıktır. Bu etkileme morfolojik değişikliklere sebep olabilir. Aynı zamanda hücresel yapıları bileşenler, organel ya da canlı biyolojik ajanlar bu dalgalara maruz kaldıkları için bu dalgalardan etkilenebilirler. Araştırmalara göre, RF dalgalarının frekansı, modülü ve etkileme süresi farklı sonuçlara yol açmaktadır. Biyolojik sistemler, RF dalgalarına maruz kaldıkları takdirde DNA zincirlerinin kırılması ve kardeş kromatid değişimi gibi DNA tamir ve sentezini etkilemez, fenotipik mutasyon gibi genetik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olmaz. Öte yandan, hücre transformasyonu sırasında karsinogen madde veya tümör promotör gibi mekanizmaların da etkisiyle prekanseröz patoloji gelişimine katkıda bulunabilirler (Meltz 2003).

2.3.4. Radyofrekans dalgaların bileşenleri ve fiziksel parametreleri

Radyofrekans dalga göndericileri modülasyonu (indüktif, kapasitif ve anten), dalga frekansı, polarizasyonu (lineer, eliptik ve dairesel polarizasyon), güç şiddeti, yapısı, uygulama mesafesi, homojenliği vs gibi parametrelere göre sınıflandırılabilir.

Tüm biyolojik yapıların maksimum radyasyon soğurulmasının yaşandığı bir frekans vardır. Bu frekans rezonans frekansı olarak adlandırılır (Polk and Postow 1996). Rezonans frekansı canlının boyutlarına ve radyofrekans alanın E (elektrik), H (manyetik) ve K (yayılm) polarizasyonuna göre değişir. E, H ve K polarizasyonları sayılmaktadır.

2.3.5. İyonize ve non-iyonize dalgalar

Elektromanyetik dalgalar, biyolojik etkileri açısından iyonlaştırma özelliklerine göre İyonize ve non-İyonize dalgaları olarak sınıflandırılmaktadır. İyonize dalgalar elektron koparabilecek kadar yüksek enerjili dalgalardır. İyonize dalgalar, kimyasal reaksiyonlara neden olup, karsinojenik (kanser yapıcı) olarak tanımlanır. Elektromanyetik dalgalara maruz kalan atomların yörüngelerinde hareket etmekte olan elektronların kopmasıyla iyon oluşur. Tipik moleküllerin iyonlaşması için 2×10^5 fotonun soğurulması gereklidir, bunun içinse 1 eV'luk enerjiye ihtiyaç vardır (Lin and Michaelson 1987). 10 eV olarak geçen iyonlaştırma limiti 1 eV olarak yerini almıştır (Challis 2005). Bir eV'dan düşük enerjilere sahip fotonlar non-İyonize (iyonlaştırmayan) olarak tanımlanır. Düşük frekans, RF, mikrodalga, kızılötesi dalgalar, elektromanyetik tayfının bir bölümüdür, Tera Hertz dalgalar non-iyonizan radyasyon olarak tanımlanır. İyonize radyasyonla non-iyonize radyasyon arasında iyonlaştırmaya neden olup olmamaları farkı yanında önemli farklardan bir diğeri de, iyonize radyasyonun kümülatif etkisinin olmasıdır, yani değişik şiddetlerde veya sürelerde uygulanan iyonize radyasyon biyolojik yapıda birikerek sonuçlanan etkiler gösterir. Mikrodalga, RF ve daha düşük frekanslı elektromanyetik dalgaların kümülatif (biriken) etkisinin olduğuna dair bilimsel bir kanıt henüz yoktur (Lin and Michaelson 1987).

2.3.6. Radyo frekans dalgaların biyomedikal alanlarda kullanımı

Sözü geçen radyofrekans dalgaları eşliğinde in-vivo uygulamaların birçoğunda ilgilenilen alan dalgalar ile medyum arasındaki enerji absorpsiyon oranının

ölçülmüştür (vücut/doku). Metal nanopartiküllerin termal dönüşüm özelliğini sayesinde, RF dalgaları, enerji kaynağı olarak hipertermi mekanizmasında benzersiz bir avantaj sunmaktadır. Radyofrekans dalgaları, optik dalgalarıyla karşılaştırıldığında, RF dalgalarının vücut içine nüfuz miktarının yüksek olduğu gözardı edilmemelidir. Örneğin RF'in, 13.56MHz'lik frekansta olan dalgalarının, 20-200cm penetrasyon gücü olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda RF dalgalarının, lazer dalgalarıyla karşılaştırıldığında yüksek transparenstesi bu dalgaların avantajlarından sayılmaktadır. Buna göre daha biyo güvenli olarak sunulmaktadır (Johnson and Guy 1972). Radyofrekans dalgaları ile birlikte nanopartiküllerin koloidal çözeltilerin kullanımı dolayısıyla kanser RF ablasyonu için, lokal hapsedilmiş partiküller aracılığı ile ısı oluşturulması şeklinde bir tedavi metodu olarak dikkat çekmektedir (Cardinal, Klune et al. 2008; Curley, Cherukuri et al. 2008; Gannon, Patra et al. 2008; Moran, Wainerdi et al. 2009). Bu dalgalar dokuda düşük özgül soğurma oranı (SAR) mekanizması eşliğinde, vücudun tüm bölgelerinde iyice nüfuz edebilmektedir. Bildirilen çalışmalara göre, radyofrekans ortamında, bu dalgalara saatlerce maruz kalan hastalarda hiçbir zararlı etki gözlenmediğinden, RF dalgaların biyomedikal uygulamalar için güvenli oldukları kabul edilmiştir (Adair, Kelleher et al. 1998; Erdreich and Klauenberg 2001). Bu dalgaların mükemmel güvenlik profilleri yüzünden, tanısal görüntüleme ve hipertermide RF ablasyon tedavi deri dahil olmak üzere tıpta kullanılmaktadır.

2.3.7. Radyo frekans ablasyonu

10-900MHz arasındaki frekans dalgaları günümüzde medikal amaçlar için, örneğin, elektrokoter şeklinde kullanılır. Radyofrekans ablasyon (RFA) etkisinden dolayı, dokunun içine uygulanan alternatif akım nedeniyle iyonların çalkalanması ve sürtünmesi sonucunda termal hasar ortaya çıkmaktadır (Goodman and Geller 2005). 1990'lerde, iki araştırma grubu, RFA tekniğini, nöroşürurji ve karaciğer tümörlerinin yok edilmesinde etkin bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir (McGahan, Browning et al. 1990; Rossi, Fornari et al. 1990). İn-vivo çalışmalarında, sözü geçen RFA karaciğer tümörlerinin tedavisinde çok güvenli ve verimli yöntemlerden

sayılmaktadır. RFA tekniğın dezavantajlarından, invaziv olması, tümör sınırlarının belirli olmaması, operatöre bağılı komplikasyonları ve tümör olmayan karaciğer parankimi ve diğeri organlara zarar vermeleri sayılmaktadır (Nahum Goldberg, Scott Gazelle et al. 1995; Curley, Izzo et al. 1999; Siperstein, Garland et al. 2000; Solbiati, Livraghi et al. 2001).

2.3.7.1. İnvaziv radyofrekans ablasyonu

İnvaziv Radyofrekans Ablasyon (IRFA) günümüzde, pratik klinik yöntemlerinden sayılarak, bazı habis tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde radyofrekans oluşturan uç, vücut bariyerlerini (Cilt, Mukoza, Konjonktiva, Kornea) aşarak, tedavi edilecek bölgeye yerleştirilerek istediğimiz bölgeyi etkiler. Birçok tümoral hastalıkta kullanılabilmesine rağmen, invaziv yaklaşım olduğu için, kullanımı kısıtlıdır. İnvaziv yöntemin dezavantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- 1) Kanseri tedavi vakalarında, tümör içine direkt iğne elektrodun eşliğinde yapılarak invaziv yöntemlerin dezavantajlarından sayılıp kısıtlı kullanılır.
- 2) Kanseri tedavisinde kullanılan bu yöntem, sadece 4-5 cm' den büyük çaptaki tümörlerde uygulanmaktadır (kütle şeklindeki olan kanserlerde).
- 3) Bu yöntem tedavi sırasında, iğne elektrodu eşliğinde, habis ve normal hücreleri birbirinden ayırt etme kabiliyetine sahip değildir.
- 4) Tedavi esnasında hastaların %10' dan fazlasında normal hücrelerde termal hasar komplikasyon ihtimali vardır.
- 5) İnvaziv radyofrekans ablasyon, sadece belli tümörlerin tedavisinde sınırlı kullanılmaktadır (örneğin karaciğer, böbrek, meme, akciğer ve kemik kanserinde). (Bilchik, Wood et al. 2000; Bleicher, Allegra et al. 2003; Curley, Marra et al. 2004; Gannon and Curley 2005; Haemmerich and Laeseke 2005; Raut, Izzo et al. 2005).

2.3.7.2. Noninvaziv radyofrekans ablasyonu (NIRFA)

Radyofrekansın kısa dalga boyları (MHz alanında), vücut bariyerlerine zarar vermeden, derin dokulara nüfuz etme potansiyeline sahiptir. Yüksek güçlü noninvaziv RF, nanopartikül “ısı oluşturma ajanları olarak” kullanmadan tümör bölgesinde hasara neden alabilirler. Bundan dolayı, daha düşük güçlü radyofrekans dalgaları, metal nanopartiküller ile birlikte kanser tedavilerinde hipertermi oluşturarak kullanılmaktadırlar (Curley, Cherukuri et al. 2008).

2.3.8. Elektromanyetik tayfındaki olan dalgaların penetrasyon özellikleri

Elektromanyetik dalgaların enerjisi bu dalgaların frekanslarına bağlıdır. Elektromanyetik dalgalar bir objeye gönderildiği zaman ya objeden geçebilir, ya objenin yüzeyinden yansır ya da objenin içine nüfuz ederek söz edilen dalganın enerjisinin bir bölümü objede absorbe edilir. Biyomedikal alanlarında terapötik modalitelerin kullanması vücut dokularının simülasyonu içindir. Sözü geçen simülasyonlar sadece gönderilen enerjini vücutta absorbe olması durumunda geçerlidir. Arndt-Schultz yasasına göre, gönderilen enerjinin vücuttaki olan dokularda herhangi bir reaksiyon veya etki göstermesi, sadece absorbe olan enerjinin yeterli miktarda olması halinde gerçekleşmektedir. Aksi takdirde etki göstermeyebilir. Dokunun enerji absorpsiyonunun ve derin tabakalara penetrasyon değeri ters oran Grattus-Draper yasasına bağlıdır. Elektromanyetik enerjinin yansımaya bölümü dokuya (cilt tabakasına) penetre olur ve sadece bu enerjinin küçük bir bölümü süperfasyel dokular tarafından absorbe olur. Radyasyonun bir büyük parçası süperfasyel dokuları tarafından absorbe olduğu zaman, diğer derin dokuların tahrik edilmesi için yeterli miktarda enerji kalmayabilir (Griffin, Karselis et al. 1988; Gasos and Stavroulakis 2003).

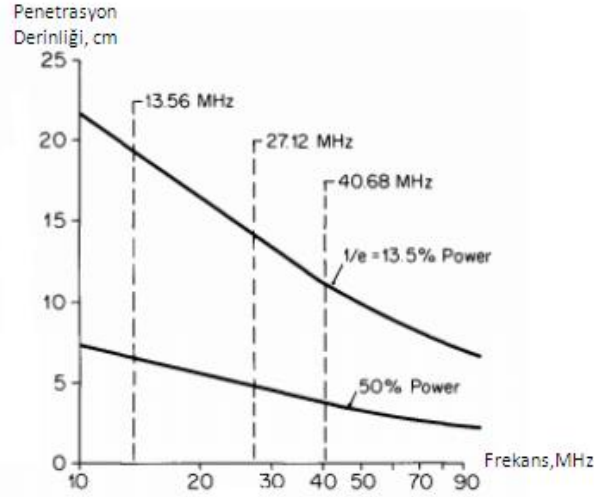
Diyatermiye kullanılan (13.56, 27.12 ve 433.9MHz) frekansda olan RF dalgaların penetrasyon mesafesi 30cm, 915MHz ve 2450MHz frekansda olan mikrodalgaların

penetrasyon mesafesi 5cm ve 1014Hz morötesi dalgaların penetrasyonu 1mm dir (Prentice and Blake 2011).

Şekil 5’de belirtildiği gibi dalgaların penetrasyon özelliği, frekans artmasıyla azalır (Harrison, Storm et al. 1985; Polk and Postow 1996). Elektromanyetik dalga dokuda enerjisini harcayarak ilerler ve dalga enerjisi doku içinde e^{-2} faktörü ile azalmaktadır ($e= 2.718$). Doku içinde EM dalganın enerjisinin $1/e^2$ ’ye (7.38’de birine) düştüğü mesafe “girginlik” olarak tanımlanmıştır (Lin and Michaelson 1987). Farklı frekanslardaki RF radyasyonun farklı dokulara girginliği Çizelge 3’de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi frekans arttıkça RF dalganın dokuda ilerleyebilmesi, bir başka deyişle girginliği azalmakta ve aynı frekanstaki dalga farklı dokularda farklı girginliğe sahip olmaktadır.

Çizelge 3 RF dalganın frekansına göre dokulara penetrasyonu (cm) (Lin and Michaelson 1987; Polk and Postow 1996)

Frekans (MHz)	433	915	2450	5800	10000
Tuz Çözeltilisi	2.8	2.5	1.3	0.7	0.2
Kan	3.7	3.0	1.9	0.7	0.3
Kas (Cilt)	3.0	2.5	1.7	0.8	0.3
Akciğer	4.7	4.5	2.3	0.7	0.3
Yağ (Kemik)	16.3	12.8	7.9	4.7	2.5



Şekil 5 Biyomedikal amaçlı bazı frekansların kas dokusuna penetrasyon derinliğine yönelik grafik

RF dalgaların yağ dokusuna girginliği kas ve kan dokularından ~ 5 kat daha fazladır. Dolayısıyla yüksek su içeriği olan dokularda RF enerjisinin girginliği daha azdır (Polk and Postow 1996). Bazı dokuların farklı frekanslardaki dielektrik sabitleri ve iletkenlikleri belirlenmiştir. Karaciğer, akciğer, kemik, kan, yağ ve iskelet kasının frekansa göre dielektrik sabitlerinin ve iletkenliklerinin nasıl değiştiği Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4 Dokuların dielektrik sabiti (ϵ_r) ve iletkenliklerinin (σ) Frekansa göre değişimi (ϵ_r / σ) (Polk and Postow 1996)

Frekans	İskelet Kası	Karaciğer	Akciğer	Kemik	Kan	Yağ
100 Hz	3.2x10 ⁵ /0.076	8.5x10 ⁵ /0.13	4.5x10 ⁵ /0.092	3800/0.0126	-/0.60	1.5x10 ⁵ /-
1 kHz	1.2x10 ⁵ /0.08	1.3x10 ⁵ /0.13	4.5x10 ⁵ /0.096	1000/0.0129	-/-	5x10 ⁵ /0.02-0.07
100 kHz	3x10 ⁵ /0.04	9760/0.15	8.5x10 ⁵ /-	280/0.0144	4000/0.55	-/-
10 MHz	170-190/0.86-0.87	338/0.47	-/-	37/0.0237	-/-	-/-
100 MHz	67-72/0.95-0.99	77/0.72	-/-	23/0.0574	-/1.0	4.5-7.5/0.02-0.07
1 GHz	57-59/1.38-1.45	46/0.98	-/-	8/0.05	58-62/1.4-1.6	4.3-7.5/0.03-0.08
10 GHz	40-42/8.3	38/5.8-6.7	-/-	50-52/0.5-1.7	3.5-4.0/9.1	-/0.3-0.4

2.4. Kanser Tedavisinde Tümör Ablasyonu ve Nanoteknoloji

Cerrahi rezeksiyonu yanında, tümör ablasyonu solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Tümör ablasyon yöntemleri termal tedaviler, fotodinamik tedaviler ve ajanlar üreten reaktif oksijen türleri içerir (ROS). Termal tedavi, termal enerji ile tümör hücre ölümüne sebep olur. Bu yöntemde, enerji kaynağı olarak radyofrekans, mikrodalga ve yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason dalgalarından yararlanılır. Fotodinamik tedavi ve ROS üreten ajanlar, tümör hücrelerinde yüksek seviyede oksidatif molekül oluşturarak apoptosis ve hücre ölümüne sebep olur. Adı geçen tedavi yöntemleri cerrahi rezeksiyonla beraber veya rezeksiyonun mümkün olmadığı durumlarda güvenli bir şekilde uygulanabilmektedir. Nanopartikül kullanarak daha önce işaret ettiğimiz enerji türleriyle ablasyonun şiddeti artırılabilir (Manthe, Foy et al. 2010).

2.4.1. Hipertermi

1800'lerin başında doktorlar ısı enerjisinden faydalanarak, kanseri tedavi ediyorlarmış. O dönemde, hipertermik tedavi, ateşli hastalıklar ve yüzeysel tümörlerin tedavisinde kullanılmaktaydı (Field and Bleehen 1979). Günümüzde, hipertermi kanser tedavisinde non-invaziv yaklaşımlardan sayılmaktadır. Bu yöntemde, biyolojik dokulardaki anormal hücreler normal sıcaklığın üstüne çıktıkları zaman yok olmaya başlarlar (Van der Zee 2002). Başka değişle, vücut ısısının, 41°C'ın üstüne çıktığı durumlara hipertermi denir. Hipertermi, kanser tedavi yöntemlerinin (cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi) dışında, modern kanser tedavi yöntemlerinden sayılmaktadır. Araştırmalara göre, sistemik hipertermi çok eskilerden adjuvan tedavilerde kullanılmıştır (Falk and Issels 2001; Wust, Hildebrandt et al. 2002; Rowe-Horwege 2006). Hiperterminin hem sistemik hemde hücresel tropatik etkilere sahip olduğu ispatlanmıştır. Bu yöntemde, bölgede sıcaklık artışı, $\Delta T=5^{\circ}\text{C}$ 'den daha fazla yükseldiğinde hücre ölümü, hücre zarını parçalanması veya proteinlerin denatüre olmaları ile gerçekleşir. Hipertermiye görünebilir ışık, lazer ışını (Waldow, Morrison et al. 1988; CastrónPersons, Schröder et al. 1991; Chen, Adams et al. 1997),

odaklanmış ultrason (Jolesz and Hynynen 2002) ve mikrodalgalar (Seki, Wakabayashi et al. 2000) kullanabilmektedir. Günümüzde, daha önce bahsedilen dalgalarla değişik derinliklerdeki tümör kitlesinde hipertermi yaratmak mümkün olabilmektedir, fakat derinlik arttıkça enerjinin sağlam çevre dokulara zarar verme ihtimali artmaktadır. Sağlam çevre dokulara hasarı azaltmak maksadıyla tümöre spesifik olarak bağlanan ve dalgaların tümör bölgesinde odaklanmasını sağlayan maddelerin gelişimine önem verilmiştir (Day, Morton et al. 2009). Düşük seviyelerde olan sıcaklık artışı, kanser hücrelerin sitotoksik ajanlara karşı duyarlılığını arttırır. Bu duyarlılık artışı, membranın toksik ajanlara karşı geçirgenliğini arttırarak, hidrostatik basıncın düşmesine neden olur (Dewhirst, Ozimek et al. 1980; Dewey 1994).

Genelde kanser hücreleri makrofajlar tarafından yok edilirler ve bundan dolayı tümör gerilmeye başlar. Dalga eşliğindeki hipertermi yöntemi non-invaziv teknik sayıldığı için, cerrahi ameliyata uygun olmayan tümörlerin yokedilmesinde kullanıldığı için bu yöntemin avantajlarından sayılır. Dalgalar eşliğinde hipertermi yönteminin avantajlarına rağmen dezavantajları da vardır. Bunlardan örneğin kullandığımızda tümörün ebatlarının büyük olmaları durumunda, dalgaların belirli penetrasyon gücüne sahip olmalarından dolayı dezavantajlar ortaya çıkabilir. Hipertermide, normal hücreler zara vermek için bu dalgalar eşliğinde hipertermi ajanların tümörün tanıyıcı moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda, tümör bölgesi sınırlarının belirlenmesi ve dalgaların istediğimiz noktaya odaklanması sonucunda tedavi gerçekleştirilir (Day, Morton et al. 2009).

2.4.1.1. Hiperterminin enerji şekillerde bağlı terapotik modaliteleri

Hiperterminin enerji türevleri yönünden sınıflandırması şöyledir (Prentice and Blake 2011);

- Elektromanyetik enerjisi modaliteleri
 - Kısa dalgalar diyatermi
 - Mikrodalga diyatermi

- Kızılötesi ampüller
- Morötesi terapisi
- Düşük enerjili lazer
- Termal enerjisi modaliteleri
 - Termoterapi
 - kriyoterapi
- Ses enerjisi modaliteleri
 - Ultrason

2.4.1.2. Non-invaziv hipertermi

Non-invaziv hipertermi vücut bariyerlerini aşmayan ölçüm ve tedavi yöntemlerine verilen bir isimlendirmedir. Bunların sınıflandırmaları şöyledir;

- Tüm vücut ısıtması hipertermi
 - Kızılötesi ışıklar ile hipertermi
 - Sıcak kabin hipertermi
 - Sıcak battaniye ya da sıcak su torbası hipertermi
- Bölgesel hipertermi
 - Kızılötesi dalgalar ile uygulanan hipertermi
 - Bölgesel sıcak kabin hipertermi
 - Bölgesel mikrodalga uygulanan hipertermi
 - Odaklanmış ultrason hipertermi
- Nanopartikülleri kullanarak dalgalar ile hipertermi
 - Altın nanopartiküller ile kızılötesine yakın veya görünür ışığın lazeri hipertermi
 - Altın nanopartiküller ile RF dalgaları hipertermi

2.4.1.3. İnvaziv hipertermi

İnvaziv hipertermi vücut bariyerlerini aşan herhangi bir yöntem demektir. Bunların sınıflandırmaları şöyledir;

- Mikrodalga probu eşliğinde interstisyel hipertermi
- Ultrason probu eşliğinde hipertermi
- Radyofrekans probu eşliğinde hipertermi (koter)
- Lazer interstisyel hipertermi
 - Görünür ışığı eşliğinde interstisyel hipertermi
 - Yakın kızılötesi (NIR) lazeri interstisyel hipertermi

2.4.2. Hiperterminin uygulanan bölgeye yönelik kategorileri

Hipertermi tedavisini bölgesel, tüm vücut ve lokal gibi çeşitli tiplere ayırabiliriz (Chang, Alexander et al. 2001; Falk and Issels 2001; Van der Zee 2002; Wust, Hildebrandt et al. 2002; Feldman, Libutti et al. 2003; Gunderson and Tepper 2007). Bu yöntemde, ısı artışını sağlayacak gerekli enerji, mikrodalga, radyofrekans ve ultrason gibi enerji kaynakları, tarafından ilgili dokulara aktarılmaktadır.

- İntralüminal hipertermi

Intralüminal ya da endokaviter hipertermi metodu, özefagus veya rektum gibi vücut boşluklarındaki tümörlerin tedavisinde kullanılır. Probler boşluğun içine girer ve tümöre doğrudan doğruya ısıyı aktarır.

- İnterstisyel hipertermi

İnterstitiyel hipertermi yöntemi, hücreler dışı, vasküler sistemin dışındaki hipertermidir. Vücut içinde daha derinde bulunan, örneğin “beyin tümörlerinde” prob eşliğinde uygulanıp, ultrason gibi görüntüleme teknikleriyle görüntülenebilmektedir. Bu teknik eksternal tekniğine göre daha yüksek ısı uygulamasına olanak verir. Anestezi altında

prob ya da iğne eşliğinde tümöre uygulanır. Probun tümörün doğru şekilde uygulanıp uygulanmadığı, ultrason gibi görüntüleme teknikleriyle kontrol edilebilir. Isı üreten kaynak prob içine yerleştirilir. Radyofrekans ablasyonu (RFA) interstitial hipertermi tekniği olarak, mikrodalgaları kullanarak kanser hücrelerin ısınıp yok edilmesine neden olmaktadır.

• Bölgesel hipertermi

Vücut boşlukları, organlar ve kollar ya da bacaklar gibi büyük alanlarda, çeşitli yöntemler ile örneğin aplikatörler eşliğinde ya da bölgesel perfüzyon uygulanmaktadır.

- Derin doku hiperetmi

Servikal, mesane kanserlerinde vücut içindeki kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Prob gibi harici aplikatörler bu yöntemde, tümör bölgesine ulaştırılarak ısınma sağlanır.

- Bölgesel perfüzyon hipertermi

Ekstremitelerinin kanser tedavisinde örneğin melanoma, ya da organlarda, akciğer, karaciğerdeki tümörlerde kullanılır. Bölgesel perfüzyon hipertermide hastanın bir miktar kanından alınıp, ısıtılır ve tekrar perfüzyon ile pompalanır. Antikanser ilaçları bu teknik esnasında hastaya verilir.

- Peritoniyel perfüzyonu hipertermi

Aralıksız peritoniyel perfüzyon hipertermisi (CHPP) kanser tedavisinde kullanılan diğer bir hipertermi uygulama yöntemidir. Bu yöntem primer peritoneal mezoteliyoma ve mide kanserinde kullanılmaktadır. Uygulama esnasında ısınmış antikanser ilaçlar peritoniyel boşluğuna enjekte edilerek, sıcaklık 42-43 °C yükselir.

• Tüm vücut hipertermi

Tümörün başka bölgeler ve ya dokulara metastaz yapıp vücudun tamamına yayılmış olduğu durumlarda kullanılır. Bu yöntem sayesinde vücut sıcaklığı 42-43°C hatta daha üst değerlere çıkmaktadır. Sayılan yöntemler sıcak oda (

büyük inkübatör) ya da sıcak su havuzu veya sıcak battaniye ile gerçekleştirilir. Uygulanan hiperterminin verimi istenen sıcaklık değerine, uygulama süresine ve hücrelerle/dokuların karakteristik özelliklerine bağlıdır (Hildebrandt, Wust et al. 2002; Van der Zee 2002). İstedığımız sıcaklığa erişmek ve bu uygulama süresi koşullarıyla, hipertermi esnasında, tümör ve çevresindeki dokuların sıcaklığı aralıksız gözlenir. Görüntü teknikleri (Bilgisayar görüntüleme) ile probun uygulama noktası aralıksız izlenmektedir (Kapp, Hahn et al. 2000; Falk and Issels 2001; Wust, Hildebrandt et al. 2002).

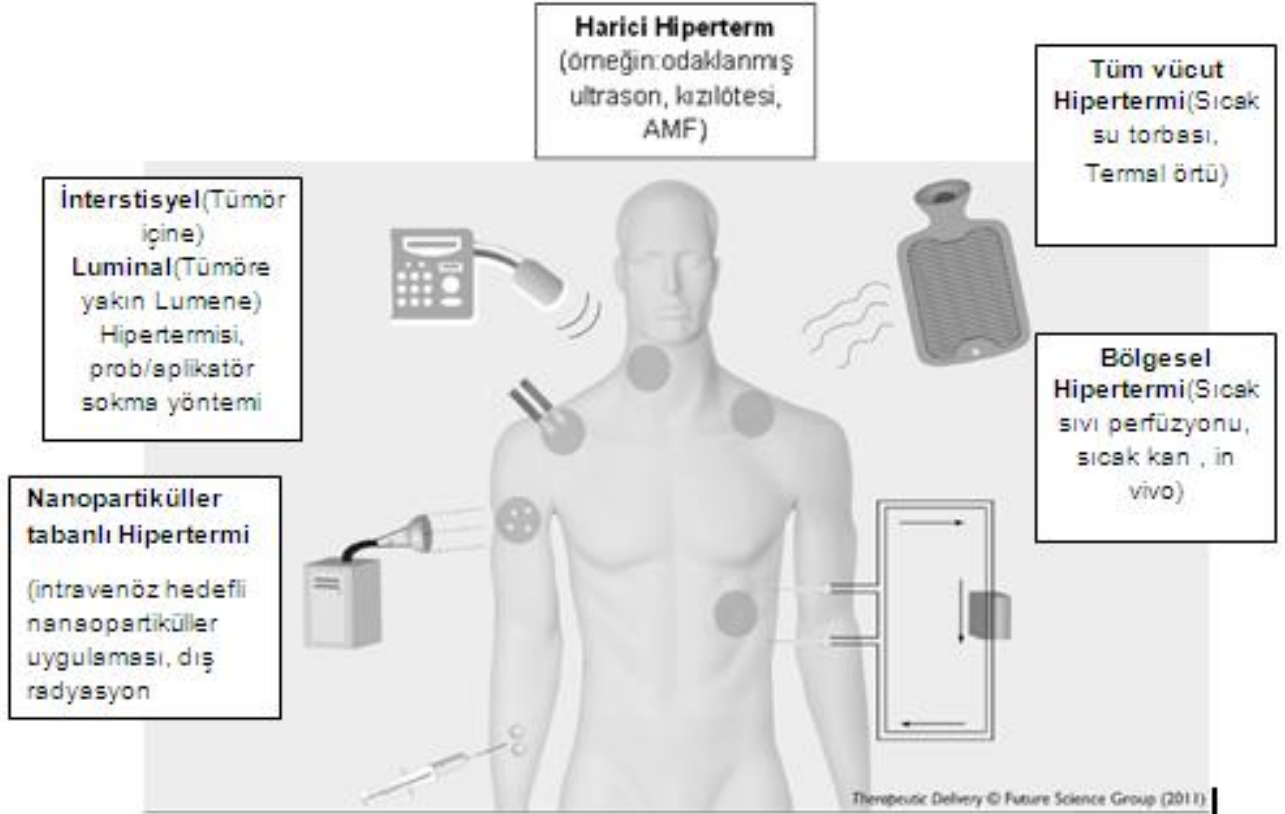
2.4.3. Konvansiyonel hipertermi yöntemlerinin dezavantajları, komplikasyonları ve yan etkileri

Hipertermi esnasında, sıcaklık 44-45°C'yi aşmazsa, normal dokuların çoğu zarar görmez, ancak dokuların bölgesel farklılık nedeniyle, karakteristik özellikleri değişir, neticede bazı noktalarda aşırı sıcaklıktan etkilenmektedir. Buda yanma ve kabarmalara neden olmaktadır (Kapp, Hahn et al. 2000; Falk and Issels 2001; Van der Zee 2002). Hiperterminin farklı uygulamaları mekanizması, Şekil 6'de anlatıldığı gibi başka bölümde açıklanacaktır.

Geleneksel hipertermi yöntemlerinin sorunlarını anlatmak istediğimizde onlardan bazıları şöyledir;

- Tümörlerin gerçek sınırları olmadıkları için, hipertermi yöntemlerinde istediğimiz bölgeye odaklanmak ciddi bir sorundur ve bundan dolayı odaklanma asla doğru olmamaktadır.
- Hipertermide, sorununun karmakarışık olduğu için, vücut içine nüfuz etmek konusunda çok sayıda sorun yaşanabilir onlarda örneğin sıcak noktaların oluşması engellenerek, hastanın bir takım doğal ve bazen gereksiz hareketleri gidermek (nefes alma gibi), bunların yanında hipertermi esnasında derinin aşırı sıcaklığa çıkması engellebilmektedir.

- Normal ve tümör hücrelerine yönelik bir takım teorik sorunlar örneğin (HSP) sıcaklık artışının etkileri konusunda görünür (Szasz 2009).

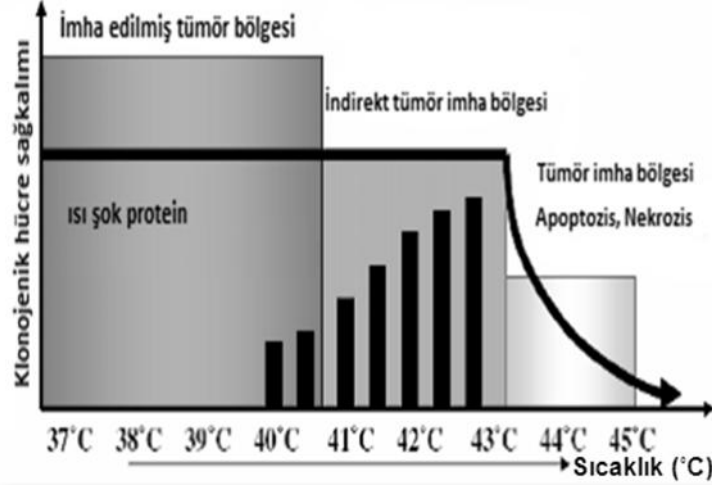


Şekil 6 Hiperterminin farklı uygulama yöntemleri

2.4.4. "Heat Shock Protein" hücre ölümü mekanizması

Isı şok proteinleri, otoimmün, enfeksiyöz ve kalp hastalıkları gibi birçok patolojik durumun klinik tezahürünün oluşmasında rol oynarlar. Kanser hücrelerinde, sıcaklık 41-45°C aralığına yükseldiği zaman apoptoz işaretleri görülmeye başlar, sıcaklığın 50°C ye artması hızlı hücre ölümü sonucu dokuda nekroz meydana getirir. Hücre apoptozunda hayati önem arz eden Caspase enzim grubu "Ölüm indükleyeci sinyal kompleksleri" adındaki biyolojik ajanlar tarafından aktive olduktan sonra hücrede

programlı ölüm başlar (Şekil 7) (Hildebrandt, Wust et al. 2002; Wust, Hildebrandt et al. 2002; Milleron and Bratton 2007).



Şekil 7 "Heat Shock Protein" Tumor yok edilme sıcaklık derecesi

2.5. Elektromanyetik Dalgalar ile Nanopartiküllerin Etkileşme Mekanizmaları ve Kanserin Tedavi Yöntemlerinde Farklı Uygulama Türleri

2.5.1.1. Fototermal tedavi (PTT) yöntemi

Fototermal etkileşim, dokularda ışık enerjisinin ısıya dönüşme mekanizmasının tedavi yöntemlerinden sayılmaktadır. Bu mekanizma hipertermi tedavi yönteminde sıcaklık artışı şeklinde görünür. Fototermal hasarları mitokondriyel şişmesi, proteinlerin denatüre olmaları, ödem, beyazlaşma ve doku nekrozuyla tanımlanmaktadır. Bu yöntemde doku dakikalar içerisinde 55-90°C sıcaklığa çıkabilmektedir (Thomsen 1991; Welch and van Gemert 2011) Dalgaların primer dokudaki emicileri su, hemoglobin, oksihemoglobin ve melaninler sayılırlar. Işının bu bileşenlerinin absorpsyonu dokuyu fototermal doku hasarına götürür ama bu mekanizmada normal dokularla, tumor dokusunu ayırt etmek çok zordur. 700-900 nm'e arasındaki olan NIR dalgaları minimum absorpsiyon gösteren ışık dalgalarından sayılmaktadırlar (Van Gemert, Welch et al. 2005). Son yıllarda lazer kullanımının, kanser tedavisi için son

derece umut verici bir metot olduğu ortaya çıkmıştır. Kanser tedavisindeki kullanılan fototermal yöntemler, dalgaların enerjisinin nanopartiküller yüzeyinde odaklamasına ve sonuç olarak tümörün hasarına ve yıkımına sebep olmaktadır. Ancak yeni nanobilim çalışmalarında, asıl metallerin nano yapıları, benzersiz fotofiziksel özelliklerine sahip olmaları gibi özellikleriyle birlikte kanser tedavisindeki kullanılan fototermal uygulamaları son derece uygun görünüyor. Bu yöntemde dalgalar düşük frekanslarda kullandıkları zaman başka bir absorpsiyon ajanı örneğin altın ile birlikte PTT'ye neden oluyorlar. Dalgaların yüksek frekanslarda kullanması ya da onları absorpsiyon ajanı kullanmadan belirli tümöre odaklaması mekanizmasında (lazer) PTT'nin kullanma çeşitlerinden sayılmaktadır. Fototermal yönteminde altın nanopartiküller ile lazer birlikte kullandığında, bu yöntem "Plasmonik Fototermal Tedavisi" (PPTT) olarak adlandırılmaktadır. PPTT' nin temeli "Yüzey Plasmon Rezonans" (SPR) mekanizmasından kaynaklanmaktadır. SPR bu bölümün devamında ayrıntılı olarak açıklanacaktır. Fotoabsorpsiyon yöntemi altın nanopartiküller ile birlikte kanser tedavilerinde son derecede gelişmiş tedavi tekniklerinden sayılmaktadır, bu yöntemin özelliği konjuge olmuş altın nanopartiküllerle birlikte tümörlerde daha seçici ve etkili stratejidir (Huang, Jain et al. 2008).

2.5.1.2. Kanser tedavi yöntemlerinden "Fotodinamik tedavisi" (PDT)

Fotodinamik kanser tedavisi (PDT) ,kanser tedavi yöntemlerin içinde modern tekniklerinden sayılır, bu yöntem aynı zamanda fotokemoterapi adıyla da anılmaktadır (Wilson and Patterson 2000), adı geçen teknikte, kimyasal fotouyaran maddeler kullanılarak, toksik oksijen singletleri oluşturarak toksisiteye neden olur veya fotokimyasal, fotobiyolojik işlemlerden üretilmiş serbest radikallerle birlikte ortamı toksik yaparlar. Bu süreçler görülebilir ışık veya yakın kızılötesi (NIR) dalgalar olabilir. Bu işlem belli dalga boylarında, fotouyaranlar ile dokudaki oksijenin arasındaki ortaya çıkan reaksiyon ile başlayıp, sonuçlanır. Adı geçen ilkel uyaranlardan akridin 1900'lerde, Paramecian'ın yoketmesinde (Raab 1900) kullanılmıştır. Onun devamında eosin adındaki madde cilt kanseri tedavisinde 1903'lerde (Von Tappeiner and Jesionek 1903) kullanmıştır. Porpifirin bazlı sensitizerler onların kanser ilerlemesini

durdurma açısından ve verimli singlet oksijen üretme özelliğinden dolayı, klinik uygulamalarında çok ilgi çekmektedir.

2.5.1.3. Manyetik nanopartiküllerin manyetik alandaki olan etkileşme mekanizması

Demir oksit nanopartiküller benzersiz manyetik ve mükemmel biyoyumluluk gösterdikleri için biyomedikal uygulama alanlarında örneğin kanser tedavi yöntemlerinde ve ilaç salınım sistemlerinde ilgi odağındadır. Bu nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin kontrolü, kanser tedavisindeki hipertermi yaklaşımı için önem arz eder. Manyetik nanopartiküllerin anizotropi özellikleri, kitlelerin anizotropi özelliklerinden fazladır, aynı nedenle manyetik nanopartiküllerin ve kitle örneklerden neden olan “Curie veya Neel” adlanan gevşeme ve sonunda ısınma mekanizmasında manyetik nanopartikül spinlerin mikroskopik fazda, spontan paralel sıcaklıklar ile antiparalel oriyantasyon sıcaklık arasında fark göstermektedir. Sözü geçen fark hatta yüz derecelere kadar yaklaşabilir. Manyetik nanopartiküllerin hipertermiye neden olan mekanizması, 1957'lere kadar gitmektedir. Araştırmalara göre süperparamanyetik kristal çözeltilerin verimi bu nanopartiküllerin alternatif manyetik alanların (AMF) enerji absorpsiyon özelliğine bağlı olarak sıcaklık artışına sebep olmaktadır. Alternatif manyetik alan hipertermisinde, bu alandaki kullanılan süperparamanyetik nanopartiküllerin elektron spinleri manyetik alanın yönünde, yön değiştirmeye başlarlar, manyetik alan kesildiği zaman spinler eski yönüne dönmeye çalışırlar. Sonuçta, nanopartiküller, alınan enerjiyi ısı şeklinde geri verirler. Bu mekanizma başka bir tabirle şöyle anlatılabilir, nanopartiküllerin manyetik enerjisi, mıknatıslama vektörlerine bağlıdır. Minimum manyetik enerjisi olan yönler anizotropi yönler'; easy axes' diye de adlandırılır (Laurent, Forge et al. 2008) Manyetik alan Nanopartiküllere enerji verdiği zaman nanopartiküllerin manyetik vektörleri ile easy axes açısı arasındaki olan fark, eğilme açısı adlandırılıp ve onun artışıyla, nanopartiküllerin manyetik alandan alan etkisi artar. Anizotropi enerji, manyetik alan kesildiğinde nanopartiküller alınan enerjini ısı şeklinde geri verir.

$$T_b(H)=T_b(0)[1-H/H_C]^k$$

Bu denklemde T_b bloklama sıcaklık, $T_b(0)$ başlangıç bloklama sıcaklığı, H manyetik alan polarizasyonu, H_C kritik polarizasyon, (düşük alanlarda, $k=2$ ve yüksek alanlarda, $k=2/3$ ve $H_C=2k/M_s$) sayılmaktadır.

Manyetik nanopartiküllü hipertermi yöntemi ilk klinik denemeleri bir araştırma grubu tarafından Ürdün'de başlatılmıştır (Dudeck, Bogusiewicz et al. 2006; Johannsen, Thiesen et al. 2006; Johannsen, Gneveckow et al. 2007; MagForce Nanotechnologies 2007). Bu grubun bir 0-15kA/m, 100kHz'lik prototip hipertermi jeneratörü adında alternatif manyetik alan oluşturan bir cihaz yapıp bu mekanizmadan hipertermide iyi sonuçlar elde etmişlerdir (Laurent, Dutz et al. 2011).

2.5.1.4. Düşük frekans radyofrekans dalgaları ile nanopartiküllerin etkileşme mekanizması

- Altın nanopartikül kütlelerin dielektrik özellikleri

Malzemelerin elektromanyetik özellikleri üzerinde yapılan çalışmalarda, dielektrik faktörü önem arz etmektedir.

$$\epsilon(\omega)=\epsilon_0[\epsilon'_r(\omega) - j\epsilon''_r(\omega)]$$

Bu denklem elektrik alanından üretilen polarizasyon bulunduğu yerdeki sanal parça kaybının ne kadar oluşunu ifade eder. Dielektrik kompleks faktörünün en basit şekli şöyledir:

$$\epsilon'(\omega)=\epsilon'_r(\omega) - j\epsilon''_r(\omega)]$$

Bu denklem kompleks geçirgenlik bazına bağlı olarak, hacimsel elektromanyetik dağılım hesaplamasında kullanılır (Furse, Durney et al. 2009).

Altın nanopartikül çözeltilerinin sıcaklık artışı, elektriksel akımın manyetik özelliğinden etkilenerek ortaya çıkmaktadır.

- Dielektrik Kayıp Modeli

Kayıp ortam için, sıcaklık artışı teorik olarak hesaplanabilir

$$\Delta T = \frac{\sigma(\omega) |\vec{E}|^2 t}{2\rho C}$$

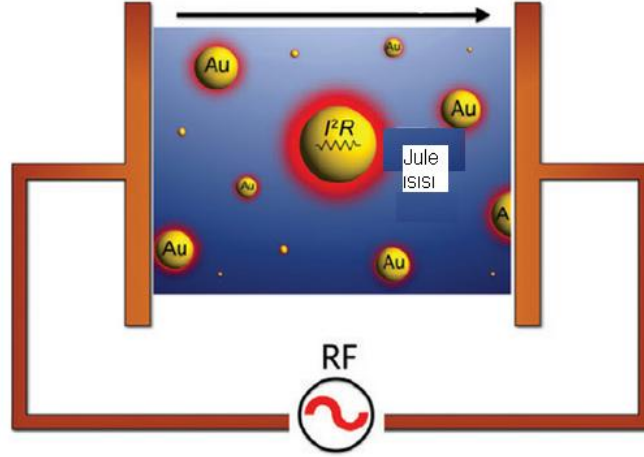
Bu denklemde ΔT sıcaklık farkı, $\delta(\omega)$ belli metalin etkili iletkenlik faktörü, E manyetik alanın şiddeti, t ısınma süresi, ρ çözelti yoğunluğu ve C maddenin özgül ısı kapasitesi bulunmaktadır.

- Joule Isınma Modeli:

Şekil 8’de görüldüğü gibi, anormal sıcaklık artışını hesaplamak için, “Joule ısınma modeli” önerilmiştir. Bu modele göre, kütle dispersiyon ısınma hızı hesaplanabilir.

$$dT/dt = [\delta(\omega) n a d E^2] / V C_w$$

Bu denklemde $\delta(\omega)$ altının iletkenlik katsayısı, n altın nanopartikül sayısı, a altın nanopartikül kesiti, d nanopartikül çapı, E, sulu ortamın elektromanyetik alan şiddeti, V dispersiyon hacmi ve C_w suyun özgül ısı kapasitesi. Bu model aynı zamanda altın nanopartikül dispersiyonlarının boyutlarına bağlı olarak ısıtma etkisini açıklamak için kullanılmaktadır. Bu teoriye göre küçük nanopartiküller, büyük nanopartiküllere göre daha hızlı ısınabilirler (Moran, Wainerdi et al. 2009). Şekil 8’de görüldüğü gibi, Joule modelindeki, RF ile altın nanopartiküllerin ısı oluşma mekanizmasını açıklamaktadır.



Şekil 8 “Jule” modeline göre, RF uygulanmış altın nanopartiküllerin sıcaklık artışı görüntüsü

2.5.1.5. “Yüzey Plasmon Rezonans” (SPR) mekanizması ve “Plasmonik FototermaI Tedavi” (PPTT) yönteminde kullanımı

- Mie Teorisi

Elektromanyetik dalgaların küre şeklinde olan parçaların (altın vb.) yüzeylerinden saçılması, Mie (Mie- Lorenz) teorisi adlanır (Mie 1976). Mie teorisi aslında bir “Maxwell denkleminin” cevabıdır. Bu teori altın nanopartiküller ile THz seviyesindeki olan elektromanyetik etkileşim ilişkisini açıklamaktadır.

Elektromanyetik dalgalar eşliğinde, serbest elektronlar rezonansa gelmeleri ve buna göre titreşimleri yüzey plasmon rezonans (SPR) fenomenine neden olabilir. Ancak Yüzey plasmon rezonans gönderilen dalga boyunun karşılaştığı nanopartikül çapından küçük olması durumunda oluşur (3 nm) (Boisselier and Astruc 2009).

Bu yöntemde kullanılan SPR mekanizması, ışık katı bir maddenin yüzeyi ile etkileştiğinde yüzeydeki valens elektronları titreşir. Rezonansın oluşması için fotonlar frekansı, yüzey elektronlarının rezonans frekansı eşit olmalıdır. Başka tabirle gelen dalganın frekansı nanopartikülün rezonans frekansı eşit ise SPR mekanizması

oluşur. Altın nanopartiküller 532 nm'e civarındaki uv dalgaları tarafından rezonansa gelebilirler (Hirsch, Stafford et al. 2003; Loo, Hirsch et al. 2004). Kanser tedavisindeki kullanılan yöntemlerden sayılan PPTT yöntemi verimli ve yeni bir teknik olarak sayılmaktadır. Bu yöntemde, hedeflenen altın nanopartiküllerin kullanımı, selektif tümör hücrelerinin yok edilmesi için lazerin enerjisini absorblayarak total enerji miktarını düşürebilir. Bu tip kanser tedavi yönteminde, belli miktar enerjiyi direkt tümör kütlelerinin içine gönderilerek, ısı artışı sağlanır . Tümör ablasyonundaki kullanılan PPTT yöntemi, normal hücrelere minimum zararlı özelliğiyle, karaciğer lezyonlarında başarıyla kullanılmaktadır (Vogel and Venugopalan 2003). Ancak yukarıda adı geçen tedavi yöntemlerinin hepsi, termal ablasyon yapabildikleri için kanser tedavi kategorisine girer.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Manyetit Nanopartiküllerin (SPIONs) Sentezi

Tez çalışmalarında manyetik nanopartiküller oda sıcaklığında, demir (II) ve demir (III) tuzları eşliğinde, ikili çöktürme sentez yöntemiyle hazırlanmıştır. Literatürde uygulanan ikili çöktürme metodu kullanılarak nanopartiküller sentezlenmiştir. Kullanılan yöntem literatürle aynıdır. Ancak, az miktarda nanopartikül çözeltisi hazırlamak için, uygulanan metotta malzemelerin miktarında denemeler sonrasında, literatürlere göre fark gözlenmiştir (Kang, Risbud et al. 1996).

3.1.1. SPIONs'lerin sentezinde kullanılan malzemeler

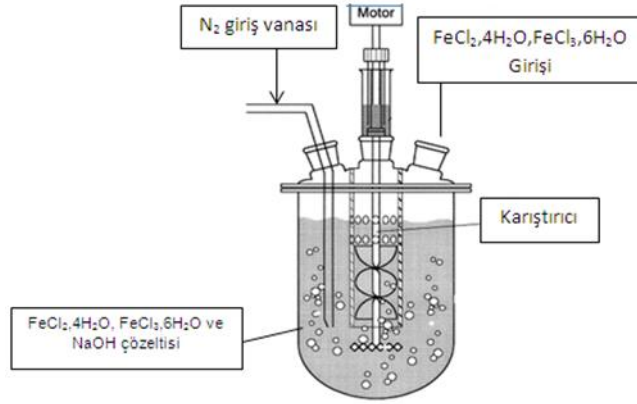
Manyetik nanopartiküllerin sentezinde kullanılan demir tuzları demir II klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve demir III klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (SIGMA-ALDRICH, Almanya) tarafından temin edilmiştir. Sentezde, çöktürme ajanı olarak kullanılan NaOH ise (MERCK, Germany) satın alınarak temin edilmiştir.

Sentez esnasında üretilen manyetit nanopartiküllerin aglomerasyonunu engellemek ve karakterizasyonu optimize etmek amacıyla tetrametil amonyum hidroksit TMAOH (SIGMA-ALDRICH, Almanya) satın alınan katı, toz şeklinde TMAOH sentezde kullanılmıştır. Tüm deneylerde distile su kullanılmıştır.

3.1.2. SPIONs'lerin sentez metodu

Şekil 9'de anlatıldığı gibi, manyetit nanopartiküllerin sentezine başlamadan önce, demir II klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve demir III klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltileri, "Kong" metoduna en yakın derişimlerde hazırlanmıştır. Buna göre, demir II klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)'den 0,0994 gr ve demir III klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'den 0.2703 gr tartıp cam tüpün içine aktarılmıştır. Tarttığımız malzemelere 5 ml distile su ilave edilerek, vorteks cihazında çözünmesi sağlanmıştır. Deneyde kullanmak üzere, 50 ml 1M sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin içinden nitrojen gazı geçirilerek çözelti oksijenden arındırılmıştır.

Şekil 9'de belirtildiği şekliyle, deney düzeneğinde nanopartiküllerin üretiminde hazırlanan reaktör kombinasyonu gösterilmiştir. Üç boyunlu bir reaktör kullanarak, güçlü mekanik karıştırıcıyla, çözeltinin iyi karışması ve ondan dolayı istenen boylarda nanopartiküllerin elde edilmesi sağlanmıştır. Mekanik karıştırıcının reaktörün tam ortasında durması ve uygun şekilde çözeltinin içine daldırılması gerekmektedir. Hazırlanan 1M Sodyum Hidroksit çözeltisi reaktörün içine aktarılır ve nitrojen gazı 10 dk içinden geçirilir. Demir II klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ve demir III klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltileri giriş boynundan damla damla reaktörün içindeki sodyum hidroksit çözeltisine eklenmiştir. Karıştırıcı yüksek hızla çalışıp, çözeltinin rengi gittikçe koyulaşmaktadır, yaklaşık 30 dakika sürede, karıştırmaya devam edildikten sonra çözeltinin rengi siyaha dönüşmüştür. Reaktörün dibine çöken siyah madde manyetit nanopartikülleridir. Bunlar 2-3 kere distile suyla yıkanır ve güçlü bir mıknatıs yardımıyla, manyetik özellikleri olan nanopartiküller, olmayanlardan ayrılmıştır. Aglomerasyon etkisini engellemek için hazırlan manyetit nanopartikülleri 0.1M (TMAOH) çözeltisi içinde saklanmıştır.



Şekil 9 Demir oksit süperparamanyetik nanopartikül (SPIONs) sentezi için reaksiyon kombinasyonu

3.1.1.1. SPIONs'lerin altın ile kaplaması

Tez kapsamında çalışılan deneylerin bir kısmı sentezlenen manyetit nanopartiküllerin altın tuzları ile kaplamasıdır. Demir oksit yüzeyler Au^{3+} iyonlarının hidroksil trisodyum sitrat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar ile indirgenme yöntemiyle kaplanabilirler (Hien Pham, Cao et al. 2008).

3.1.1.2. Manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında kullanılan maddeler

Altın kaplı manyetit nanopartiküllerde indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$), (SAFC, ABD) satın alma yoluyla temin edilmiştir. Kloroaurat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), (SIGMA-ALDRICH, Almanya) satın alarak temin edilmiştir. Bütün deneylerde distile su kullanılmıştır.

3.1.1.3. Manyetik nanopartiküllerin altın ile kaplama metodu

Tez çalışmaları kapsamında sentezlenen manyetik nanopartiküllerin altınla kaplanmasında, indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılmıştır. Çekirdek manyetit, kabuğu altın (Fe_3O_4/Au) yapılı nanopartiküllerin sentezinin ikinci aşamasında altın ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. 100 ml'lik cam beher içine, 0.5ml (0.1M) TMAOH eşliğinde olan manyetit nanopartikül çözeltisinden alıp, 100ml (0.01M) trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek sitrat iyonlarının OH^- iyonları ile değişmesi için 15 dakika sonike edilmiştir. Daha sonra çözelti yüksek hızda karıştırılarak, yağ banyosunda kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti ilk kaynama noktasına ulaştığında nanopartiküllerin etrafı altınla (Au^{3+}) kaplanmıştır. Buna göre, çözeltiliye 0.420ml (10 mM) tetrakloraurat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) çözeltisi ekleyerek, 15 dakika kaynama noktasında ($96^\circ C$) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda çözelti oda sıcaklığına gelinceye kadar yüksek hızda karıştırılmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık sarı olan çözelti, koyu kahverengine geçişerek, deneyin sonunda şeffaf kırmızı kahve renkli çözeltiliye dönmüştür. Mıknatıs yardımıyla altın ile kaplanmış manyetit nanopartiküller ile altın nanopartiküller birbirinden ayrılarak distile su ile yıkanmıştır. Bu şekilde manyetik özellik göstermeyen, çekirdeğinde manyetit içermeyen ve

sadece küresel altın nanopartiküller uzaklaştırılmıştır. Manyetik ayırma ve yıkama işlemi üç kez tekrarlanarak, altın kaplı manyetit nanopartiküllerin ortamdaki ayrılması sağlanmıştır (Hien Pham, Cao et al. 2008).

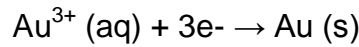
Sentez sırasında birim manyetit başına kullanılan altın çözeltinin miktarı bir başka deyişle kaplanan altın miktarının optimize edilmesi amacıyla Fe₃O₄/Au oranlarında denemeler yapılmıştır.

Bu kısımda yapılan denemeler sonucunda en ideal Fe₃O₄/Au oranının iki olduğu bulunmuştur. Yüksek Fe₃O₄ oranında düşük altın miktarına bağlı olarak kaplama olmazken, Fe₃O₄/Au oranlarının yükseltilmesine bağlı olarak, çok iyi altın kaplama gözlenmesine rağmen, manyetit özelliklerde büyük oranda düşme kaydedilmiştir.

3.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Sunulan tez çalışmasının hedefi farklı nanopartiküllerin radyo frekans ile meydana getirdiği sıcaklık değişimlerini belirlemek ve hipertermide kullanımını araştırmaktır.

Altın nanopartiküllerin sentezinde, trisodyum sitrat gibi indirgeyici ajanlar çözelti ortamında Au³⁺ iyonlarının altın atomlarına indirgenmesi ve sonuçta altın nanopartiküllerinin sentezi aşağıda görüldüğü gibi hedeflenmiştir (McFarland, Haynes et al. 2004).



Tez kapsamında sentezlenen altın nanopartiküllerde indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılmıştır.

3.2.1. Altın nanopartiküllerin sentezindeki kullanılan malzemeler

Altın nanopartiküllerin sentezinde indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat (SAFC, ABD) , altın tuzu kloraurat (HAuCl₄.3H₂O) ise (SIGMA-ALDRICH, Almanya) satın alınarak temin edilmiştir. Bütün deneylerde distile su kullanılmıştır.

3.2.2. Altın nanopartiküllerin sentez metodu

Sunulan Altın nanopartikül yöntemi temel olarak referans verilen literatür üzerinden çalışılmış ancak bazı değişiklikler örneğin malzemelerin miktarı gibi faktörler çalışma esnasında değiştirilmiştir. Tüm cam eşya deney başlamadan önce distile suyla yıkanmıştır. 45 ml distile su, 100 ml behere konulmuştur. Çözelti ısıtıcı ve manyetik karışmayla birlikte kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtılır. Beherin içine 5 ml, 10 mM kloroaurat HAuCl_4 ekleyerek, 16.5 ml, 0.01 M trisodyum sitrat çözeltisi eklenir. trisodyum sitrat indirgeme ajanı olarak, altın iyonları altın atomlarına indirgenmiştir. Çözelti koyu kırmızı rengine dönüştükten 10 dk sonra sıcaklık ve karıştırma durdurulmuştur. Reaksiyonun sonunda, altın nanopartiküllerin oluşumunu gözlemek için hazırlanan çözümden 2 ml alıp, küvet içinde UV absorpsiyon değerleri, UV/vis spektrofotometre (JASCO V-530, ABD) cihaz ile incelenmiştir.

3.3. Altın Nanorodların Sentezi

Hekzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB), altın ve gümüş nanorod sentezinde yüzey aktif madde kullanılarak, elektrokimya ve tohumlaşma araçlı büyüme metodları şeklinde iki yaklaşım kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda, altın nanorodlar iki aşamalı bir yöntem ile sentezlenmiştir. Bu yöntemin birinci aşaması öncül çözelti hazırlaması ve ikinci aşama büyüme çözeltisi olarak adlandırılmaktadır. Ancak bu metotta boy yönünden kontrolün sağlanamaması ve çok miktarda küre şeklinde parçacıkların oluşumu sentezin zayıf noktalarından sayılmaktadır. Tohumlaşma (öncül çözeltisi) araçlı, sözü geçen iki basamaklı metodunun reaksiyon verimi diğer mekanizmalardan daha düşüktür. Bu nedenle çözeltinin santrifüj edilmesi gerekmektedir. Bu yöntemde farklı hacimlerde tohumlaşma ajanı kullanılmaktadır. Farklı hacimlerde tohumlaşma ajanının kullanılması değişik boyutlarda nanorod oluşumuna neden olacaktır (Nikoobakht and El-Sayed 2003).

3.3.1. Altın nanorodların sentezindeki kullanılan malzemeler

Heksadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB)(%98), (SIGMA-ALDRICH, Almanya), kloroaurik trihidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), (SIGMA-ALDRICH, Almanya), potasyum borhidrür (KBH_4), (SIGMA-ALDRICH, Almanya), gümüş nitrat (AgNO_3), (SIGMA-ALDRICH, Almanya), L-Askorbik asit (SAFC, ABD) satın alma yoluyla temin edilmiştir. Tüm deneylerdeki kullanılan distile su labratuvardaki cihazdan temin edilmiştir.

3.3.1.1. Altın nanorodların sentez metodu

Altın nanorodların sentezi iki aşamalı olarak gerçekleşmektedir: Birinci aşamada öncül çözeltisi (Seed Solution) hazırlanmakta ve ikinci aşamada büyüme çözeltisi (Growth Solution) hazırlanmaktadır.

- Birinci aşama veya öncül çözeltinin hazırlaması için 2.5 ml, 1 mM kloroaurat, 2 ml, 0.5 M heksadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB), 0.5 ml distile su, 0.15 ml, 0.02 M potasyum borhidrür (KBH_4) oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcı eşliğinde karıştırılır.

- İkinci aşamada ya da büyüme çözelti hazırlama aşamasında 2.5ml 1 mM kloroaurat, 2 ml 0.5 M (CTAB), 0.5 ml 1mM gümüş nitrat, 0.25 ml 0.1 M L-askorbik asit kullanılarak, 18 µl öncül çözeltiden oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcı eşliğinde birinci aşamadaki parametreleri sağlamak şartıyla, ikinci çözeltiliye eklenmiştir.

Sentezin son aşamasında çözelti 10000 rpm, 20 dk boyunca 3 kere santrifüjlenerek saflaştırılmaktadır. Süpernatant kısım ayrıldıktan sonra elde edilen nanorod solüsyonu distile suyla yıkanmıştır.

3.3.1.2. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu

Sentezlenen manyetit, altın kaplı manyetit, altın nanopartiküller ve altın nanorodların karakterizasyonu boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer cihazı (3000 HSA Malvern, İngiltere) Dinamik Işık Saçılması (DLS) mekanizmasına bağlı olarak

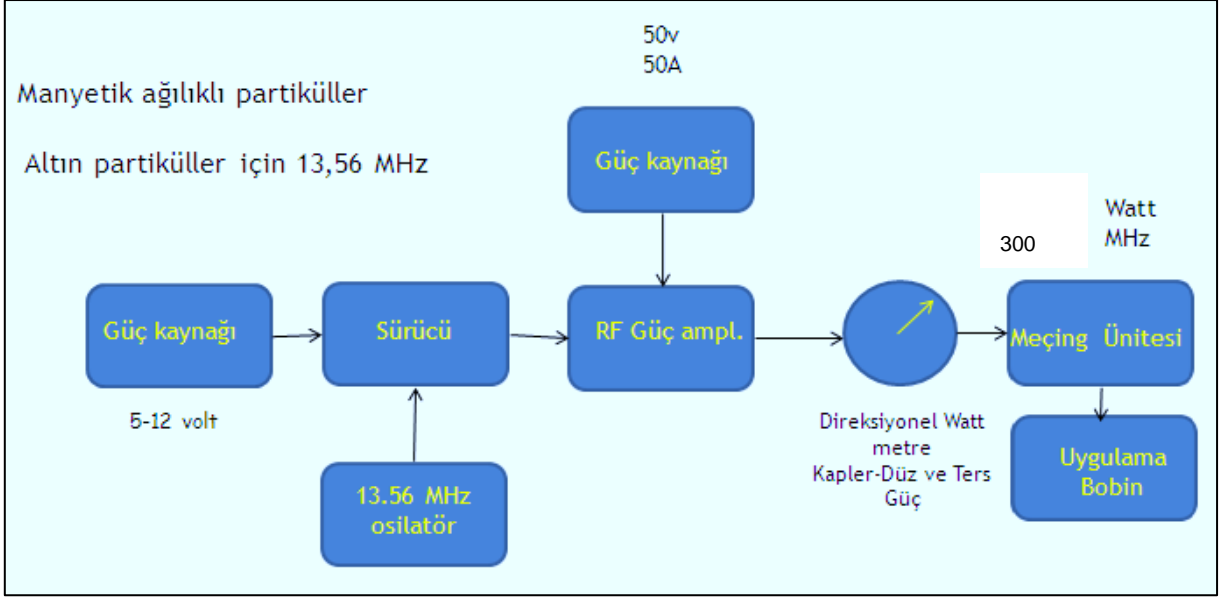
kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, mıknatısla ayrılan manyetik partiküller distile su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 2 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içerisine konulmuştur.

Tezin bu aşamasında, AuNPs, AuNRs ve Au@SPIONs çözeltilerin UV absorbans değerleri UV spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. Bu işlem için, (JASCO V-530, Japon) veya (SHIMADZU UV MİNİ 1240, Japon) kullanılmıştır. Bu cihazın prensibine dayalı, çözelti içinden gönderilen ışığın dalga boyu ile nanopartikülün çapı eşit olduğu takdirde, absorbans grafiğinde elde edilen sıçramayı kullanarak bu sıçramanın karşılık geldiği absorbans değeri ile çözeltinin yoğunluğu belirlenir.

DeneySEL çalışmalarının diğer aşamasında, sentezlenen nanopartiküllerin Transmisyon Elektronik Mikroskobu (TEM) ile görüntüleri elde edilmiştir. TEM görüntülemesinde Jem Jeo (2100 F 200kV HRTEM) cihazı kullanılmıştır. Elde edilen TEM görüntülerinden partiküllerin boyutları ve boy dağılımları belirlenmiştir.

3.4. Endüktif Modüllü Radyofrekans Üreteç (0-300w, 13.56MHz)

DeneySEL çalışmaların devamında, Şekil 10'de anlatıldığı üzere, değişken güç (0-300W), 13.56MHz endüktif modüllü RF jeneratörü tasarlanıp kullanılması düşünülmüştür.



Şekil 10 Endüktif modüllü RF jeneratörü (0-300w, 13.56MHz) kombinasyonu

Şekil 10'de ifade edildiği gibi 300w endüktif modüllü RF jeneratörünün birimleri şöyledir:

- 5-12V aralığındaki güç kaynağı
- RF sürücü
- 13.56 MHz osilatörü
- 50V, 50A güç kaynağı
- RF güç amplifikatörü
- Düz ve ters güç ayarlamaya "**Reflected Power**" ölçme ünitesi olarak "wattmetre"
- 300W, 13.56 MHz'lik "Matching" ünitesi
- Deneylerde kullanılan RF uygulama bobini

İn-vitro deneyler için RF jeneratörünün son bölümünde farklı çaplarda ve boylarda bakır borudan bobin yapılmıştır. Bobinlerde sıcaklık artışını engellemek için, bobinlerin içinden düşük sıcaklıkta akışkan geçirmesi düşünülmüştür. Bobinin ısınması RF güç verimini düşürebilir.

3.5. Endüktif Modüllü RF Üreteç (0-30w, 13.56MHz) Kombinasyonu

Deneysel çalışmaların devamında, yukarıda bahsedilen RF cihazının temin edilmesi gerekmektedir. Bu cihazın parçalarının satın alınması planlanmıştır, ama bu hedefe süre içerisinde ulaşılamayacağını anlaşılmıştır, başka bir RF cihazı, kullanılması düşünülmüş ve 13.56MHz, 30W 'lık endüktif modüllü RF jeneratörü, Şekil 11' de görüldüğü gibi temin edilmiştir. Bu RF jeneratöründeki kullanılan bobinlerin soğutması için Şekil 12'de açıklandığı şekliyle kriyostat soğutucusu kullanılmıştır.

İfade edilen RF jeneratörünün parçaları şöyle açıklanmaktadır;

- RF jeneratörün temel güç kaynağı
- “Reflected power” adlanan RF gücünün ters saçılmasını ayarlayan ünite
- Ters saçılan güç, gerçek üretilen RF gücünün ölçme birim, ” Wattmetre” birimi
- Farklı in-vitro çalışmaları için kullanılan bobin ünitesi
- Bobinlerin soğutması için kullanılan kriyostat ünitesi



Şekil 11 Endüktif modüllü RF jeneratörü



Şekil 12 Endüktif modüllü RF jeneratöründeki kullanılan kriyostat ünitesi

Şekil 13'de görüldüğü üzere, endüktif RF üreticinin önemli bölümlerinden bobin tasarımı açıklanmıştır. 3-6mm kalınlığı olan bakır boruları kullanılarak farklı bobinler

yapılmıştır. Bobinlerin çapı 3 cm ile 15 cm arasında değişmekte olup, boyları 6 cm'den 17 cm arasında değişmektedir. Radyofrekans jeneratörü, 30watt da çalıştırıldığında, bobinler fazladan ısınmaya başlar ve bu nedenle RF verimi düşer Bu problem RF jeneratörün yanında kriyostat soğutucusunun olmasını gerektirir. Deneysel çalışmaların bu bölümünde, kontrol parametrelerini göz ardı ederek, çeşitli bobinler ve farklı RF güçlerinin uygulamasına rağmen, nanopartikül çözeltilerinde, beklenen sıcaklık artışı gözlenmemektedir. Buna göre, başka modülde RF üreteci düşünerek devam edilmiştir.



Şekil 13 Endüktif RF jeneratörünün bobin görüntüsü

3.6. Kapasitif Modüllü RF (0-30w, 13.56MHz) Jeneratörü

Tasarlanan endüktif modüllü RF jeneratöründen iyi sonuçlar alamayıp beklenen sıcaklık artışın elde edilemeyince, kapasitif RF jeneratörünün tasarımı düşünülmüş ve Şekil 14'de belirtildiği gibi, 30w, 13.56MHz'lik kapasitif modüllü RF jeneratörünün tasarımı yapılmıştır. Buna göre, 10cm x 5cm x 0.1mm boyutlarda bakır levhaları RF jeneratörüne montaj olup, RF dalgaların oluşumu beklenmiştir. Bu jeneratör,

nanopartikül çözeltilerinde istenen etkiyi (RF) sağlamayıp, nanopartikül çözeltilerini ısıtamadığı için sonraki aşamalarda kullanılmamıştır.



Şekil 14 Kapasitif modüllü RF jeneratörü

3.7. Anten Modüllü RF (0-200w) Jeneratörünün Tasarımı ve Yapılması

Deneyisel çalışmaların devamında, endüktif ve kapasitif modüllü RF jeneratöründen sonuç alamadığından dolayı, Şekil 15’de açıklanıldığı gibi, anten modüllü RF jeneratörü tasarımı hedeflenmiştir.



Şekil 15 Anten modüllü RF jeneratörü

Buna göre, tasarlanan kombinasyonun üniteleri sırasıyla:

- RF dalgaların uygulamasında kullanılan telsiz ünitesi
- 200w gücünde olan RF amplifikatör devresi
- RF güç amplifikatörünün çalıştıran güç kaynağı
- “Reflected power” adlanan RF ters saçılan güç ve RF dalgalar yoğunluğunu ölçen ünite (wattmetre)
- RF anteni

3.8. Biyolojik Sistemlerdeki Sıcak Kabin Simülasyonu

Biyolojik ortamların (hücrelerin yaşama ortamları) simüle etmek için, sıcaklık kontrolü yapılabilen sıcak kabin tasarımı gerekmektedir. Kabinin içinde ısıtıcı, sıcaklığı gözlemek için termometre yerleştirilmiştir. Kabin sıcaklığını korumak için, kabin hazırlaması için kullanılan malzemenin ısı iletkenliği düşük olmalıdır.

3.9. RF Uygulanan Nanopartiküllerin Sıcaklık Artışı Değerlendirmesi

Bu aşamada sentezlenen SPIONs, Au@SPIONs, AuNPs ve AuNR çözeltilerine farklı güçlerde RF dalgalarından etkilenip, sıcaklık artışı gözlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküllerin stok çözeltilerine yüksek derişimlerde RF dalgaları karşılaştırılıp ve öncül aşama sayılarak sıcaklık artış olup olmadığı hakkında karar verilmektedir. Bu deneylerin ikinci aşamasında, stok nanopartikül çözeltilerden 30µg/ml, 15µg/ml ve 5µg/ml yoğunlukta çözeltiler hazırlanmıştır. Üç farklı güçte (180, 120 ve 80w) RF uygulayarak nanopartiküllerin sıcaklık artışı ve sonuçlanan hipertermileri incelenmiştir. Bundan dolayı en yüksek derişimden düşük derişimlere doğru gitmekte olan çözeltilerle başlatılmış olup, zamana bağlı sıcaklık artışı kızılötesi kamerayla (FLIR i5) kayd edilmiştir.

RF uygulanan nanopartikül çözeltileri SAR mekanizmasına uyum sağlayarak sıcaklık sonuçları şu faktörlere bağlıdır;

- Nanopartikül çözeltilisinin iletkenlik faktörü

- Dielektrik faktörü
- Polarizasyon faktörü
- Nüfuz eden ortamın özgül kapasitesi

3.10. İn-vitro DeneYlerinde Kullanılan Nanopartikül Çözeltilerin Hazırlaması ve Seçilen Derişimler

Manyetit nanopartiküllerin sentezinde aglomerasyonunu engellemek için TMAOH kullanılmıştır. Bu bileşenin yüksek toksik etkisinden dolayı, bu nanopartikülün stok çözeltisi TMAOH dan arınması gerekmektedir. Buna göre bu arınma, stok çözeltinin 20000 rpm,15 dk santrifüjlemesi ile mümkün olup çözelti deneylerde kullanmaya uygun görünmektedir. İn-vitro deneylerinde RF dalgaların etkisi ve elde edilen sıcaklık artışlarının değerlerinin kesinleştirmesi için, hazırlanan derişimler benzer çalışmalardaki derişim verilerine yakın olmalıdır. Buna göre, in-vitro deneylerinde hücre hatlarıyla etkileşen nanopartikül çözeltilerin yoğunluğu 30µg/ml, 15µg/ml ve 5µg/ml değerlerde hazırlanmış olup, kullanılmıştır.

3.11. İn-vitro DeneYlerinde RF Uygulanmış Hücre Hatları

3.11.1. Materyaller

3.11.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasallar

Sodyum bikarbonat (Sigma, ABD), Etil alkol (Sigma, ABD), Tripan mavisi (Sigma, ABD), FBS (Fötal sığır serumu, Serva, İsrail), Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, BD., USA), Tripsin/10mM EDTA (Etilendiamintetraasetat) (Sigma, ABD), PBS (fosfat buffer salin) (Sigma, ABD), Etüv (Ultralab U-120), Santrifüj (Ultralab), Manyetik karıştırıcı (Şimşek Labortechnik), Otomatik cell counter (Invitrogen, USA), Laminar akış kabin (Klas II Laminar Flow Cabinet, Labor ildam,Türkiye), UV sterilatör (Phlihips), Karbondioksitli etüv (Nüve, Türkiye), İnvvert mikroskop (Leica, İsverç), Hemasitometre (Bürker hemositometre, Almanya), 96 gözlü hücre kültür kabı (BD, USA), Hücre kültürü flaskları (BD, USA), 0,2 µm filtreler (Sartorius), Santrifüj tüpleri (Nunc,

Almanya), MCF-7 kanser hücre hattı (İnsan göğüs kanser hücresi) Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden, L929 fibroblast hücre hattı (Şap Enstitüsü, Ankara), Mikropipetler (Scaltec, Almanya), Pipetler (Costar steripipette, ABD), Petri kapları (Orange Scientific). Çeşitli cam malzeme ve çeşitli plastik malzeme analitik düzeyde kullanılmıştır.

3.11.2. Metod

3.11.2.1. MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin kültürde çoğaltılması

MCF-7 ve fibroblast hücreleri, %1 penesilin-steptomisin, % 10 FCS içeren DMEM-F12 (L- glutamin içermeyen) besiyerinde, 25' lik flasklarda %5 CO₂ atmosferinde, 37°C' de, karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Yeterli hücre sayısına ulaşınca kadar her iki günde hücrelerin besi ortamları taze besi yeri ile değiştirildi. Dördüncü günde Tripsin-etda kullanılarak pasajlama yapıldı. Dördüncü günün sonunda hücreler hemositometre ile sayılarak toksisite, apoptoz ve nekroz deneylerinde kullanılacak sayıya ulaşıp ulaşılmadığı kontrol edildi.

3.11.2.2. WST metodu ile sitotoksitenin tesbiti

İlk aşamada MCF-7 kanser hücreleri ve fibroblast hücrelerinin 96 vel platelere her bir kuyucuğa 5x10³ hücre düşecek şekilde ekimi yapılmıştır. Vel platelerdeki hücreler belirli bir sayıya ulaştığında AuNPs, Au@SPIONs ve SPIONs nanopartiküllerin her birinden 30,15ve 5µg/ml aynı miktarda ve üç kez tekrarlı hücrelere uygulanarak 4 saat inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak sadece medium hücrelere uygulanmıştır. Süre sonunda hücreler RF(Radyofrekans) cihazına yerleştirilerek 80, 120 ve 180 watt'ta 30 dk. RF dalgaları ile muamele edilmiştir. Süre sonunda hücreler inkübatöre kanularak 12 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. Aynı şekilde hazırlanan, aynı sayıda ve miktarda hücre ve partiküller RF cihazına konmadan inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, RF uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 ve fibroblast hücrelerinin her kuyucuğa 15 µl WST-1 çözültisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu platelerin

absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420-480 nm'de okunmuştur. WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez.

3.11.2.3. İkili boyama metodu ile apoptozun ve nekrozun belirlenmesi

Toksisite çalışmasında olduğu gibi hazırlanan MFC-7 ve fibroblast hücreleri aynı şekilde RF uygulanmış (80, 120ve 180 watt'ta) ve RF uygulanmamış aynı oranlarda nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. Süre sonunda plate tabanından kalkmış hücreleri falkon tüplere toplanarak hücreler santrifüj edilir. Süpernatantı atılır ve üzerlerine ikili boyama solüsyonu RNase (2µl/ml), hoechst 33342 (2µl/ml), propidium iodide (2µl/ml) 106 hücreye 100µl solüsyon konuldu ve 20 dak etüvde inkübe edildi. Lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatılır ve floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Plate tabanında yapışık olan hücrelerin boyanması plate içersinde yapılmıştır. Değerlendirme Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınacaktır ve Apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilecektir. Değerlendirmede normal apoptotik olmayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün değil ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/kuyucuk hücrelere uygulanarak da inceleme yapılacaktır. İkili boyama sonucunda normal ve apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır.

İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iyodid (PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normal de canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere giremez ve bu hücreler PI ile boyanmazlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içersine

girer ve çekirdeği kırmızıya boyar. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülen hücrelerin yüzdesi hesaplanarak nekrotik hücreler belirlenecektir.

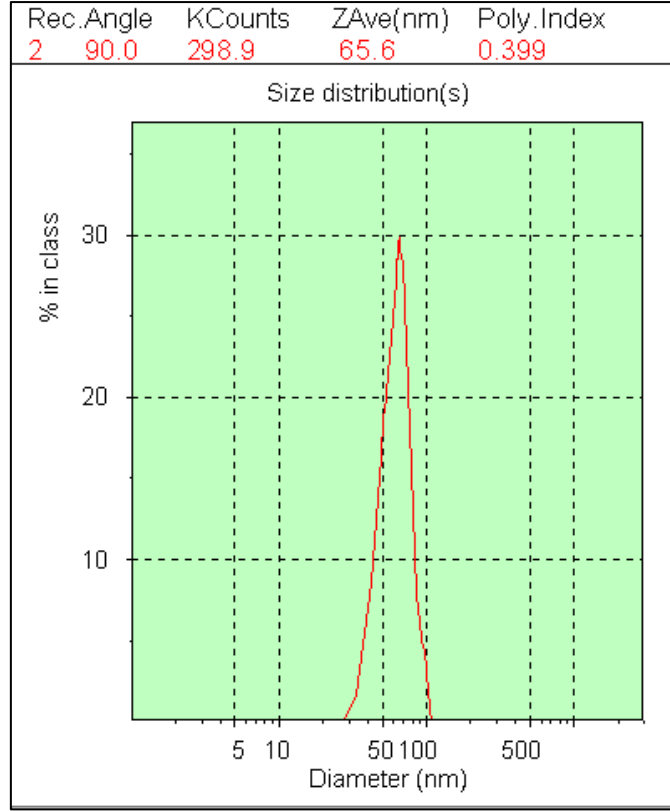
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sunulan tez çalışmalarında geçen bölümlerde belirlenen sentez metoduyla manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Manyetik nanopartikülleri, Zeta-sizer cihazı, TEM görüntüleri ve ondan elde edilen boyut ve boy dağılım grafikleri ile karakterize edilmiştir.

4.1.1. Manyetik nanopartiküllerin Zeta-sizer ile boyut ve boy dağılım grafiği

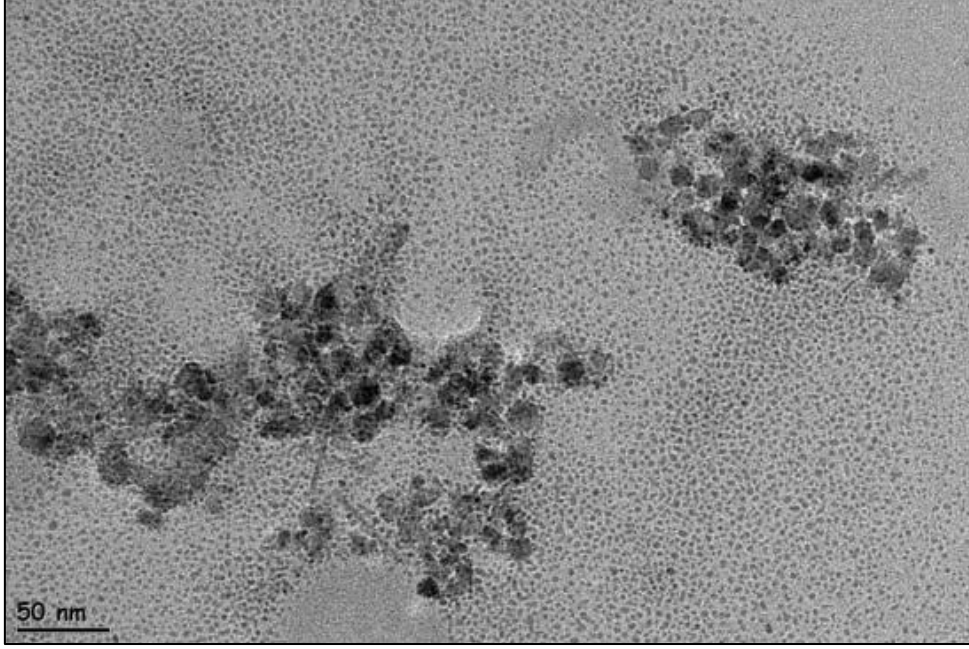
Tez çalışmalarında, Zeta-sizer cihazı (MALVERN, 3000HSA, İngiltere) ile sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyutları ölçülmüş olup, boy dağılım grafiği elde edilmiştir. Şekil 16'de elde edilen grafiğin şeması görünmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, manyetik nanopartiküllerin büyüklüğü 65.6 nm ve boy dağılımının oldukça dar olduğu görülmüştür. Zeta-sizer ile yapılan ölçümlere göre, manyetik nanopartiküller çözeltisini yıkayıp TMAOH'dan arındırılmasına rağmen, etrafında bulunan tabakanın varlığı ile hidrodinamik çap, ölçülen nanopartiküllerin boy ve boy dağılım sonuçlarını etkileyebilmektedir.



Şekil 16 Zeta-sizer cihazından elde edilen manyetit nanopartiküllerin boy ve boy dağılım grafiği

4.1.2. Manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüleri

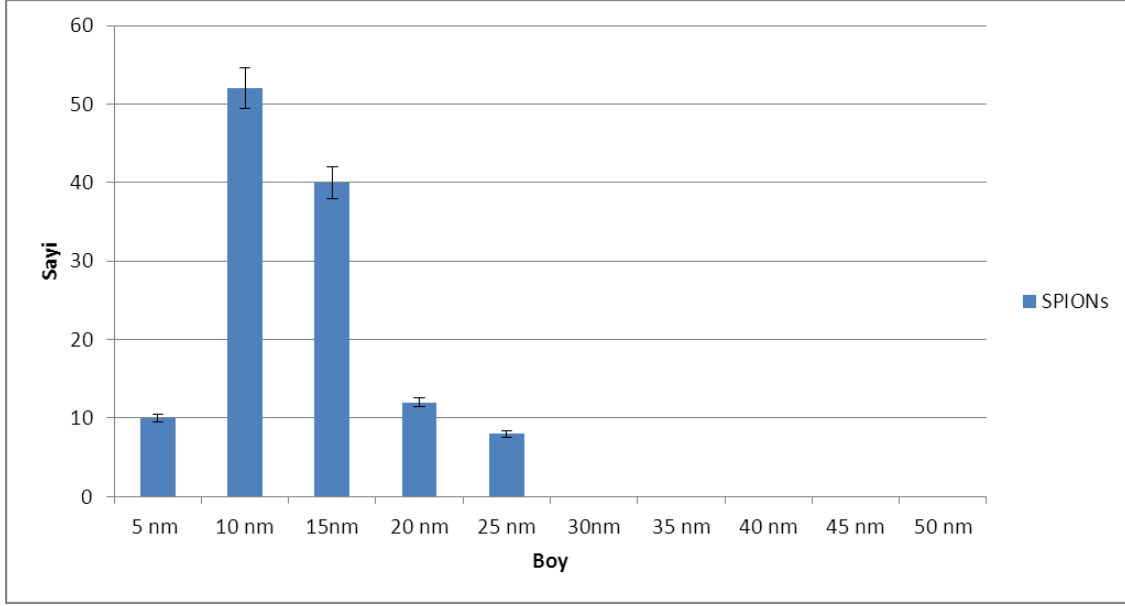
Zeta-sizer cihazın çalışma prensibi olan dinamik ışık saçılması (Dynamic light scattering, DSL) yönteminden kaynaklanan kısıtlamalardan dolayı, partiküllerin gerçek boy dağılımının tespiti için geçirimli elektron mikroskop (Transmission Electron Microscope, TEM) görüntüleri Şekil 17'de açıklandığı üzere kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda yukarıda verilen manyetit nanopartiküllerin görüntüleri ODTÜ merkezi laboratuvarlar biriminde bulunan Jem Jeo (2100 F 200kV HRTEM) cihazı kullanılarak üzere, elde edilmiştir. TEM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre, manyetit nanopartiküllerin boyutları, 10 nm civarında olduğu ispatlanmıştır.



Şekil 17 Manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüsü

4.1.1.1. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsünden elde edilen boyut ve boy dağılım grafiği

Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin, TEM görüntülerinden alınan sonuçlara göre, boy ve boy dağılımları grafiği Şekil 18’ de verilmiştir. Bu yöntem boy ve boyut dağılımları hakkında net sonuçlar vermektedir.



Şekil 18 Manyetit nanopartiküllerin TEM görüntülerinden elde edilen boy dağılım grafiği

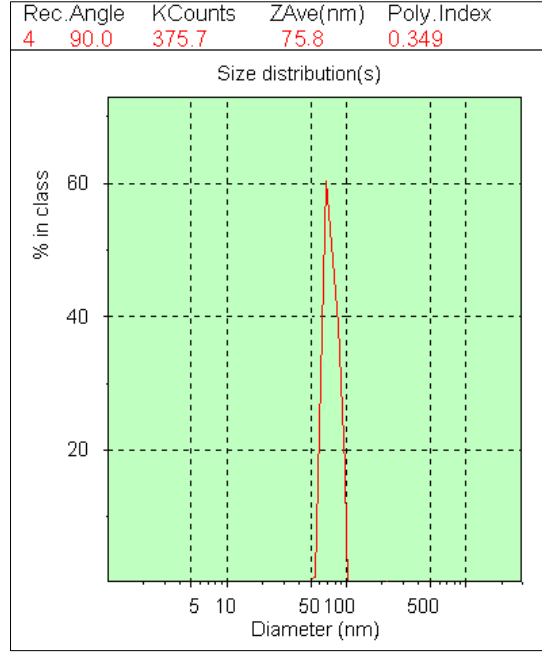
Tem görüntülerine göre sentezlenen manyetit nanopartiküllerin %40' ı, 10 nm boyunda, %30.7' si 15 nm boyundadır. Bu sonuçlara göre toplamda, nanopartiküllerin %71'inin 10-15 nm boyutunda olduğu görülmüştür.

Sonuçlara göre, sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boylarının küçük ve boy dağılımlarının oldukça dar olduğundan dolayı alan/hacim oranının oldukça büyük olduğu söylenebilir. Sözü geçen oranın büyük olması, nanopartiküllerin yüzey aktivitesini artırması nedeniyle bu nanopartiküllerin altın ile kaplama aşamasında yararlı olmaktadır.

4.2. Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Manyetit nanopartiküllerinin boy ve boy dağılım grafikleri altın ile kaplandıktan sonra Zeta-sizer (MALVERN, 3000 HSA- İngiltere) cihazı ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre altın kaplı manyetit nanopartiküllerin Zeta-sizer cihazından elde edilmek üzere boy

değerleri 75.8nm görünmüştür. Şekil 19'de görüleceği gibi, bu nanopartiküllerin boy dağılım grafiği tek ve gayet dar bir pik göstermektedir.



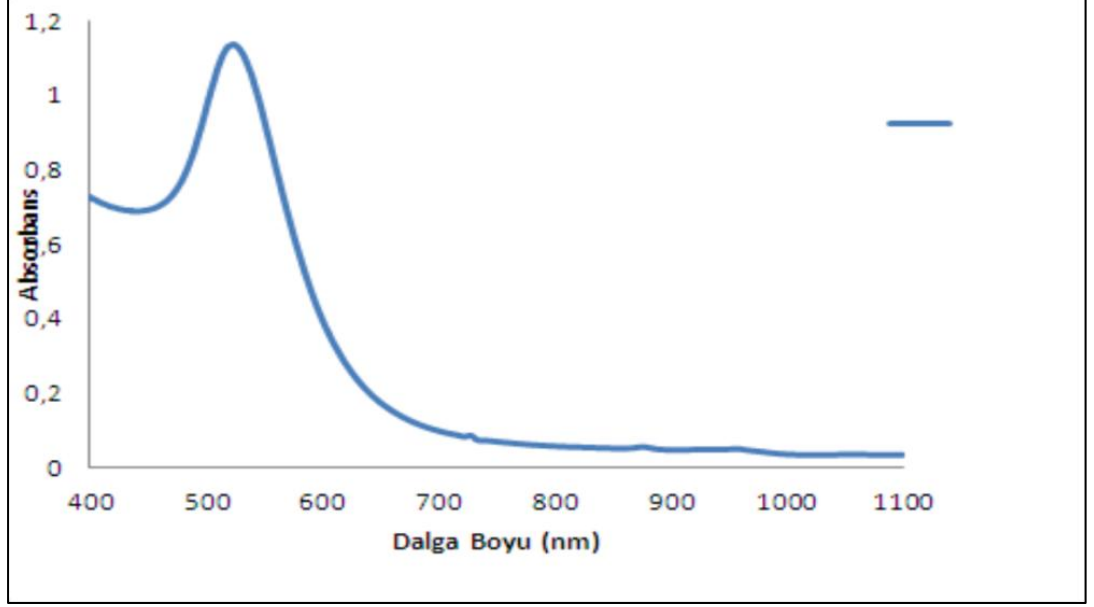
Şekil 19 Zeta-sizer cihazından elde edilen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boy ve boy dağılım grafiği

4.2.1. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin (Au@SPIONs) UV/VIS absorbands değerlerinin incelemesi

Bir önceki aşamadan sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin UV absorbands değerleri, UV MİNİ-1240 SHIMADZU spektrofotometre cihazıyla ölçülmüştür. Altın nanopartikül çözeltisinin 400-1100 nm dalga boyunda yapılan UV/VIS taraması sonucu, Şekil 20'de açıklandığı gibi, sözü geçen nanopartiküllerin absorbands değerleri tek pik şeklinde 532 nm'de ve 1.18 absorbands değerinde görülmüştür.

Elde edilen pik ve absorbands verisinden yararlanarak nanopartikül çözeltisinin derişimi belirlenmiş olup, çözeltinin nanopartikül yoğunluğu, 46.6 ppm tespit edilmiştir.

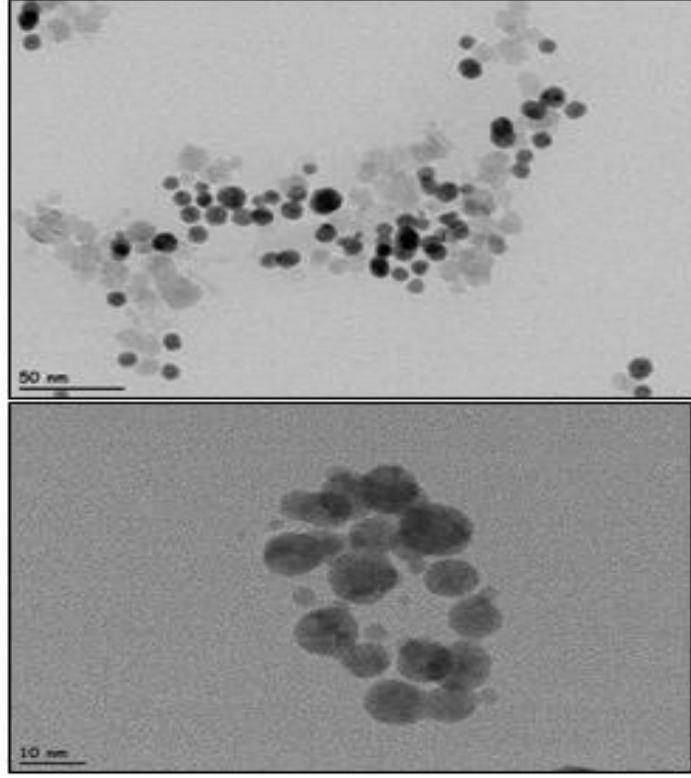
UV/VIS absorbans verilerini kullanarak, nanopartiküllerin tahmini boyunun hesaplanması mümkündür. Buna göre, nanopartiküllerin büyüklüğü, 45nm olarak bulunmuştur.



Şekil 20 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin UV/VIS absorbans verilerinin grafiği

4.2.2. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin gerçek boyut tespiti nedeniyle geçirimli elektron mikroskop kullanılmıştır. Şekil 21'de TEM görüntüsü görünmektedir. Bu görüntüler nanopartiküllerin boyutları hakkında daha kesin değerler verebildiğini ispatlamıştır.



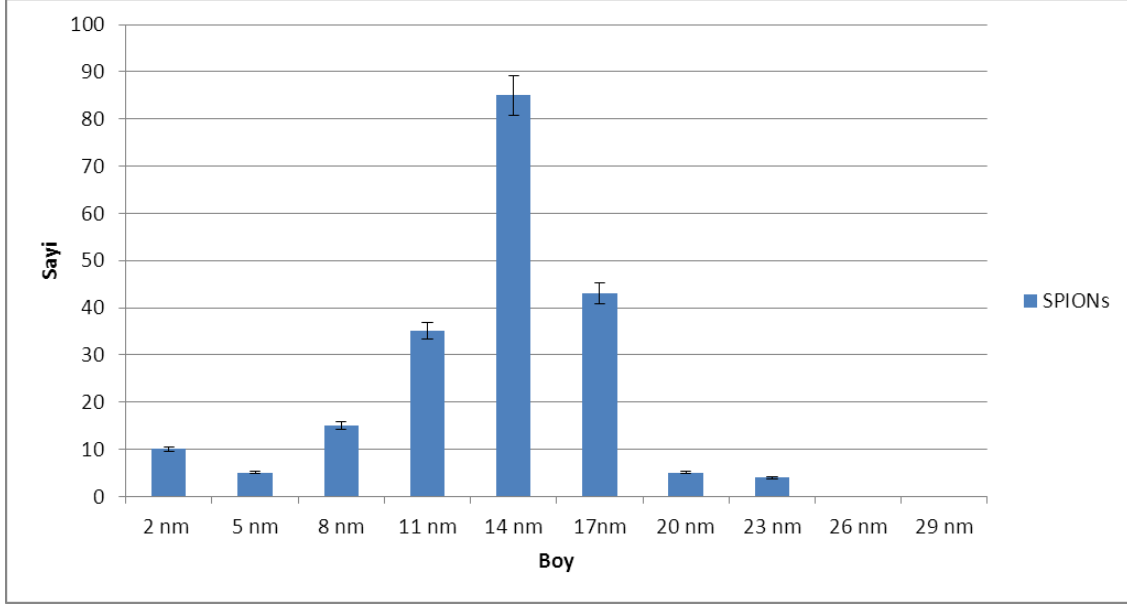
Şekil 21 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüleri

4.2.2.1. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntülerinden elde edilen boy dağılımı grafiği

Bu aşamada, Zeta-sizer cihazı ile boyut belirleme metodundan kaynaklanan kısıtlamalardan dolayı, partiküllerin net boy dağılımı belirlemek için TEM görüntüleri kullanılmış olup nanopartiküllerin boylarına karşılık sayıları hesaplanıp, çizilmiştir. TEM görüntülerine göre, nanopartiküllerin %42'sinin 14 nm ve %21,'inin 17 nm boyunda olduğu belirlenmiştir. TEM görüntüsünden elde edilen değerlere bakıldığında, nanopartiküllerin %88'inin 14-17 nm boyunda görünmüş olup, Şekil 22'de görülmektedir.

Sonuçlar incelendiğinde, sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin küçük boyutta oldukları anlaşılmıştır. Elde edilen nanopartiküllerin küçük olması nanopartiküldeki alan/hacim oranının büyümesini sağlamaktadır. Toplam yüzey

alanının büyük olması, bu nanopartiküller ile RF dalgalarının etkileşimini artırarak, muazzam hipertermi verim göstermiştir.



Şekil 22 TEM görüntülerinden sonuçlanan Au@SPIONs'ların boyutlarına yönelik sayı grafiği

4.3. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

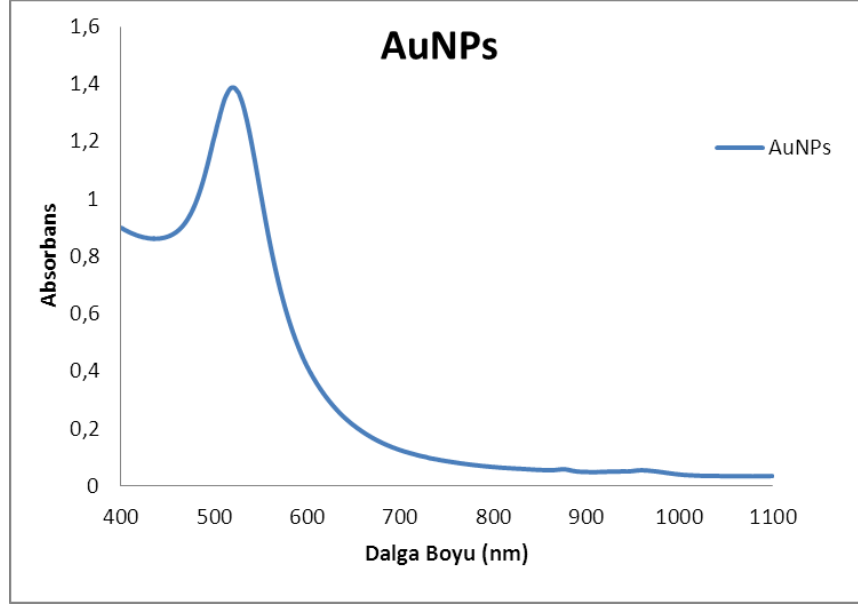
Çalışmaların devamında sentezlenen altın nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları Zeta-sizer, UV/vis spektrofotometre ve sonunda TEM ile karakterize edilmiştir.

4.3.1. Altın nanopartiküllerin UV/VIS absorbands değerleri

UV/vis absorbands değerleri grafiğinde, dalga boyuna karşılık absorbands verileri çizilmiştir. Altın nanopartiküllerin UV/vis spektrasi Şekil 23'de 400-1100 nm dalga boyu aralığı için taranmıştır. Altın nanopartikül çözeltisinin UV spektrofotometre sonuçları değerlendirildiğinde, 527nm'de 1.43 absorbands belirlenmiştir. Elde edilen pik ve absorbands verilerini kullanarak nanopartikül çözeltisinin derişimi elde

edilmektedir. Buna göre altın nanopartikül çözeltinin yoğunluğu 49.2 ppm olarak tespit edilmiştir.

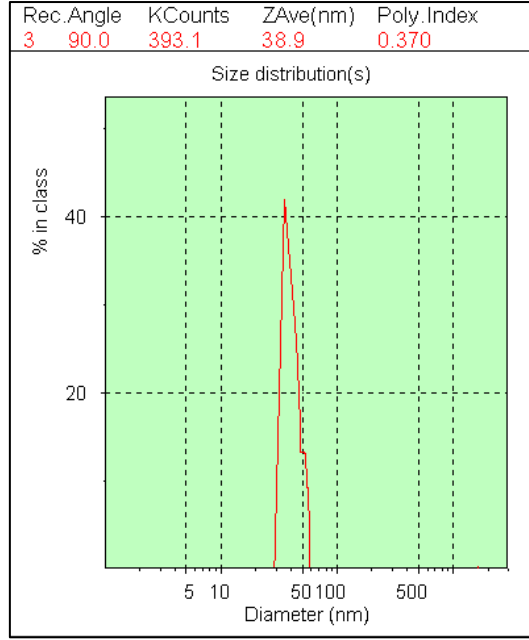
UV spektrumundan elde edilen değerlere göre, nanopartiküllerin boyutlarının 30 nm civarında olduğu hesaplanarak belirlenmiştir.



Şekil 23 Altın nanopartiküllerinin uv/vıs spektrumu

4.3.2. Altın nanopartiküllerin (AuNPs) Zeta-sizer cihazı ile boyut dağılımı incelemesi

Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutları önceki aşamalarda olduğu gibi, Zeta-sizer cihazında ölçülmüştür. Zeta-sizer ile elde edilen sonuçlar Şekil 24' de görülmektedir. Elde edilen grafiğe göre sentezlenen altın nanopartiküllerin boy dağılım grafiği tek ve oldukça dar bir pik elde edilmiştir. Zeta-sizer ile elde edilen sonuçlardan nanopartiküllerin boylarının 38.9 nm olduğu belirlenmiştir.



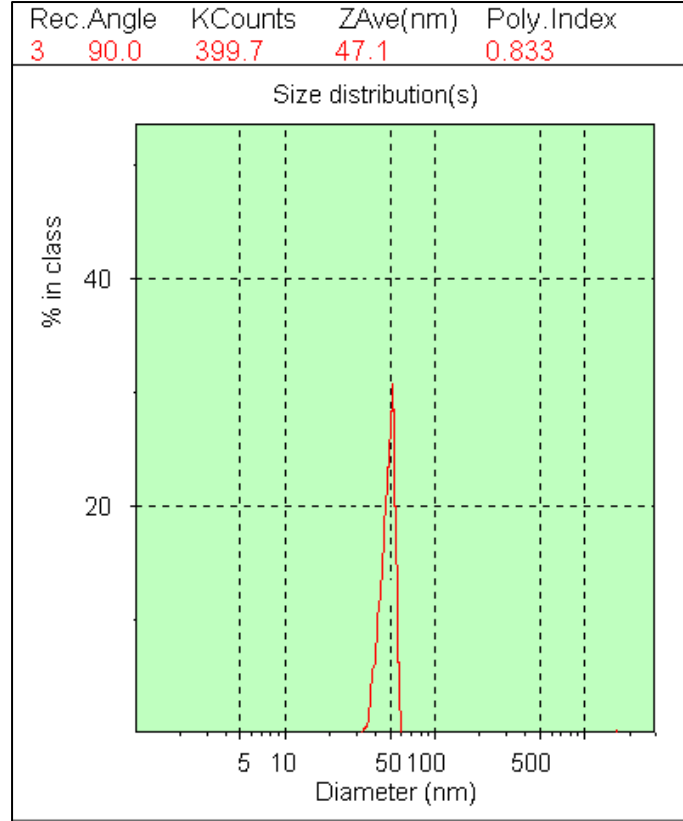
Şekil 24 Altın nanopartiküllerin Zeta-sizer ile elde edilen boy ve boy dağılım sonuçları

4.4. Altın Nanorodların (AuNRs) Karakterizasyonu

Altın nanorodların karakterizasyonu boy ve boy dağılımları ve UV spektrumundan elde edilen verilere göre değerlendirilmiştir. Bunun için, nanorodların boy ve boy dağılım grafiği, Zeta-sizer cihazı ile elde edilmiştir. UV absorbans verileri UV/vis spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir.

4.4.1. Altın nanorodların (AuNRs) Zeta-sizer cihazı ile boyut dağılımı belirlemesi

Zeta-sizer cihazından ölçümler sonucu, elde edilen nanorodların boy ve boy dağılımları Şekil 25'de görülmektedir. Bu sonuçlara göre, sentezlenen nanorodların boyları 47.1 nm elde edilerek belirlenmiştir. İncelenen boy dağılım grafiğine göre, boy dağılım grafiği yeterince dar, tek bir pik vermektedir. Bu grafiğe göre sentezlenen nanorodların boylarının 30-60 nm aralığında olduğu belirlenmiştir.

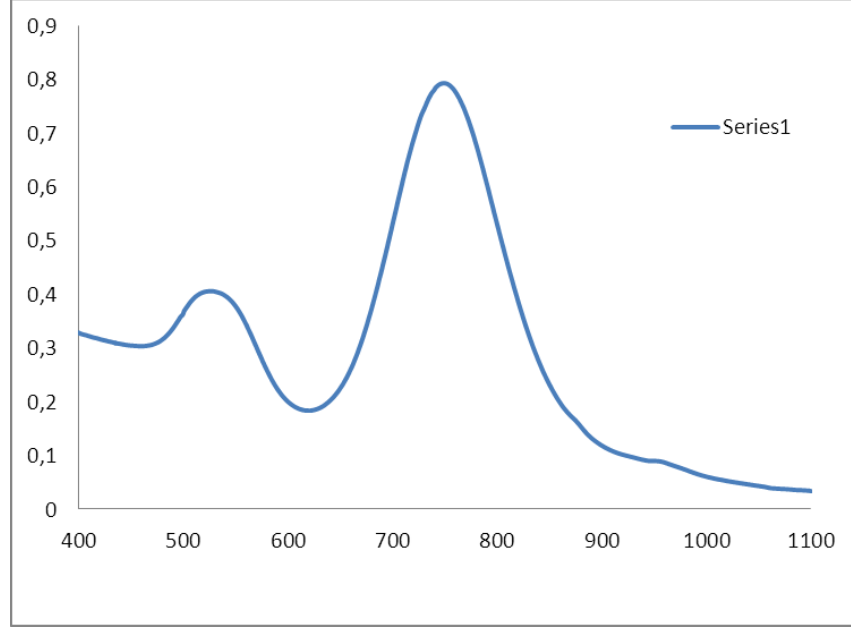


Şekil 25 Zeta-sizer ile altın nanorodların elde edilen boy ve boy dağılım grafiği

4.4.2. Altın nanorodların (AuNRs) UV/VIS spektrasından elde edilen absorbans değerleri

Deneysel çalışmaların önceki aşamalarına benzer, altın nanopartiküllerin UV/vis grafiğinde, dalga boyuna karşılık absorbans değerleri Şekil 26'de 400-1100 nm dalga boyu aralığında taranmıştır. UV spektrometre ile elde edilen sonuçlara bakıldığında birinci pikin 526nm'de, 0.89 absorbans değerinde ve ikinci piki 753nm'de, 1.78 absorbans değerinde olduğu görülmüştür. UV/vis grafiğinden boy/çap verisi (aspect ratio) olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen değerlere göre, sentezlenen nanorodların boyu 86 nm ve çapları 25 nm dir. Nanorodların bu değerlerden sonuçlanan boy/çap

değeri 3.5 olarak belirlenmiştir. Elde edilen pik ve absorbands değerinden yararlanılarak çözeltinin derişimi 80 ppm olarak belirlenmiştir.



Şekil 26 Altın nanorodların UV/VIS absorbands spektrumu

4.5. Endüktif Modüllü RF Dalgaları ile Çeşitli Nanopartiküllerin Etkileşimi ve Sıcaklık Artışının Gözlenmesi

Bu aşamada, sentezlenen nanopartiküllere karşılık, RF dalgalarının etkisi gözlenmiş olup bu etkileşim sonucu çıkan hipertermik sıcaklık artışı incelenmiştir. Bunun için etkili endüktif modüllü RF jeneratörü, 30w güçde ve 13.56 MHz frekansta tasarlanıp yapılmıştır.

Sözü geçen RF dalgaların etkisini izlemek için, bu cihazın son bölümündeki bobin dediğimiz empedans birimi tasarlanıp yapılmıştır. Ancak, tasarlanan bu RF jeneratörü, RF dalgaları oluşturma konusunda olumlu olmadığı için, nanopartiküller ile sıcaklık artışı gözlenmemiştir. Bunun nedeni, RF dalgaların geriye saçılması ve bobinlerin yüzeyinde, enerjilerini ısı şeklinde dönüştürmesidir. Deneyler sırasında, izlenen nanopartiküllerin sıcaklık artışı, sadece bobin yüzeyindeki ısı enerjisinin

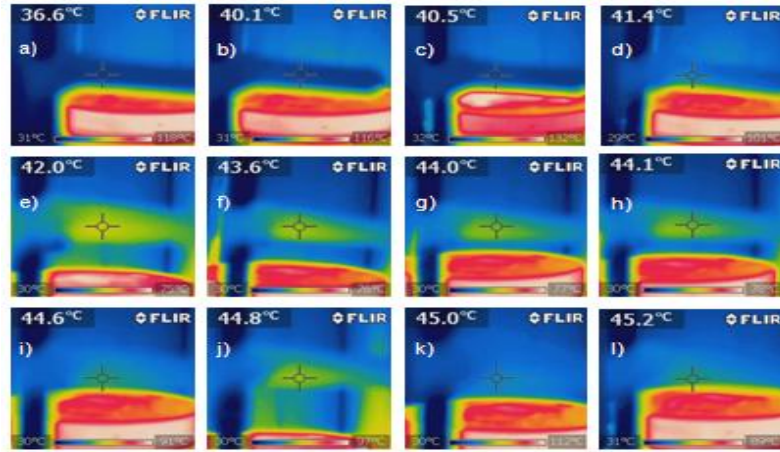
nanopartiküllere yansıma sonucudur buna göre bobinlerin ısısının nanopartikül çözeltilerine aktarımının engellemesi önem arz eder.

4.6. RF Uygulanan Çeşitli Nanopartiküllerin Sıcaklık Artışı İncelemesi ve Sonuçların Tartışılması

Bu aşamada RF dalgaların farklı güçleri, nanopartikül stok çözeltilerinin ile etkileştirilmiştir. Buna göre, belli zaman aralığında, sıcaklık artışı gözlenip, sonuçlar termal kamerayla gözlenmiştir.

4.7. 46µg/ml Derişimdeki Altın Kaplı Manyetit Nanopartikül Çözeltilisine RF uygulaması ve Sıcaklık Artışının Gözlenmesi

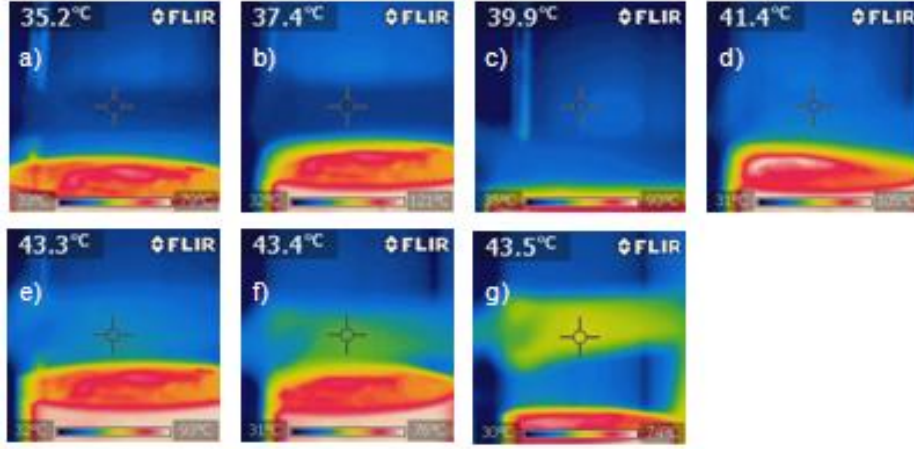
46µg/ml derişimde olan altın kaplı manyetit nanopartikül çözeltilisine 120 watt gücünde RF uygulanarak, hipertermik sıcaklık artışı termal kamerayla görülmüş olup, Şekil 27' de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek sıcaklık 45.2 °C görünmüştür.



Şekil 27 RF uygulanmış altın kaplı manyetit nanopartiküllerin sıcaklık artışı ve termal kamera ile görüntüleri (46µg/ml Au@SPIONs çözelti, 120 watt RF gücü) a) 1dk b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk i) 40dk j) 45dk l) 50dk

4.8. 49µg/ml Derişimdeki Altın Nanopartikül Çözeltinin RF Uygulaması ve Elde Edilen Sıcaklık Artışının İncelenmesi

Sentezlenen altın nanopartiküllerin RF dalgalarıyla etkileşimi ve meydana gelen sıcaklık artışı termal kamerayla Şekil 28'de belirlendiği gibi görüntülenmiştir. 49µg/ml derişimli altın nanopartikül çözeltisi, 120 watt gücünde anten modüllü RF ile etkileşmiştir. 120 watt'lık RF uygulanmış altın nanopartikül çözeltisinin sıcaklık artışı, 1-30 dk zaman aralığında termal kamerayla görüntülenmiş, Şekil 28'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek sıcaklık 43.5 °C elde edilmiştir.



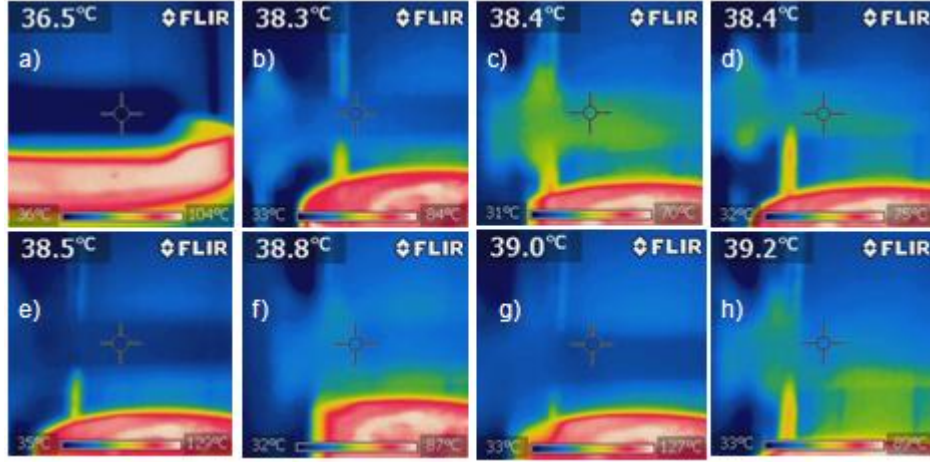
Şekil 28 120 watt gücünde RF uygulanmış 49 µg/ml yoğunluğundaki altın nanopartikül çözeltisinin termal kamerayla elde edilen sıcaklık artış görüntüleri a)1 dk. b) 5 dk c) 10dk d)15 dk e) 20 dk f) 25 dk g) 30 dk

4.9. 120 Watt Gücünde RF Uygulanmış 80 µg/ml Derişimli Altın Nanorod Çözeltinin Sıcaklık Artışı İncelenmesi

Bu aşamada, altın nanorod çözeltisine, RF uygulanarak, sıcaklık artışı görüntüleri termal kamerayla Şekil 29'de açıklanıldığı şekliyle görüntülenip incelenmiştir. Sentezlenen altın nanorod stok çözeltisi 80 µg/ml altın nanorodların RF dalgalarıyla

etkileşiminden sonuçlanan sıcaklık artışı, 1-30 dk zaman aralığında termal kamerayla görüntülenip 39.2 °C elde edilmiştir.

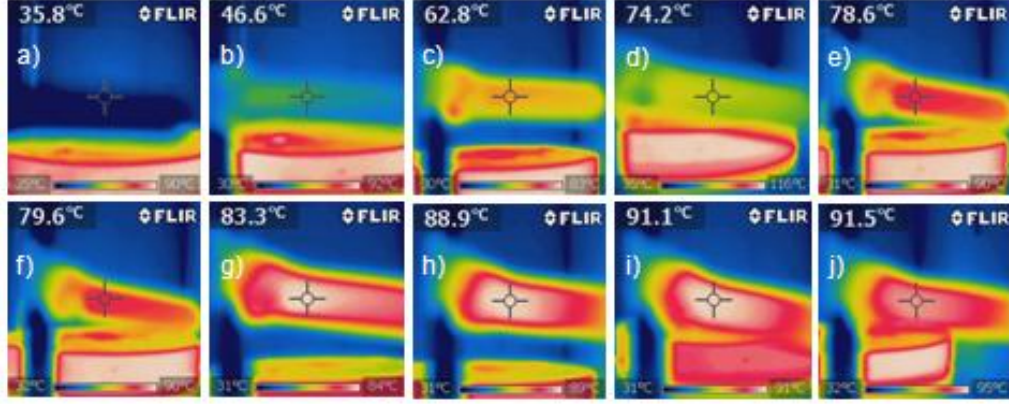
Sıcaklık artışına göre, nanorod çözeltisi, çok az miktarda ısındığı için deneylerin in-vitro aşamalarında kullanılmamıştır.



Şekil 29 80 µg/ml yoğunluğundaki olan AuNRs çözeltisi ile 120w'lık RF uygulaması ardından sıcaklık artışı incelenmesi a) 1dk. b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk

4.10. 6400 µg/ml derişimde olan Manyetit Nanopartiküllerin RF Uygulaması ve Sıcaklık Değerlerinin İncelenmesi

DeneySEL çalışmaların ardından, 120 watt RF dalgaları sentezlenen manyetit nanopartiküllerin 6400 µg/ml' lik stok çözeltisine uygulanarak sıcaklık artışı 1-30 dk zaman aralıklarında Şekil 30' de belirtildiği şekliyle termal kamera ile görüntülenip kaydedilmiştir.



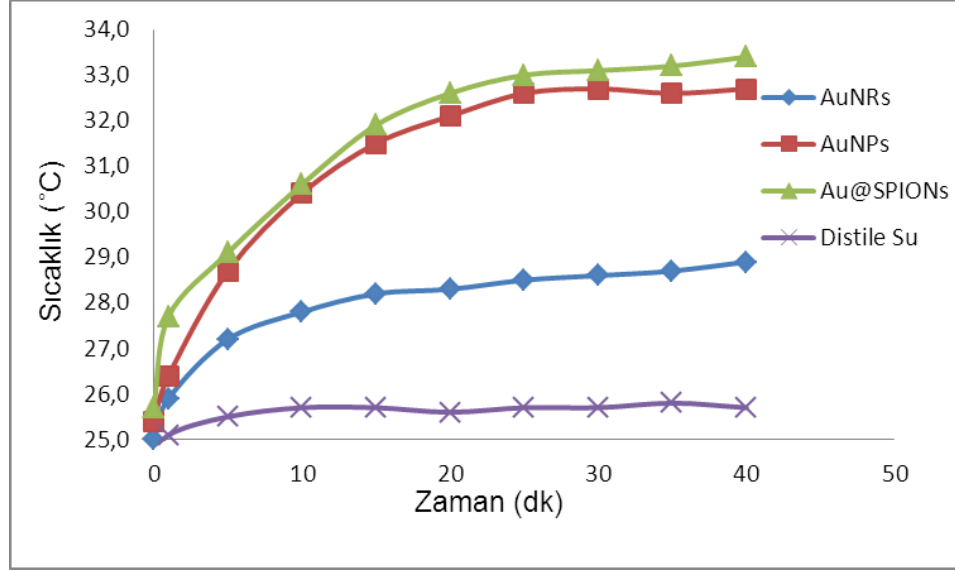
Şekil 30 120 watt gücünde RF uygulanmış 6400 µg/ml yoğunluğundaki manyetit nanopartikül çözeltisinin termal kamera ile sıcaklık artışı görüntüleri a) 1dk b) 5dk c) 10dk d)15dk e) 20dk f) 25dk g) 30dk h) 35dk i) 40dk j) 45dk

4.11. Farklı Nanopartikül Stok Çözeltilerinin Anten Modüllü RF Dalgaları ile Etkileşimi ve Sıcaklık Analizi

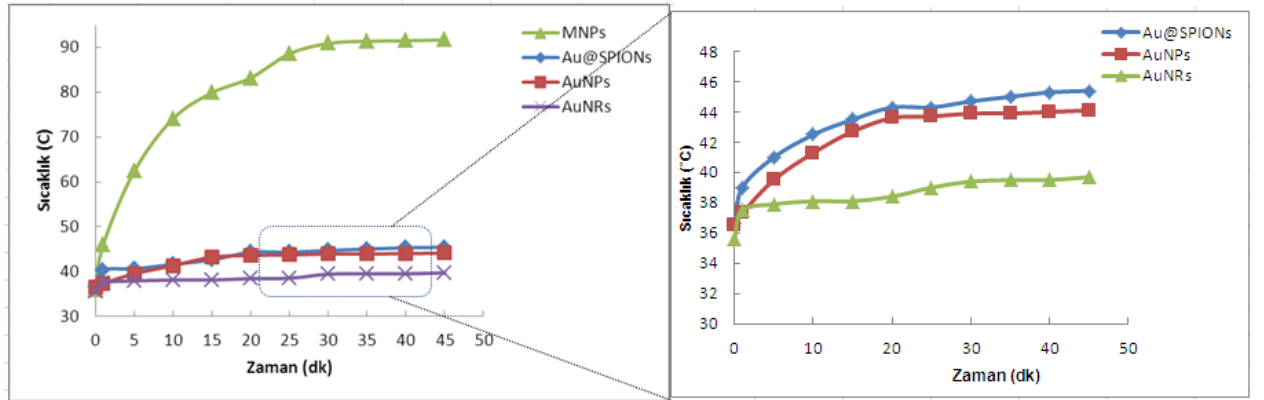
Tezin bu aşamasında sentezlenen çeşitli nanopartiküllerin farklı konsantrasyondaki (30µg/ml, 15µg/ml ve 5µg/ml) çözeltileri hazırlanıp, farklı RF (80w, 120w ve 180w) dalgaları uygulanarak sıcaklık artışı değerlendirilmiştir. Yukarıdaki bölümlerde sentezlenen nanopartiküllerin stok çözeltilerinin örneğin AuNPs için 49µg/ml, Au@SPIONs için 46µg/ml, SPIONs için 6400µg/ml ve AuNRs için 80µg/ml, 120w RF uygulaması incelenmiştir. Bu aşamada, canlı biyolojik ortamı simüle etmek amacıyla, 37°C de bir sıcak kabin model tasarlanıp yapılmıştır.

Hatırlatmakta yarar var, kızılötesi termal kameranın ölçtüğü sıcaklıklar, kullanılan Eppendorflerin dış sıcaklık değerleridir. Bunun nedeni kapların Polipropilen cinsinden oldukları ve yalıtıklık özelliğini taşımalarıdır. Bu sebepten içindeki çözeltinin sıcaklığı 2°C fark göstermektedir (çözelti sıcaklığı 2°C fazla olmalıdır)(Şekil 31).

Kullanılan termal kamera sabit yerde ayarlanamadığı için Eppendorf'ün iç sıcaklığı ölçülememektedir.



Şekil 31 Nanopartikül çözeltilerin RF uygulaması ve sıcaklık artışının incelenmesi



Şekil 32 Stok nanopartiküllerin 120w RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışının incelenmesi

Şekil 32, incelendiğinde stok manyetit nanopartikül çözeltisini yüksek yoğunluğundan dolayı (6400µg/ml), diğer taraftan bu nanopartikülün boyunun küçük olması bu nanopartikül çözeltisinde sıcaklık artışının 91.7 °C olmasına sebep olmuştur. Altın kaplı nanopartiküller ise düşük yoğunlukları ve altın kaplamadan kaynaklanan nedenle partikül boyutlarının büyümesine bağlı 45dk sonunda 45 °C' ye ulaşmıştır.

Aynı grafikten altın içeren nanopartiküller ise aynı süre içerisinde 43°C ye kadar sıcaklık artışı gözlenmiştir. Verilen bu üç çeşit nanopartikülün sonraki aşamalarda kullanımı uygun görülmüştür. Altın nanorodlarda ise çok fazla sıcaklık artışı izlenmemiş ve 45 dk sonunda 2-3 °C sıcaklık artışıyla ancak 39.7 °C'ye ulaşmıştır. Altın nanorodların çubuk şeklinde olmaları ve boylarının uzun olması nedeniyle nanorodların komşu nanoparçacığa çakışmasının engellenmesi buna sebep olarak gösterilebilir. Bundan dolayı sonraki deneysel çalışmalarda belirtilen sebeplerden, altın nanorodların sıcaklık artışı ve hipertermi oluşturma mekanizmasına olan etkisi incelenmeyecektir. Sonuçlara göre SAR mekanizmasında olan önemli faktörlerden nanopartikül yoğunluğu (parçacık sayısı) ve çözeltideki nanoparçacıkların şekli, cinsi ve boyutu ile nanoparçacıkları taşıyan çözeltinin dielektrik ve iletkenlik faktörü RF dalgalarının absorplama kuvvetinde etkili olduğu görülmektedir. SAR'da RF dalgaların gücü ve nanoparçacıkları taşıyan çözeltiden etkili mesafesi bu mekanizmanın oluşmasında önem arzeder.

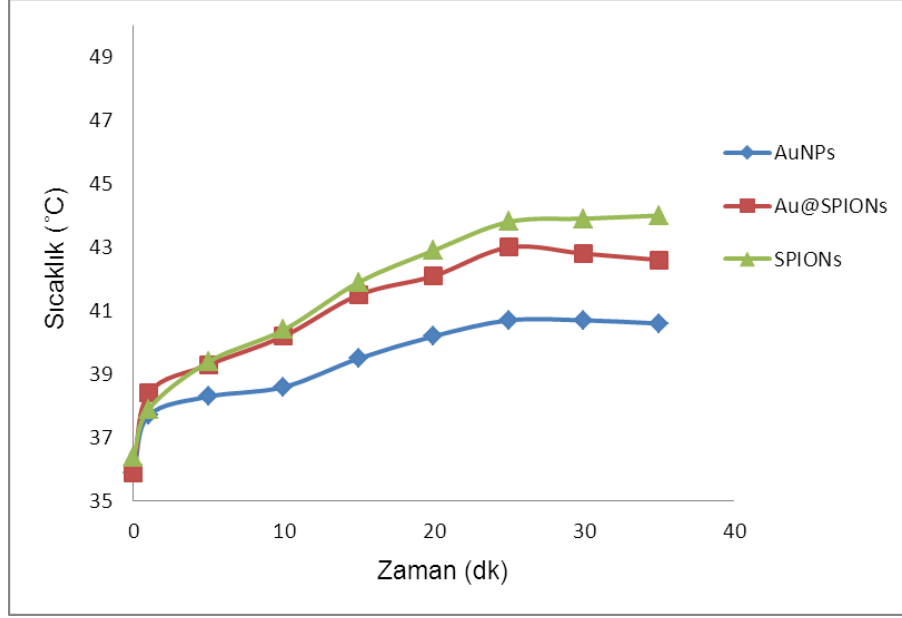
Bu kısımda yapılan denemelerden alınan sonuçlar ışığında altın, altın kaplı manyetit ve manyetit nanopartiküller için eşit derişimlerde çözeltiler hazırlanmış ve çözeltilere farklı RF güçleri uygulanarak zamanla sıcaklıklarındaki artış izlenmiştir. Bu kısımda uygulanan şartlar in-vitro deneylere de aynen uygulanmıştır. Böylelikle RF ile hiperterminin hücre canlılık, apoptoz ve nekrozuna olan etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

4.11.1.1. 30µg/ml yoğunluktaki çeşitli nanopartikül çözeltilere farklı güçlerde RF uygulaması ve sıcaklık değerlendirmesi

Sentezlenen Altın, altın kaplı manyetit ve manyetitler 30 µg/ml yoğunlukta olacak şekilde ayarlanmıştır. 180, 120 ve 80W gücünde anten modülü RF dalgaları her bir nanopartikül çözeltilerine ayrı ayrı uygulanarak, sıcaklık değişimlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 33, Şekil 34 ve Şekil 35 'de sunulmuştur.

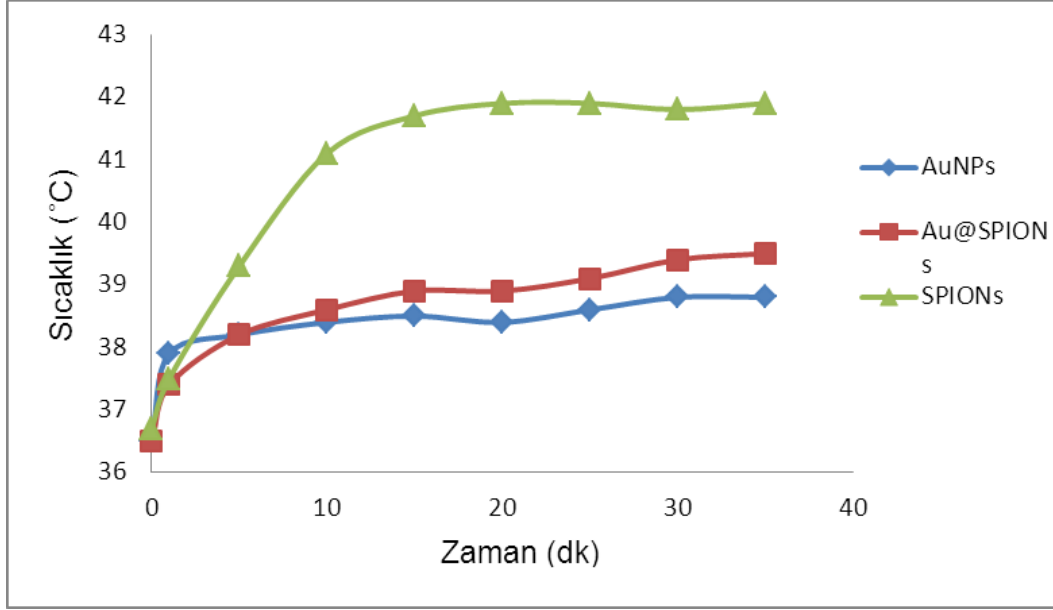
Nanopartikül çözeltilerinin 30µg/ml yoğunlukta ve 180W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 33'de sunulmuştur. Buna göre 30dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının süperparamanyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Bunu

altın kaplı manyetit izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 35dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 40.6°C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 42.6°C ve manyetit nanopartiküller için 44°C olarak belirlenmiştir.



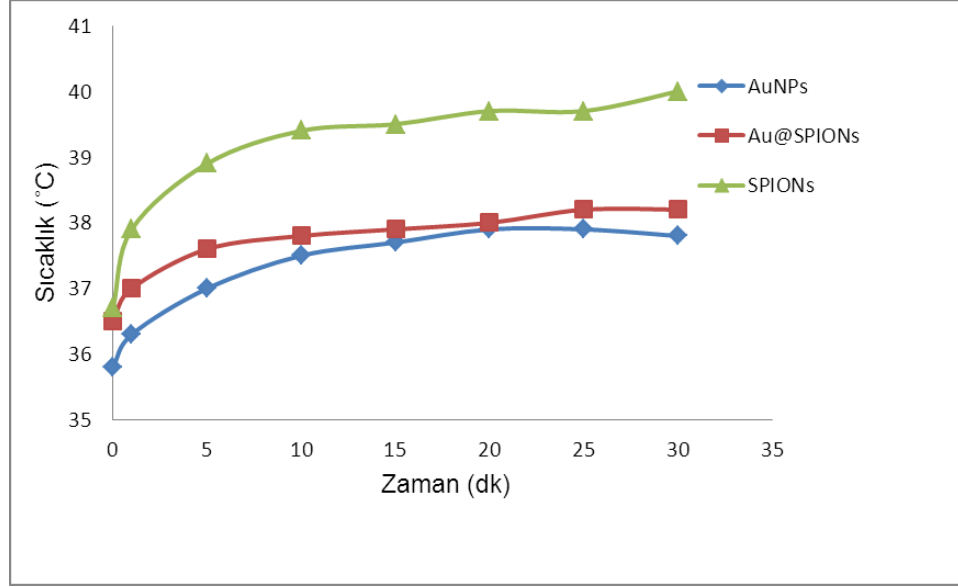
Şekil 33 30µg/ml yoğunlukta olan farklı nanopartiküllerin 180W RF uygulaması ve sıcaklık artışının değerlendirilmesi

Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 34’de sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışı manyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Bunu altın kaplı manyetit izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 35 dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 38.8 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 39.5 °C ve manyetit nanopartiküller için 41.9 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 34 Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi

Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 80W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 35' de açıklanıldığı şekliyle sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Bunun ardından altın kaplı manyetit görünmektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 30 dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 37.8 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 38.2 °C ve manyetit nanopartiküller için 40 °C olarak belirlenmiştir.



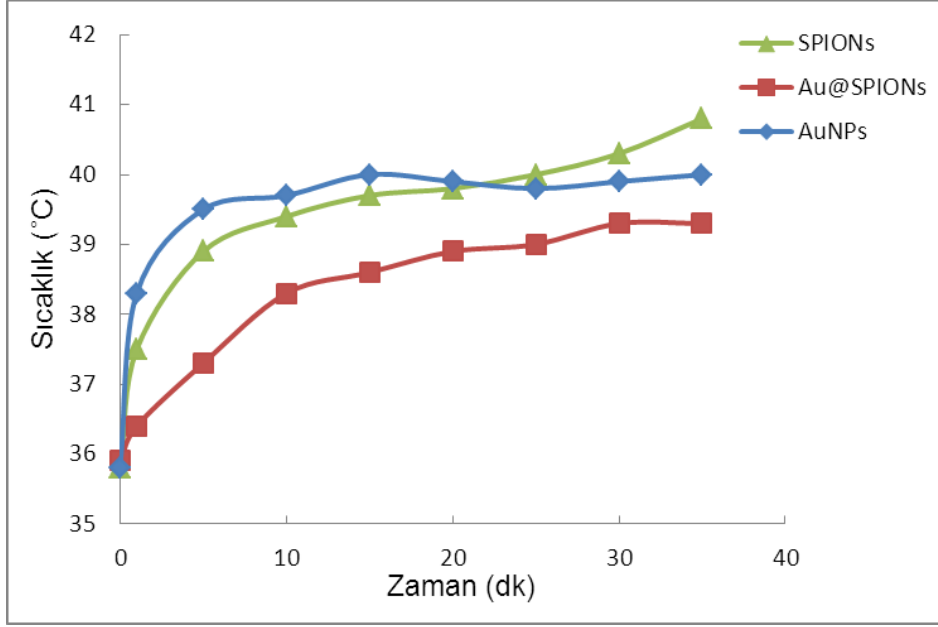
Şekil 35 Nanopartikül çözeltilerin 30 µg/ml yoğunlukta ve 80W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi

Üstteki üçlü grubu (Şekil 33, Şekil 34 ve Şekil 35' de) değerlendirdiğimizde, grafiklerde elde edilen sıcaklık değerlerine göre tüm RF güçlerinde (80, 120, 180 W) ve aynı derişimde (30 µg/ml) manyetit nanopartiküller ile daha yüksek sıcaklıklara çıkılmıştır. RF gücü arttıkça daha yüksek sıcaklık artışı gözlenmiştir. Manyetit nanopartiküllerde en yüksek sıcaklık artışının gözlenmesi manyetit nanopartiküllerin diğer partiküllere göre daha küçük boyda olması ve partikülün doğasına bağlanabilir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerde ise altın kaplanmadan kaynaklı partikül büyümesi ve altın partiküllerin daha düşük oranda hipertermiye neden olmasından dolayı daha düşük hipertermi etkisi ve buna bağlı olarak daha düşük sıcaklık artışı gözlenmiştir. Altın nanopartiküllerde ise en düşük sıcaklık artışı belirlenmiştir. Yukarıda verilen sebepler bu durumu da kapsamaktadır. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar Jule yasasına ve SAR mekanizmasına uyumludur. SAR mekanizmasını anlatan modellerinden olarak, Jule yasasına göre sıcaklık artışı, RF dalgaları taşıyan çözeltideki olan nanopartiküllerin cinsi ve büyüklüğüne bağlı olarak sayılmaktadır.

4.11.1.2. Farklı güçlerdeki anten modüllü RF dalgaları ile 15µg/ml yoğunluktaki çeşitli nanopartikül çözeltilerinin etkileşimi ve sıcaklık analizi

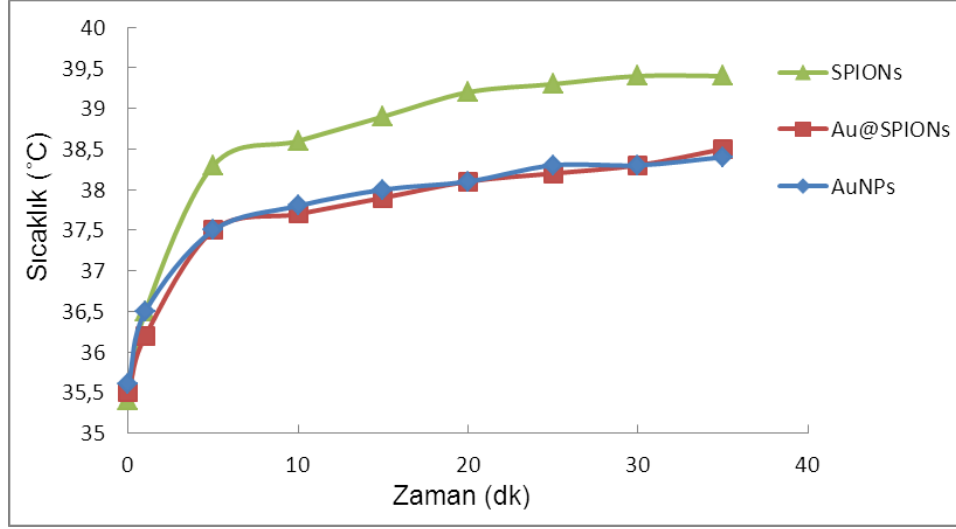
Sentezlenen Altın, altın kaplı manyetit ve manyetitler 15 µg/ml yoğunlukta olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir nanopartikül ayrı ayrı 180, 120 ve 80W gücünde anten modülü kullanılarak elde edilen radyofrekans dalgalarıyla etkileştirilmiş ve sıcaklık değişimlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 36, Şekil 37 ve Şekil 38 'de sunulmuştur

Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 180W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 36'de sunulmuştur. Buna göre 30dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Bunu altın kaplı manyetit nanopartiküller izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 35dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 39.3°C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 40°C ve manyetit nanopartiküller için 40.8°C olarak belirlenmiştir.



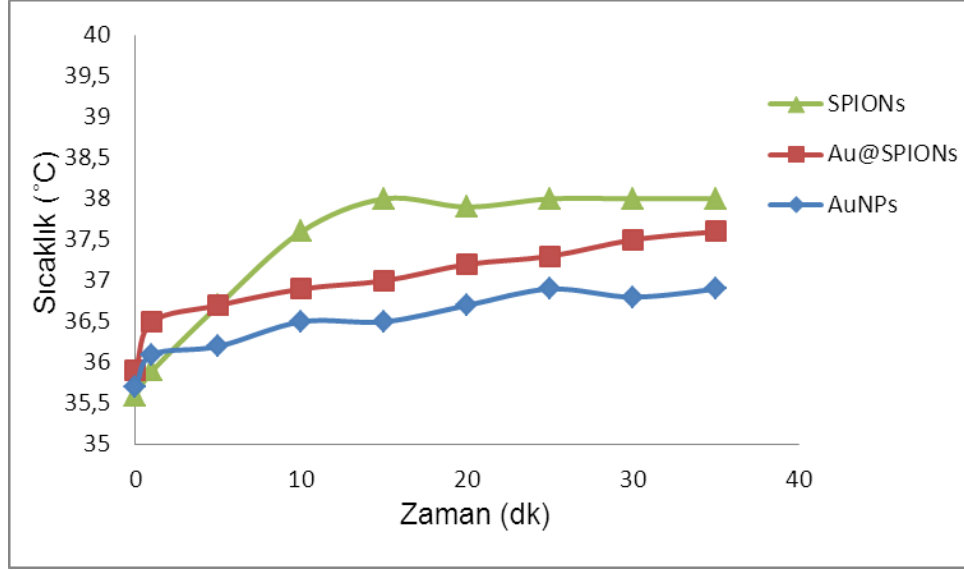
Şekil 36 Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 180W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi

Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 37'de sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Altın kaplı manyetit ve altın nanopartiküllerde birbirine yakın sıcaklık değişimi görülmektedir. 30 dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 38.4°C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 38.5°C ve manyetit nanopartiküller için 39.4°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 37 Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF uygulamasının zamana bağlı sıcaklık artışı

Nanopartikül çözeltilerin 15 µg/ml yoğunlukta ve 80W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 38' de sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Bunu altın kaplı manyetit nanopartiküller izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 30 dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 36.9 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 37.6 °C ve manyetit nanopartiküller için 38 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 38 15 µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 80W gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı

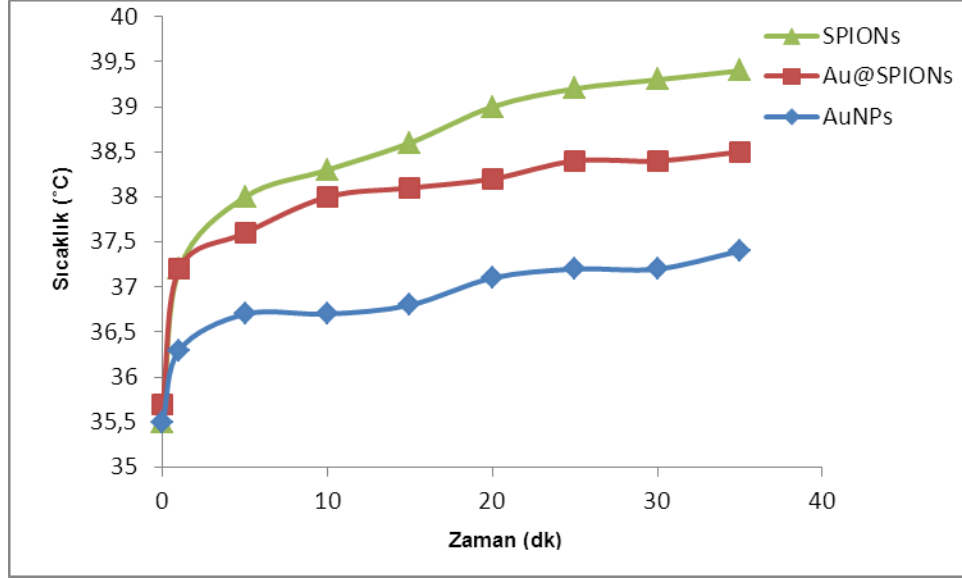
Üstteki üçlü grubu (Şekil 36, Şekil 37 ve Şekil 38’de) değerlendirdiğimizde, grafiklerde elde edilen sıcaklık değerlerine göre tüm RF güçlerinde (80, 120, 180 W) ve aynı derişimde (15 µg/ml) yine de yukarıda sözü geçen ilk grup da olduğu gibi, manyetit nanopartiküller ile daha yüksek sıcaklıklara çıkılmıştır. Ama 15 µg/ml derişimlerde olan üçlü grub (80, 120, 180W) çözeltilerin sıcaklık artışları, 30 µg/ml derişimlerde olan çözeltilerin sıcaklık değerleriyle karşılaştırıldığında daha düşük değerlere sahipler. Buda Jule modeli ile uyum sağlamaktadır. Bu modelde çözeltideki nanopartikül sayısının azalması, sıcaklık artışının azalmasına neden olmaktadır. Bu ikinci üçlü grup da “(15 µg/ml)” da radyofrekans gücü arttığında hipertermi etkisinin yükselmesi ve buna bağlı sıcaklık artışının yükselmesi görülmektedir. Bu grupta en yüksek artış önceki sonuçlar gibi manyetit nanopartiküllere aittir. Manyetit nanopartiküllerde en yüksek sıcaklık artışının gözlenmesi manyetit nanopartiküllerin diğer partiküllere göre daha küçük boyda olması ve partikülün doğasına bağlanabilir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerde ise daha önceki bölümde söylendiği gibi, altın kaplanmadan kaynaklı partikül büyümesi ve altın partiküllerin daha düşük oranda hipertermiye neden olması ve bundan dolayı daha düşük sıcaklık artışı gözlenmiştir.

Altın nanopartiküllerde ise en düşük sıcaklık artışı belirlenmiştir. Yukarıda verilen sebebler bu kısım içinde geçerlidir. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar Jule yasası ve SAR mekanizmasına uyumludur. SAR mekanizmasını anlatan modellerinden olarak, Jule yasasına göre sıcaklık artışı, RF uygulanan nanopartiküllerin cinsine, büyüklüğüne ve nanopartikül sayısına (yoğunluğuna) orantısı olarak sayılmaktadır.

4.11.1.3. Farklı güçlerdeki anten modüllü RF dalgaları ile 5µg/ml derişimli nanopartikül çözeltilerinin etkileşimi ve sıcaklık artışlarının değerlendirilmesi

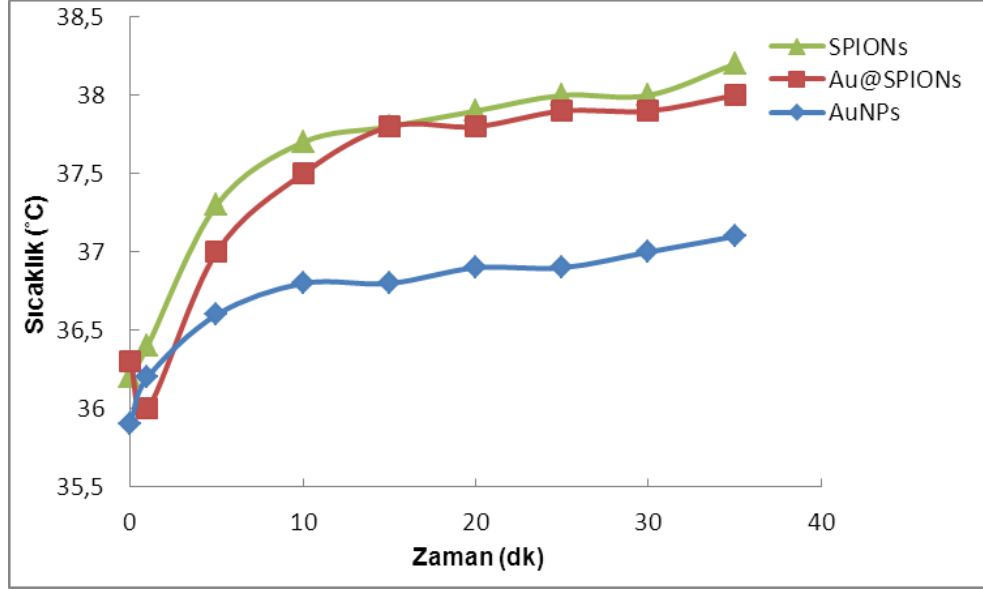
Elde edilen manyetit, altın kaplı manyetit ve altın nanopartikülleri 5 µg/ml yoğunlukta olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir nanopartikül ayrı ayrı 180, 120 ve 80W gücünde anten modülü kullanılarak elde edilen radyo frekans dalgalarıyla etkileştirilmiş ve sıcaklık değişimlerinden elde edilen sonuçlar (Şekil 39, Şekil 40 ve Şekil 41'de) belirtildiği gibi sunulmuştur.

Nanopartikül çözeltilerin 5 µg/ml yoğunlukta ve 180W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 39' da sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllere ait olduğu belirlenmiştir. Bunu altın kaplı manyetit nanopartiküller izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 30dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 37.4 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 38.5 °C ve manyetit nanopartiküller için 39.4 °C olarak belirlenmiştir.



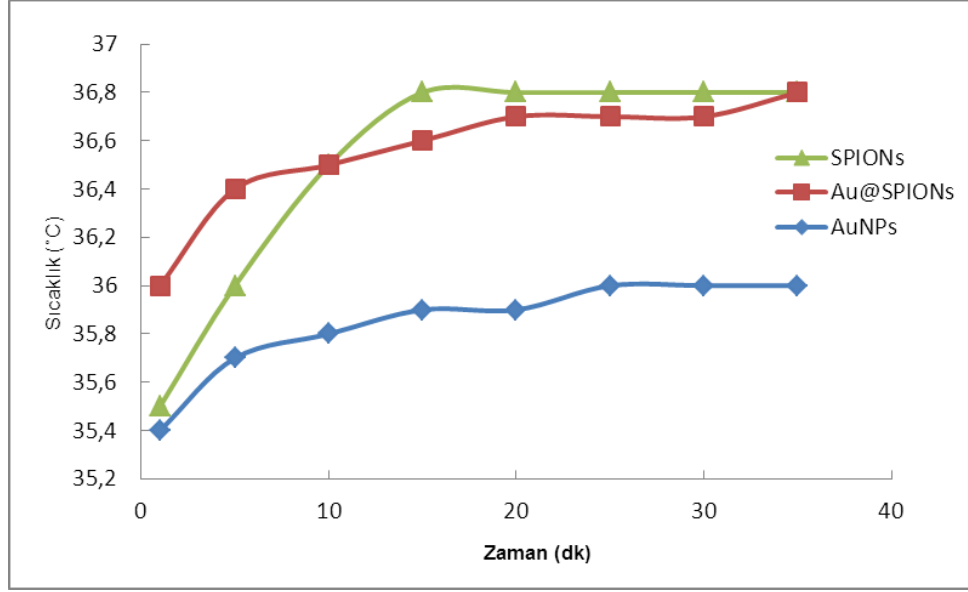
Şekil 39 5 µg/ml derişimideki nanopartikül çözeltilerinin 180W gücünde RF uygulaması ve zamana bağılı sıcaklık artışı

Nanopartikül çözeltilerin 5 µg/ml yoğunlukta ve 120W RF gücünde sıcaklığının zamanla değişimi Şekil 40' de sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetit nanopartiküllerde görünmüştür. Bunu altın manyetit nanopartiküller izlemektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 30 dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 37.1 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 38 °C ve manyetit nanopartiküller için 38.2 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 40 5µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 120w gücünde RF uygulaması ve zamana bağılı sıcaklık artışı

Nanopartikül çözeltilerin 5 µg/ml yoğunlukta ve 80W RF gücünde sıcaklığın zamanla değişimi Şekil 41’de sunulmuştur. Buna göre 30 dk sonunda en yüksek sıcaklık artışının manyetik nanopartiküllere ve altın nanopartiküllere ait olduğu görülmüştür. Sıcaklık artış değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir. En düşük sıcaklık artışı altın nanopartiküllerde olmuştur. 30dk sonunda elde edilen sıcaklık değerleri altın nanopartiküller için 36 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküller için 36.8 °C ve manyetit nanopartiküller için 36.8 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 41 5 µg/ml derişimdeki nanopartikül çözeltilerinin 80W gücünde RF uygulaması ve zamana bağlı sıcaklık artışı

Sonuçlardan anlaşılacağı üzere manyetit nanopartiküllerin belirlenen frekanslarda RF dalgaların enerjisini daha iyi absorbe etme potansiyeline sahip olduğu görölmektedir.

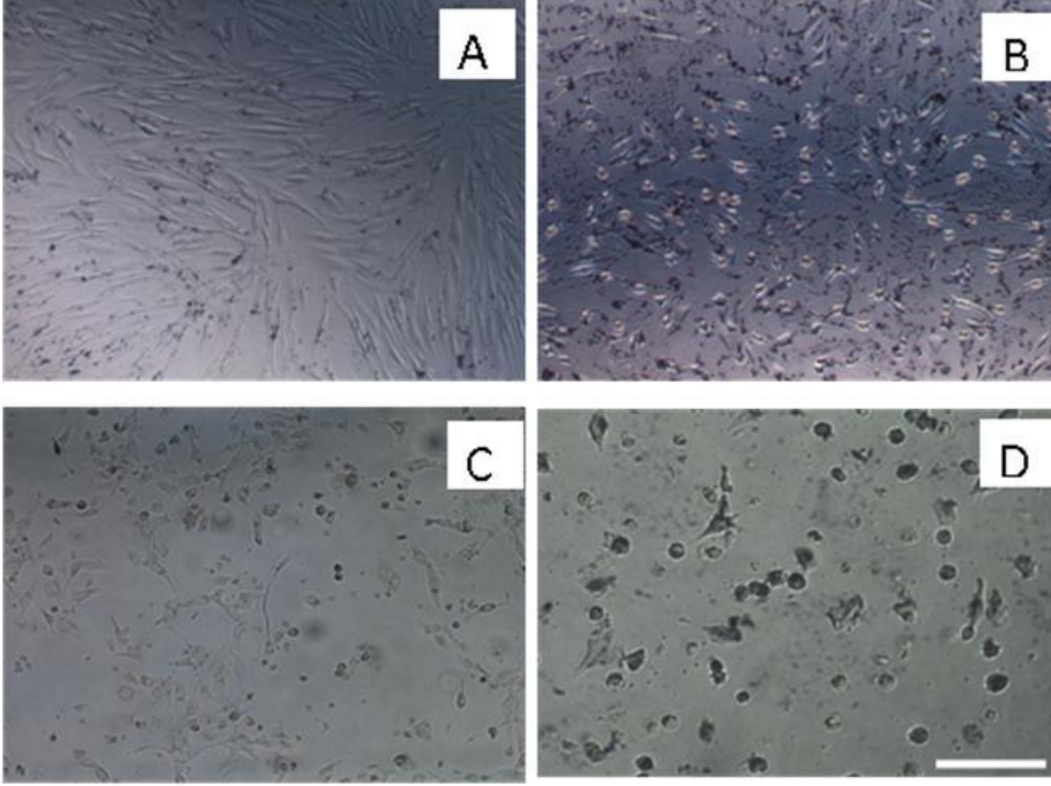
Farklı kategorilerde (RF gücü ve nanopartikül çözeltilinin derişimi yönünden) sonuçlar incelendiği zaman, yüksek RF güçleri, SAR mekanizmasını etkileyerek sıcaklığın artışında daha fazla etki göstermektedir. Sıcaklık değerleri zamana bağlı incelendiğinde, Jule modele neğli olarak, RF gücünün artışıyla sıcaklık artışının yükselmesi beklenilmektedir.

Sıcaklık artışının görölmesi belli nanopartikül, derişim ve RF gücünün artışıyla artmaktadır. Başka değişle, yüksek RF gücünde daha yüksek sıcaklık elde edilirken, düşük RF gücünde daha düşük sıcaklık artışı görölmektedir. SAR mekanizmasındaki, Jule modelini kullandığımızda, bu modelde de nanopartiküllerin sayısı (derişimi), sıcaklığın artışıyla doğru orantı göstermektedir, sonuçlar da bunu desteklemektedir.

4.12. İn-vitro DeneYlerinde RF Uygulanmış Hücre Hatlarının Canlılık, Apoptoz ve Nekroz Sonuçları

4.12.1. Toksosite sonuçları

Yapılan toksisite çalışmasına göre, nanopartiküllerle etkileştirilmiş hücrelerde Au@SPIONs, AuNPs ve SPIONs partiküllerin özellikle 30µg/ml konsantrasyonda hem fibroblast hemde MCF-7 kanser hücrelerine karşı toksik etkileri gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonda bu toksik etkinin azaldığı, 5µg/ml konsantrasyonda ise toksik etkinin önemsiz denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. Partikül içermeyen kontrol grupları RF dalgaları ile muamele edildiğinde yüksek olmasa da toksistenin olduğu, hücre bölünmesinin yavaşladığı gözlenmiştir. RF uygulanmamış kontrol gruplarında hücrelerin çoğalarak plate'i kapladığı gözlenirken RF uygulanmışlarda hücrelerdeki sayıca artışın azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 42 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin ışık mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, B) RF uygulanmış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, C) RF uygulanmamış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15 µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri. Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200 µm.

RF uygulanmadan sadece nanopartiküller fibroblast hücreleri ile etkileştirildiğinde, en yüksek toksisite 30 µg/ml konsantrasyonda SPIONs partikülleri ile elde edilmiş olup canlılık %69.4 oranındadır (Çizelge 12). Diğer partiküllerin toksik etkileri de bu değerlere yakın elde edilmiştir. Partiküllerle etkileştirilmiş fibroblast hücreleri 80, 120 ve 180 watt'ta RF dalgaları ile muamele edildiğinde toksisitenin %30 civarında arttığı gözlenmiştir. En yüksek toksiste 180 watt'ta 30 µg/ml SPIONs ile hücreler muamele edildiğinde görülmüş olup canlılık oranı %43.52 düşmüştür (Çizelge 9, Çizelge 10,

Çizelge 11, Çizelge 12) görüldüğü gibi farklı watt'larda hücreler nanopartiküllerle muamele edildiğinde özellikle 180 watta ve yüksek partikül konsantrasyonlarında toksistenin artışı gözlenmiştir.

Çizelge 5 WST ile elde edilmiş 80 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin % canlılık oranları

80w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	43.7±1.4	42.1±2.1	39.4±0.6
15	81.6±0.7	78.5±2.4	76.2±1.2
5	93.8±0.8	92.3±3.5	89.8±1.4
0	98±1	98±1	98±1

Çizelge 6 WST ile elde edilmiş 120 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş MCF-7 hücrelerinin % canlılık oranları

120w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	35.3±1.6	32.4±0.4	32.8±1.2
15	76.5±1.3	75.7±0.6	71.4±1.6
5	89.3±2.1	85.6±0.8	82.8±2.4
0	98±1	98±1	98±1

Çizelge 7 WST ile elde edilmiş 180w RF dalgaları ile MCF-7 hücrelerinin etkileşimi ve % canlılık oranları

180w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	25.7±4.7	26.3±2.3	23.6±5.2
15	61.3±3.2	57.8±2.8	53.9±5.8
5	83.4±3.6	82.6±2.1	78.9±2.6
0	98±1	98±1	98±1

Çizelge 8 WST ile elde edilmiş RF uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin nanopartiküllerle etkileşimi ve % canlılık oranları

(RF uygulanmamış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	73.2±1.1	68.7±0.8	65.3±0.7
15	87.8±3.2	80.5±0.6	82.4±0.8
5	96.5±1.2	95.3±1.4	94.9±1.7
0	98±1	98±1	98±1

MCF-7 Hücreleri RF uygulanmamış ortamda partiküllerle etkileştirildiğinde canlılık oranı en düşük % 65.3 oranında elde edilmiş olup her üç partikülün toksitesi birbirine yakındır. MCF-7 hücreleri partiküllerle etkileştirilip farklı watt'larda RF dalgaları ile muamele edildiklerinde toksisitenin artığı gözlenmiştir (Çizelge 5, Çizelge 6, Çizelge 7 ve Çizelge 8). Özellikle yüksek konsantrasyonda partikül içeren plâtelelerde canlılık

oranının % 20 civarında olduğu tesbit edilmiştir (Çizelge 7). Düşük partikül ve düşük watta RF dalgaları ile etkileşim toksik değerlerin düşmesine neden olmuştur. RF dalgaların etkisi iki farklı hücrede karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerinin özellikle yüksek konsantrasyonda daha fazla etkilendiği söylenebilir (Şekil 42B,C).

Çizelge 9 WST ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları

80w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	67.6±1.4	63.4±1.2	62.7±1.4
15	78.3±1.8	76.4±1.4	73.6±2.1
5	88.8±2.2	88.3±0.8	87.2±1.3
0	99±1	99±1	99±1

Çizelge 10 WST ile elde edilmiş 120 watt RF ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları

120w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	59.5±0.6	61.8±1.2	57.4±1.6
15	72.2±1.6	69.7±0.7	65.3±0.7
5	84.8±1.8	89.5±1.5	78.4±1.4
0	99±1	99±1	99±1

Çizelge 11 WST ile elde edilmiş 180 watt RF dalgaları ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları

180w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	49.6±1.2	47.1±0.9	43.5±2.3
15	64.5±1.5	58.6±0.8	56.4±2.6
5	76.7±1.3	74.6±0.6	72.8±1.2
0	99±1	99±1	99±1

Çizelge 12 WST ile elde edilmiş Sadece nanopartiküllerle etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinin % canlılık oranları

(RF uygulanmamış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs % canlılık	Au@SPIONs % canlılık	SPIONs % canlılık
30	70.6±0.8	72.3±0.7	69.4±1.6
15	83.7±1.3	78.9±1.1	77.6±1.4
5	96.2±0.8	94.3±0.6	94.2±1.6
0	99±1	99±1	99±1

4.12.2. Apoptotik ve nekrotik etkisi

Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; bileşiklerin farklı konsantrasyonlarının hepsinde apoptotik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Apoptotik indeks sonuçları (Çizelge 13, Çizelge 14, Çizelge 15, Çizelge 16, Çizelge 17, Çizelge

18, Çizelge 19, Çizelge 20) ve apoptotik hücrelerin floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 43 ve Şekil 44'te verilmiştir. Tabloya bakıldığında nanopartiküllerin apoptotik etkilerinin birbirine yakın ve yüksek apoptotik etkiye neden olduğu görülmektedir.

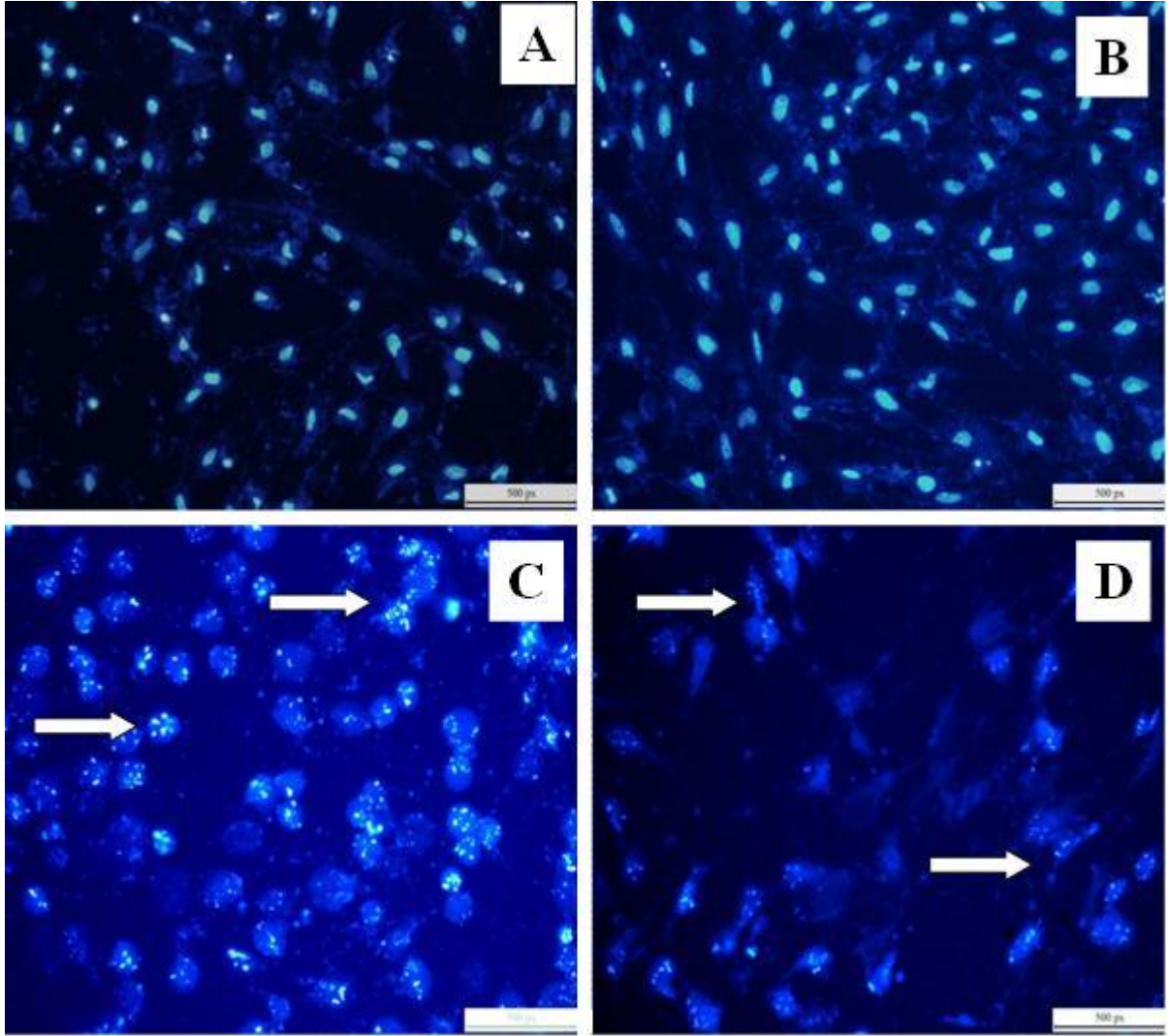
RF uygulamadan sadece partiküllerle fibroblast hücreleri etkileştirildiğinde apoptotik etkinin düşük olduğu, en yüksek %6 oranında SPIONs partiküllerinde elde edilmiştir (Çizelge 20). RF uygulanmamış fibroblast kontrol gruplarında da apoptotik etkinin yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 43 ve Çizelge 20). Fakat partiküllerle muamele edilmiş fibroblast hücrelerine farklı dozlarda RF uygulandığında apoptoz oranında artış gözlenmiştir. Özellikle 120 watta 15µg/ml SPIONs pariküller uygulanmış fibroblastlarda %25 oranında apoptoz elde edilmiştir. Diğer partiküllerden elde edilen oranlarda buna yakındır (Çizelge 18). Yüksek dozlarda RF uygulanmış fibroblast hücrelerinde apoptozun düştüğü nekrozun arttığı gözlenmektedir. Fakat apoptoza giren hücrelerin devamında nekroza uğramaları dolaysı ile apoptotik oranın bu konsantrasyonlarda düşük olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 44B). Partikül içermeyen RF dalgaları ile muamele edilmiş kontrol gruplarında %7 civarında apoptoz gözlenmiş olup buda bize RF dalgaları ile etkileşimin sadece kendisinin bile sağlıklı hücrelerde DNA hasarına neden olabileceğini göstermektedir.

MCF-7 hücreleri sadece partiküller ile etkileştirildiğinde apoptotik oranın yüksek olmadığı ve en yüksek %12 civarında olduğu gözlenmiştir (Şekil 43B, Çizelge 16). Kontrol gruplarında ise bu oranın %2 olduğu gözlenmiştir. Fakat partikül ile etkileştirilmiş RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinde uygulanan watt'a ve partikül konsantrasyonuna göre apoptoz oranlarında artış gözlenmiştir (Çizelge 13, Çizelge 14, Çizelge 15 ve Şekil 43C,D). Yüksek dozlarda partikül içeren MCF-7 hücreleri RF dalgaları ile muamele edildiğinde toksistenin özelliklede 180 watta yüksek olması nedeni ile apoptoz oranı çok yüksek değildir. Fakat 15 µg/ml konsantrasyonda partikül içeren plateler RF dalgaları ile muamele edildiğinde apoptotik etkinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek apoptotik etki 180 watta, 15µg/ml Au@SPIONs veSPIONs nanopartiküllerinde elde edilmiştir. 5 µg/ml konsantrasyonda ise apoptotik etkinin en düşük olduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak optimum partikül konsantrasyonunda RF dalgaları ile etkileşim kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde etkin bir yol

olabileceği tahmin edilmektedir. Sadece RF uygulanmış partikül içermeyen MCF-7 hücrelerinde 180 watta %15 apoptotik indeks elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre partiküllerle muamele edilmiş MCF-7 hücreleri RF dalgaları ile muamele edildiğinde fibroblastlara göre apoptoz oranının arttığı gözlenmiştir.

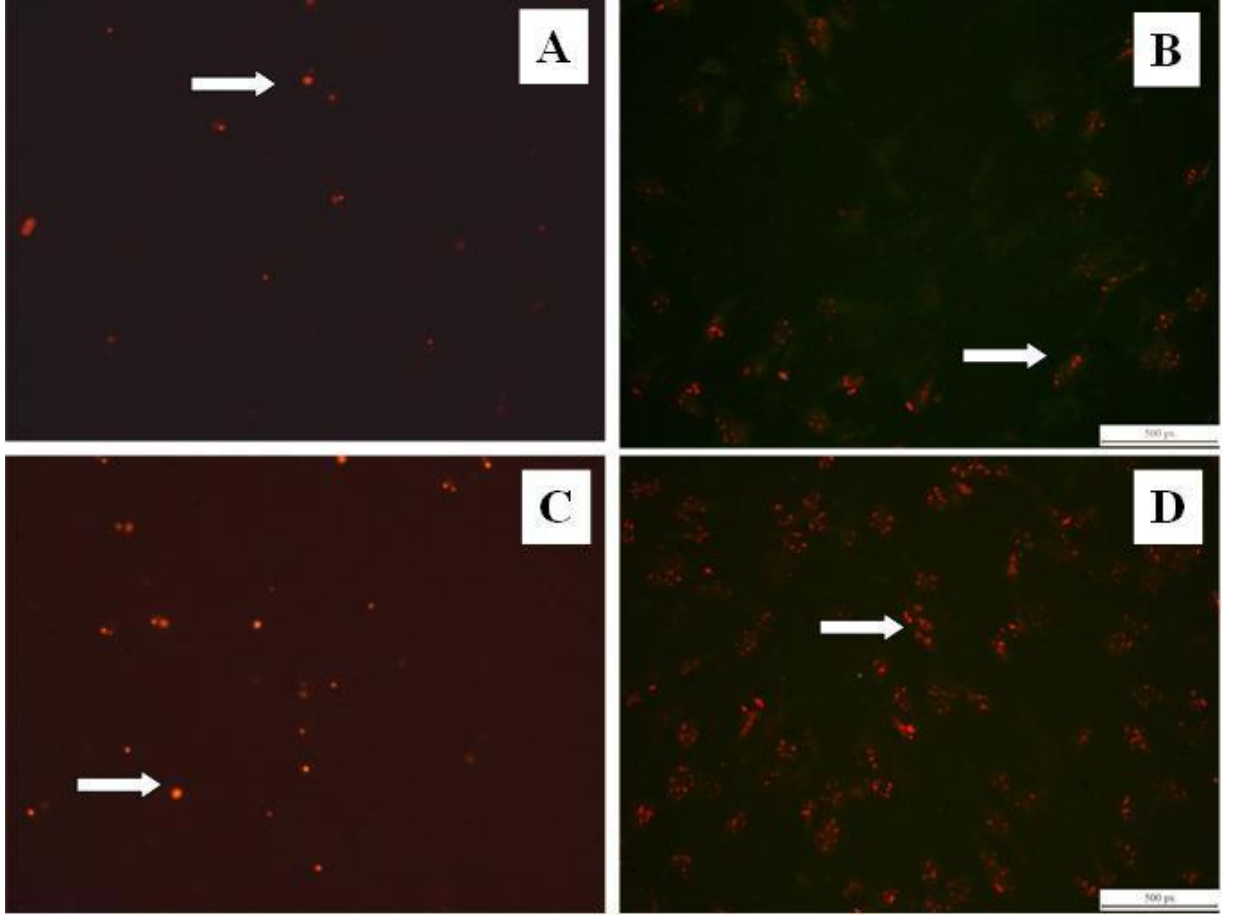
Nekrotik indeks sonuçlarına bakıldığında ise sonuçlar toksisite sonuçları ile yakın elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 13, Çizelge 14, Çizelge 15, Çizelge 16, Çizelge 17, Çizelge 18, Çizelge 19 ve Çizelge 20 ve nekrotik hücrelerin fotoğrafları ise Şekil 44'de verilmiştir. Sadece partikül ile etkileştirilmiş fibroblast hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak nekroz da bir artış gözlenmiştir. En yüksek oranda %21 ile SPIONs partikülünden elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki nekrotik değerler çok yüksek değildir (Çizelge 20). Fibroblast hücreleri partikül ile etkileştirilip RF dalgaları ile muamele edildiğinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve yüksek watta nekrotik etkinin arttığı gözlenmiştir. En yüksek nekrotik etki 180 watta 30µg/ml konsantrasyonda SPIONs partikülünden elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda nekrotik etkinin yüksek olmadığı gözlenmiştir.

MCF-7 hücreleri sadece partiküller ile etkileştirildiğinde nekrotik etkinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. RF uygulanmamış ortamda en yüksek nekrotik etki 30µg/ml konsantrasyonda SPIONs partiküllerinden elde edilmiş olup diğer partiküllerin değerleri de bu değere yakındır (Çizelge 16). RF uygulanmamış ortamda kontrol gruplarında %3 oranında nekroz görülmüştür. Partikül ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri farklı oranlarda RF dalgaları ile muamele edildiğinde nekrotik etkinin uygulanan RF wattına ve partikül konsantrasyonuna bağlı olduğu tesbit edilmiştir. Yüksek watta ve partikül konsantrasyonunda nekrotik etki toksistede olduğu gibi artarken, düşük watt ve konsantrasyonda azaldığı gözlenmiştir. Kontrol gruplarında da RF dalgaların tek başına etkisinin (%21) yüksek sayılabilecek bir değer elde edilmiştir. En yüksek nekrotik etki 180 watta 30µ/ml konsantrasyonda SPIONs nanopartiküllerinden elde edilmiştir. Nekrotik indeks sonuçları toksiste sonuçlarına yakın elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre partikül ile etkileştirilerek RF dalgaları ile muamele etmek kanser hücrelerinde fibroblast hücrelerine göre daha yüksek oranda nekroza neden olmaktadır.



Şekil 43 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin Floresan mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri,B) RF uygulanmamış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri,C) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15µg/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri. Oklar apoptoza uğramış hücrelerden

birkaçını göstermektedir Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200 μ m.



Şekil 44 MCF-7 ve L929 fibroblast hücrelerinin Floresan mikroskop fotoğrafları: A) RF uygulanmamış ortamda 15 μ g/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, B) RF uygulanmış ortamda 15 μ g/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş fibroblast hücreleri, C) RF uygulanmamış ortamda 15 μ g/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri, D) RF uygulanmış ortamda 15 μ g/ml SPIONs partikülleri ile etkileştirilmiş MCF-7 hücreleri. Oklar nekroza uğramış hücrelerden birkaçını göstermektedir Fotoğraflar Leica DMI6000 model inverted mikroskopta 100X büyütmede çekilmiştir. Bar= 200 μ m.

Çizelge 13 İkili boyama ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

80w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	20±2	57±5	22±2	58±4	22±3	61±8
15	33±2	15±1	36±4	22±2	35±4	27±3
5	12±1	3±1	14±1	4±1	15±1	7±1
0	10±2	3±1	10±2	3±1	10±2	3±1

Çizelge 14 İkili boyama ile elde edilmiş 120 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

120w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	18±1	71±3	24±2	75±4	23±3	74±2
15	42±2	27±4	41±4	29±2	53±4	31±4
5	20±1	9±1	17±1	12±1	22±1	13±2
0	13±1	7±1	13±1	7±1	13±1	7±1

Çizelge 15 İkili boyama ile elde edilmiş 180 watt RF uygulanmış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

180w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	12±2	79±8	10±2	81±7	13±1	83±5
15	54±6	37±3	62±7	33±2	61±4	38±5
5	21±1	25±1	33±2	18±2	35±2	23±1
0	15±1	13±1	15±1	13±1	15±1	13±1

Çizelge 16 İkili boyama ile elde edilmiş RF uygulanmamış MCF-7 hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

RF uygulanmamış Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	9±1	25±2	11±1	23±2	12±1	26±2
15	5±1	12±1	5±1	11±1	7±1	14±2
5	2±1	4±1	3±1	5±1	3±1	4±1
0	2±1	3±1	2±1	3±1	2±1	3±1

Çizelge 17 İkili boyama ile elde edilmiş 80 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

80w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	11±1	32±3	13±1	33±2	12±2	38±4
15	13±2	20±2	15±1	22±3	18±3	26±3
5	5±1	14±1	5±1	12±1	7±1	13±1
0	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1

Çizelge 18 İkili boyama ile elde edilmiş 120 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

120w (RF uygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	15±2	35±3	18±2	39±3	22±3	41±4
15	18±1	21±2	24±2	28±2	25±2	33±2
5	5±1	6±1	11±1	10±1	14±1	17±1
0	5±1	4±1	5±1	4±1	5±1	4±1

Çizelge 19 İkili boyama ile elde edilmiş 180 watt RF uygulanmış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

180w (RFuygulanmış) Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIONs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	7±1	45±4	9±1	51±6	10±1	54±4
15	9±1	32±2	13±1	38±3	14±2	43±3
5	11±2	24±2	10±1	26±2	12±1	27±2
0	7±1	5±1	7±1	5±1	7±1	5±1

Çizelge 20 İkili boyama ile elde edilmiş RF uygulanmamış fibroblast hücrelerinin % apoptotik ve nekrotik indeks sonuçları

RF uygulanmamış Partikül derişimi µg/ml	AuNPs		Au@SPIOs		SPIONs	
	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%	apoptoz%	nekroz%
30	3±1	15±1	4±1	18±1	6±1	21±2
15	3±1	10±1	2±1	13±1	3±1	15±1
5	1±1	4±1	2±1	6±1	2±1	6±1
0	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1	1±1

5. SONUÇLAR

- Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin boy dağılım grafikleri Zeta-sizer cihazı ile elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre manyetit nanopartiküllerin boyu 65.6 nm olarak ölçülmüştür. Aynı nanopartiküllerin TEM görüntüleri boy dağılım grafikleri açısından incelendiğinde boyutlar 10 nm olarak gözlemlenmiştir.
- Bir sonraki aşamada sentezlenen manyetit nanopartiküllerin altın kaplaması gerçekleştirilmiştir. Bu partiküllerin partikül boyut dağılımları zeta-sizer ve uv absorbans değerleri UV spektrofotometre cihazıyla ölçülmüştür. Buna göre, altın kaplı manyetit nanopartiküllerin boyutu ve absorbans değerleri sırasıyla 75.8 nm ve 532 nm dalga boyunda 1.18 absorbans olarak elde edilmiştir. Diğer aşamada, aynı nanopartiküllerin TEM görüntüleri incelenmiştir. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin TEM görüntüsünden elde edilen boy dağılım grafiği bu nanopartiküllerin 14-17 nm arasında olduğunu ispatlamıştır.
- Altın nanopartiküllerin büyüklükleri ve UV absorbans değerleri, sırasıyla Zeta-sizer ve UV spektrofotometre cihazlarıyla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, altın nanopartiküllerin boyutu 38.9 nm ve absorbans değerleri, 527 nm dalga boyunda 1.47 olarak gözlenmiştir.
- Sentezlenen altın nanorodların boy dağılım grafikleri ve UV absorbans değerleri Zeta-sizer ve UV spektrofotometre cihazlarıyla ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, altın nanorodların boyu 47.1 nm ve UV absorbans değerleri 753 dalga boyunda 1.78 ve 526 nm dalga boyunda 0.89 olarak ölçülmüştür.
- Kurutma ve tartama aşamaları sonucu, sentezlenen manyetit nanopartikül çözeltinin yoğunluğu 6400 µg/ml olarak elde edilmiştir. UV spektrofotometresinde elde edilen absorbans değerlerine göre, altın kaplı

manyetit nanopartikül, altın nanopartikül ve nanorod stok çözeltilerin derişimleri sırasıyla 46, 49 ve 80 µg/ml olarak elde edilmiştir.

- Diğer aşamada, RF uygulanan stok nanopartikül çözeltilerin sıcaklık artışı incelenmiştir. 120 watt RF gücünde elde edilen sonuçlarına göre, en yüksek sıcaklık artışı manyetit nanopartiküllerin stok çözeltisinde 91.5 °C, altın kaplı manyetit nanopartikül stok çözeltisinde 45.9 °C, altın nanopatikül stok çözeltisinde 44 °C ve altın nanorod stok çözeltisinde 39.2 °C olarak ölçülmüştür. Distile suda 2 °C sıcaklık artışı görülmüştür. Altın nanorod çözeltisi yüksek sıcaklıklara çıkma deneylerinin sonraki aşamalarında kullanılmamıştır.
- 30 µg/ml derişimli çözeltilerin, 180 W güç ve 144.000 MHz RF uygulamaları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en yüksek sıcaklık artışı manyetit nanopartiküllerde 44 °C, altın kaplı manyetit nanopartiküllerde 42.6 °C ve altın nanopartiküllerde 40.6 °C görülmüştür.
- İn-vitro deneylerinde canlılık değerleri incelendiğinde nanopartiküller eşliğindeki MCF-7 hücrelerinin canlılık değeri %23.6±5.2 ve fibroblast hücrelerinin canlılık değeri, %43.5±2.3 elde edilmiştir. Elde edilen bu değerler SPIONs'ların 30 µg/ml derişiminde ve RF'in en yüksek gücünde 180W olarak gözlenmiştir.
- RF uygulanmadan sadece nanopartiküller Fibroblast hücreleri ile etkileştirildiğinde, en yüksek toksisite 30 ppm konsantrasyonda SPIONs partikülleri ile elde edilmiş olup canlılık %69.4 oranındadır.
- Fibroblast hücre hattında, en yüksek toksiste 180 watt'ta 30 ppm SPIONs ile hücreler muamele edildiğinde görülmüş olup canlılık oranı %43.52 görülmüştür.
- Farklı RF güçlerinin toksisite oranı, RF çücünün artışıyla artmıştır, en yüksek toksisite 180 Watt' a ve partikül yoğunluğuyla artış göstermiştir.

- 120 Watt' a ve 15µg/ml SPIONs pariküller uygulanmış fibroblastlarda %25 oranında apoptoz elde edilmiştir.
- Apoptoz değerlerine göre, nanopartikül eşliğindeki RF uygulanan hücrelerin en yüksek apoptoz değerleri MCF-7 hücrelerinde, 180 W RF gücü altında Au@SPIONs ve SPIONs nanopartiküllerin 15 ppm derişimlerinde %61 oranla elde edilmiştir. Buna bağlı olarak optimum partikül konsantrasyonunda RF dalgaları ile etkileşim kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde etkin bir yol olabileceği tahmin edilmektedir.
- Fibroblast hücre hattında ise 15 ppm SPIONs derişiminde ve 120 W RF gücü altında apoptoz değeri %25±2 olarak elde edilmiştir.
- Fibroblast hücrelerinde en yüksek nekrotik etki 180 watta 30 µg/ml konsantrasyonda SPIONs partiküllerde %54±4 oranında elde edilmiştir.
- MCF-7 hücrelerinde en yüksek nekrotik etki 180 watta 30 µg/ml konsantrasyonda SPIONs partiküllerde %83±5 oranında elde edilmiştir.

6. REFERANSLAR

- Adair, E. R., S. A. Kelleher, et al. (1998). "Thermophysiological responses of human volunteers during controlled whole - body radio frequency exposure at 450 MHz." Bioelectromagnetics **19**(4): 232-245.
- AG, C. (1998). "Değişik şiddet ve süreli magnetik alanların deri hidroksiprolin seviyesine etkisi." Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Ahlbom, A., U. Bergqvist, et al. (1998). "Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection." Health Phys **74**(4): 494-522.
- Ahlers, O., T. Kerner, et al. (2003). "Whole body hyperthermia induces apoptosis in subpopulations of blood lymphocytes." Immunobiology **207**(4): 265-273.
- Albrecht, R. and J. E. Beesley (1993). "Immunocytochemistry: A Practical Approach." Oxford University Press **2**.
- Arbab, A. S., L. A. Bashaw, et al. (2003). "Characterization of Biophysical and Metabolic Properties of Cells Labeled with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Transfection Agent for Cellular MR Imaging1." Radiology **229**(3): 838-846.
- Babes, L., B. Denizot, et al. (1999). "Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: a parametric study." Journal of Colloid and Interface Science **212**(2): 474-482.
- Babincova, M., P. Babinec, et al. (2001). "High-gradient magnetic capture of ferrofluids: implications for drug targeting and tumor embolization." ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG C **56**(9/10): 909-911.
- Battle, X. and A. Labarta (2002). "Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties." Journal of physics D: Applied physics **35**(6): R15.
- Bilchik, A. J., T. F. Wood, et al. (2000). "Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasms: a proposed algorithm." Archives of Surgery **135**(6): 657.

- Bleicher, R. J., D. P. Allegra, et al. (2003). "Radiofrequency ablation in 447 complex unresectable liver tumors: lessons learned." Annals of surgical oncology **10**(1): 52-58.
- Boisselier, E. and D. Astruc (2009). "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity." Chemical Society Reviews **38**(6): 1759-1782.
- Cardinal, J., J. R. Klune, et al. (2008). "Noninvasive radiofrequency ablation of cancer targeted by gold nanoparticles." Surgery **144**(2): 125-132.
- CastrénPersons, M., T. Schröder, et al. (1991). "Contact Nd-Yag Laser Potentiates the Tumor-Cell Killing Effect of Hyperthermia." Lasers in Surgery and Medicine **11**(6): 6.
- Challis, L. (2005). "Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissue." Bioelectromagnetics **26**(S7): S98-S106.
- Chanda, N., V. Kattumuri, et al. (2010). "Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(19): 8760-8765.
- Chang, E., H. Alexander, et al. (2001). "Laparoscopic continuous hyperthermic peritoneal perfusion." Journal of the American College of Surgeons **193**(2): 5.
- Chatterjee, J., Y. Haik, et al. (2003). "Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles." Journal of magnetism and magnetic materials **257**(1): 113-118.
- Chen, W. R., R. L. Adams, et al. (1997). "Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment." Cancer letters **115**(1): 25-30.
- Coroiu, I. (1999). "Relaxivities of different superparamagnetic particles for application in NMR tomography." Journal of magnetism and magnetic materials **201**(1): 449-452.
- Curley, S. A., P. Cherukuri, et al. (2008). "Noninvasive radiofrequency field-induced hyperthermic cytotoxicity in human cancer cells using cetuximab-targeted gold nanoparticles." Journal of experimental therapeutics & oncology **7**(4): 313.

- Curley, S. A., F. Izzo, et al. (1999). "Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients." Annals of surgery **230**(1): 1.
- Curley, S. A., P. Marra, et al. (2004). "Early and late complications after radiofrequency ablation of malignant liver tumors in 608 patients." Annals of surgery **239**(4): 450.
- Daniel, M. C. and D. Astruc (2004). "Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology." Chemical Reviews-Columbus **104**(1): 293.
- Day, E. S., J. G. Morton, et al. (2009). "Nanoparticles for thermal cancer therapy." Journal of biomechanical engineering **131**(7): 074001.
- Dewey, W. (1994). "Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic." International Journal of Hyperthermia **10**(4): 457-483.
- Dewhirst, M., E. Ozimek, et al. (1980). "Will hyperthermia conquer the elusive hypoxic cell? Implications of heat effects on tumor and normal-tissue microcirculation." Radiology **137**(3): 811-817.
- Dreaden, E. C., A. M. Alkilany, et al. (2011). "The golden age: gold nanoparticles for biomedicine." Chem. Soc. Rev.
- Dudeck, O., K. Bogusiewicz, et al. (2006). "Local arterial infusion of superparamagnetic iron oxide particles in hepatocellular carcinoma: A feasibility and 3.0 T MRI study." Investigative radiology **41**(6): 527-535.
- Erdreich, L. and B. Klauenberg (2001). "Radio frequency radiation exposure standards: considerations for harmonization." Health physics **80**(5): 430-439.
- Ernest, H. and R. Shetty (2005). "Impact of nanotechnology on biomedical sciences: review of current concepts on convergence of nanotechnology with biology." Journal of Nanotechnology Online **1**: 1-14.
- Eustis, S. and M. A. El-Sayed (2006). "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes." Chemical Society Reviews **35**(3): 209-217.

- F Jiao, P., H. Y Zhou, et al. (2011). "Cancer-targeting multifunctionalized gold nanoparticles in imaging and therapy." Current medicinal chemistry **18**(14): 2086-2102.
- Falk, M. and R. Issels (2001). "Hyperthermia in oncology." International Journal of Hyperthermia **17**(1): 1-18.
- Feldman, A. L., S. K. Libutti, et al. (2003). "Analysis of factors associated with outcome in patients with malignant peritoneal mesothelioma undergoing surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy." Journal of clinical oncology **21**(24): 4560-4567.
- Ferrari, M. (2005). "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges." Nature Reviews Cancer **5**(3): 161-171.
- Field, S. and N. Bleehen (1979). "Hyperthermia in the treatment of cancer." Cancer treatment reviews **6**(2): 63.
- Foye, W. and S. Sengupta (1995). "Cancer chemotherapy." Principles of Medicinal Chemistry: 829.
- Furse, C., C. H. Durney, et al. (2009). Basic introduction to bioelectromagnetics, CRC.
- Gannon, C. J. and S. A. Curley (2005). The role of focal liver ablation in the treatment of unresectable primary and secondary malignant liver tumors. Seminars in radiation oncology.
- Gannon, C. J., C. R. Patra, et al. (2008). "Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells." J Nanobiotechnology **6**(2).
- Gasos, J. and P. Stavroulakis (2003). "Biological Effects of Electromagnetic Radiation."
- Ghosh, P., G. Han, et al. (2008). "Gold nanoparticles in delivery applications." Advanced drug delivery reviews **60**(11): 1307-1315.
- Gobin, A. M., M. H. Lee, et al. (2007). "Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy." Nano Letters **7**(7): 1929-1934.

- Goodman, M. and D. A. Geller (2005). "Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma." Hepatocellular Cancer: 171-183.
- Goodwin, S., C. Peterson, et al. (1999). "Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCs) enhancing intra-arterial chemotherapy." Journal of magnetism and magnetic materials **194**(1): 132-139.
- Goya, G., T. Berquo, et al. (2003). "Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles." Journal of Applied Physics **94**(5): 3520-3528.
- Greenlee, R. T., M. B. Hill Harmon, et al. (2009). "Cancer statistics, 2001." CA: a cancer journal for clinicians **51**(1): 15-36.
- Griffin, J. E., T. C. Karselis, et al. (1988). Physical agents for physical therapists, Thomas.
- Gunderson, L. L. and J. E. Tepper (2007). Clinical radiation oncology, Churchill Livingstone.
- Haemmerich, D. and P. Laeseke (2005). "Thermal tumour ablation: devices, clinical applications and future directions." International Journal of Hyperthermia **21**(8): 755-760.
- Häfeli, U., W. Schütt, et al. (1997). Scientific and clinical applications of magnetic carriers, Springer.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." cell **100**(1): 57-70.
- Harrison, W. H., F. K. Storm, et al. (1985). "A Comparison of Deep-Heating Electrode Concepts for Hyperthermia." Journal of microwave power **20**: 1-8.
- Herceg, Z. and P. Hainaut (2007). "Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis." Molecular oncology **1**(1): 26.
- Hergt, R., R. Hiergeist, et al. (2004). "Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia." Journal of magnetism and magnetic materials **270**(3): 345-357.

- Hien Pham, T. T., C. Cao, et al. (2008). "Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations." Journal of magnetism and magnetic materials **320**(15): 2049-2055.
- Hildebrandt, B., P. Wust, et al. (2002). "The cellular and molecular basis of hyperthermia." Critical reviews in oncology/hematology **43**(1): 33-56.
- Hirsch, L. R., R. Stafford, et al. (2003). "Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(23): 13549-13554.
- Hoover, R. (1996). "Breast cancer: geographic, migrant, and time-trend patterns." Accomplishments in cancer research. New York: Lippincott-Raven: 403-425.
- Huang, X., P. K. Jain, et al. (2008). "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles." Lasers in medical science **23**(3): 217-228.
- IEEE, s. (1999). "IEEE Standards for Safety Levels with Respect to Human Exposure to Radio Frequency Electromagnetic Fields, 3 kHz to 300 GHz." IEEE Std **C95**(1).
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA: a cancer journal for clinicians **58**(2): 71-96.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2009). "Cancer statistics, 2007." CA: a cancer journal for clinicians **57**(1): 43-66.
- Johannsen, M., U. Gneveckow, et al. (2007). "Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial." International Journal of Hyperthermia **23**(3): 315-323.
- Johannsen, M., B. Thiesen, et al. (2006). "Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer." The Prostate **66**(1): 97-104.
- Johnson, C. C. and A. W. Guy (1972). "Nonionizing electromagnetic wave effects in biological materials and systems." Proceedings of the IEEE **60**(6): 692-718.
- Jolesz, F. A. and K. Hynynen (2002). "Magnetic resonance image-guided focused ultrasound surgery." CANCER JOURNAL-NEW YORK- **8**: 100-112.

- Jordan, A., R. Scholz, et al. (1999). "Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles." Journal of magnetism and magnetic materials **201**(1): 413-419.
- Kang, Y. S., S. Risbud, et al. (1996). "Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ particles." Chemistry of Materials **8**(9): 2209-2211.
- Kanzius, J., W. H. Steinbrink, et al. (2009). Systems and methods for combined RF-induced hyperthermia and radioimmunotherapy, Google Patents.
- Kapp, D., G. Hahn, et al. (2000). "Principles of hyperthermia." Cancer medicine e **5**(5).
- Laurent, S., S. Dutz, et al. (2011). "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles." Advances in colloid and interface science **166**(1): 8-23.
- Laurent, S., D. Forge, et al. (2008). "Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications." Chemical Reviews **108**(6): 2064.
- Lin, J. C. (1997). Advances in electromagnetic fields in living systems, Springer.
- Lin, J. C. and S. M. Michaelson (1987). Biological effects and health implications of radiofrequency radiation, Springer.
- Loo, C., L. Hirsch, et al. (2004). "Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer." Technol Cancer Res Treat **3**(1): 8.
- Lu, Q., K. Yao, et al. (2006). "Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores." Journal of magnetism and magnetic materials **301**(1): 44-49.
- MagForce Nanotechnologies, A. (2007). "Thermal therapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles." Actas Urol Esp **31**(6): 660-667.
- Majetich, S. and Y. Jin (1999). "Magnetization directions of individual nanoparticles." Science **284**(5413): 470-473.

- Majewski, P. and B. Thierry (2007). "Functionalized magnetite nanoparticles— synthesis, properties, and bio-applications." Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences **32**(3-4): 203-215.
- Manthe, R., S. Foy, et al. (2010). "Tumor ablation and nanotechnology." Mol Pharm **7**(6): 18.
- Matthes, R. (1996). Non-Ionizing Radiation, Austria, ICNIRP–1/96.
- McFarland, A. D., C. L. Haynes, et al. (2004). "Color my nanoworld." Journal of Chemical Education **81**(4): 544.
- McGahan, J. P., P. D. Browning, et al. (1990). "Hepatic ablation using radiofrequency electrocautery." Investigative radiology **25**(3): 267-270.
- Meek, A. G. (2000). "Breast radiotherapy and lymphedema." Cancer **83**(S12B): 2788-2797.
- Melancon, M., W. Lu, et al. (2009). "Gold-based magneto/optical nanostructures: challenges for in vivo applications in cancer diagnostics and therapy." Materials research bulletin **34**(6): 415.
- Meltz, M. L. (2003). "Radiofrequency exposure and mammalian cell toxicity, genotoxicity, and transformation." Bioelectromagnetics **24**(S6): S196-S213.
- Mie, G. (1976). "Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions." Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions Transl. into ENGLISH from Ann. Phys.(Leipzig), v. 25, no. 3, 1908 p 377-445 **1**: 377-445.
- Milleron, R. and S. Bratton (2007). "'Heated' Debates in Apoptosis." Cellular and Molecular Life Sciences **64**(18): 2329-2333.
- Moran, C. H., S. M. Wainerdi, et al. (2009). "Size-dependent joule heating of gold nanoparticles using capacitively coupled radiofrequency fields." Nano Research **2**(5): 400-405.
- Nahum Goldberg, S., G. Scott Gazelle, et al. (1995). "Tissue ablation with radiofrequency: effect of probe size, gauge, duration, and temperature on lesion volume." Academic radiology **2**(5): 399-404.

- Nieder, C., L. Milas, et al. (2000). Tissue tolerance to reirradiation. Seminars in radiation oncology, Elsevier.
- Nikoobakht, B. and M. A. El-Sayed (2003). "Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method." Chemistry of Materials **15**(10): 1957-1962.
- Odabas, S. (2006). Mezenkimal kok hucre saflastirmasi icin manyetik yuklu nanosorbentlerin uretimi. **Yuksekk Lisans**, Hacettepe Universitesi.
- Olorundare, O. E., S. R. Simmons, et al. (1992). "Cytochalasin D and E: effects on fibrinogen receptor movement and cytoskeletal reorganization in fully spread, surface-activated platelets: a correlative light and electron microscopic investigation." Blood **79**(1): 99-109.
- Pankhurst, Q. A., J. Connolly, et al. (2003). "Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine." Journal of physics D: Applied physics **36**(13): R167.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." International journal of cancer **94**(2): 153-156.
- Phillips, J. L. (2005). "A topical review of magnetic fluid hyperthermia." Journal of Science and Health at the University of Alabama **3**: 14-18.
- Polk, C. and E. Postow (1996). Handbook of biological effects of electromagnetic fields, CRC Press/ Llc.
- Prentice, W. E. and B. Blake (2011). "The Basic Science of Therapeutic Modalities." Therapeutic Modalities in Rehabilitation: 3.
- Raab, O. (1900). "The effect of fluorescent agents on infusoria." Z Biol **39**: 524-526.
- Raut, C. P., F. Izzo, et al. (2005). "Significant long-term survival after radiofrequency ablation of unresectable hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis." Annals of surgical oncology **12**(8): 616-628.
- Reimer, P. and R. Weissleder (1996). "Development and experimental use of receptor-specific MR contrast media." Radiologe **36**: 11.
- Rossi, S., F. Fornari, et al. (1990). "Thermal lesions induced by 480 KHz localized current field in guinea pig and pig liver." Tumori **76**(1): 54.

Rowe-Horwege, R. (2006). Systemic Hyperthermia, John Wiley and Sons, NY, USA: 42-62.

Sante, C. (1999). "Limits of Human Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields in the Frequency Range from 3 kHz to 300 GHz." Health Canada/Santé Canada.

Seki, T., M. Wakabayashi, et al. (2000). "Percutaneous microwave coagulation therapy for patients with small hepatocellular carcinoma." Cancer **85**(8): 1694-1702.

Selwood, K. (2009). "Side effects of chemotherapy." Cancer in Children and Young People: Acute Nursing Care: 35-71.

Siegel, R., D. Naishadham, et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." CA: a cancer journal for clinicians.

Siegel, R., E. Ward, et al. (2011). "Cancer statistics, 2011." CA: a cancer journal for clinicians **61**(4): 212-236.

Siperstein, A., A. Garland, et al. (2000). "Laparoscopic radiofrequency ablation of primary and metastatic liver tumors." Surgical endoscopy **14**(4): 400-405.

Sirav Aral, B. (2008). Radyofrekans radyasyon (RFR) kaynaklari, ulkeler ve uluslararası kurumların standartları, Türkiye’de durum, bir pilot bölge radyasyon hesaplaması. **Doktora**, Gazi Üniversitesi.

Solbiati, L., T. Livraghi, et al. (2001). "Percutaneous Radio-frequency Ablation of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer: Long-term Results in 117 Patients¹." Radiology **221**(1): 159-166.

Stone, J., S. Jackson, et al. (2011). "Biological applications of gold nanorods." Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology **3**(1): 100-109.

Szasz, A. (2009). "Oncothermia summary."

Tartaj, P., M. del Puerto Morales, et al. (2003). "The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine." Journal of physics D: Applied physics **36**(13): R182.

- Thomsen, S. (1991). "Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions." Photochemistry and photobiology **53**(6): 825.
- Tiwari, P. M., K. Vig, et al. (2011). "Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications." Nanomaterials **1**(1): 31-63.
- Turkevich, J., P. C. Stevenson, et al. (1951). "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold." Discuss. Faraday Soc. **11**: 55-75.
- Van der Zee, J. (2002). "Heating the patient: a promising approach?" Annals of oncology **13**(8): 1173-1184.
- Van Gemert, M. J. C., A. Welch, et al. (2005). "Wavelengths for laser treatment of port wine stains and telangiectasia." Lasers in surgery and medicine **16**(2): 147-155.
- Vogel, A. and V. Venugopalan (2003). "Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues." Chemical Reviews **103**(2): 577-644.
- Von Tappeiner, H. and A. Jesionek (1903). "Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen." Münch Med Wochenschr **47**: 2042-2044.
- Waldow, S. M., P. R. Morrison, et al. (1988). "Nd: YAG laser - induced hyperthermia in a mouse tumor model." Lasers in surgery and medicine **8**(5): 510-514.
- Wang, Y., S. Hussain, et al. (2011). "Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging." Euro Radiology **11**(11): 13.
- Weir, H. K., M. J. Thun, et al. (2003). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control." Journal of the National Cancer Institute **95**(17): 1276-1299.
- Welch, A. J. and M. J. C. van Gemert (2011). Optical-thermal response of laser-irradiated tissue, Springer.
- Wilson, B. and M. Patterson (2000). "The physics of photodynamic therapy." Physics in medicine and biology **31**(4): 327.
- Wilson, J. and J. F. B. Hawkes (1989). "Optoelectronics-an introduction."

Wust, P., B. Hildebrandt, et al. (2002). "Hyperthermia in combined treatment of cancer." The lancet oncology **3**(8): 487-497.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Behzad Nasseri

Doğum Yeri Tebriz, İran

Doğum Tarihi 19/05/1969

Medeni Halı: Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: Şehit Mustafa Khomeini Lisesi

Lisans: Amir Kabir Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği

Yabancı Dil: Türkçe, İngilizce, Fransızca