

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ**

**MANYETİK NANOPARTİKÜL-KİTOSİN KOMPLEKSİNİN MİKRODALGA
HİPERTERMİ KARAKTERİZASYONUNUN ARAŞTIRILMASI**

Proje No: PYO.TIP.1904.22.004

**Doç. Dr. Ayşegül AKAR KARADAYI
Yüksek Lisans Öğrencisi Elif Elçin ETLİ**

**MART 2023
SAMSUN**

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

***Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından PYO.TIP.1904.22.004 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Kanser.....	2
2.1.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	4
2.2.1. Cerrahi Yöntemi.....	4
2.2.2. Kemoterapi Yöntemi.....	4
2.2.3. Radyoterapi.....	5
2.2.4. İmmünoterapi.....	5
2.2.5. Hipertermi.....	6
2.3. Manyetik Nanopartikül Hipertermi.....	6
2.3.1. Manyetik Nanopartiküller.....	8
2.3.1.1 Demir Oksit Nanopartiküller (SPION).....	9
2.4. Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Kaplamaları.....	10
2.4.1. Kitosan.....	12
2.5. Fe ₃ O ₄ +Kitosan Nanopartikülleri.....	13
2.6. Mikrodalga Hipertermi.....	15
2.6.1. Mikrodalga Kullanılarak Gerçekleştirilen Manyetik Nanopartikül Hipertermi Uygulamaları.....	15
3. MATERYAL METHOD.....	16
3.1. Materyeller.....	17
3.1.1.Çözücü ve Kimyasallar.....	17
3.1.2.Kullanılan Cihazlar.....	17
3.2. Fe ₃ O ₄ 'ün Kitosan ile Kaplanması.....	17
3.2.1.Madde Karakterizasyon Çalışmaları.....	18
3.2.1.1 Partikül Büyüklüğü Tayini (DLS) Analizi.....	18
3.2.1.2 Zeta Potansiyel Analizi.....	19
3.2.1.3 X-Işını Kırınımı Analizi (XRD) Analizi.....	19
3.2.1.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	19
3.2.1.5 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi.....	19
3.2.1.6 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizi.....	19
3.3. Meme Dokusu ve Tümör Dokusu Eşdeğeri Fantom Hazırlanması.....	20
3.4. Mikrodalga Maruziyeti.....	21
3.4.1. Termal Karakterizasyon Çalışmaları.....	23
3.5. İstatistiksel Analizler.....	24
4. BULGULAR.....	24
4.1. Madde Karakterizasyonu Bulguları.....	24
4.1.1.DLS Analizi.....	24
4.1.2.Zeta Potansiyel Analizi.....	26
4.1.3.XRD Analizi.....	27
4.1.4.FTIR Analizi.....	28
4.1.5. DSC Analizi.....	29
4.1.6. SEM Analizi.....	30
4.1.7. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi.....	32
4.2. Termal Karakterizasyon Bulguları.....	34
4.2.1.Thermocouple Cihazı Bulguları.....	34

4.2.2.Termal Kamera Bulguları.....	35
5. TARTIŞMA/SONUÇ.....	36
6. KAYNAKLAR.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Süperparamanyetik MNP'lere Harici Manyetik Alan Uygulanması.....	10
Şekil 2.2. MNP'lerin "Çekirdek-Kabuk" Yapısı.....	11
Şekil 2.3. Kitin ve Kitosanın Yapısı.....	12
Şekil 2.4. İyonik Jelasyon ile Nanopresipitasyon Tekniği ile C-MNP'lerin Hazırlanması, Şematik Gösterim.....	14
Şekil 3.1 C-MNP'lerin Hazırlanma Aşamalarının Şematik Gösterimi.....	18
Şekil 3.2 Meme Dokusu ve Tümör Dokusu Eşdeğeri Fantomların Hazırlanma Aşamalarının Şematik Gösterimi.....	21
Şekil 3.3 Mikrodalga Maruziyet Ortamı.....	22
Şekil 3.4 Termal Değerlendirme Bölgeleri.....	23
Şekil 4.1 Fe ₃ O ₄ için DLS Ölçümü	25
Şekil 4.2 C-MNP için DLS Ölçümü.....	25
Şekil 4.3 Fe ₃ O ₄ için Zeta Potansiyel Ölçüm Grafiği (mV).....	26
Şekil 4.4 C-MNP için Zeta Potansiyel Ölçüm Grafiği (mV).....	26
Şekil 4.5 4.5 (a) Kitosan (b) C-MNP için XRD Grafiği	27
Şekil 4.6 (a) Kitosan (b) C-MNP'ler için FTIR spektrumu.....	28
Şekil 4.7 C-MNP'lerin DSC Termogramı.....	30
Şekil 4.8 C-MNP'lerin SEM Görüntüleri.....	31
Şekil 4.9 C-MNP'lere ait (a) Kontrast Oluşturulmuş SEM Görüntüsü (b) Partikül Boyut Dağılım Analizi.....	32
Şekil 4. 10 C-MNP'ye ait yüzey atomlarının oranları.....	32
Şekil 4.11 Çalışmadaki Grupların madde karakterizasyon analiz sonuçlarının karşılaştırması.....	33
Şekil 4.12 Çalışmadaki Grupların Thermocouple Sıcaklık Kayıt Grafiği.....	34
Şekil 4.13 Çalışmadaki Grupların Sıcaklık Değişimi (Thermocouple Cihazı ile).....	35
Şekil 4.14. Çalışmadaki Grupların Sıcaklık Değişimi (Termal Kamera ile).....	36

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Fe ₃ O ₄ ve C-MNP nanopartiküllerinin boyut ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları.....	27
Tablo 4.2. Çalışmadaki Grupların Thermocouple Sıcaklık Düzeyleri.....	35
Tablo 4.3. Çalışmadaki Grupların Termal Kamera Sıcaklık Düzeyleri.....	36

ÖZET

Manyetik Nanopartiküller (MNP)'lerin indüklenme yoluyla hipertermi uygulaması, klinikte tanı ve tedavi için alternatif yaklaşımlar sunmaktadır. Manyetik nanopartikül hipertermi (MNPH) uygulaması, sağlıklı dokuyu korurken hedeflenen kötü huylu hücrelerin seçici olarak ısınmasını sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, MNP'lerin karakterizasyonlarını tespit edebilmek, maddeyi tanımlayabilmek için önemlidir. Bu çalışmanın amacı, sentezlenen C-MNP'nin madde karakterizasyonu ve sağlıklı meme ve tümör doku eşdeğeri üzerinde C-MNP'nin MW hipertermi termal etkinliğini araştırmaktır. Bu çalışma iki temel aşamada gerçekleştirildi. Çalışmanın ilk aşamasında, iyonik jelasyon ile nanopresipitasyon tekniği kullanılarak kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartikülleri (C-MNP) sentezlendi ve DLS, ZetaSizer, DSC, FTIR, XRD ve SEM cihazları ile madde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. İkinci aşamada, termal karakterizasyon için, MW uygulaması termal kamera ile görüntülenerek sayısal veriler elde edildi ve Pico TC-08 Thermocouple cihazı ile de sıcaklık kaydı yapıldı. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel analiz ile değerlendirildi. Gruplar, sağlıklı meme doku eşdeğeri, tümörlü doku eşdeğeri, Tümörlü Doku+MNP, tümörlü doku eşdeğeri+C-MNP olarak oluşturuldu ve aynı zaman süreci içerisinde MW'ya maruz bırakıldı. DLS sonuçlarına göre, Fe_3O_4 ve C-MNP nanopartiküllerinin boyutları sırasıyla, 571,5 ve 665,9 nm, Zeta potansiyelleri ise, 30,4 ve -15,6 mV olarak bulundu. C-MNP'lerin XRD analiz sonuçlarına göre, Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait keskin pikler gözlenmemiştir. FTIR analizi sonuçlarına göre, yaklaşık $500\text{-}790\text{ cm}^{-1}$ civarında gözlemlenen pik Fe-O bağının titreşimine karşılık gelmektedir. Bu durum C-MNP'de Fe_3O_4 varlığını göstermektedir. DSC analizi sonucunda, C-MNP'lerin, $97,14\text{ }^\circ\text{C}$ 'de erime noktasına karşılık gelen bir endotermik pik görüldü. C-MNP'lerin boyut analizleri sonuçları SEM ile incelendiğinde, C-MNP'lerin boyutu $24,87\pm 11,5$ nm olarak tespit edildi. Termal karakterizasyon sonuçlarına göre, Thermocouple cihazı ile yapılan sıcaklık ölçümlerindeki Sağlıklı Doku ve Tümörlü Doku ile diğer gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık bulundu ($p=0.0015$; $p<0.0001$). Termal kamera sonuçlarında ise gruplar arasındaki karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Sonuç olarak C-MNP kompleksinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu ve MW uygulamasıyla klinikte hipertermi tedavisi için uygun olduğu öngörüldü. Bu öngörünün desteklenmesi için hayvan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Manyetik Nanopartiküller, Hipertermi, Mikrodalga, Kitosan, Manyetit, Karakterizasyon

ABSTRACT

The application of hyperthermia by induction of Magnetic Nanoparticles (MNPs) presents alternative approaches for diagnosis and treatment in the clinic. Magnetic nanoparticle hyperthermia (MNPH) can selectively heat the targeted malignant cells while preserving healthy tissue. However, being able to detect the characterizations of MNPs is important to be able to identify the matter. The aim of this study the matter characterization of synthesized C-MNP and the MW hyperthermia thermal efficiency of C-MNP on healthy breast and tumor tissue equivalent were investigated. This study was carried out in two main stages. In the first stage of the study, Fe_3O_4 nanoparticles (C-MNP) coated with chitosan were synthesized using the Ionic Gelation Nanoprecipitation Technique and matter characterization studies were carried out with DLS, ZetaSizer, DSC, FTIR, XRD and SEM devices. In the second stage, for thermal characterization, the MW application was imaged with a thermal camera, and the temperature was recorded with the Pico TC-08 Thermocouple device. The obtained numerical data were evaluated by statistical analysis. Groups were formed as Healthy Tissue, Tumor Tissue, Tumor Tissue+MNP, Tumor Tissue+C-MNP and were exposed to MW during the same time period. According to DLS results, the sizes of Fe_3O_4 and C-MNP nanoparticles were found to be 571.5 and 665.9 nm, respectively and their Zeta Potentials were 30.4 and -15.6 mV, respectively. According to the XRD analysis results of C-MNPs, no sharp peaks of Fe_3O_4 nanoparticles were observed. According to the results of the FTIR analysis, the peak observed around $500\text{-}790\text{ cm}^{-1}$ corresponds to the vibration of the Fe-O bond. This indicates the presence of Fe_3O_4 in C-MNP. According to the results of FTIR analysis, it was determined that Fe_3O_4 nanoparticles were successfully coated with chitosan. As a result of DSC analysis, an endothermic peak corresponding to the melting point of C-MNPs at $97,14\text{ }^\circ\text{C}$ was observed. When the size analysis results of C-MNPs were investigated by SEM, the size of C-MNPs was found to be $24.87\pm 11.5\text{ nm}$. According to the thermal characterization results, statistical significance was found in the comparison between Healthy Tissue and Tumor Tissue and other groups in temperature measurements made with the Thermocouple device ($p=0.0015$; $p<0.0001$). In the thermal camera results, it was observed that there was statistical significance in the comparison between the groups ($p<0.0001$). As a result, it was predicted that the C-MNP complex was successfully formed and appropriate for clinical hyperthermia treatment with MW application. Animal studies are needed to support this prediction.

Keywords: Magnetic Nanoparticles, Hyperthermia, Microwave, Chitosan, Magnetite, Characterization

1. GİRİŞ

Kanser hastalığı, hastalık tanı ve tıbbi tedavi tekniklerindeki gelişmelere rağmen, halen dünya genelindeki en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'na göre, 2020 yılında, dünya çapında tahmini 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10,0 milyon kanser ölümü meydana gelmiştir. Ayrıca, meme kanseri, en sık teşhis edilen kanser olarak akciğer kanserini geride bırakmıştır (1). WHO, 2040 yılında, 30,2 milyon yeni kanser vakası tespit edileceğini ve önümüzdeki yirmi yılda küresel kanser insidansında %60'lık bir artış olacağını tahmin etmektedir (2,3). Kanser tedavisi için cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi birçok geleneksel yöntem bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır. Örneğin; kemoterapi tedavisinde kullanılan terapötik/anti-kanser ilaçlar, sağlıklı doku ve hücreler ile birlikte sağlıklı doku ve hücreleri de olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, düşük tümör seçiciliği, hasta üzerinde halsizlik, saç dökülmesi gibi istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır.

Hipertermi tedavisi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemine ek olarak kullanılan alternatif bir yaklaşımdır. Hipertermi, özellikle biyomedikal mühendisliği alanında dikkat çekmekte, kimya, mühendislik, tıp ve fizik alanındaki araştırmacıların iş birliği ile araştırmalar yapılmaktadır (4). Son yıllarda, nanoteknoloji alanı kanser tedavisi için yeni yollar açmıştır. Nano ölçekli sistemler, kanserin hedefe yönelik tedavisi için araştırılmaktadır (5,6). Manyetik Nanopartiküller (MNP) saf metallere veya metal-polimer karışımından oluşan nano boyuttaki malzemelerdir. Son yıllarda, MNP'lerin bir polimer ile kaplanmasıyla hipertermi uygulamaları, kanser tedavilerinde bir umut olarak görülmektedir. Manyetik nanopartikül hipertermisi (MNPH), bilinen hipertermi prosedürlerinin aksine, sağlıklı dokuyu korurken hedeflenen kötü huylu hücrelerin seçici olarak ısınmasını sağlayabilmektedir. Bu sayede kanserli dokudaki hedeflenen kötü huylu hücreler diğer sağlıklı dokulara zarar vermeden apoptoza uğratılmaktadır. Yapılan hayvan çalışmaları, MNPH ile hayatta kalma oranlarının arttığını in-vivo olarak göstermiştir (7,8). MNPH tedavisinin performansı, MNP'lerin malzeme tipine büyük ölçüde bağlıdır. Örneğin literatürde Manyetit (Fe_3O_4), Kobalt Ferrit (CoFe_2O_4), Nikel Ferrit (NiFe_2O_4) vb. odaklı ayrı yazarlar tarafından yayınlanan yayınlar bulunmaktadır (9,10,11). Bu projede, düşük yoğunluk ve elektrik alan değerlerindeki Mikrodalga (MW) hipertermi karakterizasyonunun araştırılması için diğer MNP'lere göre daha avantajlı özelliklerinden dolayı Fe_3O_4 tercih edilmiştir. Yüzey kaplaması olarak kullanılan kitosan, fiziksel özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yüzey kaplamalarının,

MNP'lerin kan dolaşım süresini artırdığı ve onların manyetik özelliklerini iyileştirdiği bilinmektedir (12,13). Fe_3O_4 çekirdek malzemelerin diğerlerinden daha üstün olduğu ve biyouyumlu bir polimer olan kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) kontrast maddesi, ilaç dağıtım sistemleri, hipertermi ve diğer biyomedikal uygulamalar için kullanılmaları literatürde tavsiye edilmektedir (14). Ayrıca, kitosan, polietilen glikol (PEG) gibi polimerler ile kaplanmış MNP tabanlı sistemlerin çeşitli kanser türleri için, Alternatif Manyetik Alan (AMF), Radyofrekans (RF), MW frekansı uygulaması ile tümörlü bölgenin sıcaklığı arttırabildiği, hipertermi uygulamalarındaki başarısı yapılan fantom, in-vitro araştırmalar ile gösterilmiştir (8,15). Hipertermi uygulamaları için kitosan kaplı Fe_3O_4 üretimi konusunda birçok çalışma yapılmıştır (16,17). Genel olarak manyetik Fe_3O_4 -kitosan nanokompozitleri biyouyumluluk, ısı üretme kabiliyeti gibi özellikleri nedeniyle hipertermi uygulamaları için umut verici sistemlerdir.

Bu projede, Fe_3O_4 -Kitosan nanopartiküllerinin düşük seviye MW hipertermi karakterizasyon mekanizması ve düşük yoğunluk, elektrik alan değerlerindeki MW uygulamasının termal etkisi fantom çalışması ile açıklanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, genetik faktörler, yaşam tarzı, çevresel faktörler, gibi farklı temel nedenlere sahip fiziksel belirtilere yol açan ve genetik değişikliklerden kaynaklanan karmaşık bir hastalıktır. WHO, 2020 yılında dünyada kanser nedeniyle yaklaşık 10 milyon ölüm gerçekleştiğini bildirmiştir (18). Kanser hücreleri, sağlıklı hücre davranışını kontrol eden sinyallere uygun yanıt vermek yerine, kontrolsüz bir şekilde büyür ve bölünürler. Sağlıklı olan çevre doku/organları istila edebilir ve sonunda tüm vücuda yayılabilirler. Hücrelerin olması gerekenden fazla büyüüp bölündüğü veya gerektiğinde ölmediği zaman oluşan anormal doku kütlesi “tümör” olarak adlandırılmaktadır. Tümör, iyi huylu veya kötü huylu olabilmektedir. İyi huylu tümörler büyüyebilir, konumu ile sınırlı kalmakta, diğer doku veya organlara yayılmamaktadır. Kötü huylu tümörler ise, hem çevredeki sağlıklı dokuyu işgal edebilir hem de dolaşım veya lenfatik sistemler yoluyla tüm vücuda yayılabilirler (National Cancer Institute). Bu metastaz olarak adlandırılır ve kanserden ölümün birincil nedenidir (19). Eğer hastalık metastatik evrede teşhis edilmişse tam bir tedavi yöntemi yoktur. Yalnızca kötü huylu tümörler kanserlidir ve tehlikeli ve yaşamı tehdit edici olabilirler. Kanser tedavi yöntemleri,

hastalığın iyileşmesinden ve hastaların yaşam süresinin uzamasından sorumludur. Cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi tedavileri, kanser hastalıklarında en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Daha az sıklıkla immünoterapi, hormon tedavileri, kök hücre nakli, hedefe yönelik tedaviler ve hipertermi tedavileri kanser tedavisi için kullanılmaktadır (20). Bu tedavi yöntemleri, kanser tedavisi için tek başına veya birlikte uygulanabilmektedir. Kanser tedavisi için geçmiş yüzyıllardan günümüze kadar birçok araştırma yapılmıştır ve halen bu konu ile ilgili araştırmalar yapılmaya devam etmektedir (3,5,6,7,8). Kanser tedavisi için önemli ölçüde teknik gelişmeler olmasına rağmen, tamamen etkili bir yöntem halen bulunamamıştır. Yalnızca, kanser hücrelerinin hedeflenmesine dayalı tedaviler için yeni yaklaşımlar geliştirilmekte ve ciddi çabalar, yüksek miktarda bütçeler harcanmaktadır (7,8,9). Bu çalışmalar ile klinik uygulamaya geçebilecek, daha etkin ve daha az yan etkiye sahip olan tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (9,10,11,15,17). Son zamanlarda yapılan bu çalışmalar arasında, lokal bir tedavi olabilecek MNP'lerin kullanıldığı hipertermi yöntemi bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemi ile hedeflenen kötü huylu hücrelerin ısıtılıp öldürülebileceği yüksek sıcaklıklara ulaşmaları sağlanırken sağlıklı dokular zarardan korunabilmektedir. Böylece geleneksel yöntemlerin tedavi sırasında meydana getirdiği yan etkiler ve sağlıklı dokulara meydana getirdiği hasarlar ortadan kaldırılabilir (6,7,9,10,11,15,17).

2.1.1. Meme Kanseri

Tüm yeni kanser teşhislerinin yaklaşık onda birini oluşturan ve sıklıkla 50-70 yaş arasındaki kadınlarda görülen meme kanseri, dünya çapında kadınlar arasında en çok teşhis edilen kanser türüdür. Sağlıklı meme bezi hücrelerinden kaynaklanan kötü huylu bir tümördür ve metastatik özelliği nedeniyle tedavisi oldukça zordur (6, 21). Tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen, genel sağ kalım oranlarında önemli artışlar gözlemlenmemiştir (22). WHO'nun 2020 yılı istatistiklerine göre meme kanseri, akciğer kanserini geride bırakmıştır ve günümüzde kanser hastalıklarının en yaygın türünü oluşturmaktadır (23). Dünya çapında 2020 yılında, 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi konulmuş ve meme kanseri nedeniyle 685.000 ölüm gerçekleşmiştir (19). Meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesi, diğer kanser türlerindeki gibi hücrel farklılaşmanın düzensiz olması, aşırı çoğalma gibi birçok olayı içermektedir. Cinsiyet, genetik faktörler, yaş, beslenme, çevresel faktörler gibi çeşitli risk faktörleri, tüm kanser türlerinde ki gibi, meme kanserinin gelişmesinde de etkilidir (24).

Meme kanseri tedavisi, özellikle hastalık erken teşhis edildiğinde oldukça etkili olmaktadır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi, meme kanseri tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır

(19). Bu tedaviler arasında kemoterapi en fazla kullanılan yöntemdir ve meme kanserinin çeşitli evrelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın kullanılan kemoterapi rejimleri, kanserin yayılma veya tekrarlama olasılığını azaltmada etkilidir. Kanser büyümelerini ve yayılmasını önleyebilen bu tür tedaviler hayat kurtarmaktadır. Fakat kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlar, sadece kanserli hücreleri öldürmekle kalmayıp sağlıklı hücreleri de öldürerek yaşamı tehdit eden yan etkilere neden olmaktadır (21). Tedavi yöntemlerinin meme dokusunda kayıp, halsizlik, mide bulantısı, iştah kaybı gibi yan etkileri bulunmaktadır ve bunlar hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Toksik yan etkiler ve ilaca direnç gibi sınırlamaları olan geleneksel kanser tedavileri çoğu zaman tümörü tamamen ortadan kaldırmayı başaramamıştır (6).

2.2. Kanser Tedavi Yöntemleri

2.2.1 Cerrahi Yöntemi

Kanser tedavisinde kullanılan en önemli yaklaşımlardan biri lokal, bölgesel veya genel anestezi altında tümörün tamamının veya bir kısmının vücuttan çıkarılmasına dayanan cerrahi yöntemidir. Cerrahi, biyopsi yoluyla kanseri teşhis ederek (kanserin nereye yerleştiğinin, nerelere yayıldığının, vücutta diğer organların etkilenip etkilenmediğinin tanımlaması) kanseri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Cerrahi yöntemi, kanserin kolayca bulunmasına ve çıkarılmasına yardımcı olur. Bir alanda bulunan katı tümörler için en iyi sonucu vermektedir. Fakat kanser vücudun başka bir yerine yayıldığında, cerrahi yöntemi genellikle etkili olmamaktadır. Bu nedenle yayılmış kanser türleri için tercih edilmemektedir (25).

2.2.2. Kemoterapi Yöntemi

Kemoterapi, kanser hücrelerini öldürmek için anti-kanser ilaçları kullanan bir kanser tedavisi yöntemidir. Kemoterapi; kanseri tedavi etmek, tekrarlama olasılığını azaltmak, büyümelerini durdurmak, yavaşlatmak, kanser semptomlarını hafifletmek ağrıyı ve diğer sorunlara neden olan tümörleri küçültmek için kullanılabilir (26). Şu anda klinikte kullanılan birçok farklı kemoterapi ilacı vardır (27). Tedavi sırasında kullanılan ilaç; kanserin türüne, kanserin vücuttaki başlangıç noktasına, kanserin yayılıp yayılmadığına, hastanın genel sağlığına bağlı olarak değişmektedir. Birçok kemoterapi ilacının tedavi sonuçları birçok kanser türü için iyi sonuçlar vermektedir. Ancak kemoterapi ilaçlarından her zaman istenen faydayı sağlamak mümkün değildir ve bu ilaçların birçok yan etkisi vardır. Örneğin; hastayı yorgun hissettirebilir,

hastanın iştahını etkiler, özellikle el ve ayaklardaki sinirlere zarar verir. Bazı kemoterapi ilaçları böbrek, karaciğer, kalp veya akciğerlerin çalışma şeklini etkileyebilir (26). Ayrıca kemoterapik ilaçlar çoğunlukla bölünen hücreleri hedef aldığından kanser kök hücrelerini yüksek dirençlerinden dolayı yok etmeyi başaramamaktadır. Bu da kanserin tekrarlamasına neden olmaktadır. Kemoterapi ilaçlarının yan etkilerini azaltmak, hedefe yönelik tedavi sağlayabilmek ve kanser kök hücrelerini yok edebilmek için nanoteknoloji alanında çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (8,21,28).

2.2.3. Radyoterapi

Radyoterapi, kanser hücrelerini öldürmek ve tümörleri küçültmek için yüksek dozda iyonize radyasyon kullanan kanser tedavisi yöntemidir (29). Radyoterapi tedavisinin hedefi, tümörlü dokunun yok edilmesi sırasında normal dokuların korunmasıdır. İyonize radyasyon ile kanser hücrelerin DNA'sına zarar verilerek bu hücreler öldürülmektedir. Sağlıklı hücreler radyasyondan etkilense de onarım mekanizmaları genellikle birkaç ay içinde bu sorunu düzeltir. Radyasyonun tipi, dozlama programı, uygulama tekniği ve ayrıca tümörün ve normal dokuların biyolojik özellikleri gibi faktörler radyoterapi sonrasındaki klinik sonucu etkilemektedir (29). Radyoterapi tedavisinin, harici radyoterapi ve dahili radyoterapi olmak üzere iki türü bulunmaktadır. Harici radyasyon tedavisi, vücudun belirli bir bölümünü tedavi edildiği lokal bir tedavidir. Örneğin, akciğerde kanser varsa, tüm vücuda değil, yalnızca göğüs bölgesine radyasyon uygulanır. Dahili radyasyon tedavisi ise vücudun içerisine bir radyasyon kaynağının yerleştirildiği bir tedavi yöntemidir. Radyasyon kaynağı katı veya sıvı olabilir. Uygulanacak radyoterapi; kanser türü, tümör boyutu, tümörün vücuttaki yeri, hastanın tıbbi geçmişi, yaşı gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (30).

Radyoterapi yöntemi dünya çapında en çok tercih edilen kanser tedavi yöntemlerinden birisidir. Fakat bulantı, kusma, saç dökülmesi, ishal, şişlik gibi çeşitli yan etkilere neden olabilmektedir. Bu yan etkiler hastadan hastaya farklılık göstermektedir (31).

2.2.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi, bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan kanser tedavisi yöntemidir (32). Bağışıklık sistemi, vücudun hastalık yapan yabancı mikroplara karşı korunmasına, enfeksiyon ve diğer hastalıklarla savaşmasına yardımcı olmaktadır. İmmünoterapi tedavisi, tümör büyümesini teşvik etmede etkili olan normal sinyalleri taklit

etmek için kansere karşı bir bağışıklık tepkisi oluşturan veya güçlendiren biyolojik ajanların kullanılmasına dayanmaktadır (32).

2.2.5. Hipertermi

Son yıllarda tekrarlayan ve ilerlemiş kanserlerin tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi farklı tıbbi tekniklerin yanı sıra tedavi edici, zararsız ve tamamlayıcı bir yöntem olan hipertermiden yararlanılmaktadır (33). Hipertermi, temel olarak, kanser hücrelerine zarar vermek, onları öldürmek veya diğer tedavi yöntemlerini daha duyarlı hale getirmek için vücut dokusunun fizyolojik sıcaklıkların üzerinde ($\sim 41-47\text{ }^{\circ}\text{C}$) ısıtılarak sağlıklı vücut bölgesine uygulanan bir tedavi türüdür (34). Kemoterapi ve radyoterapi tedavisinin yanı sıra klinikte tamamlayıcı bir yöntem olarak, kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, cerrahi, gen tedavisi ve kanser için immünoterapi dahil olmak üzere şu anda mevcut tedavileri tamamlar (35). Kanseri tedavi etmek için uygulanan hipertermi, termal terapi, termal ablasyon veya termoterapi olarak da adlandırılmaktadır (36).

Kanserli hücrelerin düzensiz damar ağları ve kanserli doku içerisindeki düşük kan akışı tümörün konvektif soğuma hızını düşürür ve tümörün aşırı ısınmasına neden olur. Sağlıklı hücreler bu sıcaklıklara kısa bir süre dayanabilirken kanserli hücreler apoptoza uğrarlar (33). Sonuç olarak, kanserli dokudaki hücrelerin canlılığı $41-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında önemli ölçüde azalırken, sağlıklı dokular ısıyı başarılı bir şekilde dağıtabilmekte ve oradaki hücreler hayatta kalabilmektedir. Lokal, bölgesel ve tüm vücut hipertermisi, mevcut üç hipertermi stratejisi olarak kategorize edilmektedir (33). Bu stratejilerin uygulanması mikrodalga, radyofrekans, lazer ve ultrason teknikleri gibi farklı ısıtma yöntemleriyle gerçekleştirilebilir (37). Hipertermi uygulamaları, klinik uygulamalarda önemli ilerlemeler sağlasa da kabarcıklar, yanıklar, ağrı ve düzensiz doku büyümesi gibi çeşitli yan etkileri vardır (38). Son yıllarda radyoterapi ile birlikte farklı yaklaşımlarda kullanılmaya başlanmıştır ancak sağlıklı dokularda bu tedavilerle ilişkilendirilebilecek ciddi zararlı etkiler olduğu bulunmuştur (39). Bu çerçevede nanoteknoloji, MNP'lerin yerel bir ısıyı uzaktan indüklemek için kullanımına dayanan manyetik hipertermi uygulaması ile yeni bir çözüm sunmaktadır. Çeşitli kaplamalar sayesinde MNP'lerin kullanımı, yeni bir terapötik ısıtma tekniği olarak kabul edilmiştir (33). Araştırmacılar, yapılan araştırmalarda MNP'ler ile gerçekleştirilen lokalize hiperterminin daha az yan etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

2.3. Manyetik Nanopartikül Hipertermi

Manyetik Nanopartiküller (MNP) kullanılarak gerçekleştirilen hipertermi uygulaması manyetik nanopartikül hipertermi (MNPH) olarak adlandırılmaktadır (35). MNPH ısı

indüksiyonunun uzaktan tetiklenmesi, tümörlerin seçici olarak öldürülmesi ve minimal invaziv olma gibi arzu edilen değerlere sahip, gelişmekte olan bir kanser termoterapisidir (40). MNPH, doğrudan nanopartiküllerden kaynaklanan benzersiz avantajlar sağlayan tek termal kanser nano-tıbbıdır ve diğer tümör tedavi yöntemlerine kıyasla nispeten toksik değildir (41,42). Ayrıca, MNPH ile, tümörü çevreleyen dokulara zarar vermeden tümör hücreleri lokalize olarak ısıtılabilir (43).

Süperparamanyetik nanopartiküller, sadece tümör bölgesinin sıcaklığının artırılması ve sağlıklı dokunun korunması amacıyla MNPH uygulamalarında büyük ilgi görmüştür (15,17,33,35,44,45,46). Bu parçacıklar, belirli alanda ısı artışı şeklinde enerji üretimine neden olan harici bir alternatif manyetik alan uygulanarak doğrudan kanser hücrelerini hedef almaktadır. Sonuç olarak, tümörler kısmen veya tamamen yok edilebilmektedir. Ayrıca hipertermi tekniği için süperparamanyetik nanopartiküllere, antikanser ilaçlar konjuge edildiğinde kanser hücrelerine terapötik ajanlar verilerek bu yöntemin etkinliği artırılabilir (44). Manyetit (Fe_3O_4), dekstran, katyonik lipozomlar, polivinil alkol ve hidrojel gibi farklı ligandlarla kararlı hale gelebilen iyi bilinen süperparamanyetik bir malzemedir. Düşük doyum manyetizasyonuna sahip olması nedeniyle klinik araştırmalarda tercih edilebilmektedir.

MNPH'nin, diğer geleneksel tedavi yöntemleriyle birlikte veya sadece hipertermi uygulaması sonrası kanserli bölge üzerine olumlu etkileri bildirilmektedir (7, 8, 47). Basel ve arkadaşları 2012'deki çalışmada sentezledikleri demir/demir oksit nanopartiküllerini tümör yerleşim hücreleri olan RAW264.7 (fare monosit/makrofaj benzeri hücreler) hücrelerine yüklemişlerdir. Yayılmış peritonal pankreas kanserinin bir murin modeli oluşturulmuş ve tümör gelişimi gerçekleştikten sonra demir/demir oksit nanopartikülleri ile yüklenmiş RAW264.7 hücreleri intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan üç gün sonra fareler, hipertermi tedavisi için 20 dakika boyunca alternatif bir manyetik alana maruz bırakılmış ve bu işlem bir grup farede üç kez tekrarlanmıştır. MNP'ler bir AMF stimülasyonu altında ısı üretmiştir. Çalışma bu sistemin bir murin pankreas kanseri modelinde hayatta kalma oranını %31 oranında arttırdığını göstermiştir (7). 2013 yılında Lee ve arkadaşları, Adamantine çekirdeğini PEG ile kaplayarak oluşturdukları poliami doamin dendrimerleri, doksorubisin ile kapsüllemişler ve DOX-SMNP'leri oluşturmuşlardır. Oluşturdukları MNP'lerin hipertermi tedavi potansiyelini değerlendirerek tedavi için bir protokol ortaya koymuşlardır. Çalışma sonucunda tasarlanan DOX-SMNP ile ilaç salımı ve hipertermi tedavisinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiş, 2 kez hipertermi tedavisi uygulanan hayvanlarda, tümör büyümesinde azalma

olduğu görülmüştür (8). Kolosnjaj-Tabi ve arkadaşları 2014 yılında yayımladıkları çalışmada, manyetik özelliklere sahip 19 nm boyutlarında, PEG kaplı demir oksit nanopartiküllerinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Farelerde epidermoid karsinom ksenograftlarına, 700 µg nanopartikül enjeksiyonundan sonra, hipertermi uygulamasının ve nanopartiküllerin tümör üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar kemoterapi tedavisinin MNP'ler ile daha etkili olabileceğini bildirmiştir (47).

2.3.1. Manyetik Nanopartiküller

MNP'ler, harici bir manyetik alanın etkisi altında manipüle edilebilen, mevcut klinik teşhis ve tedavi tekniklerinde olumlu değişiklikler yaratma potansiyeline sahip nano ölçekli malzemelerdir (48). MNP'ler biyomedikal uygulamalar için birçok avantajı sunmaktadır. Bunlardan bazıları şu şekilde özetlenebilir:

- Kontrol edilebilir boyutlar sunarlar (49). Boyut ve özelliklerin optimizasyonu, çalışmanın ilgi alanına giren biyomoleküllerle kolayca eşleşir.
- Harici bir manyetik gradyan tarafından manipüle edilebilirler.
- Biyouyumlu hale getirmek için, organik ve inorganik malzemeler ile kaplanmaya ve çeşitli biyoaktif moleküllerin eklenmesiyle daha fazla işlevselleştirilmeye uygundur (50).
- Benzersiz manyetik özelliklere ve biyolojik etkileşimlerin hücresel ve moleküler düzeyinde işlev görme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri onları manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast ajanları ve ilaç dağıtımı için taşıyıcı sistemlerde önemli bir rol oynamasını sağlar (48, 51, 52,53).

Birçok biyomedikal uygulamada genellikle yüksek doygunlukta magnetizasyon içeren metaller (Demir, kobalt, nikel gibi) veya metal oksitlerini içeren materyaller tercih edilmektedir. Saf metaller yüksek doygunlukta magnetizasyona sahiptir. Fakat oldukça toksiktir ve oksidasyona duyarlıdır. Bu sebeple bu metal nanopartiküller biyomedikal uygulamalara uygun değildirler. Metal nanopartiküllerin aksine, demir oksit nanopartiküller (SPION) oksidasyona daha az duyarlıdır ve bu sebeple daha kararlı manyetik cevap verirler. SPION'lar çok kristalli yapıya sahiptir ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda, çekirdek yapısı olarak γ -Fe₂O₃ (maghemit) ve Fe₃O₄ (magnetit) sıklıkla tercih edilmektedir (54). Farklı materyaller ve SPION'ların kombine edilmesiyle hazırlanan nanomateriyaller, içerdikleri farklı materyallerden dolayı yüksek özgülük, spesifik yüzey kimyası, özgül optik ve manyetik özellikler taşırlar ve bu özellikler onların yaygın olarak kullanımını sağlar. Bu kullanım

alanları; ilaç salım sistemleri, hipertermi ve görüntüleme uygulamaları vb. olarak ifade edilebilir.

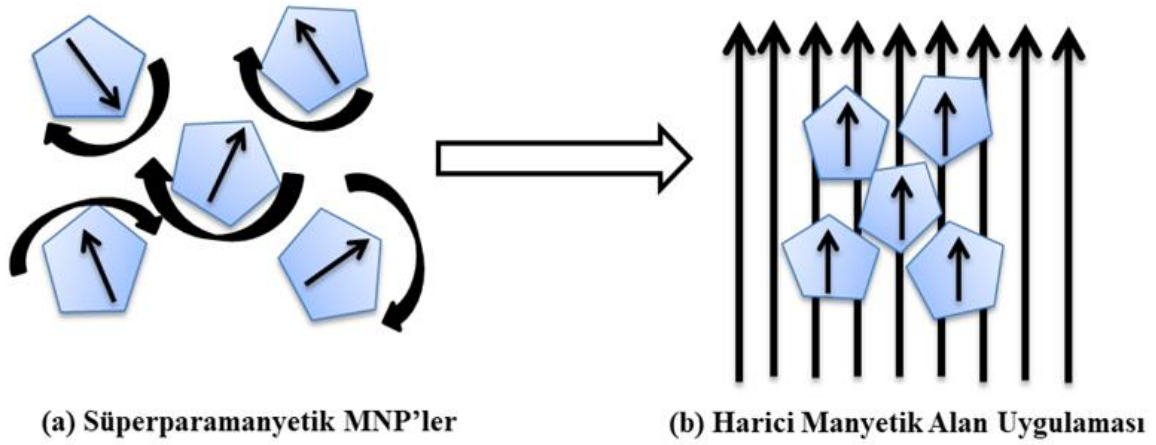
2.3.1.1. Demir Oksit Nanopartiküller (SPION)

Demir oksit çekirdekleri, biyouyumlulukları ve klinik görüntülemede kullanımları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda daha başarılı bulunmaktadır. Geçen son 20 yıllık süreçte, geniş yüzey alanı/hacim oranı, bir mıknatısla kolay manipülasyon, yüksek manyetizasyon ve yüksek doyumluk, kanıtlanmış biyouyumluluk ve biyolojik uygulamalarda umut vermesinden dolayı farklı çeşitteki demir oksitlerle yapılan çalışmalarda önemli oranda bir artış gözlemlenmektedir (55). Araştırmacılar özellikle γ -Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ içeren süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin araştırılmasına ve geliştirilmesine odaklanmaktadır (56, 57, 58). Biyomedikal uygulamadaki, kimyasal kararlılığı, toksik olmaması ve üretim kolaylığı gibi benzersiz özellikler gösterdikleri için Fe₃O₄ çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (59,60). Bu projede manyetik çekirdek olarak Fe₃O₄ kullanılmıştır.

Malzemeler manyetik özelliklerine göre 3 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar:

- Diamanyetik malzemeler
- Paramanyetik malzemeler
- Ferromanyetiki malzemelerdir (61).

SPION'lar, ferromanyetik malzemeler sınıfına dâhil edilen süperparamanyetik malzemeler sınıfında yer almaktadır. Süperparamanyetik malzemeler, ferromanyetik malzemelerden farklı olarak boyutları nedeniyle harici bir manyetik alan dışında manyetik özelliklere sahip değildir (62). Süperparamanyetizma, parçacıklar, termal etkiler nedeniyle manyetik momentlerinin rastgele değişmesine neden olacak kadar küçük olduğunda meydana gelir. Süperparamanyetizma elde edebilmek için gereken boyut sınırları, çekirdek malzeme bileşimlerine göre farklılık göstermektedir ve bu boyut sınırı SPION'lar için boyut<30 nm'dir (63).



Şekil 2.1. Süperparamanyetik MNP'lere Harici Manyetik Alan Uygulanması (63)

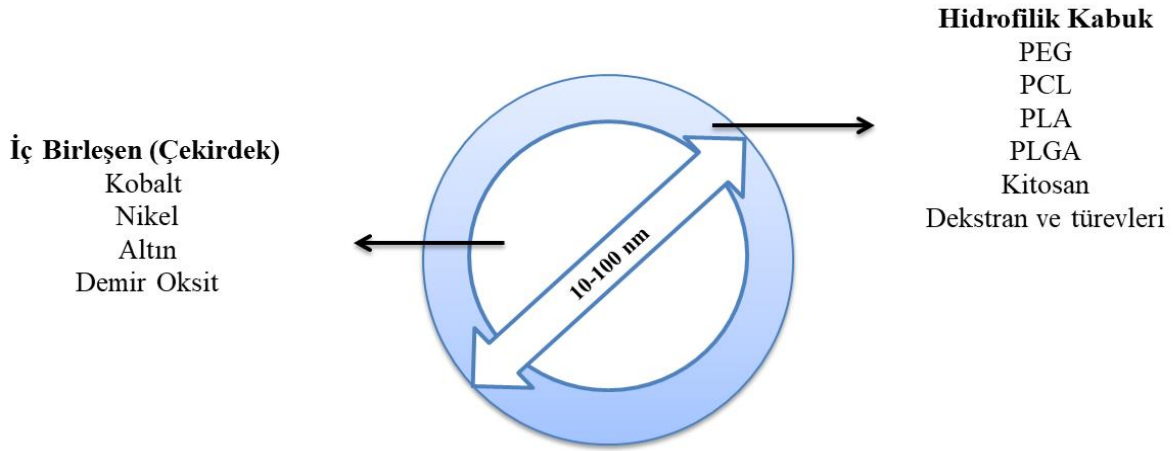
Süperparamanyetik MNP'ler, uygulanan manyetik alanla aynı yönde manyetik momentler içerirler. Harici manyetik alan olmadığında, MNP'lerin momentleri termal etkilerden dolayı rastgele ters döner ve yaklaşık olarak sıfır manyetizma gözlenir (Şekil 2.1. (a)). Harici bir manyetik alan uygulandıktan sonra, MNP'lerin momentleri manyetik alan yönünde hizalanır. (Şekil 2.1. (b)). Dış manyetik alan uygulandığında manyetik alan yönüne dönen momentler, alan kaldırıldığında tekrar rastgele yönelerek toplam mıknatısları yaklaşık olarak tekrar sıfırlanır (22). Bir moment-dönüşünden diğerine karakteristik zaman Neel gevşeme zamanı olarak adlandırılır ve yaklaşık olarak Neel-Arrhenius denklemi ile belirlenir: $\tau_0 \cdot \exp(KV/(k_B \cdot T))$. τ_0 , çevirme girişimleri arasındaki süredir ve malzemeye bağlı olarak 10^{-9} - 10^{-12} aralığında değişir. V partikül hacmi, K manyetik anizotropi enerji yoğunluğu, T sıcaklık ve k_B Boltzmann sabitidir (63).

Biyomedikal uygulamalar için kullanılan SPION'lar genellikle manyetik bir çekirdek ve işlevselleştirmeyi kolaylaştıran bir dış organik katmandan oluşmaktadır (22). Bunun nedeni: SPION'un kararlılığının, manyetik, dipolar ve van der Waals etkileşimleri gibi farklı çekici etkileşimlerin dengesinden etkilenmesidir (64). Bu nedenle, herhangi bir organik/inorganik kaplama ile kaplanmayan SPION'lar, manyetik özelliklerini etkileyen, bir araya toplanma eğilimindedir (14, 55). Bu kümelenmeyi önlemek için, genellikle ya elektrostatik ya da sterik itme ile stabilize etmek için koruyucu kabuk(lar) ile yüzeyleri modifiye edilir (65, 66).

2.4 Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Kaplamaları

MNP'lerin nanoboyutu ve artan yüzey alanı/hacim oranının bir sonucu olarak araştırmacılar MNP'lerin yapı ve özellikleri arasındaki ilişkiyi çalışmaya odaklanmışlardır. Birleşim, boyut, morfoloji ve yüzey kimyası hem manyetik özellikleri geliştirmek hem de in-vivo olarak

nanopartiküllerin istenilen davranışı göstermesi için çeşitli prosesler ile ayarlanabilmektedir (67).



Şekil 2.2. MNP'lerin "Çekirdek-Kabuk" Yapısı (67)

İyi biyouyumluluk gösteren bir malzeme ile kaplanan MNP'lerin yüzey alanları genişletilebilmektedir. Manyetik bir çekirdek ve yüzey kaplaması ile oluşturulan yapı "çekirdek-kabuk" yapısı olarak adlandırılır ve ek modifikasyonlar ile işlevsellik kazandırılabilir (Şekil 2.2.).

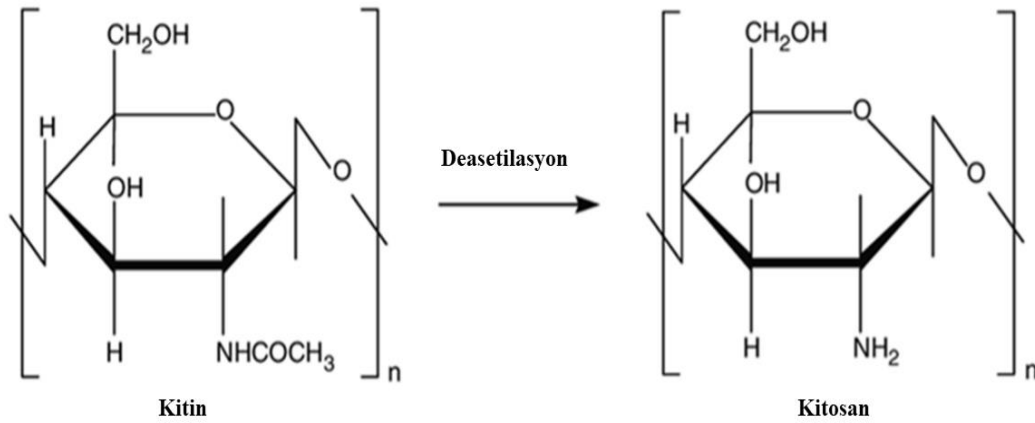
10-100 nm MNP'lerin intravenöz uygulama için uygun olduğuna düşünülmektedir; çünkü >100 nm nanopartiküller dalakta fagositoz ile süzülür ve <10 nm nanopartiküller renal filtrasyon ile hızla temizlenir (68, 69). Ek olarak, nano partiküllerin retiküloendotelial sistem (RES) tarafından opsonizasyonu ve temizlenmesi, katyonik polimerlerin veya PEG gibi hidrofilik polimerler ile kaplanması sağlanarak önlenabilir (34). Kaplamalar MNP'leri fizyolojik sıvılarda stabilize eder ve vücutta kalma sürelerini uzatır. MNP'lerin kararlılığının artırılması amacıyla sentez süresince ya da sentez sonrası biyouyumlu bir polimer kullanılarak yapılan kapsülleme işlemi, biyolojik sisteme maruz kaldıklarında agregat oluşumunu ve biyodegradasyonu engeller. Ayrıca, yüzey kaplamaları MNP'lere terapötik (antikanser ilaç vb.) ve hedefleyici parçaların tutunmasını sağlar (6,8, 22, 70).

Hem doğal hem de sentetik polimerler, MNP'leri kaplamak için araştırılmıştır. Bu polimerlerden bazıları ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Polikaprolakton (PCL), PEG, polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), dekstran ve kitosan bu polimerlere örnek verilebilir (67). PCL, PLGA, kitosan gibi biyouyumlu polimerler, özellikle ilaç dağıtımı gibi uygulamalarda kullanıldığında MNP'lerin biyouyumluluğunu ve biyobozunurluğunu daha da geliştirmektedir. Bu polimerler

arasında kitosan, ilaç/gen dağıtımını, kanser ve mikrop tedavilerini kontrol etme, protein-ağır metallerin adsorpsiyonunu ve yara iyileşmesini destekleme yeteneği ile bilinmektedir (14).

2.4.1. Kitosan

Kitosan, dünyada selülozdan sonra en bol bulunan ikinci polisakkarit olan kitin'in kapsamlı deasetilasyonundan elde edilen FDA tarafından onaylanmış doğal bir polimerdir. N-asetil d-glukozamin ve d-glukozamin birimlerinden oluşmaktadır (71,72). İki alt birim, bir sonraki birimi (1-4)-β-glikosidik bağ ile bağlar. Kitinin deasetilasyonu kitin içindeki N-asetil glukozaminden asetil gruplarının ayrılması ile gerçekleşir (Şekil 2.3.). Deasetilasyon derecesi, ortalama glukozamin ve Nacetyl glukozamin sayısına göre bir parametredir. Bu parametre ve moleküler ağırlık bazında kitosanın kimyasal, fiziksel özellikleri belirlemektedir (73).



Şekil 2.3. Kitin ve Kitosanın Yapısı (73)

Pozitif yüzey yükü, katyonik yapısı ve SPION'lar gibi negatif yüklü maddelerle bağlanma yeteneği, kitosanın birçok uygulamada kullanımı için biyolojik ve fizyolojik fayda sağlamıştır (74). Antibakteriyel özelliklere sahip olan kitosan, hidrofilik, toksik olmayan, uyarıcıya karşı duyarlı bir polimerdir. Ayrıca yüksek biyoyararlanım, modifikasyon kolaylığı, uygun su geçirgenliği, mükemmel kimyasal direnç, nanopartiküller, içi boş küre, jeller, filmler, mikropartiküller vb. gibi farklı şekiller ve kombinasyonlar oluşturma kabiliyetine sahip olduğu kanıtlanmıştır (75). Biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoaktivite gibi ideal özelliklerinden dolayı nanopartiküllerin agregasyonunu önlemek ve kolloidal stabilizeyi ve in-vivo kan dolaşımını iyileştirmek için moleküler bir yüzey aktif madde olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (60, 75). Özellikle son 20 yıl içerisinde kitosan üzerine yapılan çalışmalar artmıştır (16, 76). Biyolojik olarak parçalanabilirliği, hemostatik aktivite, antibakteriyel ve

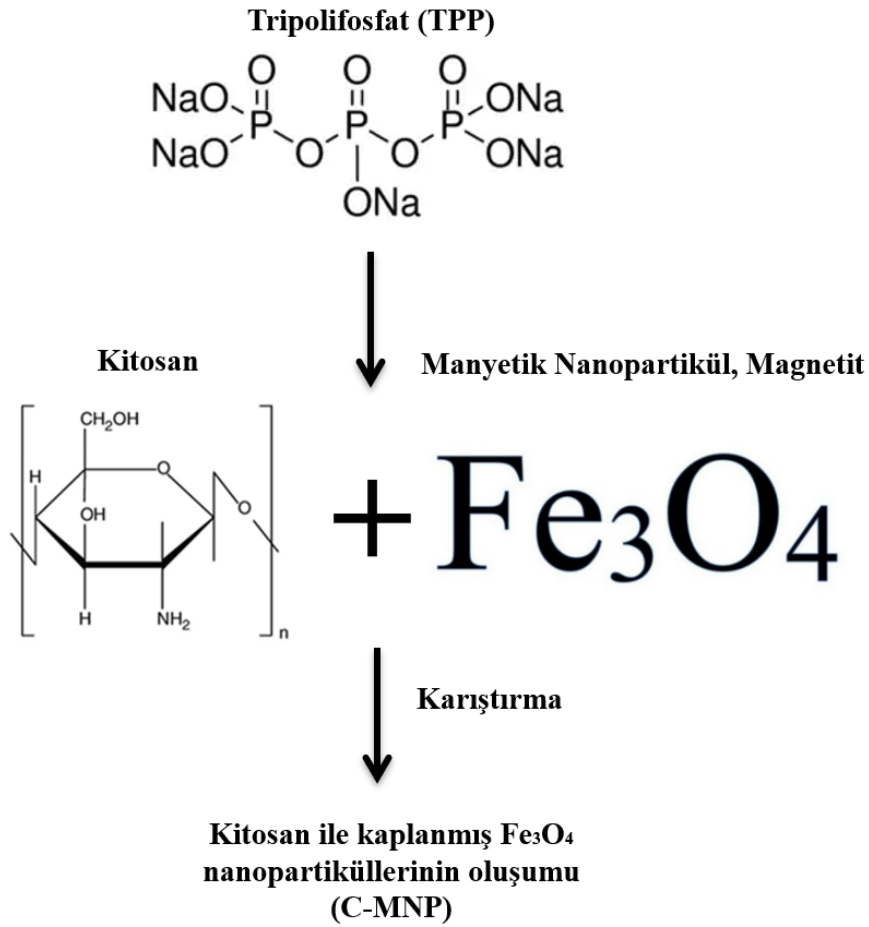
antifungal aktiviteleri, hücre uyumluluğu ve sınırlı immünojenisite gibi olumlu özellikleri bu polimeri farklı biyomedikal uygulamalarda (ilaç salım sistemleri, hipertermi, hidrojel vb.) yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır (71).

2.5. Fe₃O₄-Kitosan Nanopartikülleri

Fe₃O₄ nanopartikülleri, tüm nanopartiküller arasında biyomedikal alanda en yaygın olarak kullanılanlardır. Fe₃O₄ nanopartikülleri üzerindeki, kitosan kaplama, agregat oluşumunu azaltır ve terapötik ilaçların yüklenmesi ve fonksiyonel grupların eklenmesi için boşluklar sağlamaktadır (22). Yapılan önceki çalışmalar, kitosan kaplı Fe₃O₄ nanopartiküllerin hücre takibi, kanser tespiti ve terapötik yanıt için kullanılabileceğini göstermiştir (22, 60, 69, 77, 78). Ayrıca, hipertermi uygulamaları için Fe₃O₄-kitosan sisteminin üretimi konusunda çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (16, 79). Soares ve arkadaşları, 2016 yılında yayımladıkları çalışmada, kimyasal çökeltme ve termal ayrışma yöntemleri ile üretilen ve farklı moleküler ağırlıklara sahip kitosan ile kaplanmış Fe₃O₄ nanopartiküllerini incelemişlerdir. Fe₃O₄ ve kitosan-Fe₃O₄ nanopartiküllerinin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Araştırmacılar, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin kitosan ile kaplanmasının, nanopartiküllerin hidrodinamik çapını arttırdığını fakat kitosanın, nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini (kristalliliği, kimyasal bileşimi, süperparamanyetik özellik) değiştirmediği bulgusuna ulaşmışlardır. Ayrıca, manyetik hipertermi ölçümleri gerçekleştiren araştırmacılar, bu nanopartiküllere AMF uyguladıklarında ısı üretebilmişlerdir (16). Chauhan ve arkadaşları 2020 yılında yayımladıkları çalışmada, elektrokimyasal yöntem ile 30-40 nm boyutlarında, kitosan ile kaplanmış Fe₃O₄ nanopartiküllerini sentezlemişler bu nanopartikülleri AMF hipertermi uygulaması için kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda, kitosan ile kaplanmış Fe₃O₄ nanopartiküllerinin düşük sitotoksisite ve yüksek ısıtma verimliliği sergilediğini ve kitosan kaplamanın Fe₃O₄ nanopartiküllerinin kolloidal stabilitesini ve biyoyumluluğunu arttırdığı belirtmişlerdir (17). Pazouki ve arkadaşları, 2021 yılında yayımladıkları çalışmada kurkumin içeren karboksimetil kitosan ile kaplanmış Fe₃O₄ nanopartiküllerinin hipertermi ile insan meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Hazırlanan nanopartiküllerin hipertermi ile kombinasyonunun, MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını engelleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar, antikanser ilaçların, MNP'lerde kapsüllenmesinin ve hipertermi ile kombine edilmesinin tedavinin etkinliğini artırabileceğini, çalışmanın meme kanseri tedavisi için umut verici bir kombinasyon tedavi sunduğunu düşünmektedir (80). Fe₃O₄ nanopartiküllerinin kitosan ile kaplanmasının, nanopartiküllerin manyetik özelliklerini

etkilemediği literatürde bulunan çalışma sonuçları incelendiğinde görülmektedir. Ayrıca, yaygın ve biyoyumlu polimer olan kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin MRI kontrast maddesi, ilaç dağıtım sistemleri, hipertermi ve diğer biyomedikal uygulamalar için kullanılmaları literatürde tavsiye edilmektedir (14). Araştırmacılar, kitosan kaplı Fe_3O_4 'in AMF hipertermi uygulamasında başarılı olduğunu, AMF karakterizasyonu belirleyerek göstermiştir (81).

Bu çalışma planlanırken “MNP”ler ile hipertermi tedavisinin klinik de kullanılabilmesi için düşük yoğunluk ve elektrik alan değerlerindeki MW hipertermi karakterizasyonunun belirlenmesi önemlidir” hipotezi ile çalışılmaya başlanılmıştır. Literatür çalışmaları göz önüne alınarak, düşük yoğunluk ve düşük elektrik alan değerlerindeki MW hipertermi karakterizasyonunun belirlenmesi için, projede C-MNP’ler kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanması Şekil 2.4’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. İyonik Jelasyon ile Nanopresipitasyon Tekniği ile C-MNP’lerin Hazırlanması, Şematik Gösterim

2.6. Mikrodalga Hipertermi

MW, 300 MHz ila 300 GHz aralığındaki elektromanyetik radyasyonlardır (5). Elektromanyetik spektrumun iyonize olmayan radyasyon bölgesinde olan MW, biyolojik sistem üzerinde termal etkiye neden olabilmektedir. Mikrodalga hipertermi, mikrodalga radyasyonu uygulaması ile, vücut dokusunun yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldığı kanser tedavisi için kullanılan termal bir tedavi yöntemidir. Kanser hücrelerinin öldürülmesi, proteinlerin ve hücre içi yapıların zarar görmesi ile tümör dokuları küçültebilmektedir (83).

Mikrodalga teknolojisi, farklı tümör türleri için diğer ablasyon yöntemleri (RF, ultrason, vb.) ile karşılaştırıldığında önemli avantajlar sağlamaktadır:

- Daha yüksek tümör içi sıcaklıklar,
- Daha geniş tümör ablasyon hacmi,
- Daha kısa ablasyon süresi,
- Damarlara yakın tümör dokularında optimal ısınma,
- Daha az ağrı vb. (84).

Tüm bu avantajlar ile birlikte, MW hipertermi tedavisi onarım süreçlerini iyileştirebilmekte, ilaç aktivitesini artırabilmekte ve ağrıdan daha etkili bir şekilde kurtulmaya izin verebilmektedir. Fakat MW hipertermi tedavisinin, çevredeki hayati organlara ve dokulara zarar veren yanlış hedefleme ve düşük seçicilik gibi zorlukları bulunmaktadır (55). Cilt MW enerjisinin çoğunu dağıtmaktadır. Bu nedenle MW hipertermi tedavisinin klinik uygulamaları sınırlanmaktadır (85). Araştırmacılar MW hipertermi tedavisinin sınırlamalarının üstesinden gelmek, kanserli hücreleri ısıtarak yok etmek ve çevredeki sağlıklı dokuya verilen zararı en aza indirmek için hedefe yönelik/spesifik termal terapi yöntemlerinin kullanımına odaklanmıştır (5,15). MNP kullanılarak gerçekleştirilen MW hipertermi tedavisi kanser tedavisi alanında, bu sınırlamaların üstesinden gelebileceği düşünülen yeni bir araştırma alanıdır.

2.6.1 Mikrodalga Manyetik Nanopartikül Hipertermi Uygulamaları

Manyetik nanopartiküller ile MW hipertermi tedavisi kanser tedavisi alanında yeni bir araştırma alanıdır ve konu ile ilgili in-vivo ve in-vitro araştırmalar sınırlıdır. Ulaşılan literatür sonuçlarına aşağıda değinilmiştir.

McWilliams ve arkadaşları 2017 yılındaki çalışmalarında, $\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ve Fe_3O_4 nanopartiküllerinin MW ısıtma etkinliğini değerlendirmişlerdir. $\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ (10 ve 20 nm çapında küresel çekirdek/kabuk yapısında) ve Fe_3O_4 (20 nm kenar uzunluğunda kübik yapıda ve 45 nm kenar uzunluğunda/10 nm yüksekliğinde altıgen yapıda) nanopartiküllerini kullanan araştırmacılar, yüzey kaplaması olarak dopamin kullanmışlardır. MNP'ler, agar fantom içerisinde çözülerek 2.0, 2.45 ve 2.6 GHz MW frekanslarının ısıtma etkileri deneysel olarak değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda, 10 mg/mL MNP konsantrasyonu için, 2.0 GHz MW frekansında daha fazla ısıtma artışının olduğu gösterilmiştir. 10 nm çapındaki $\text{Fe}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNP'lere sahip fantomlarda, 20 nm çapında küresel MNP'lere sahip fantomlara kıyasla daha büyük sıcaklık eğimi görülmüştür. Araştırmacılar, MW ısıtma mekanizmasını aydınlatmak, MNP'lerin tasarımını kolaylaştırmak, MNP'lerin termal ve elektromanyetik özelliklerini karakterize etmek için çalışmaların yapılmaya devam etmesi gerektiğini bildirmişlerdir (15). Abo-Neima ve arkadaşları, 2021 yılında farelerde ehlich tümör modeli oluşturularak in-vivo bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, bir grup fareye MTX ilacı, Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 nanopartikülleri enjekte etmiş ve sonrasında MW'ya maruz bırakmıştır. MW maruziyetinin MTX ilacı, Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 nanopartiküllerinin etkinliğini arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar, MW ışıması ile birlikte hedeflenen nanopartiküllerin bölgesel sıcaklık artışı sağlayabileceğini ve kanser tedavisi için uygun olduğunu bildirmişlerdir (5).

3. MATERYAL METHOD

Bu bölümde, proje kapsamında kullanılan materyaller ve gerçekleştirilen deneysel çalışmalar açıklanmıştır. Deneysel çalışmalar 2 temel aşamada aşağıda belirtilen sıralama doğrultusunda gerçekleştirilmiştir:

Çalışmanın ilk aşamasında, Kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin üretimi sentezlenerek elde edilen sentezlenmiş MNP'lerin madde karakterizasyon çalışmaları yer almaktadır.

İkinci aşamasında, sağlıklı meme ve tümör eşdeğeri dokuları agar tozu kullanılarak oluşturulmuş ve oluşturulan dokular üzerinde C-MNP'nin MW hipertermi termal karakterizasyonu araştırılmıştır.

3.1. Materyaller

3.1.1 Çözücü ve Kimyasallar

Kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin (C-MNP) sentezi için, manyetik demir oksit nanopartikülleri (Fe_3O_4 , 5 nm,) (Sigma-Aldrich, PCode:7000320) satın alındı. Kitosan (Sigma-Aldrich, PCode: 101726308), asetik asit, Tween®80 (Sigma Aldrich, PCode:101560188), sodium tripolifosfat (TPP) Prof. Dr. Seda Tıǧlı Aydın tarafından sağlandı. Agar tozu (Sigma-Aldrich, PCode:05040) manyetik hipertermi deneyleri için agar jel fantomu hazırlanması amacıyla kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS): Malvern Mastersizer 2000

Zeta-Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı: Malvern Nano ZS90

X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD): Rigaku MiniFlex Masaüstü X-Işını Kırınım Cihazı, Rigaku Ultima-IV X-Işını Kırınım Cihazı

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR): Bruker Tensor 27 FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) Spectrometer, Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR Spectrometer

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC): TA Instruments DSC Q2000, Perkin Elmer DSC 8000

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): JEOL JSM-7001F Electron Microscope

Mikrodalga Verici Cihaz ve Anten (2004X RF, Set Elektronik Ltd. Ştd., Adapazarı, Türkiye)

Termal Kamera: Testo 865

Pico TC-08 Thermocouple

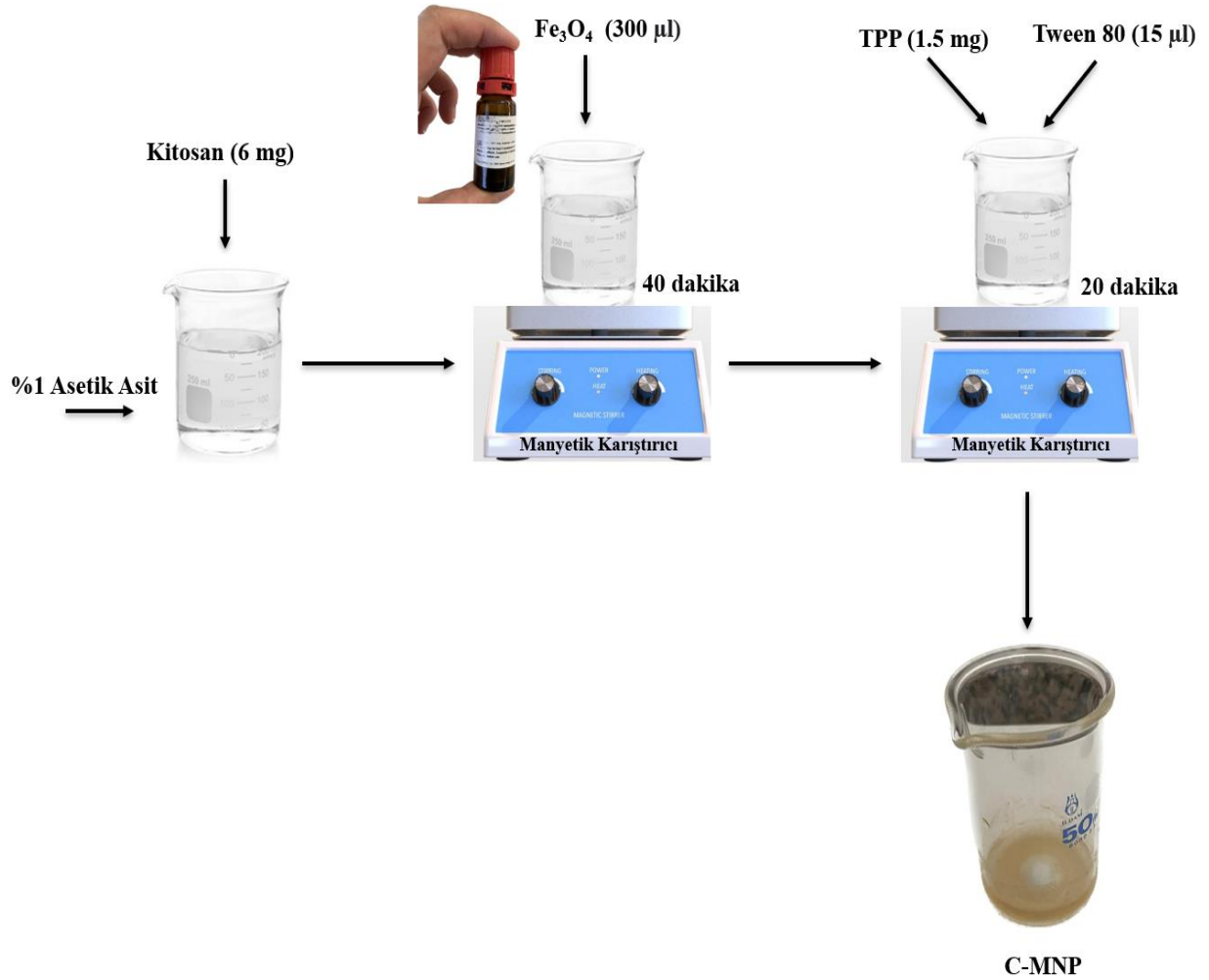
3-Axis RF Field Strength Meter (TM-196)

Hassas terazi

3.2. Fe_3O_4 'ün Kitosan ile Kaplanması

Bu çalışmada kitosan ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartikülleri (C-MNP) sentezlendi. C-MNP'lerin sentezinde iyonik jelasyon metodu kullanıldı. C-MNP'lerin sentezi lüiteratür çalışmalarına benzer şekilde gerçekleştirildi (22, 86). Fe_3O_4 üzerine kitosan kaplama işlemi için öncelikle, kitosan (6 mg) %1 asetik asit içinde çözündürüldü. 5 nm boyutundaki Fe_3O_4 (300 μl), hazırlanan kitosan çözeltisi içerisinde çözdürülerek manyetik karıştırıcıda 40 dakika (dk)

boyunca karıştırıldı. Bu çözelti içerisine, 1,5 mg TPP ve 15 µl Tween 80, 500 rpm altında manyetik karıştırıcıda, karıştırılarak eklendi. Çözelti, 20 dk boyunca karıştırılarak C-MNP elde edildi (Şekil 3.1). C-MNP'leri içeren çözeltinin bir kısmı, petri kabına koyularak 1 gece boyunca bekletildi. Elde edilen kitosan kaplı nanopartiküller etiketlendi. Karakterizasyon analizleri ve hipertermi çalışması için kuru toz formunda saklandı.



Şekil 3.1 C-MNP'lerin Hazırlanma Aşamalarının Şematik Gösterimi

3.2.1 Madde Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1.1. Partikül Büyüklüğü Tayini (DLS) Analizi

Partikül büyüklükleri, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında, DLS metodu ile tayin edildi.

3.2.1.2. Zeta Potansiyel Analizi

Malzemelerdeki sağlamlık, kimyasal reaktivlik, opaklık, akışkanlık gibi özellikleri ve malzeme mukavemeti, malzemelerin içindeki tanecik boyutu karakteristiklerine bağlıdır. Zeta Potansiyel ölçümleri ODTÜ Merkezi Laboratuvarında yapıldı.

3.2.1.3. X-Işını Kırınımı Analizi (XRD) Analizi

Sentezlenen, C-MNP'lerin, kristal yapıları, ODTÜ Merkezi Laboratuvarında XRD analizi yapılarak karakterize edildi. Sonuçlar 20-80° (2θ) arasında, 0.026° 'lik adımlarla (adım başına 99.45 s süre) tarama yapılarak elde edildi.

3.2.1.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) Analizi

Kitosan ve sentezlenen C-MNP'lerin kimyasal bileşimini doğrulamak için FTIR spektrumları elde edildi. Kitosan'ın kimyasal içeriği Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARTMER)'de bulunan FTIR cihazı kullanılarak, C-MNP'nin kimyasal içeriği, Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (KİTAM)'da bulunan FTIR cihazı kullanılarak karakterize edildi. Kuru haldeki örnekler potasyum bromür ile pellet haline getirildikten sonra 400-4000 cm⁻¹ aralığında spektrumlar alındı.

3.2.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

C-MNP'lerin termal davranışlarının incelenmesi için OMÜ KİTAM'da DSC (Perkin Emler Diamond, DSC) ile azot ortamında yürütülen analizler yapıldı. Dondurularak kurutulmuş numuneler 10-300°C arasında 10°C/dk ısıtma hızı ile muamele edildi.

3.2.1.6. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) Analizi

Hazırlanan, C-MNP'lerin şekil ve yüzey morfolojilerinin incelenmesi amacıyla OMÜ KİTAM'da bulunan SEM cihazı kullanıldı. Bu amaçla nanopartiküller altın ile kaplandı. Kaplanan numuneler SEM cihazına yerleştirilerek görüntülendi. EDX analizi de aynı SEM cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. SEM ile görüntülenen, C-MNP'ler ve arka plan arasında bir kontrast oluşturmak, görüntü ölçeğini ayarlamak için ImageJ (National Institutes of Health)

yazılımı kullanıldı. Bu işlemde, SEM görüntüsünden bir kesit alındı ve hazırlanan C-MNP'ler küresel morfolojide oldukları varsayılarak manuel hesaplama yapıldı. Partiküllerin ortalama boyut ve standart sapma değerleri OriginPro 2023 programı kullanılarak belirlendi.

3.3 Meme Dokusu ve Tümör Dokusu Eşdeğeri Fantom Hazırlanması

Spesifik şekil ve özelliklere sahip özel yapım fantomlar, insan vücuduna benzer koşullarda deneyler yapma imkânı sunmaktadır. Projede, ısıtma deneyleri için gerçek dokularınkine benzer akustik özelliklere sahip agar bazlı toz kullanıldı. Çalışma için 4 tip agar numunesi hazırlandı:

- Nanopartikül eklenmemiş % 3 lük saf agar-jeli, (Sağlıklı meme eşdeğeri doku)
- Nanopartikül eklenmemiş % 5 lik saf agar-jeli, (Sağlıklı meme eşdeğeri doku+tümör eşdeğeri doku)
- Fe₃O₄ nanopartikülü eklenmiş % 5 lik agar-jel (MNP+tümör eşdeğeri doku)
- C-MNP eklenmiş % 5 lik agar-jel (C-MNP+tümör eşdeğeri doku)

Sağlıklı dokular ve tümörlü dokular farklı mekanik özelliklere sahiptir. Tümörler normal dokulardan daha yüksek sertlik ve daha düşük elastik modüller sergilerler. Bu nedenle çalışmada tümör modeli oluşturulması için daha yüksek agar konsantrasyonu kullanıldı. Tümör modeli ile fantomu taklit eden doku, saf bir agaroz jel (sağlıklı dokuyu taklit eden) ile çevrili MNP (MNP içeren, tümörlü dokuyu taklit eden) içeren bir karışım oluşturuldu. %4'ten düşük agar konsantrasyonlu jel, beyin gibi yumuşak dokudakine benzer bir gözenekliliğe sahipken, daha yüksek agar konsantrasyonlu jellerin, sert dokuya benzer bir mikro yapıya sahip olduğu bilinmektedir (87). Literatür doğrultusunda, tümör dokuyu taklit eden agaroz jel konsantrasyonu %5 (w/w), tümör dokuyu çevreleyen ve sağlıklı dokuyu taklit eden agaroz jel konsantrasyonu meme benzer bir mikro yapı elde edebilmek hedeflendiği için <%4 (w/w) olarak belirlenmiştir (88). Manyetik nanomalzemenin konsantrasyonu, yaklaşık olarak %0.033 (w/w)' olarak kullanıldı. Agar fantom numunelerinin hazırlanması için kullanılan işlem basamakları şu şekilde özetlenebilir:

1. Agar tozu ve deiyonize suya eklendi.
2. Karışım mikrodalga fırında kontrollü şekilde ısıtıldı.
3. Agar jel oluşumu tamamlandıktan sonra Fe₃O₄ ve C-MNP'ler eklendi.
4. Karışım soğumaya bırakıldı ve sonrasında fantoma döküldü.



Şekil 3.2 Meme Dokusu ve Tümör Dokusu Eşdeğeri Fantomların Hazırlanma Aşamalarının Şematik Gösterimi

Agar malzemesinin sınırlı stabilitesi ve düşük konsantrasyonlu agar fantomlarının çok yumuşak ve mekanik hasara meyilli olması nedeniyle, ölçüm için sadece deneyden önce hazırlanmış taze agar numuneleri kullanıldı.

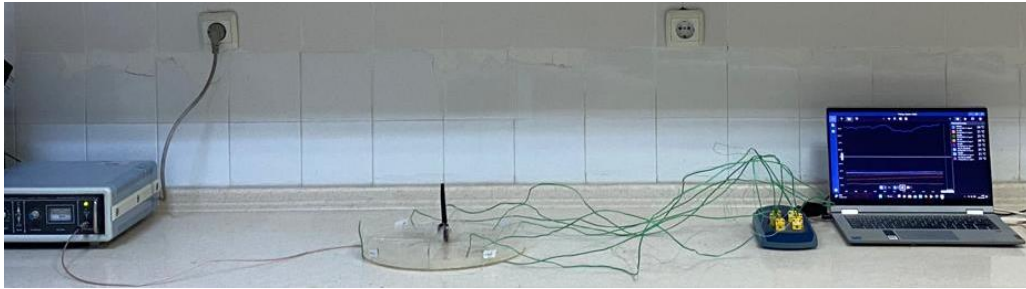
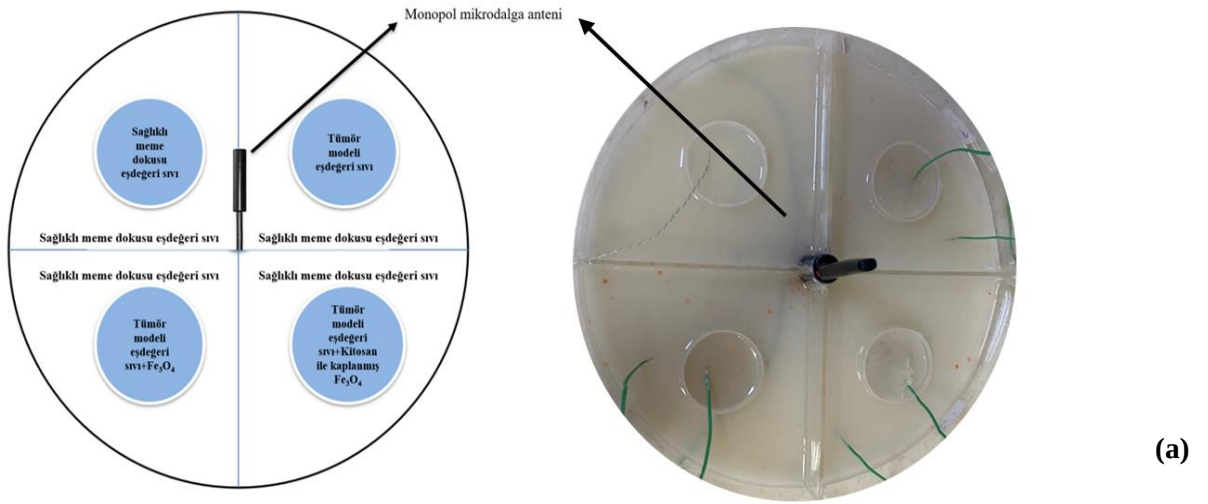
3.4 Mikrodalga Maruziyeti

Bu projede WLAN sistemlerince üretilen 2,45 GHz frekansı üretmek için, monopol antenli Mikrodalga sistemi (2004X-RF, Everest Co., Adapazarı, Turkey) kullanıldı. Mikrodalga sistemi, 2,45 GHz frekans, 0-1 Watt çıkış gücünde, 217 Hz modülasyonda, sürekli veya kesikli dalga yayabilmektir. Çalışma başlangıcında, 2,45 GHz MW sistemi çalıştırılmadan önce, ortam elektrik alan ölçümü belirlendi. Oluşturulan meme dokusu eşdeğeri ile MNP'leri içeren bir tümörün ısınmasını canlandırabilmek için, Şekil 3.3'de gösterilen maruziyet ortamı yaratıldı. MW maruziyeti 4 dilimli fantom içerisinde uygulandı ve elektrik alanın eşit dağılımını sağlamak amacıyla anten, fantomun tam orta noktasına yerleştirildi. Tüm gruplar aynı zaman süreci içerisinde. 2.45 GHz ve $15.18 \pm 0.22 \text{ V/m}$ MW'ya maruz bırakıldı. Maruziyet sırasında (3-Axis RF Field Strength Meter (TM-196) elektrik alan ölçüm cihazıyla 1 saat süresi içerisinde 10 dakikada bir ölçüm alınarak alınan elektrik alan ölçümlerinin ortalaması maruziyet elektrik alanı olarak kabul edildi. Düşük düzey elektrik alanı, 15.18 ± 0.22 idi. Ölçüm Şekil 3.3 (b)'de, MW maruziyet ortamı Şekil 3.3 (a)'da gösterilmektedir.

Gruplar şu şekilde oluşturuldu:

- Grup 1, Tümör Kontrol Grubu: Sağlıklı meme dokusu eşdeğeri +MW hipertermi uygulaması.
- Grup 2, Tümörlü Doku Grubu: Sağlıklı meme dokusu eşdeğeri +Tümör modeli eşdeğeri +MW hipertermi uygulaması.

- Grup 3, MNP Grubu: Sağlıklı meme dokusu eşdeğeri +Tümör modeli eşdeğeri sıvı+ Fe_3O_4 +MW hipertermi uygulaması.
- Grup 4, C-MNP Grubu: Sağlıklı meme dokusu eşdeğeri +Tümör modeli eşdeğeri ı+C-MNP+MW hipertermi uygulaması.

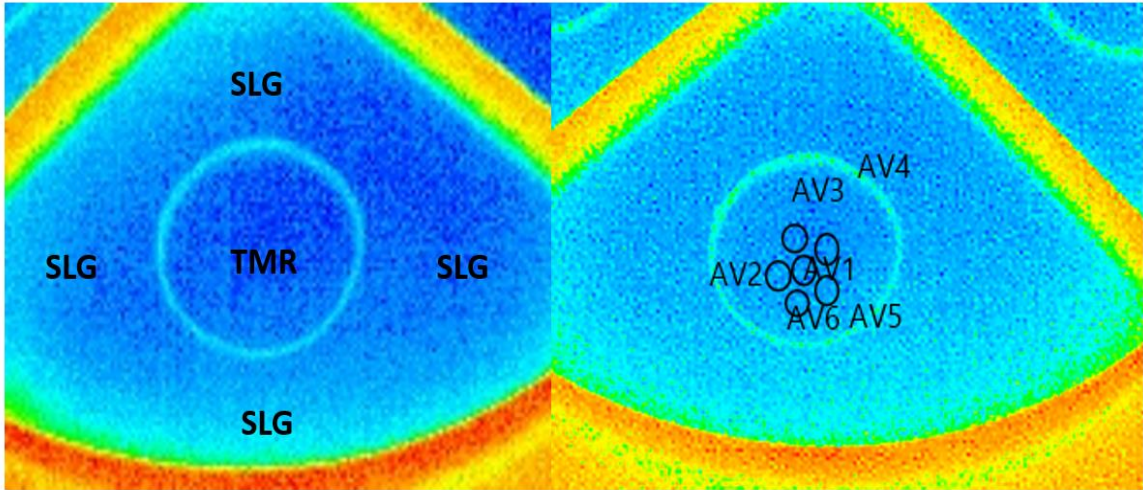


Şekil 3.3 Mikrodalga Maruziyet Ortamı

3.4.1 Termal Karakterizasyon Çalışmaları

Çalışmada, düşük yoğunluk ve elektrik alan değerlerindeki MW hipertermi uygulamasının ısıtma etkinliğini değerlendirmek için, MW hipertermi uygulanması Testo marka 865 model bir termal kamera ile kaydedildi. Termal kamera, 160 x 120 piksel IR çözünürlüğe, 0,1°C termal duyarlılığa, $\pm 2^\circ\text{C}$ ölçüm doğruluğuna sahiptir. Yaklaşık olarak 15.18 ± 0.22 V/m maruziyet sonrası görüntüler Testo IRSof yazılımında “Bir bölgedeki ortalama hesapla” seçeneği ve “daire” ile değerlendirilmiştir. Ayrıca Pico TC-08 Thermocouple cihazı ve PicoLog yazılımı kullanılarak sıcaklık kaydı yapılmıştır.

Bu projede, fantomlar için tüm fantomun değerlendirilmesi yerine bölgesel sıcaklık değişimleri incelendi. Bunun için fantom sağlıklı doku (termal sağlıklı doku bölgesi, SLG) ve tümör doku (termal tümörlü doku bölgesi, TMR) bölgesi olmak üzere iki analiz bölgesi belirlendi. Şekil 3.4 bu bölgeleri göstermektedir.



Şekil 3.4 Termal Değerlendirme Bölgeleri

Thermocouple cihazı ile her grubun TMR bölgesinden sıcaklık kaydı alındı. Thermocouple cihazının bağlanmış olduğu noktalar termal kamera analizi için analiz bölgesi olarak belirlendi. Termal kamera ile değerlendirme için 6 farklı dairesel bölgenin ortalama sıcaklık değerleri alınmış ve istatistiksel analiz için kullanılmıştır. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel analiz ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları Termal Karakterizasyon Bulguları bölümünde verilmiştir.

3.5 İstatistiksel Analizler

Sayısal verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Graphpad Prism-8 Demo bilgisayar paket programı ile yapıldı. Bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla “Shapiro- Wilk” testi yapıldı ve verilerin normal dağılım göstermediği belirlendi. Gruplar arası farklılıkların tespitinde “Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” testi, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için ise “Duncan” testi kullanıldı. $p < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi. Grafik çizimleri Graphpad Prism-8 Demo programı ile yapıldı. Tüm parametreler açısından grupların kendi içindeki ilişkileri korelasyon analizi ile test edildi.

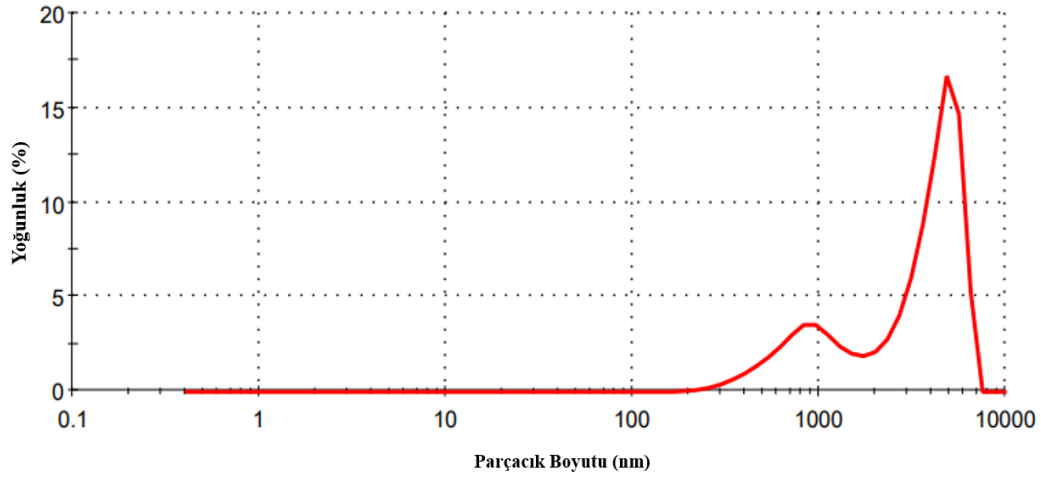
4. BULGULAR

4.1. Madde Karakterizasyonu Bulguları

4.1.1. DLS Analizi

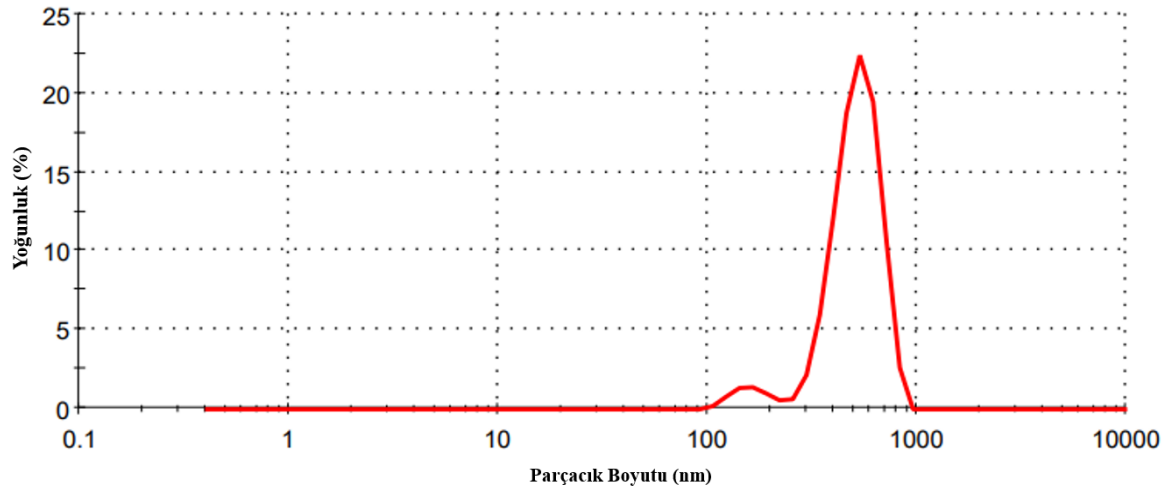
Fe_3O_4 ve C-MNP nanopartiküllerinin parçacık boyutlarının belirlemesi amacıyla DLS ölçümleri yapıldı. DLS, sıvı bir ortamda parçacıkların, özellikle kolloidal süspansiyonların hidrodinamik boyutunun ve polidispersite indeksinin (PDI) ölçümlerine ilişkin iyi istatistikler sunan hızlı, analitik bir yöntemdir. Ancak polidispers yapıdaki kolloidlerin ölçüm doğruluğunun sorgulanabileceği bilinmektedir. DLS, sulu çözeltide nanopartiküller ile birlikte bulunan ligandları, iyonları veya molekülleri içeren hidrodinamik çapı da ölçmektedir. Bu ligandlar, iyonlar veya diğer moleküller, partikülün normalden daha büyük görünmesine sebep olur (89). Daha büyük parçacıklar, küçük parçacıkların varlığını engellemektedir (90).

Bu çalışmada, MNP'lerin zeta-ortalama büyüklüğünü belirlemek için Malvern Nano ZS90 cihazı kullanıldı. Fe_3O_4 (Şekil 4.1) ve C-MNP (Şekil 4.2)'ye ait boyut değerlerini içeren grafikler sırasıyla gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Fe₃O₄ için DLS Ölçümü

Şekil 4.1, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin zeta-ortalama değerini göstermektedir. DLS ölçüm sonucuna göre Fe₃O₄ nanopartiküllerinin ortalama büyüklüğü 571,5 nm, PDI değeri 0,467 olarak bulundu.

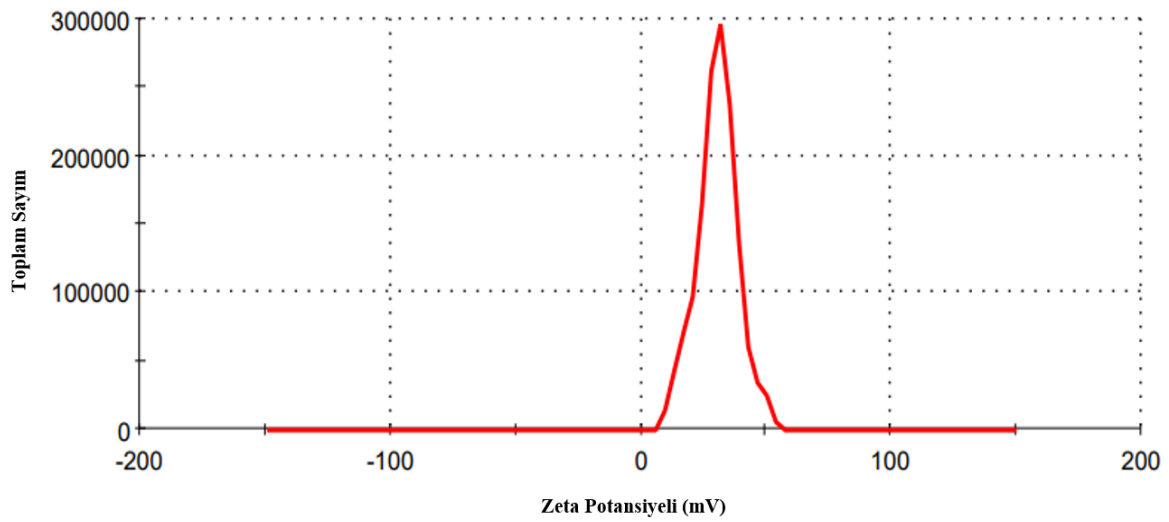


Şekil 4.2 C-MNP için DLS Ölçümü

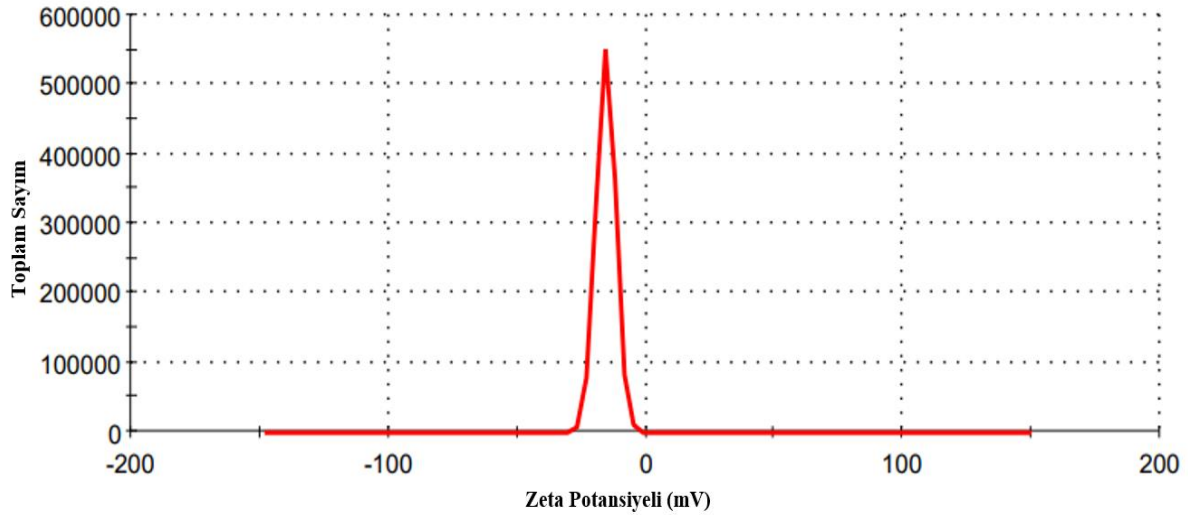
Fe₃O₄'ün kitosan ile kaplanması ile sentezlenen C-MNP'ye ait zeta-ortalama değeri Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Parçacıkların ortalama büyüklüğü DLS ölçüm sonucuna göre 665,9 nm, PDI değeri 0,862 olarak bulundu.

4.1.2. Zeta Potansiyel Analizi

Yüzey zeta potansiyeli sulu bir ortamda nanopartiküllerin stabilitesini karakterize etmek için gerekli parametrelerden biridir. Nanopartiküllerin yüzey yükleri zeta analizleri ile belirlenmekte ve nanopartiküllerin kararlılığının yorumlanmasını sağlamaktadır. Fe_3O_4 ve C-MNP nanopartiküllerinin Zeta Potansiyelleri, Zetasizer NanoZS90 cihazı kullanılarak elde edildi. MNP'lerin zeta potansiyel ölçüm grafikleri, Şekil 4.3 (Fe_3O_4) ve Şekil 4.4 (C-MNP)'de sırasıyla gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Fe_3O_4 için Zeta Potansiyel Ölçüm Grafiği (mV)



Şekil 4.4 C-MNP için Zeta Potansiyel Ölçüm Grafiği (mV)

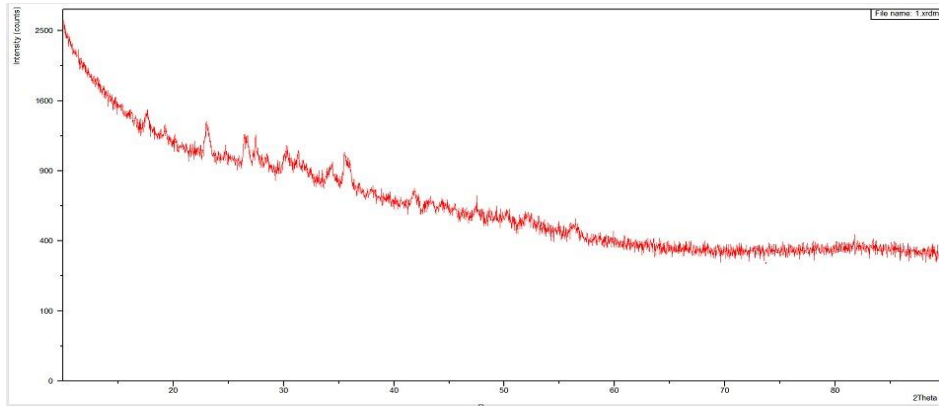
Tablo 4.1, Fe₃O₄ ve C-MNP nanopartiküllerinin boyut ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Fe₃O₄ ve C-MNP için sırasıyla 30,4 mV, -15,6 mV yüzey potansiyeline sahip olduklarını görülmektedir.

Tablo 4.1. Fe₃O₄ ve C-MNP nanopartiküllerinin boyut ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

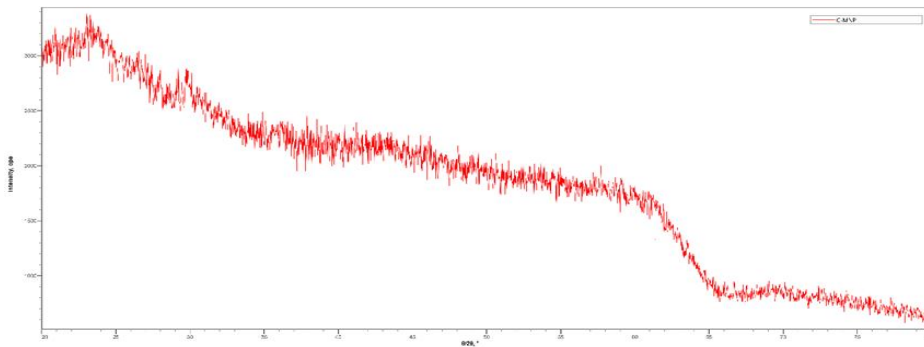
	Boyut (nm)	Polidispersite İndeks Değeri	Zeta Potansiyel (mV)
Fe₃O₄	571,5 nm	0,467	30,4 mV
C-MNP	665,9 nm	0,862	-15,6 mV

4.1.3. XRD Analizi

Nanopartiküllerin kristallliği, boyutu ve kimyasal bileşimi, X-ışınlarının bir kristalin atomları tarafından saçılarak, kırınım modelinin yapısı hakkında bilgi verdiği XRD tekniği kullanılarak belirlenebilmektedir (89, 91, 92, 93). Şekil 4.5’de Kitosan ve hazırlanan C-MNP’lerin XRD difraktogramları verilmiştir.



(a)

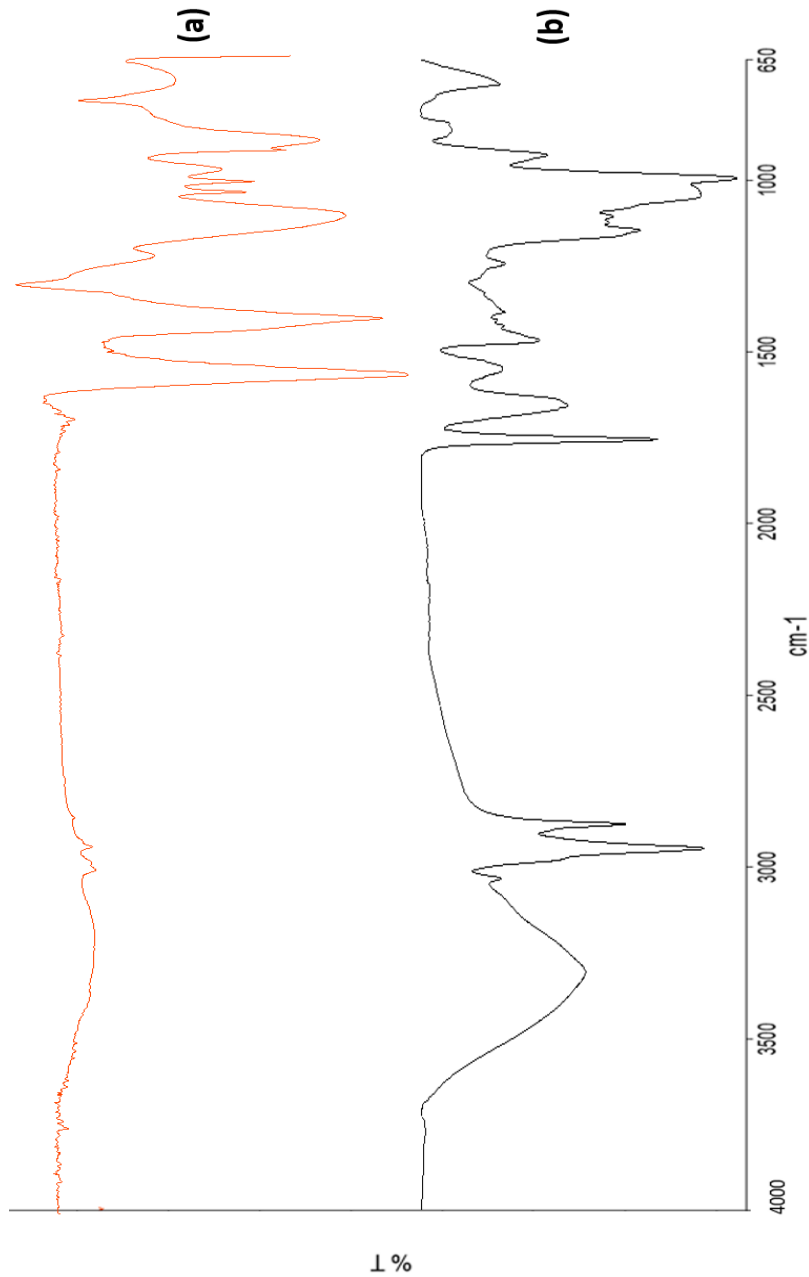


(b)

4.5 (a) Kitosan (b) C-MNP için XRD Grafiği

4.1.4. FTIR Analizi

FTIR, numunelerin kimyasal yapısını karakterize etmek için kullanılan hızlı ve kullanışlı olan bir tekniktir. Her molekülün sahip olduğu benzersiz bir parmak izi vardır, bu da FTIR spektrometresini kimyasal tanımlama için önemli bir araç haline getirmektedir. Bu projede, kitosan ve C-MNP'lerin kimyasal yapısı ve fonksiyonel grupları FTIR analizi ile incelenmiş ve Fe₃O₄ nanopartikülü üzerindeki kitosan yüzey kaplaması doğrulanmıştır. FTIR spektrumları Şekil 4.6'da verilmiştir.



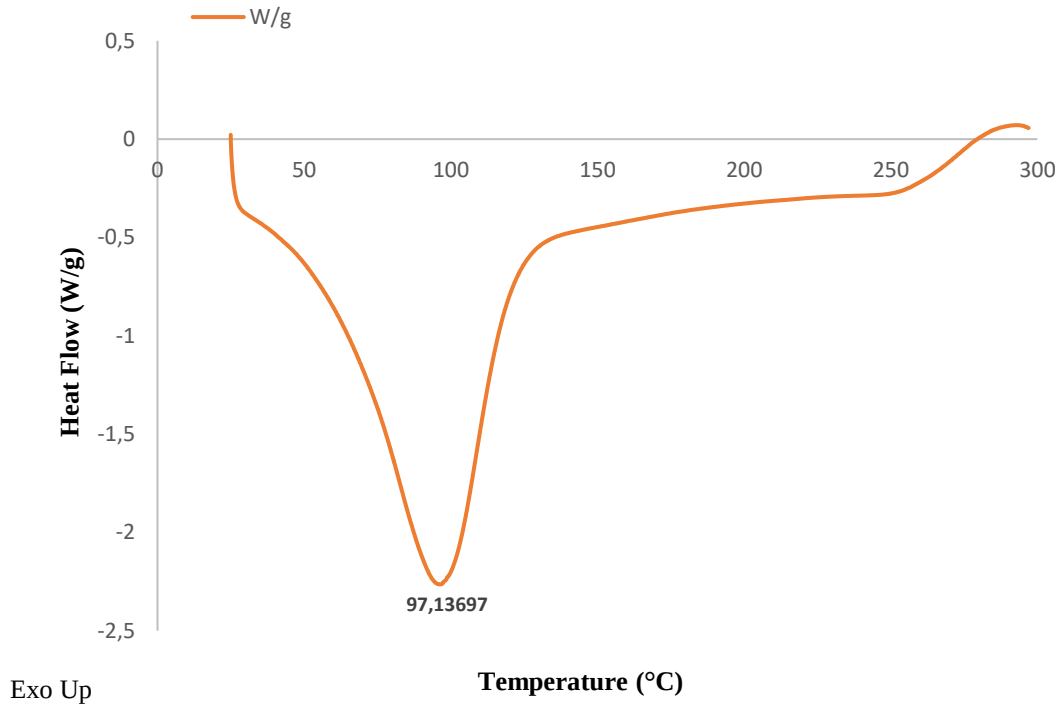
4.6 (a) Kitosan (b) C-MNP'ler için FTIR spektrumu

Yüzey kaplaması olarak kullanılan kitosanın spektroskopik analizi Şekil 4.6 (a)'da gösterilmektedir. FTIR spektrumunda, yaklaşık 3002 cm^{-1} 'de gözlenen bant, kitosanın O-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1226 cm^{-1} 'deki bant, kitosan yapısının bir parçası olan, glukozamindeki C–O–C gerilme titreşim bandına karşılık gelmektedir (94).

Sentezlenen C-MNP'lerin spektroskopik analizi Şekil 4.6 (b)'de gösterilmektedir. C-MNP'lerin FTIR spektrumu birçok karakteristik bant içermektedir. IR spektrumunun $500\text{--}790\text{ cm}^{-1}$ aralığında genişletilmiş bantlar Fe_3O_4 'in titreşim modlarını ifade etmektedir. Parmak izi bölgesi olarak adlandırılan bölgede, Fe-O gerilmesi olduğu ve Fe_3O_4 nanopartiküllerin varlığını gösterdiği literatürde belirtilmektedir (92). Yaklaşık $500\text{--}790\text{ cm}^{-1}$ civarlarında gözlemlenen ve kitosan spektrumunda görülmeyen pik Fe-O bağının titreşimine karşılık gelmektedir. Kitosan kaplamasının, kitosandaki C-H 'nin gerilme titreşimlerinin ortaya çıkmasıyla kurulduğu literatürde belirtilmektedir (95). 2924 cm^{-1} 'deki C-H gerilme titreşim bandı Fe_3O_4 yüzeyindeki kitosan polimerinin varlığını göstermektedir. Literatürdeki çalışmalar ve elde edilen FTIR sonuçları ile doğrulanmıştır. 3237 cm^{-1} 'deki pik O-H, 2853 cm^{-1} 'deki pik C-H ve 1140 cm^{-1} 'deki pik C-O-C bağı gerilme titreşimi ile ilgilidir. Tüm bunlara ek olarak, 3002 cm^{-1} 'de gözlenen O-H bandı 3237 cm^{-1} 'e, 1226 cm^{-1} 'de gözlenen C–O–C bandı 1140 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu kaymalar, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının kitosan ile kaplandığı bulgusunu vermektedir.

4.1.5. DSC Analizi

C-MNP'nin termal özelliklerinin belirlemesi amacıyla DSC ölçümleri yapıldı. DSC termogramı sırasıyla Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

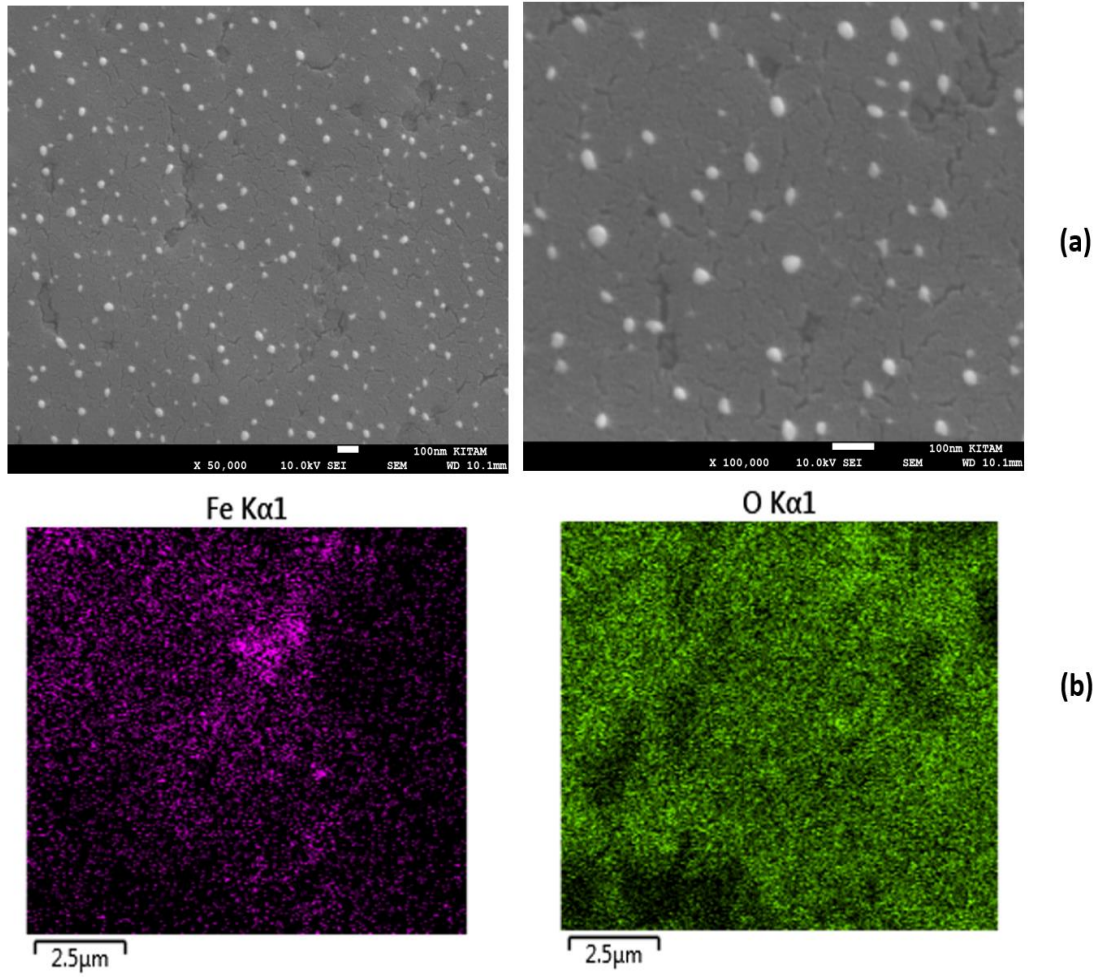


Şekil 4.7 C-MNP'lerin DSC Termogramı

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, C-MNP'lerin termogramında 97,14 °C'de erime noktasına karşılık gelen bir endotermik pik görülmektedir.

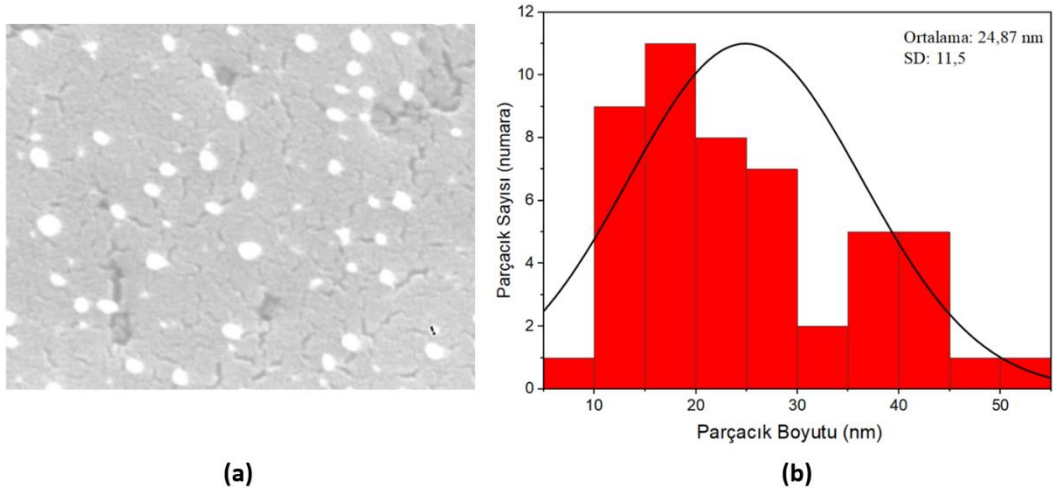
4.1.6. SEM Analizi

Sentezlenen ve sonrasında MW hipertermi uygulaması için kullanılan, C-MNP'lerin morfolojik özellikleri SEM-Taramalı Elektron Mikroskobu altında görüntüleri alınarak karakterize edildi. Şekil 4.8, C-MNP'lere ait mikrografları göstermektedir. C-MNP'lerin çoğunlukla küresel olan şekli Şekil 4.8 (a)'da sentezlenen C-MNP'lerde bulunan Fe (Demir) ve O (Oksijen)'nin eşlemesi Şekil 4.8 (b)'de görülmektedir.



Şekil 4.8 C-MNP'lerin SEM Görüntüleri

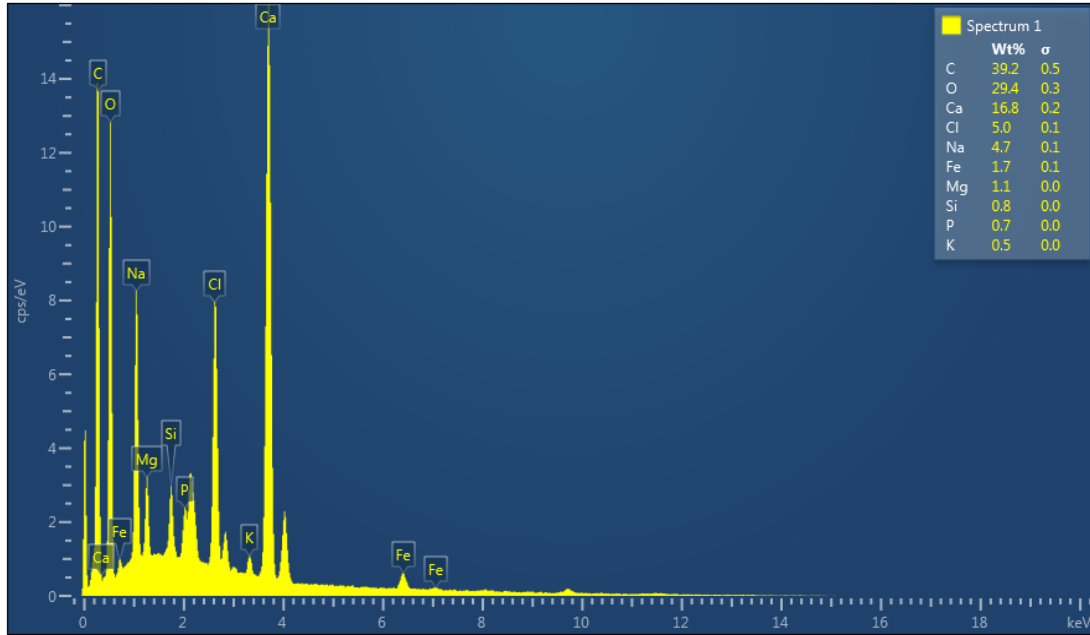
Şekil 4.9 (a), sentezlenen C-MNP'lerin iyileştirilmiş SEM görüntüsünü, C-MNP'lerin boyut dağılım analizi Şekil 4.9 (b)'de gösterilmektedir. Boyut dağılım analizi için 50 tane C-MNP nanopartikülünün çapı ölçüldü ve partiküllerin ortalama boyutları $24,87 \pm 11,5$ nm olarak hesaplandı. C-MNP'lerin parçacık büyüklüğünün 9-52 nm civarında olduğu görüldü. C-MNP'lerin SEM mikrografından parçacıkların çok dağılımlı (polidispersitesi yüksek) yapıda ve kümelenmeye eğilimli olduğu yorumu yapılabilir. C-MNP'lerin DLS ve zeta potansiyel ölçüm sonuçlarına paralel olarak SEM görüntüsünden elde edilen sonuçlar, kümelenme eğilimlerini destekler nitelikte birbiriyle örtüşmektedir.



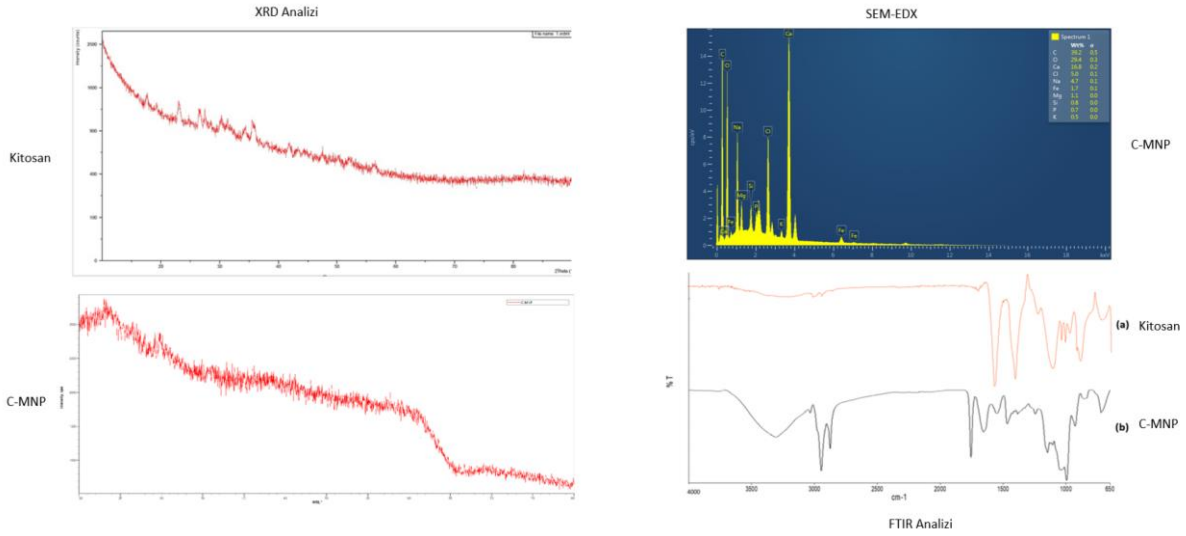
Şekil 4.9 C-MNP'lere ait (a) Kontrast Oluşturulmuş SEM Görüntüsü (b) Partikül Boyut Dağılım Analizi

4.1.7. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) Analizi

İyonik jelyasyon ile nanopresipitasyon tekniği kullanılarak C-MNP'lerin element bileşimi, enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile analiz edildi. C-MNP için kantitatif analiz, %39,2 ağırlık yüzdesine sahip C'yi ortaya çıkarırken, O, Ca, Cl, Na, Fe, Mg, Si, P ve K için ağırlık yüzde değerleri sırasıyla; %29,4, %16,8, %5,0, %4,7, %1,7, %1,1, %0,8, %0,7 ve %0,5 olduğunu göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10 C-MNP'ye ait yüzey atomlarının oranları



Şekil 4.11 Çalışmadaki Grupların madde karakterizasyon analiz sonuçlarının karşılaştırması

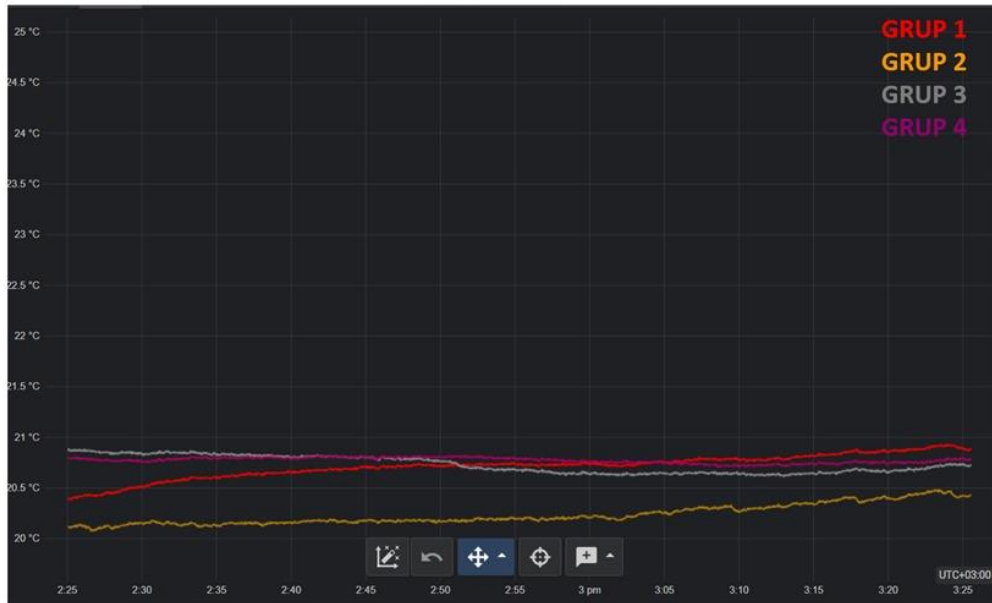
Madde karakterizasyon sonuçları aşağıda özetlenmektedir:

- C-MNP'lerin DLS ve zeta potansiyel ölçüm sonuçlarına paralel olarak SEM görüntüsünden elde edilen sonuçlar, kümelenme eğilimlerini destekler nitelikte birbiriyle örtüşmektedir.
- C-MNP'lerin DSC termogramında 97,14 °C'de erime noktasına karşılık gelen bir endotermik pik görülmüştür.
- C-MNP'lerin XRD analizi sonuçlarına göre Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait keskin pikler gözlenmemiş ve bu durumun nanopartiküllerin amorf veya moleküler durumda kitosan yapısı içerisinde dağılması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.11).
- SEM-EDX sonuçları incelendiğinde Fe elementinin %1,7 oranında yapıda bulunduğu ispatlanmıştır. Ayrıca, C, O, Ca, Cl, Na, Mg, Si, P ve K için ağırlık yüzde değerleri sırasıyla; %39,2, %29,4, %16,8, %5,0, %4,7, %1,1, %0,8, %0,7 ve %0,5 oranında bulunmaktadır (Şekil 4.11).
- FTIR analizinde, yaklaşık $500\text{-}790\text{ cm}^{-1}$ civarlarında gözlemlenen pik Fe-O bağının titreşimine karşılık gelmektedir. Bu durum C-MNP de Fe_3O_4 varlığını göstermektedir. FTIR sonuçları diğer karakterizasyon sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 4.11).

4.2. Termal Karakterizasyon Bulguları

4.2.1 Thermocouple Cihazı Bulguları

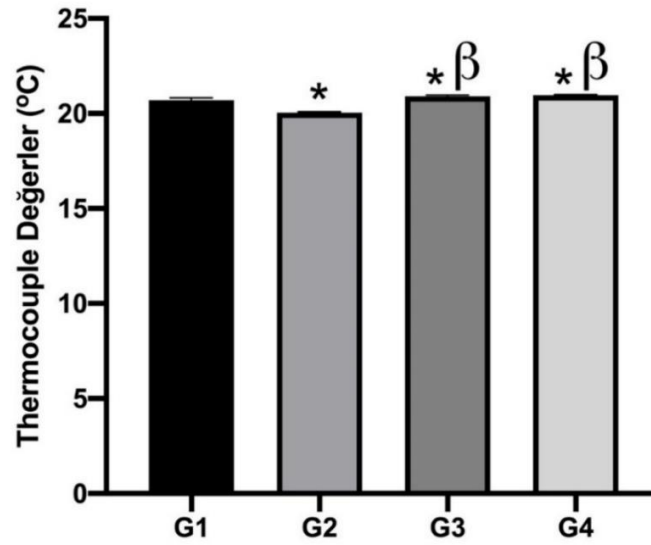
Gruplara MW uygulaması sonrası, Thermocouple cihazı ile yapılan sıcaklık ölçümlerinde, Sağlıklı meme eşdeğer doku (Grup1) ve tümör eşdeğer doku (Grup 2) ile diğer gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık bulundu ($p=0.0015$; $p<0.0001$). En yüksek sıcaklık artışı, MW hipertermi uygulamasına maruz bırakılan C-MNP eklenen tümör doku eşdeğeri Grup 4’de elde edildi. Grup 1 ile diğer gruplar arasında sıcaklık değişimi karşılaştırıldığında, Grup 2 tümör modeli MW uygulama sonrası daha düşükken (Tablo 4.2) ($p<0.001$), Grup 3 ve Grup 4 daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (Tablo 4.2) ($p=0.0015$; $p<0.0001$). Şekil 4.12, gruplara MW uygulaması sırasında Thermocouple cihazı ile elde edilen sıcaklık ölçümlerini göstermektedir. Gruplara MW uygulaması sonrası, Grup 2 sert tümör dokusunda, Grup 1 kontrol grubuna göre sıcaklık azalması olurken, en fazla ısı artışının Grup 4 (tümör doku eşdeğeri+C-MNP) te olması, C-MNP nin ısınma etkinliğinin olduğunu gösterdi. Bu sonuç C-MNP nin 15.18 ± 0.22 V/m gibi düşük elektrik alanında hipertermi etkisinin olduğunu gösterdi.



Şekil 4.12 Çalışmadaki Grupların Thermocouple Sıcaklık Kayıt Grafiği

Tablo 4.2. Çalışmadaki Grupların Thermocouple Sıcaklık Düzeyleri

Gruplar	Ortalama $\pm$ STD
Grup 1	20,70 $\pm$ 0,13
Grup 2	20,04 $\pm$ 0,05*
Grup 3	20,89 $\pm$ 0,07*, β
Grup 4	20,97 $\pm$ 0,02*, β



Şekil 4.13 Çalışmadaki Grupların Sıcaklık Değişimi (Thermocouple Cihazı ile) *, β : Farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($p < 0,05$; *, Grup1 ile diğer gruplar arasındaki; β , Grup 2 ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı göstermektedir)

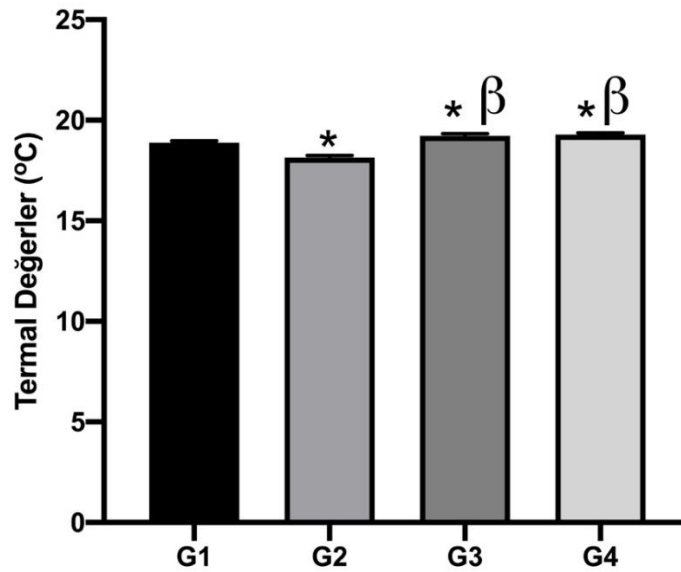
4.2.2 Termal Kamera Bulguları

MW uygulaması sonrası alınan termal kamera görüntüleri ile yapılan sıcaklık analizlerinde, sağlıklı meme eşdeğer doku (Grup1) ve tümör eşdeğer doku (Grup 2) ile diğer gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık bulundu ($p < 0.0001$) (Şekil 4.14). MW uygulaması sonrasında, çalışmadaki grupların termal kamera sıcaklık düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek sıcaklık artışının Thermocouple ile elde edilen sonuçlara benzer olarak, tümör eşdeğer doku+C-MNP grubu grup 4’de elde edildi ($p < 0.0001$). Tümör eşdeğer doku olan Grup 2’nin sıcaklık düzeyi diğer gruplardan daha düşükken ($p < 0.001$), Grup 3 ve Grup 4’ün sıcaklık düzeyi Grup 1’den daha yüksekti ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p < 0.0001$) (Tablo 4.3). Mevcut çalışmada en düşük sıcaklık artışı yalnızca MW hipertermi uygulaması yapılan tümör modeli eşdeğeri doku grubu Grup 2’de elde edildi. Yalnızca sağlıklı doku eşdeğeri sıvı oluşturulan ve sonrasında MW hipertermi uygulaması

yapılan Grup 1'in sıcaklık artışının Grup 2'den fazla olmasının nedeninin sağlıklı dokunun, tümör dokusuna göre daha yumuşak olması ve MW'yı daha kolay soğurması ile ilişkilendirildi. Thermocouple ile elde edilen sonuçlara benzer olarak en yüksek sıcaklık Grup 4, tümör doku eşdeğeri+C-MNP grubunda elde edildi. Bu sonuçlar, thermocouple ile elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir ve 15.18 ± 0.22 V/m MW uygulamasının C-MNP kompleksinde ısı meydana getirdiğini göstermektedir.

Tablo 4.3. Çalışmadaki Grupların Termal Kamera Sıcaklık Düzeyleri

Gruplar	Ortalama $\pm$ STD
Grup 1	$18,88 \pm 0,10$
Grup 2	$18,15 \pm 0,10^*$
Grup 3	$19,23 \pm 0,10^{*,\beta}$
Grup 4	$19,28 \pm 0,10^{*,\beta}$



Şekil 4.14. Çalışmadaki Grupların Sıcaklık Değişimi (Termal Kamera ile) *, β: Farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($p < 0,05$; *, Grup1 ile diğer gruplar arasındaki; β, Grup 2 ile diğer gruplar arasındaki anlamlılığı göstermektedir).

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Mevcut kanser tedavisi yaklaşımları tam iyileşme sağlamadığından, alternatif kanser tedavi yöntemleri için çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi geleneksel stratejiler ile immünoterapi ve hormon tedavisi gibi ek yöntemler kanser tedavisinde

başarı bulunmuştur ancak sonuçlar hala sınırlıdır. Bu nedenle, sağlıklı hücreleri veya dokuları etkilemeden tümör hücrelerini tanımlayabilen lokalize tedavi yöntemleri tasarlanma çalışmaları önemlidir.

Bu çalışmada, Kitosan ile kaplı Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü (C-MNP) oluşturulması, C-MNP'nin madde karakterizasyonu ve agar tozu ile sağlıklı meme ve tümör doku eşdeğeri oluşturularak C-MNP'nin, Mikrodalga (MW) hipertermi karakterizasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla deneysel çalışmalar iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında C-MNP'lerin üretimi ve elde edilen MNP'lerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada, sentezlenen C-MNP'ler de kullanılarak agar bazlı doku eşdeğerleri oluşturuldu. Oluşturulan eşdeğer dokular fantom içerisinde, düşük yoğunluk ve elektrik alan değerlerindeki MW uygulaması termal kamera ile görüntülenmiş, MW maruziyeti sırasında TC-08 Thermocouple cihazı kullanılarak sıcaklıkların veri kaydı yapılmıştır. Termal görüntüler ve Thermocouple cihazından kayıt edilen veriler ile düşük yoğunluk ve elektrik alan değerlerindeki MW uygulamasının termal etkisi değerlendirilmiştir.

MNP'lerin 10-100 nm hidrodinamik çapa sahip olmasının farmakokinetikleri için optimal olduğu ve polimer yüzey kaplamaları RES tarafından vücuttan temizlenmesini önleyebildiği ve biyoyumluğu arttırdığı bilinmektedir (34, 96). Literatür araştırması sonucu elde edilen bu bilgiler doğrultusunda, bu projede doğada bol miktarda bulunan ve biyoyumlu, biyobozunur ve toksik olmayan kitosan yüzey kaplaması ve tüm nanopartiküller arasında biyomedikal alanda en yaygın olarak kullanılan Fe_3O_4 nanopartikülleri (5 nm hidrodinamik çapa sahip) kullanılmıştır. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kitosan ile kaplanması sonucu elde edilen, C-MNP'ler, iyonik jelasyon ile nanopresipitasyon tekniği kullanılarak literatüre paralel bir şekilde sentezlendi (22, 86). Sentezlenen C-MNP'ler DLS, ZetaSizer, XRD, FTIR, DSC ve SEM yöntemleri kullanılarak madde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

DLS analizi sonuçları; Fe_3O_4 ve C-MNP nanopartiküllerin boyutlarının sırasıyla 571,5 ve 665,9 nm ve PDI değerlerinin 0,467 ve 0,862 olduğunu gösterdi. Nano boyuttaki partiküllerin partikül büyüklüğü/boyutu dağılımını ifade eden PDI değerinin, 0.1-0.25 arasında olması monodisperse (tek dağılımlı popülasyon) yakın dar bir dağılıma sahip olduğunu gösterirken, PDI değeri >0.5 olması geniş çaplı partiküllerin varlığına ve agregat oluşumuna bağlı olarak geniş bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu göstermektedir. Geniş bir partikül boyutu dağılımına sahip nanopartikül DLS ile analiz edilmeye uygun olmadığı bilinmektedir (97, 98). Bu çalışmadan elde edilen DLS sonuçlarına göre; kümelenme eğilimi gösterdikleri için

parçacıkların homojen bir yapıda olmadıkları ve DLS ile analiz edilmeye uygun olmadıkları söylenebilir. Benzer bir çalışmada, araştırmacılar DLS yönteminin kısıtlamalarından dolayı nanopartiküllerin gerçek boyutunun, DLS ölçüm sonuçlarından daha küçük olduğunu bildirmişlerdir (9). Zeta Potansiyel analizi sonuçları; Fe₃O₄ ve C-MNP nanopartikülleri için sırasıyla 30,4 ve -15,6 mV yüzey potansiyeline sahip olduklarını gösterdi. Fe₃O₄ kitosan ile kaplandıktan sonra zeta potansiyeli ve boyut dağılımı değişmiştir. Ayrıca C-MNP'nin zeta potansiyeli negatif değer taşımaktadır. Elde edilen sonuçlara benzer bir çalışmada Rana ve grubu sentezledikleri altın nanopartiküllerin zeta potansiyelinin negatif değerler taşıdığını bulmuş ve bunu biyolojik bileşiklerin kaplanmasına atfetmişlerdir (89). Zeta potansiyel ve boyut dağılımının ölçüm sonuçlarına bakılarak Fe₃O₄'ün yüzey kaplaması kitosan ile kaplandığı yorumu yapılabilir. Ayrıca, nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma (agregasyon) eğilimleri hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Zeta potansiyel değerleri, < -30 mV ve > +30mV olan çözeltiler kararlı kabul edilmektedir. Bu değerler arasında ise partiküller kararsızdır ve bir araya gelerek kümelenme eğilimindedirler (97). Mevcut çalışmada kullanılan, Fe₃O₄ ve C-MNP nanopartiküllerinin sahip olduğu zeta potansiyel değerlerine dayanarak, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin kararlı yapıda, C-MNP'lerin kararsız yapıda oldukları söylenebilir. Fakat her iki nanopartikülün sahip oldukları PDI değerleri nanopartiküllerin kararsız yapıda ve kümelenmeye eğilimli olduklarını göstermektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin ve C-MNP'lerin XRD analizi sonucunda keskin piklerin oluştuğu görüldü (86, 91, 92, 93, 94). Bizim çalışmamızda, sentezlenen C-MNP'lerin XRD analizi sonuçlarına göre Fe₃O₄ nanopartiküllerine ait keskin pikler gözlenmemiş ve bu durumun nanopartiküllerin amorf veya moleküler durumda kitosan yapısı içerisinde dağılması ile ilişkilendirilmiştir. C-MNP'lerin DSC analizi sonucunda C-MNP'lerin, 97,14 °C'de erime noktasına karşılık gelen bir endotermik pik görülmüştür. C-MNP'lerin SEM analizi sonuçları, boyutunun 24,87±11,5 nm olduğunu gösterdi. SEM çalışması sonucunda C-MNP'lerin istenilen 10-100 nm parçacık büyüklüğü aralığında olduğu bulundu. SEM çalışması sonucunda elde edilen, SEM mikrografından parçacıkların çok dağılımlı yapıda ve kümelenmeye eğilimli olduğu görüldü. EDX analizinde ise nanopartiküllerin yüzeyinde demir, oksijen ve kitosandan gelen karbon atomları görüldü ve Fe elementinin %1.7 oranında yapıda bulunduğu ispatlanmıştır. FTIR analizi sonuçları, diğer karakterizasyon sonuçlarını desteklemektedir. Yaklaşık 500-790 cm⁻¹ civarında gözlenen pik Fe-O bağının titreşimine karşılık gelmektedir. Bu durum C-MNP'de Fe₃O₄ varlığını göstermektedir. C-MNP'lerin madde karakterizasyonu sonuçlarına göre,

partiküllerin kümelenmeye eğilimli olduğu ancak başarılı bir kitosan kaplamanın gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında agar bazlı fantomlar hazırlanarak ısıtma deneyleri gerçekleştirildi. Thermocouple ve Termal kamera cihazlarından elde edilen bulguların termal karakterizasyon sonuçlarında en yüksek sıcaklık artışı tümör modeli eşdeğeri sıvı oluşturulduktan sonra, C-MNP eklenen ve sonrasında MW hipertermi uygulaması yapılan Grup 4’de elde edildi. Termal karakterizasyon sonuçları, C-MNP kompleksinin yaklaşık 15 V/m’lik düşük elektrik alan değerinde ısı üretebildiğini ve hipertermi uygulaması için uygun olduğunu göstermiştir. Thermocouple ve Termal kamera elde edilen sayısal veriler birbirini desteklemektedir.

Çalışmamızda sonuç olarak, C-MNP kompleksinin başarılı bir şekilde oluşturulduğu ve MW uygulamasıyla klinikte hipertermi tedavisi için uygun olduğu öngörülmüştür. Bu öngörünün desteklenmesi için hayvan çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (2020). International Agency for Research on Cancer Erişim: 6 Mayıs, 2022, <https://www.losante.com.tr/Content/brosur/DS%C3%96%20Kanser%20Verileri%20Tablo%20%C3%87evirisi.pdf>
2. World Health Organization (2020). International Agency for Research on Cancer Erişim: 2 Kasım 2022, <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>
3. Cerqueira M, Belmonte-Reche E, Gallo J, Baltazar F, Bañobre-López M. Magnetic solid nanoparticles and their counterparts: recent advances towards cancer theranostics. *Pharmaceutics*, 506, 14: 1-31, (2022).
4. Ansari L, Malaekhe-Nikouei B. Magnetic silica nanocomposites for magnetic hyperthermia applications. *International Journal of Hyperthermia*, 33: 354-363, 2017.
5. Abo-Neima SE, Ismail AS, Motaweh HA. Treatment of Cancer by Radiotherapy and Nanoparticles Coupled With Methotrexate. *Iranian Journal of Medical Physics*, 18: 232-246, 2021.
6. Avazzadeh R, Vasheghani-Farahani E, Soleimani M, Amanpour S, Sadeghi M. (Synthesis and application of magnetite dextran-spermine nanoparticles in breast cancer hyperthermia. *Progress in Biomaterials*, 6: 75-84, 2017.
7. Basel MT, Balivada, S Wang, et al. Cell-delivered magnetic nanoparticles caused hyperthermia-mediated increased survival in a murine pancreatic cancer model. *International journal of nanomedicine*, 7: 297-306, 2012.
8. Lee JH, Chen KJ, Noh SH, et al. On-demand drug release system for in vivo cancer treatment through self-assembled magnetic nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 52: 4384-4388, 2013.
9. Didarian R, Vargel I. Treatment of tumour tissue with radio-frequency hyperthermia (using antibody-carrying nanoparticles). *IET nanobiotechnology*, 15: 639-653, 2021.
10. Kim DH, Nikles DE, Johnson DT, Brazel CS. Heat generation of aqueously dispersed CoFe₂O₄ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320: 2390-2396, 2008.
11. Umut E Coşkun, M Pineider F, Berti D, Güngüneş H. Nickel ferrite nanoparticles for simultaneous use in magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia. *Journal of colloid and interface science*, 550: 199-209, 2019.
12. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology*, 2: 469-478, 2007.

13. Sun C, Du K, Fang C, et al. PEG-mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: their physicochemical properties and function in vivo. *ACS nano*, 4; 2402-2410, 2010.
14. El-kharrag R, Abdel Halim SS, Amin A, Greish YE. Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles using a modified wet method for drug delivery applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68, 1-3; 73-82, 2018.
15. McWilliams BT, Wang H, Binns VJ, et al. Experimental investigation of magnetic nanoparticle-enhanced microwave hyperthermia. *Journal of functional biomaterials*, 8, 21; 1-15, 2017.
16. Soares PI, Machado D, Laia C, et al. Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, 149; 382-390, 2016.
17. Chauhan A, Kumar R, Singh P, Jha S K, Kuanr B K. RF hyperthermia by encapsulated Fe₃O₄ nanoparticles induces cancer cell death via time-dependent caspase-3 activation. *Nanomedicine*, 15,4; 355-379, 2020.
18. World Health Organization (2021). Cancer Erişim: 25 Ocak 2022, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
19. World Health Organization (2021). Breast Cancer Erişim: 19 şubat 2022, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
20. National Cancer Institute (2021). Types of Cancer Treatment Erişim: 25 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
21. Aydın RST. Herceptin-decorated salinomycin-loaded nanoparticles for breast tumor targeting. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101, 5; 1405-1415, 2013.
22. Parsian M, Unsoy G, Mutlu P, Yalcin S, Tezcaner A, Gunduz U. Loading of Gemcitabine on chitosan magnetic nanoparticles increases the anti-cancer efficacy of the drug. *European journal of pharmacology*, 784; 121-128, 2016.
23. World Health Organization (2021). Breast Cancer Erişim: 19 şubat 2022, <https://www.who.int/news/item/03-02-2021-breast-cancer-now-most-common-form-of-cancer-who-taking-action>
24. Koçak ř, Çelik L, Özbaş S, Saka DS, Tükün A, Yalçın B. Meme kanserinde risk faktörleri, riskin değerlendirilmesi ve prevansiyon: İstanbul 2010 konsensus raporu. *Meme Sağlığı Dergisi*, 7,2; 47-67, 2012.
25. National Cancer Institute (2015). Surgery to Treat Cancer Erişim: 31 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery>
26. National Cancer Institute (2015). Chemotherapy to Treat Cancer Erişim: 31 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>
27. Fisusi F A, Akala E O. Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7,1; 3-23, 2019.
28. Hałupka-Bryl M, Asai K, Thangavel S, Bednarowicz M, Krzymiński R, Nagasaki Y. Synthesis and in vitro and in vivo evaluations of poly (ethylene glycol)-block-poly (4-vinylbenzylphosphonate) magnetic nanoparticles containing doxorubicin as a potential targeted drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118; 140-147, 2014.
29. Allen C, Her S, Jaffray DA. Radiotherapy for cancer: present and future. *Advanced drug delivery reviews*, 109; 1-2, 2017.
30. National Cancer Institute (2019). Radiation Therapy to Treat Cancer Erişim: 31 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>
31. National Cancer Institute (2022). Radiation Therapy Side Effects Erişim: 31 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/side-effects>
32. National Cancer Institute (2019). Immunotherapy to Treat Cancer Erişim: 31 Ocak 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>
33. Eivazzadeh-Keihan R, Radinekiyan F, Asgharnasl S, Maleki A, Bahreinizad H. A natural and eco-friendly magnetic nanobiocomposite based on activated chitosan for heavy metals adsorption and the in-vitro hyperthermia of cancer therapy. *Journal of Materials Research and Technology*, 9,6; 12244-12259, 2020.
34. Singh A, Sahoo SK. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug discovery today*, 19,4; 474-481, 2014.

35. Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63,9; 789-808, 2011.
36. National Cancer Institute (2021). Hyperthermia to Treat Cancer Treatment Erişim: 5 Şubat 2022, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hyperthermia>
37. Ma G, Jiang G. Review of tumor hyperthermia technique in biomedical engineering frontier In *2010 3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, October 2010, China. 2010;1357-1359.
38. Pennacchioli E, Fiore M, Gronchi A. Hyperthermia as an adjunctive treatment for soft-tissue sarcoma. *Expert review of anticancer therapy*, 9,2; 199-210,2009.
39. Bañobre-López M, Teijeiro A, Rivas J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 18,6; 397-400, 2013.
40. Huang PC, Chaney EJ, Aksamitiene E, et al. Biomechanical sensing of in vivo magnetic nanoparticle hyperthermia-treated melanoma using magnetomotive optical coherence elastography. *Theranostics*, 11,12; 5620-5633, 2021.
41. Healy S, Bakuzis F, Goodwill PW, Attaluri A, Bulte J W, Ivkov R. Clinical magnetic hyperthermia requires integrated magnetic particle imaging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14,3; 1-20, 2022.
42. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Materials & Design*, 123; 174-196, 2017.
43. Petryk AA, Giustini AJ, Gottesman RE, Tremblay BS, Hoopes P. Comparison of magnetic nanoparticle and microwave hyperthermia cancer treatment methodology and treatment effect in a rodent breast cancer model. *International Journal of Hyperthermia*, 29,8; 819-827, 2013.
44. Salmanian G, Hassanzadeh-Tabrizi SA, Koupaei N. Magnetic chitosan nanocomposites for simultaneous hyperthermia and drug delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184; 618-635, 2021.
45. Johannsen M, Thiesen B, Jordan A, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *The prostate*, 64,3; 283-292, 2005.
46. Farzin A, Etesami S A, Quint J, Memic A, Tamayol A. Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced healthcare materials*, 9,9; 1-29, 2020.
47. Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, et al. Heat-generating iron oxide nanocubes: Subtle “destructor” of the tumoral microenvironment. *ACS nano*, 8,5; 4268-4283, 2014.
48. Sun C, Lee JS, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 60,11; 1252-1265, 2008.
49. Hyeon T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chemical communications*, 8; 927-934, 2003.
50. Berry CC, Curtis AS. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36,13; R198, 2003.
51. Choi JS, Jun YW, Yeon SI, Kim HC, Shin JS, Cheon J. Biocompatible heterostructured nanoparticles for multimodal biological detection. *Journal of the American Chemical Society*, 128,50; 15982-15983, 2006.
52. Shi X, Wang SH, Swanson SD, et al. Dendrimer-functionalized shell-crosslinked iron oxide nanoparticles for in-vivo magnetic resonance imaging of tumors. *Advanced Materials*, 20,9; 1671-1678, 2008.
53. Taboada E, Solanas R, Rodriguez E, Weissleder R, Roig A. Supercritical-fluid-assisted one-pot synthesis of biocompatible core (γ -Fe₂O₃)/shell (SiO₂) nanoparticles as high relaxivity T₂-contrast agents for magnetic resonance imaging. *Advanced Functional Materials*, 19,14; 2319-2324, 2009.
54. Huang SH, Juang RS. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. *Journal of Nanoparticle Research*, 13; 4411-4430, 2011.
55. Kwizera EA, Stewart S, Mahmud M M, He X. Magnetic nanoparticle-mediated heating for biomedical applications. *Journal of Heat Transfer*, 144,3; 1-14, 2022.
56. Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 58,14; 1471-1504, 2006.
57. Khedri B, Shahanipour K, Fatahian S, Jafary F. Preparation of chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and assessment of their effects on enzymatic antioxidant system as well as high-density lipoprotein/low-density lipoprotein lipoproteins on wistar rat. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 2,1; 68-73, 2018.

58. Zhu L, Ma J, Jia N, Zhao Y, Shen H. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68,1; 1-6, 2009.
59. Bucak S, Altan C L. Magnetic nanoparticles and cancer. In *Nanotechnology in Cancer* William Andrew Publishing, 105-137, 2017.
60. Kavaz D, Odabaş S, Güven E, Demirbilek M, Denkbaşı E B. Bleomycin loaded magnetic chitosan nanoparticles as multifunctional nanocarriers. *Journal of Bioactive and compatible polymers*, 25,3; 305-318, 2010.
61. Ünlü CG, Manyetik Nanomalzemeler, Ersöz M, Arzum I, Balaban M. Nanoteknoloji 1: nanoteknolojinin temelleri, 2018, Denizli, BilalOfset, 2018, 187-192.
62. Bonnemain B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications a review. *Journal of drug targeting*, 6,3; 167-174, 1998.
63. Cole AJ, Yang VC, David AE. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 29,7; 323-332, 2011.
64. Appel C, Kuttich B, Kraus T, Stühn B. In situ investigation of temperature induced agglomeration in non-polar magnetic nanoparticle dispersions by small angle X-ray scattering. *Nanoscale*, 13,14; 6916-6920, 2011.
65. Gutiérrez L, De la Cueva L, Moros M, et al. Aggregation effects on the magnetic properties of iron oxide colloids. *Nanotechnology*, 30,11; 112001, 2019.
66. Kalambur VS, Longmire E, Bischof JC. Characterization of Cell Association and Heat Treatment Using Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. In *Summer Bioengineering Conference*, March 12, 2014, Colorado, USA. American Society of Mechanical Engineers, 2014:1053-1054.
67. Erdoğan A. Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartiküller. *Natural and Applied Sciences Journal*, 1,1; 23-30, 2018.
68. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *biomaterials*, 26,18; 3995-4021, 2005.
69. Unsoy G, Yalcin S, Khodadust R, Gunduz G, Gunduz U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 14; 1-13, 2012.
70. Piehler S, Dähring H, Grandke J, et al. Iron oxide nanoparticles as carriers for DOX and magnetic hyperthermia after intratumoral application into breast cancer in mice: impact and future perspectives. *Nanomaterials*, 10,6; 1016, 2020.
71. Hammouda HF, Farag MM, El Deftar MM, Abdel-Gabbar M, Mohamed BM. Effect of Ce-doped bioactive glass/collagen/chitosan nanocomposite scaffolds on the cell morphology and proliferation of rabbit's bone marrow mesenchymal stem cells-derived osteogenic cells. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20,1; 1-19, 2022.
72. Zhu L, Ma J, Jia N, Zhao Y, Shen H. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68,1; 1-6, 2009.
73. Sultankulov B, Berillo D, Sultankulova K, Tokay T, Saparov A. Progress in the development of chitosan-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomolecules*, 9,9; 470, 2019.
74. Siavashy S, Soltani M, Ghorbani-Bidkorbeh F, et al. Microfluidic platform for synthesis and optimization of chitosan-coated magnetic nanoparticles in cisplatin delivery. *Carbohydrate Polymers*, 265; 1-16, 2021.
75. Salmanian G, Hassanzadeh-Tabrizi SA, Koupaei N. Magnetic chitosan nanocomposites for simultaneous hyperthermia and drug delivery applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184; 618-635, 2021.
76. Wang J, Wang D, Yan H, et al. An injectable ionic hydrogel inducing high temperature hyperthermia for microwave tumor ablation. *Journal of Materials Chemistry B*, 5,22; 4110-4120, 2017.
77. Shen CR, Juang JH, Tsai ZT, et al. Preparation, characterization and application of superparamagnetic iron oxide encapsulated with N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chitosan chloride. *Carbohydrate polymers*, 84,2; 781-787, 2011.
78. Tsai ZT, Wang JF, Kuo HY, et al. In situ preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 322,2; 208-213, 2010.

79. Patil RM, Shete PB, Thorat ND, et al. Superparamagnetic iron oxide/chitosan core/shells for hyperthermia application: Improved colloidal stability and biocompatibility. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 355; 22-30, 2014.
80. Pazouki N, Irani S, Olov N, Atyabi SM, Bagheri-Khoulenjani S. Fe₃O₄ nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan containing curcumin in combination with hyperthermia induced apoptosis in breast cancer cells. *Progress in Biomaterials*, 11,1; 43-54, 2022.
81. Hadjianfar M, Semnani D, Varshosaz J. An investigation on polycaprolactone/chitosan/Fe₃O₄ nanofibrous composite used for hyperthermia. *Polymers for Advanced Technologies*, 30,11; 2729-2741, 2019.
82. El Khaled D, Novas N, Gazquez JA, Manzano-Agugliaro F. Microwave dielectric heating: Applications on metals processing. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82 ;2880-2892, 2018.
83. Görgün AR. Çölekçi S, Kaya A. Mikrodalga Tümör Ablasyonu İçin Hüzme Yönlülüğünü Yüksek Kompakt Anten ve Kompakt Çok Bandlı Düzlemsel Anten Tasarımı Ve Anallizi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*. 7,3; 662-670, 2019.
84. Carrafiello G, Laganà D, Mangini M, et al. Microwave tumors ablation: principles, clinical applications and review of preliminary experiences. *International journal of surgery*. 6; 65-69, 2008.
85. Chen X, Tan L, Liu T, Meng X. Micro-Nanomaterials for Tumor Microwave Hyperthermia: Design, Preparation, and Application. *Current Drug Delivery*. 14,3; 307-322, 2017.
86. Dinçer CA, Erdek AM, Karakeçili A, Yıldız N. Preparation of chitosan and glycol chitosan coated magnetic nanoparticles loaded with carboplatin as anticancer drug. *Politeknik Dergisi*. 22,4; 1017-1022, 2019.
87. Józefczak A, Kaczmarek K, Kubovčiková M, Rozynek Z, Hornowski T. The effect of magnetic nanoparticles on the acoustic properties of tissue-mimicking agar-gel phantoms. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 431; 172-175, 2017.
88. Kaczmarek K, Hornowski T, Antal I, Rajnak M, Timko M, Józefczak A. Sono-magnetic heating in tumor phantom. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 500; 1-6, 2020.
89. Rana A, Yadav K, Jagadevan S. A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*. 272; 1-25, 2020.
90. Jans H, Liu X, Austin L, Maes G, Huo Q. Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies. *Analytical chemistry*. 81,22; 9425-9432, 2009.
91. Mohammadi-Samani S, Miri R, Salmanpour M, Khalighian N, Sotoudeh S, Erfani N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. *Research in pharmaceutical sciences*. 8,1; 25-33, 2013.
92. Mata-Pérez F, Martínez JR, Guerrero AL, Ortega-Zarzosa G. New way to produce magnetite nanoparticles at low temperature. *Adv. Chem. Eng. Res*, 4; 48-55, 2015.
93. Nguyen QH, Quyen DH, Hoang TKN. A new route of emulsifier-free emulsion polymerization for the preparation of polymer coated magnetite nanoparticles. *Materials Science-Poland*. 32,2; 264-271, 2014.
94. Sun JZ, Sun YC, Sun L. Synthesis of surface modified Fe₃O₄ super paramagnetic nanoparticles for ultra sound examination and magnetic resonance imaging for cancer treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 197; 111547, 2019.
95. Pham XN, Nguyen TP, Pham TN, Tran TTN, Tran, TVT. Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles and their application in curcumin drug delivery. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 7,4; 1-9, 2016.
96. Cardoso BD, Rio IS, Rodrigues ARO, et al. Magnetoliposomes containing magnesium ferrite nanoparticles as nanocarriers for the model drug curcumin. *Royal Society open science*. 5,10; 1-15, 2018.
97. Özkahraman B, Acar I, Gök MK, Güçlü G. Poli (N-Vinilkaprolaktam) Mikrojellerinin Sentez Şartlarının Optimizasyonu. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 14,1; 13-21, 2014.
98. Tang SY, Shridharan P, Sivakumar M. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions-comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. *Ultrasonics sonochemistry*. 20,1; 485-497, 2013.