



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**MİKROBİYAL ALTIN NANOPARTİKÜL (AuNP)
SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE ADJUVAN OLARAK
KULLANIM POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Nefise ÜNLÜER

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir

2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**MİKROBİYAL ALTIN NANOPARTİKÜL (AuNP)
SENTEZİNİN OPTİMİZASYONU,
KARAKTERİZASYONU VE ADJUVAN OLARAK
KULLANIM POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nefise ÜNLÜER

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Doktora Programı

İZMİR

2022

Nefise ÜNLÜER tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Mikrobiyal altın nanopartikül (AuNP) sentezinin optimizasyonu, karakterizasyonu ve adjuvan olarak kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.05.2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

.....

Raportör Üye:

Doç. Dr. Sait SARGIN

.....

Üye:

Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR

.....

Üye:

Prof. Dr. Ataç UZEL

.....

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Didem ŞEN KARAMAN

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Mikrobiyal altın nanopartikül (AuNP) sentezinin optimizasyonu, karakterizasyonu ve adjuvan olarak kullanım potansiyelinin değerlendirilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30 / 05 / 2022

Nefise ÜNLÜER

ÖZET**MİKROBİYAL ALTIN NANOPARTİKÜL (AuNP) SENTEZİNİN
OPTİMİZASYONU, KARAKTERİZASYONU ve ADJUVAN OLARAK
KULLANIM POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÜNLÜER, Nefise

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA

Mayıs 2022, 202 sayfa

Altın nanopartiküller (AuNP) yüzey plazmon rezonansları (SPR), kolay sentezlenebilmeleri, küçük parçacık boyutu ile geniş yüzey-hacim oranına sahip olmaları, yüzeylerine bağlanabilen fonksiyonel gruplar ile kolay modifikasyonları ve biyoyumlu yapıları sayesinde tıp, biyoteknoloji ve medikal alanda, görüntüleme, tanı ve tedavi uygulamalarında yaygın şekilde kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Aşı teknolojisinde daha etkin ve güvenli adjuvan ve antijen taşıma sistemi konusundaki çalışmalarda nanopartiküllerin artan kullanımıyla beraber AuNP'ler de ilgi odağı haline gelmiştir. AuNP'ler fiziksel, kimyasal veya biyolojik sentez ile farklı boyut, şekil ve yüzey özelliklerinde üretilmektedir. Diğer yöntemlere göre iyi bir alternatif olan biyolojik sentezde (biyojenik) metabolitler kullanılarak Au^{+3} iyonlarının Au^0 'a indirgenmesi gerçekleşir.

Bu tez çalışmasında 30 aktinomiset (*Actinobacteria*) üyesi, AuNP sentezi açısından tarandı ve 5 aday izolat içerisinde M137-2 suşu ile en küçük boyutlarda AuNP ($66,12 \pm 1,19$ nm) sentezi gerçekleştirildi. Ardından, *Streptomyces* sp. M137-2 olarak tanımlanan izolat ile ekstrasellüler AuNP sentezinin pH, altın tuzu ($HAuCl_4$) derişimi (M) ve inkübasyon süresi değişkenleri Merkezi Bileşen Tasarımı (CCD) ile optimize edildi. Sentezlenen AuNP'lerin karakterizasyonu [UV-Vis spektroskopisi, taramalı elektron mikroskopu (SEM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), X-Işını Kırınım Difraktometresi (XRD), X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS), Fourier Dönüşümlü-Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), stabilite] yapıldı ve L929 ile U937 hücreleri üzerinde sitotoksitesi belirlendi. Daha sonra model antijen olan sığır serum albümin (BSA) ile konjüge edilen mikrobiyal AuNP'ler karakterize edildi ve adjuvan potansiyeli *in vitro* hücre kültürü denemeleri ile değerlendirildi. Bunun için karakterizasyonun ardından makrofaja farklılaştırılan U937 monosit hücreleri ile TNF- α ve IL-6 salınımı ve hücrel alım çalışmaları yapıldı. Kimyasal sentezlenen AuNP (tAuNP) ve aşı adjuvanı olan alüminyum tuzu (alum) kontrol olarak kullanıldı.

Sonuçta Yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM) kullanılarak biyosentezin optimum pH 8, $HAuCl_4$ 10^{-3} M ve inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlendi. Seçilen izolattın *Streptomyces* suşu olduğu tanımlandı ve yüzeyinde 20-25 nm protein koronaya sahip, 30-50 nm boyutunda, monodispers ve oldukça stabil formda küresel AuNP'ler sentezlendi. mAuNP'ler, XRD analizinde altına özgü karakteristik spektrum ve 541 nm'de ortalanmış SPR bandı ile doğrulandı. FT-IR sonuçları AuNP'lerin indirgenmesi ve stabilizasyonu için

Streptomyces sp. M137-2 metabolitlerinin rolünü doğruladı. L929 hücreleri ile gerçekleştirilen sitotoksosite testi (MTT yöntemi) mAuNP'lerin tıp alanında güvenle kullanılabileceğini gösterdi. BSA konjugasyonu ile SPR bandında 7 nm kayma oldu, konjugat oluşumu toplam protein tayini ve FT-IR ile karakterize edildi. AuNP-BSA konjugatlarının SPR bantları ve zeta potansiyelleri stabil olduğunu doğruladı. Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri üzerinde AuNP-BSA ve alum-BSA konjugatlarının %70'in üzerinde canlılık gösterdiği belirlendi. AuNP-BSA ile indüklenen hücrelerin TNF- α ve IL-6 sitokin seviyeleri, alum-BSA ile indüklenenden sırasıyla 3 kat ($p<0.05$) ve 2 kat ($p<0.05$) daha yüksek olduğu belirlendi. AuNP'lerin hücresel alımı ve nükleusların çevresinde lokalize olduğu konfokal mikroskopisi ile gösterildi.

Mikrobiyal AuNP'lerin adjuvan özelliği, muhtemelen güçlü inflamatuvar yanıtı indüklemesinden ve antijenin makrofaj hücreleri tarafından alımını arttırmasından kaynaklanıyordu. Bu çalışma, mikrobiyal AuNP sentezinin boyut bağımlı istatistiksel optimizasyonunu ve mikrobiyal AuNP'lerin aşı adjuvanı olarak potansiyelini gösteren ilk rapordur.

Anahtar kelimeler: Altın nanopartikül, Aşı adjuvanı, Yanıt Yüzeyi Metodolojisi, *Actinobacteria*, *Streptomyces*

ABSTRACT**OPTIMIZATION OF MICROBIAL GOLD NANOPARTICLES (AUNP)
SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF POTENTIAL USE
AS ADJUVANT**

ÜNLÜER, Nefise

PhD in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA

May 2022, 202 pages

Gold nanoparticles (AuNP) are widely used and researched in medicine, biotechnology and medical fields, imaging, diagnosis and treatment thanks to their surface plasmon resonance (SPR), easy synthesis, large surface-to-volume ratio due to small particle size and biocompatibility due to functional groups that can be attached to their surfaces. With the increasing use of nanoparticles in vaccine technology, studies on more effective and safe adjuvant and antigen delivery systems, AuNPs have also become the focus of attention. AuNPs can be produced in different sizes, shapes and surface properties by physical, chemical or biological synthesis. In biological synthesis (biogenic), which is a good alternative to other methods, the reduction of Au^{+3} ions to Au^0 occurs by using metabolites.

In this study, 30 actinomycete (*Actinobacteria*) members were screened for AuNP synthesis and the smallest AuNP ($66,12 \pm 1,19$ nm) synthesis was performed with M137-2 strain among 5 selected candidate isolates. Then, pH, gold salt ($HAuCl_4$) concentration (M) and incubation time variables of extracellular AuNP synthesis with the isolate identified as *Streptomyces* sp. M137-2 were optimized by Central Component Design (CCD). The synthesized AuNPs were characterized [UV-Vis Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), Dynamic Light Scattering (DLS), X-Ray Diffraction (XRD) and X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), Fourier Transform-Infrared Spectroscopy (FT-IR), stability] and their cytotoxicity was determined on L929 and U937 cells. Next, microbial AuNPs conjugated with the model antigen, bovine serum albumin (BSA), were characterized and their adjuvant potential was evaluated by *in vitro* cell culture experiments. For this, TNF- α and IL-6 release and cellular uptake studies were performed with U937 monocyte cells differentiated into macrophages. Chemically synthesized AuNP (tAuNP) and the vaccine adjuvant aluminum salt (alum) were used as controls.

As a result, the optimum pH of biosynthesis was determined as 8, $HAuCl_4$ 10^{-3} M and incubation time 72 hours using Response surface methodology (RSM). The selected isolate was identified as *Streptomyces* strain and spherical AuNPs were synthesized in monodisperse and highly stable form, 30-50 nm in size, with 20-25 nm protein corona on the surface. mAuNPs were confirmed by XRD analysis with gold-specific characteristic spectrum and SPR band centered at 541 nm. FT-IR results confirmed the role of *Streptomyces* sp. M137-2 metabolites for the reduction and stabilization of AuNPs. The cytotoxicity test (MTT method) performed with L929 cells showed that mAuNPs can be

used safely in the medical field. After mAuNP-BSA conjugation, there was a 7 nm shift in the SPR band, and conjugate formation was characterized by total protein assay and FT-IR analysis. The SPR bands and zeta potentials of the mAuNP-BSA conjugates confirmed that they were stable. It was determined that AuNP-BSA and alum-BSA conjugates showed over 70% viability on U937 monocyte cells that differentiated into macrophages. TNF- α and IL-6 cytokine levels of cells induced by AuNP-BSA were determined to be 3-fold ($p < 0.05$) and 2-fold ($p < 0.05$) higher, respectively, than those induced by alum-BSA. Cellular uptake of AuNPs and localization around nuclei was demonstrated by confocal microscopy.

The adjuvant property of mAuNPs was probably due to their induction of potent inflammatory response and increased uptake of antigen by macrophage cells. This study is the first to demonstrate the size-dependent statistical optimization of microbial AuNP synthesis and the potential of microbial AuNPs as vaccine adjuvants.

Keywords: Gold nanoparticle (AuNP), Vaccine adjuvant, Response Surface Method, *Actinobacteria*, *Streptomyces*

ÖNSÖZ

SARS-Coronavirüs-2 etkenine bağılı gelişen COVID 19 pandemisi kısa sürede tüm dünyayı etkisi altına almıştır. Toplum sağığı açısından salgınla mücadelede aşılamanın önemi yaşanan pandemi ile günümüzde bir kere daha ön plana çıkmıştır. Aşı tasarlama süreçlerinde yaygın olarak kullanılan aluma alternatif adjuvanların geliştirilmesi konusunda araştırmacılar tarafından pek çok çalışma yapıldığı görölmektedir.

Bu araştırmanın amacı Altın nanopartiküllerin (AuNP) fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif oluşturan biyolojik yöntem ile (mikroorganizma kaynaklı) sentezinin istatistiksel optimizasyonu, partiküllerin karakterizasyonu ve model antijen ile konjüge edilerek aşı adjuvanı olarak kullanım potansiyelinin *in vitro* değerlendirilmesidir.

Tez çalışmam süreci boyunca her aşamasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen daima desteğini hissettiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Elif Esin HAMEŞ TUNA'ya ve bana emeğı geçen tüm laboratuvar ekibine teşekkürü borç bilirim.

Mikrobiyal kaynak ile sentezlenen AuNP'lerin alternatif adjuvan adayı olarak araştırıldığı bu çalışma proje kapsamında Aliye ÜSTER Vakfı tarafından desteklenmiştir. Projeyi destekleyen Aliye ÜSTER Vakfı'na teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

30.05.2022

Nefise ÜNLÜER



İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Nanoteknoloji ve Uygulamaları.....	3
2.2 Koloidal Altın/Altın Nanopartiküllerin Tarihçesi.....	5
2.3 Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	6
2.3.1 Fiziksel yöntemler ile AuNP sentezlenmesi	6
2.3.2 Kimyasal yöntemler ile AuNP sentezlenmesi	7
2.3.3 Biyolojik yöntemler ile AuNP sentezlenmesi.....	8
2.4 Geleneksel ve İstatistiksel Optimizasyon	13
2.4.1 Yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM)	13
2.4.2 Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design - CCD)	14
2.5 Altın Nanopartiküllerin (AuNP) Biyomedikal Alanda Uygulamaları	16
2.6 Aşılama ve Aşı Çeşitleri	18
2.7 Aşı Adjuvanları ve Etki Mekanizmaları	20
2.8 Nanoteknoloji ve Aşı Uygulamaları	27
2.8.1 Nanopartikül ve Biyosistem/APC Etkileşimleri	28
2.8.2 Nanopartikül ve Antijen Etkileşimleri	29
2.9 Aşı Uygulamalarında Kullanılan Nanopartiküller	30
2.9.1 Polimerik nanopartiküller	31

2.9.2	Lipozomlar.....	31
2.9.3	İmmün sistemi uyarıcı kompleksler (ISCOM ve ISCOMATRIX)	32
2.9.4	Emülsiyonlar.....	32
2.9.5	Virüs benzeri partiküller (VLPs)	32
2.9.6	Self-assembled/kendiliğinden toplanan proteinler	33
2.9.7	İnorganik nanopartiküller	33
3.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	40
3.1	Gereçler	40
3.1.1.	Mikroorganizmalar ve hücre hatları	40
3.1.2	Besin Ortamları.....	42
3.1.3	Çözelti, tampon ve kimyasallar	44
3.1.4	Cihazlar.....	47
3.2	Yöntemler	48
3.2.1	Aktinomiset izolatlarının aktivasyonu, saflık kontrolü ve stoklanması	48
3.2.2	Altın nanopartikül (AuNP) biyosentezi tarama çalışmaları	48
3.2.3	Aday izolatların AuNP biyosentezi ve karakterizasyonu	50
3.2.4	Aktinomiset izolatının dizi analizi ve filogenetik tanılanması	50
3.2.5	<i>Streptomyces</i> sp. M137-2 ile AuNP biyosentez optimizasyonu.....	53
3.2.6	AuNP karakterizasyon çalışmaları	58
3.2.7	AuNP ve AuNP-BSA konjugatının stabilitesi.....	63
3.2.8	AuNP miktar tayini.....	64
3.2.9	AuNP-BSA konjugatı oluşturma ve saflaştırma.....	65
3.2.10	AuNP-BSA konjugatının karakterizasyonu	67
3.2.11	mAuNP'lerin sitotoksitesinin ve adjuvan potansiyelinin değerlendirilmesi.....	68
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	78
4.1	Aktinomiset İzolatlarının Aktivasyonu, Saflık Kontrolü ve Stoklanması	78
4.2	AuNP Biyosentezi Tarama Çalışmaları.....	79
4.3	Aday İzolatların AuNP Biyosentezi ve Karakterizasyonu	82
4.4	M137-2 İzolatının Tanılanması	84
4.4.1	Genomik DNA izolasyonu, miktar, saflık ve bütünlük değerlendirmesi	84

4.4.2	PCR, dizi analizi ve filogenetik ağaç.....	84
4.5	<i>Streptomyces</i> sp. M137-2 ile AuNP Biyosentezinin Optimizasyonu	86
4.5.1	OVAT denemeleri.....	86
4.5.2	AuNP biyosentezinin istatistiksel optimizasyonu.....	90
4.5.3	Doğrulama deneyleri.....	98
4.6	AuNP Karakterizasyon Çalışmaları.....	99
4.6.1	SPR Spektrumu (UV-Vis spektroskopisi)	99
4.6.2	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy - SEM)	101
4.6.3	Monodispersite (Dynamic Light Scattering - DLS)	102
4.6.4	Fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	104
4.6.5	X-ışını kırınım difraktometresi (X-Ray Diffraction - XRD) analizi.....	105
4.6.6	X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS).....	106
4.7	AuNP Stabilité Değerlendirmesi	108
4.8	AuNP Miktar Tayini	108
4.9	AuNP-BSA Konjugat Oluşturma ve Saflaştırma.....	109
4.10	mAuNP-BSA Konjugatının Karakterizasyon Çalışmaları	110
4.10.1	SPR-Shift kayması.....	110
4.10.2	Toplam protein tayini	112
4.10.3	Fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....	112
4.10.4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	115
4.11	AuNP-BSA Konjugat Stabilitesi	118
4.12	<i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Denemeleri ile mAuNP'lerin Adjuvan Potansiyelinin Değerlendirilmesi	120
4.12.1	U937 insan monosit hücrelerinin makrofajlara farklılaştırılması	120
4.12.2	Sitotoksité testi.....	122
4.12.3	Sitokin seviyelerinin belirlenmesi	135
4.12.4	Altın nanopartiküllerin hücresel alımı (cellular up take).....	142
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	153
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	157
	TEŞEKKÜR.....	199

ÖZGEÇMİŞ.....	200
---------------	-----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 2. 1 Kimyasal yöntem ile polidispers AuNP'lerin TEM görüntüsü-bar 100 nm (Hanauer et al., 2007)	8
Şekil 2. 2 Üç faktörlü bir CCD tasarımının şematik görünümü (Bhattacharya, 2021)	15
Şekil 2. 3 Nanopartikül ve antijenin bağlanma yöntemlerinin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3. 1 Aktinomiset izolatından biyokütle üretimi.....	49
Şekil 3. 2 Farklı şekillerdeki AuNP'lerin ana SPR bantları (Chanana and Liz-Marzan, 2012).....	59
Şekil 3. 3 AuNP'lerin tuz ile flokülasyonunun şematik gösterimi	65
Şekil 4. 1 Aktinomiset izolatlarından bazılarının SFM agarda morfolojisi 1. sıra soldan sağa; 5SM-03, 2SM-05, 4SM-06, M43-1. 2. sıra soldan sağa; M33-14, 4SM-02, M46-6, M7, 3. Sıra soldan sağa M65-2, 137-KT-13, M33-12, 2M-10	78
Şekil 4. 2 MGYF sıvı besiyerinde kültürasyon sonrası biyokütlenin uzaklaştırıldığı kültür sıvılarından bazıları - (*) Melanin üreticileri	79
Şekil 4. 3 AuNP biyosentezi a) hücresiz fermentasyon sıvısı b) sentezlenen AuNP c) kontrol grubu (sadece H _{AuCl} ₄ çözeltisi).....	80
Şekil 4. 4 Seçilen aktinomiset izolatlarının SFM agarda morfolojisi a) M137-2, b) 3SM-03, c) 4SM-02, d) 5SM-03, e) 6SM-123	82
Şekil 4. 5 Aday izolatlar tarafından sentezlenen AuNP çözeltilerinin (cam tüp içinde) görünümü.....	83
Şekil 4. 6 M137-2 izolatının 16S rDNA dizi analiz sonucuna dayanılarak çizilen filogenetik ağaç (3000 bootstrap)	86
Şekil 4. 7 Farklı pH'larda (6-12) hazırlanan H _{AuCl} ₄ çözeltisi ile eşit hacimde karıştırılan hücresiz fermentasyon sıvılarının inkübasyon sonrası gözlenen renk değişimleri.....	87
Şekil 4. 8 Sentezlenen AuNP'lerin SEM görüntüleri ve nanopartikül boyutları	88
Şekil 4. 9 CCD deney tasarımı sonucu her bir deney koşulunda elde edilen AuNP biyosentez sıvılarının görünümü	92
Şekil 4. 10 Lineer hata grafiği	95

Şekil 4. 11 AuNP boyutu üzerinde etkili olan bağımsız değişkenlerin bireysel etkileri; a) pH, b) Altın tuzu derişimi	96
Şekil 4. 12 AuNP boyutu üzerinde etkili olan bağımsız değişkenlerin birlikte etkileri; pH ve tuz konsantrasyonu	97
Şekil 4. 13 <i>Streptomyces</i> sp. M137-2'e ait AuNP biyosentez çözeltisinin SPR spektrumu	99
Şekil 4. 14 AuNP'lerin boyut dağılımı.....	101
Şekil 4. 15 <i>Streptomyces</i> sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin 100.000 büyütmedeki görünümü.....	102
Şekil 4. 16 <i>Streptomyces</i> sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin DLS analizi	103
Şekil 4. 17 Mikrobiyal AuNP'ler ve <i>Streptomyces</i> sp. M137-2'e ait HFS'ye (CFS) ait FT-IR analizi	105
Şekil 4. 18 <i>Streptomyces</i> sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin XRD grafiğı	106
Şekil 4. 19 AuNP XPS spektrumları a) Geniş tarama spektrumu, b) Au 4f'nin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları	107
Şekil 4. 20 Ticari AuNP (tAuNP) standart eğrisi.....	109
Şekil 4. 21 Kritik flokülasyon konsantrasyon testi	110
Şekil 4. 22 mAuNP ve mAuNP-BSA konjugatının SPR bantları	111
Şekil 4. 23 Bradford Standart Eğrisi	112
Şekil 4. 24 mAuNP, mAuNP-BSA ve BSA'ya ait FT-IR analizi (Mavi: BSA, Siyah: mAuNP-BSA, Kırmızı: mAuNP).....	114
Şekil 4. 25 mAuNP protein koronası ve boyutları a)350000x, b)500000x.....	116
Şekil 4. 26 ticari AuNP SEM görüntüsü	117
Şekil 4. 27 BSA ile konjuge edilen ticari AuNP (tAuNP-BSA), boyutları ve protein koronası	117
Şekil 4. 28 AuNP-BSA konjugatının 72. saate kadar ölçülen SPR bantları	119
Şekil 4. 29 U937 monosit hücrelerinin sırasıyla a), 10x, b) 20x ve c) 40x büyütmelerdeki mikroskop görüntüleri ve PMA uygulaması ardından makrofaja farklılaşan hücrelerin sırasıyla d)10x, e) 20x ve f)40x büyütmelerdeki mikroskop görüntüleri.....	121
Şekil 4. 30 L929 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda mAuNP sitotoksitesitesi....	123
Şekil 4. 31 Makrofaj hücrelerinin (U937) a) mAuNP ve b) mAuNP-BSA konjugatının varlığında hücre canlılığı.....	125
Şekil 4. 32 Makrofaj hücrelerinin alum varlığında hücre canlılığı	126
Şekil 4. 33 Makrofaj hücrelerinin deney gruplarındaki hücre canlılığı (%)	128

Şekil 4. 34 Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin farklı deney gruplarında TNF- α seviyeleri.....	136
Şekil 4. 35 Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin farklı deney gruplarında IL-6 seviyeleri.....	137
Şekil 4. 36 U937 makrofaj hücrelerinin a)DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b)monokrom ışık altında elde edilen görüntü, c)görüntülerin birleştirilmiş hali.....	144
Şekil 4. 37 a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b)FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d)Görüntülerin birleştirilmiş hali, e)Monokrom ışık altında elde edilen görüntü	145
Şekil 4. 38 FITC-BSA ile konjuge mAuNP (3×10^{10} NP/ml) fagositozu a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b)FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d)Görüntülerin birleştirilmiş hali, e)Monokrom ışık altında elde edilen görüntü.....	146
Şekil 4. 39 FITC-BSA ile konjuge mAuNP (6×10^{10} NP/ml) fagositozu a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b)FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d)Görüntülerin birleştirilmiş hali, e)Monokrom ışık altında elde edilen görüntü.....	147

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2. 1 Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen AuNP ile ilgili çalışmalar.....	10
Tablo 2. 2 Adjuvan çeşitleri (Yurdakök ve İnce, 2008).....	22
Tablo 2. 3 Lisanslı aşı adjuvanları (Gül ve Yurdakök Dikmen, 2019)	26
Tablo 2. 4 Aşı tasarımlarında kullanılan kimyasal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin indüklediği bağışıklık tepkileri.....	38
Tablo 3. 1 Çalışmada AuNP biyosentezi için değerlendirilen aktinomiset izolatları	41
Tablo 3. 2 CCD (Merkezi Bileşen Tasarımı) modeline göre önerilen deney tasarımı	55
Tablo 3. 3 Doğrulama deneyleri	57
Tablo 3. 4 U937 hücreleri için sitotoksosite testi deney grupları	74
Tablo 3. 5 Sitokin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan deney grupları	76
Tablo 3. 6 Nanopartiküllerin hücresel alımının belirlenmesindeki deney grupları	77
Tablo 4. 1 İzolatların melanin üretim durumu, spektrofotometrik tarama sonucu ve 550 nm'de absorbansları	81
Tablo 4. 2 Aday izolatlar tarafından sentezlenen AuNP'lerin ortalama boyut dağılımları ve optik analizi	83
Tablo 4. 3 Nükleik asitlerin saflık kontrolü	84
Tablo 4. 4 <i>Streptomyces</i> sp. M137-2 izolatının 16S rDNA kısmi dizisi	85
Tablo 4. 5 <i>Streptomyces</i> sp.M137-2 HFS ile sentezlenen AuNP'lerin optik analizi	87
Tablo 4. 6 CCD (Merkezi Bileşen Tasarımı) model tasarımı için bağımsız değişkenlerin alt-üst değerleri	90
Tablo 4. 7 CCD deney tasarımı ve yanıtları ile spektrofotometrik tarama sonuçları	91
Tablo 4. 8 İlk modelin ANOVA sonuçları	93
Tablo 4. 9 İyileştirilen modelin/sadeleştirilen ANOVA sonuçları	93
Tablo 4. 10 Doğrulama deneyleri	98
Tablo 4. 11 Zeta potansiyeli ölçümleri	119
Tablo 4. 12 Makrofaja farklılaşan U937 hücrelerinin sitotoksosite testi ANOVA analizi	127

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
eV	Elektronvolt enerjisi
g	Gram
kb	Kilobaz
mbar	Milibar
mV	Milivolt
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
ng	Nanogram
μg	Mikrogram
mg	Miligram
L	Litre
pmol	Pikomol
pM	Pikomolar
dk	Dakika
sn	Saniye

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
rfc/g	Relatif santrifüj kuvveti/Revolutions centrifugal force - gravite
rpm	Dakikadaki devir sayısı/Revolutions per minute
v/v	Hacim/hacim oranı
2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
Au	Altın
C	Karbon
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
Cl	Klor
H	Hidrojen
He	Helyum
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
N	Azot
Na	Sodyum
O	Oksijen
P	Fosfor
S	Kükürt
CO ₂	Karbondiyoksit formülü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

Simgeler Açıklama

Al(OH)_3	Alüminyum hidroksit formülü
Al(PO)_4	Alüminyum fosfat formülü
HAuCl_4	Altın tuzu/Gold (III) chloride hydrate
HCl	Hidroklorik asit formülü
MgCl_2	Magnezyum klorid
NaBH_4	Sodyum borohidrit formülü
NaCl	Sodyum klorid formülü
NaOH	Sodyum hidroksit formülü

Kisaltmalar Açıklama

A_{260}	260 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A_{280}	280 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
ACTIN OCC	Aktinomiset kültür koleksiyonu
AlNP	Alüminyum nanopartiküller
ANOVA	Varyans analizi
APC	Antijen sunan hücreler/Antigen Presenting Cell
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu/American Type Culture Collection
AuNP	Altın nanopartikül
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Sığır serum albümin/Bovine Serum Albumin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
CaPNP	Kalsiyum fosfat nanopartikül
CCD	Merkezi Bileşen Tasarımı/Central Composite Design
CD4+	CD4 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CD8+	CD8 hücre yüzey antijeni bulunduran lenfosit
CFA	Tamamlanmış Freund's Adjuvanı/Complete Freund's Adjuvant
CFC	Kritik flokülasyon konsantrasyonu/Critical Flocculation Concentration
CI	Güven aralığı/Confidence Interval
CM	Şartlandırılmış Ortam/Conditioned Media
CTAB	Heksa-desiltrimetilamonyumbromid/Hexa-decyltrimethylammonium bromide
DAPI	6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritik hücreler/Dendritic Cells
DMEM	Dulbecco'nun modifiye minimum esansiyel besi ortamı/Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit/Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit/Deoxynucleotide
DLS	Dinamik Işık Saçılımı/Dynamic Light Scattering
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit/Ethylenediaminetetraacetic acid

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EGE – MATAL	Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Test/Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal sığır serum/Fetal Bovine Serum
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi/Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GYA	Gliserol – Maya Özütü Agar
HFS/CFS	Hüresiz Fermentasyon Sıvısı/Cell Free Supernatant
HPV	İnsan Papilloma Virüs/Human Papilloma Virus
IFN- α	İnterferon alfa
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin/Interleukin
IR	Kızılötesi / Infrared
ISCOMs	İmmün sistemi uyarıcı kompleksler /Immune Stimulating Complexes
ISCOMATRIX	İmmün sistemi uyarıcı kompleksler /Immune Stimulating Complexes
İYTE-TAM	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü –Tümleşik Araştırma Merkezi
LPS	Lipopolisakkarit/Lipopolysaccharide
L929	Fare fibroblast hücreleri
mAuNP	Mikrobiyal altın nanopartikül

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi/Major Histocompatibility Complex
MTT	3'- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5- diphenyl tetrazolium bromide
MGYP	Malt özütü - glukoz - maya özütü - pepton besi ortamı
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi
OD	Optik yoğunluk/Optical density
OVAT	One variable at a time
PAMPs	Patojene özgü moleküler modeller/Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi/Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu/Polymerase Chain Reaction
PCV	Porsin Sirko Virüs/Porcine Circo Virus
PdI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol / Polyethylene glycol
PGA	γ -Poliglutamik asit/Polyglutamic acid
PLA	Poli Laktik asit/Polylactic acid
PLGA	Poli Laktik-ko-gliloik asit/Poly Lactic-co-glycolic acid
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRR	Model tanıma reseptörü/Pattern Recognition Receptors
rDNA	Ribozomal DNA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kisaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640 besi ortamı
RSM	Yanıt Yüzeyi Metodolojisi/Response Surface Methodology
SDS	Sodyum dodesil sülfat/Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu/Scanning Electron Microscopy
SFM	Soya Mannitol Agar
SiNP	Silika nanopartiküller
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı/Surface Plasmon Resonance
tAuNP	Ticari altın nanopartikül
TE	Tris – EDTA tamponu
TCR	T hücre reseptörü/T Cell Receptor
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu/Transmission Electron Microscopy
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü Beta/Transforming Growth Factor Beta
TLR	Toll benzeri reseptör/Toll Like Receptor
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa/Tumour necrosis factor-alpha
UV-Vis	Ultraviyole ve Görünür Bölge/Ultraviolet-Visible
VLPs	Virüs benzeri partiküller/Virus Like Particle
XPS Spectroscopy	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi/X-ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	X-ray Difraksiyon/X-ray Diffraction



1. GİRİŞ

Nanomalzemeler sağladıkları muazzam uygulamalar nedeniyle ve günümüzde nanoteknoloji ile biyoteknolojideki gelişmelerin de etkisiyle biyoloji, tıp, elektronik ve tarımda giderek daha yaygın uygulama alanı bulmaktadır. Nanoteknoloji, 1-100 nm boyut aralığında ve rasyonel tasarımların geliştirilmesiyle birlikte istenen özelliklere sahip nanopartiküllerin üretilmesi bilimidir. Nanopartiküller organik (karbon np) ve inorganik (manyetik np, metal np, yarı iletken np) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gelişen nanoteknolojik yaklaşımlar, tıp ve biyomedikal alandaki uygulamalarda kullanılmak üzere farklı boyut, şekil, bileşim ve yüzey özelliklerine sahip nanopartiküllerin tasarlanmasına fırsat sunmaktadır. Nano ölçekli boyutları sayesinde nanopartiküller geniş yüzey/hacim oranı sunarlar, sahip oldukları karakteristik özellikler, biyolojik sistemlerle kolay penetrasyon (endositoz mekanizması ile hücre içerisine alınması) ve biyomoleküllere benzer boyutları ile biyomedikal uygulamalar için benzersiz avantajlar sağlamaktadır (Shaalán et al., 2016; Shen et al., 2018; Das et al., 2021; Ghosh et al., 2021).

Nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemlerde karşılaşılan bazı kısıtlar göz önüne alındığında biyolojik yöntem iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Dahası biyolojik sistemler kullanılarak yapılan nanopartikül sentezi güvenilir, sürdürülebilir, ekonomik, çevre dostu ve diğer yöntemler ile karşılaştırıldığında ılımlı bir yöntemdir. Biyomedikal uygulamalar için, bir metal yüzeyinin biyoyumluluğu oldukça önemli bir unsurdur ve biyolojik sistemler kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerde metale yüksek biyoyumluluk sağlamaktadır. Nanopartiküllerin agregasyonunu önleyen ve stabilizasyonunu sağlayan kaplama ajanları genellikle canlı sistemlerin salgıladığı metabolitlerdir. Böylelikle sentezlenen nanopartiküllerin bir lipid tabakası ve/veya biyomoleküller ile kaplanması biyomedikal uygulamalarda kullanılacak nanopartiküllere fizyolojik çözünürlük ve stabilite kazandırmaktadır. Bakteri, alg, mantar ve maya hücrelerinin çevrelerindeki metalleri transport ettiği ve onları elemental nanopartiküle dönüştürerek biriktirdikleri veya salgıladıkları bilinmektedir. Mikroorganizmalar metal iyonlarına maruz kaldığında (stres altındaki koşullarda), metal iyonlarının indirgenmesi, hücre içi ayırma, hücre dışı birikim, efluks pompası gibi kendi doğal savunma mekanizmaları ile metal iyonlarını biyomineralize edebilmekte ve böylece hücre içi veya hücre dışı proses ile nanopartikülleri sentezleyebilmektedir. Altın, gümüş, bakır, çinko, magnezyum, kalsiyum, sülfid, platin, kadmiyum gibi çeşitli nanopartiküllerin

sentezlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar biyo-fabrikalar olarak kabul edilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen nanopartiküller, kontrol edilebilir boyutları, biyouyumlu yapıları ve sahip oldukları diğer özellikleri göz önüne alındığında biyomedikal ve terapötik uygulamalar için umut vericidir (Gahlawat and Choudhury, 2019; Das et al., 2021; Ghosh et al., 2021).

Son yıllarda nanopartiküllerin kullanımı çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde uygulanan geleneksel birçok yöntemi dönüştürerek dikkat çekici bir hal almış ve nanoaşı uygulamaları da aktif olarak araştırılan bir alan haline gelmiştir. Mevcut aşı yaklaşımları ile kıyaslandığında antijen iletim/taşıma ve/veya adjuvan sistemleri olarak tasarlanan nano aşı formülasyonları antijen işlemeyi arttırması, immün sistemin daha etkin uyarılması, kontrollü salım imkânı veya antijenin vücuttaki degradasyonuna karşı korunması gibi geliştirilen özellikleri ile öne çıkmaktadır. Birçok nanopartikül aşı platformu, minimal toksisitesi, biyobozunur ve biyouyumlu yapısı sayesinde geleneksel aşı formülasyonlarına güvenli ve etkili alternatifler oluşturmaktadır. Sonuç olarak nanopartiküllerin hem profilaktik hem de terapötik aşı formülasyonlarında kullanılması, gereksinim duyulan etkin antijen taşıma sistemi ve adjuvanların geliştirilmesine böylece antijen sunan hücrelerin (APC) hedeflenmesine ek olarak antijen alımının iyileştirilmesine ve güçlü bağışıklık tepkisi ile birlikte minimal toksisite ile yeni fırsatlar sunmaktadır (Zaman et al., 2013; Shen et al., 2018; Falahati et al., 2019).

Çeşitli nanopartikül tipleri bulunmasına rağmen altın nanopartiküller i) yüzey plazmon rezonans (SPR) etkisi, ii) optik ve elektronik özellikleri, iii) kolay yüzey modifikasyonu, iv) biyouyumluluk ve düşük toksisiteleri, v) oksidasyona karşı dirençli olması, vi) kontrol edilebilir morfolojisi ve boyut dağılımı gibi özellikleri nedeniyle bu çalışmada tercih edildi (Shedbalkar et al., 2014; Carabineiro, 2017). Bu tez kapsamında bakterilerin önemli bir grubunu oluşturan aktinomisetler kullanılarak biyolojik yöntem ile 30-50 nm boyutlarında küresel altın nanopartikül (AuNP) sentezinin istatistiksel deney tasarımı yaklaşımıyla optimizasyonu ve karakterizasyonu ardından düşük immünojeniteye sahip model antijen olan BSA ile konjugat oluşturulması ve nihai ürünün aşı adjuvanı olarak kullanım potansiyelinin *in vitro* değerlendirilmesi hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji ve Uygulamaları

Nanoteknoloji, 100 nm'den daha küçük boyutta malzeme üretilmesini ve bu malzemelerin incelenmesine yönelik cihazların geliştirilmesini içeren bilim dalıdır. Yoğun bir araştırma alanı olarak ortaya çıkan ve 21. yüzyılın hızlı gelişen en önemli alanlarından biri olan nanoteknoloji, tıp, fizik, kimya, biyoloji, mühendislik, bilgisayar ve malzeme bilimi alanlarındaki uygulamaları kapsamaktadır (Havel et al., 2009; Shen et al., 2018).

Evrendeki tüm maddelerin yapıtaşı olarak kabul edilen atomlar, düzenine ve boyutuna bağlı olarak kaba partiküller (10000-2500 nm), ince partiküller (2500-100 nm) ve ultra ince partiküller (100-1 nm) olarak sınıflandırılmaktadır. Yunanca “cüce” anlamına gelen “nanos” kelimesinden türetilen nano sözcüğü 100 nm ölçeğinden daha küçük boyutlardaki malzemeleri tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır. Metrik ölçekte 1 nm, metrenin milyarda biridir (Gunasekera et al., 2009; Dreaden et al., 2012; Shah et al., 2014).

İngiliz bilim insanı Michael Faraday nano ölçekteki partiküllerin kütlesinden farklı davrandığına dair gözlemlerde bulunmuş ve 1852 yılında Londra'daki Kraliyet Enstitüsü'nde “Metallerin Işıkla Deneysel İlişkileri” üzerine bir konferans vermiştir. Faraday altın çözeltilerinin daha yakut renkli çözeltilere indirgenebileceğini ilk fark eden kişidir. Nanoteknoloji alanının yükselişe geçmesi yüzyıl sonra olacak olsa da Faraday'ın çalışmaları oldukça temel ve kritik keşiflerdir (Dreaden et al., 2012; Abadeer and Murphy, 2016). Tarihsel olarak nanoteknoloji kavramının ortaya çıkışı Faraday'dan bir asır sonra 1959'da Kaliforniya'daki Amerikan Fizik Derneği toplantısında Richard P. Feynman'ın “There's plenty of room at the bottom” başlıklı konuşmasıyla başlamaktadır. Dr. Feynman tek tek atomların ve moleküllerin manipüle edilebileceğini unutulmaz bir şekilde savunmuş, nano ölçekli tasarımın gelecekteki yenilik ve gelişim için hizmet edebilecek potansiyel adaylar olduğunu vurgulamıştır (Narayanan and Sakthivel, 2010).

Partiküller, nano boyuta yaklaştıkça makro ölçektekinden oldukça farklı özellikler sergilemektedir. Nanopartiküllerin boyuta bağlı olarak optik, elektronik, katalitik, manyetik, termodinamik, fiziksel ve kimyasal birçok özelliği (erime noktası, floresan, elektriksel iletkenlik, manyetik geçirgenlik, kimyasal reaktivite gibi) büyük ölçüde

değişmektedir. Aynı zamanda bulundukları ortamın doğasından kaynaklı olarak ta nanopartiküllerin sahip olduğu özellikler büyük ölçüde etkilenmektedir. Tasarlanan yeni malzemenin davranışları ise “klasik” değil “kuantum” olarak tanımlanmaktadır (Huang et al., 2007; Gunasekera et al., 2009; Singh and Kundu, 2014; Golinska et al., 2014; Nikzamir et al., 2018).

Nanoteknoloji yaklaşımları, nanotıp alanında yeni bir dönem açmış, hastalıkların teşhis, tedavi, izlenmesi ve önlenmesine yönelik yapılan geleneksel tedavilerin sağlayamadığı ve/veya kısıtlandığı durumlarda iyileştirmeye olanak sağlayan ve sağlık sistemini olumlu yönde etkileyen muazzam bir potansiyele sahiptir. İlaç, genetik materyal, biyolojik aktif moleküller, teşhis/tanı/görüntüleme ajanları gibi vücuttaki farklı hücreleri hedefleyerek spesifik olarak iletebilen çeşitli nanopartikül sistemleri tasarlanması son yıllarda artmaktadır. Biyomedikal uygulamalarda, toksik olmayan, suda dağılılabilen, biyouyumlu, fizyolojik ortamlarda stabil ve immünojenik etkisi olmayan nanopartiküllerin tasarlanması gerekmektedir. Aynı zamanda hedef dokulara yönelik tasarlanan özgül nanopartiküllerin geliştirilmesi ile lipozomal, misel bazlı ve metal nanopartiküllerin günümüzde klinik uygulamalarda artan şekilde kullanılması ve son yıllarda pek çok araştırmaya konu olması oldukça heyecan vericidir (Havel et al., 2009; Moreira et al., 2018; Nikzamir et al., 2018; Shen et al., 2018).

İnorganik ve organik bileşimdeki nanopartiküller, i)yarı iletken kuantum noktaları, ii)manyetik nanopartiküller, iii)polimerik nanopartiküller, iv)karbon bazlı nanopartiküller ve v)metalik nanopartiküller olmak üzere 5 ana grupta sınıflandırılmaktadır (Huang et al., 2007; Nikzamir et al., 2018). Doğal olarak oluşmadıkları için tasarlanan bu nanopartiküllerin her birinin karakteristik özellikleri ve çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Örneğin; yarı iletken kuantum noktaları biyolojik etiketleme ve görüntüleme uygulamalarında yararlı olan floresan özellikler gösterirken; manyetik nanopartiküller manyetik özellikleri sayesinde hücre sınıflandırılması, manyetik rezonans indüksiyonu, ilaç dağıtımı ve manyetik hipertermi tedavisi için güçlü imkanlar sağlamaktadır. Metal nanopartiküller ise diğer nanopartiküllerin aksine boyut, şekil, kompozisyon gibi özelliklerinin kontrol edilebilmesine ve daha esnek/kolay sentezlenmesine olanak sunmaktadır. Dahası çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına temel oluşturan optik özellikleri sayesinde Yüzey Plazmon Rezonansı'nın (SPR) ayarlanabilmesidir (Shah et al., 2014; Abadeer and Murphy, 2016; Nikzamir et al.,

2018; Shen et al., 2018). Biyolojik uygulamalar için en yaygın kullanılan ve araştırılan metal nanopartikül altın nanopartiküllerdir (AuNP).

2.2 Kolloidal Altın/Altın Nanopartiküllerin Tarihçesi

Altın, $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$ elektron konfigürasyonuna sahip, atom numarası 79, atom ağırlıkları 192 – 206 arasında değişen 14 izotopu bulunan bir elementtir. Erime noktası $1063^{\circ}C$, kaynama noktası $2970^{\circ}C$ ve özgül ağırlığı $19,3 \text{ gr/cm}^3$ 'tür. Altın doğası gereği tepkimeye girmeyen, kimyasal oksidasyona karşı dirençli, optik, manyetik, elektriksel, fiziksel özellikleri ile dikkat çeken bir soy metaldir. Nano ölçekteki malzemelerin fiziko-kimyasal özellikleri bulk halinden farklıdır. Bulk halinde sarı renge sahip altının aksine altın nanopartiküller tipik yakut kırmızısı/şarap kırmızısı renk ile tanımlanmaktadır. Bulk formdaki altın mücevher, madeni para ve elektronikte kullanılırken moleküler formdaki altın bileşikler katalizör ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç bileşeni olarak kullanılmaktadır (Daniel and Astruc, 2004; Havel et al., 2009; Dreaden et al., 2012).

Kolloidal altın “Antik çağlara” kadar uzanan tedavi ve dekoratif amaçlı zengin bir kullanım geçmişine sahiptir. MÖ 4. ve 5. yy'larda Arap, Çinli ve Hintli bilim insanları tarafından tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Simyacılar tarafından kolloidal altının her derde deva muazzam bir tıbbi değeri olduğu düşünülmekteydi. MS 8. yy'da, Arabistan'da bir simyacı olan Cabir İbn Hayyan nitrik asit ve hidroklorik asit karışımı içerisinde altını çözmeyi başardı ve adına “Yaşam İksiri – Kral Suyu – Aqua Regia” denilen içilebilir altın sıvısını böylelikle üretti. Romalılar (4. yy'da Roma İmparatorluğu) ise kolloidal altının estetik özelliğini keşfederek cam yüzeylerin, seramik ve bronz kapların renklendirilmesi (gümüş nanopartikülleri sarı, altın nanopartikülleri ise kırmızı renk tonu) amacıyla kullandılar (Daniel and Astruc, 2004; Arvizo et al., 2012; Dreaden et al., 2012; Shedbalkar et al., 2014).

Kolloidal yapıdaki altın ve gümüş nanopartiküllerin boyuta bağlı optik özelliklerini inceleyen ve bildiren ilk bilimsel çalışma 1857'de İngiliz fizikçi ve kimyager Michael Faraday tarafından yapılmıştır. Modern tıpta kolloidal altının ilk kullanımı 1890'da Alman bakteriyolog Robert Koch'un tüberküloz basiline karşı düşük konsantrasyonda $K[Au(CN)_2]$ 'ü (potasyum altın siyanür) kullanması ve antibakteriyel özellikte olduğunu keşfetmesi ile başlamaktadır. Altın tuzlarının sahip olduğu güçlü anti-inflamatuar etkiden

faydalanan Lande (1927) eklemlerdeki ağrı, şişlik, sertlik, fonksiyon kaybına karşı romatoid artrit tedavisinde altın tiyolatları uyguladı. 19. yy başlarında Avrupa'da yaygınlaşan kolloidal altın solüsyonlarının, başta kanı arındırmak olmak üzere bronşiyal astım, romatizmal hastalıklar, diyabet, frengi, sıtma, alkolizm, sinir sistemi hastalıkları ve lupus, ürtiker, sedef gibi cilt hastalıklarının tedavisinde içildiği bilinmektedir (Daniel and Astruc, 2004; Havel et al., 2009; Arvizo et al., 2012; Dreaden et al., 2012; Shedbalkar et al., 2014).

2.3 Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Nanopartiküllerin yapı, bileşim, boyut ve şekil dağılımları sentez aşamasında kinetik veya termodinamik değişkenlerin manipüle edilmesiyle ayarlanabilmektedir. Partiküllerin belirli özelliklerinin bu şekilde kontrol edilebilmesi metal nanopartiküllerin araştırılmasını ve kataliz, elektronik, optik cihazlar, tıbbi uygulamalar (teşhis ve terapötik), sensörler ve biyoteknoloji alanlarındaki uygulamalarda kullanım potansiyelini arttırmaktadır (Balasubramanian et al., 2010; Arvizo et al., 2012).

Metal nanopartiküllerin, sentezlenmesinde “Bottom-up” ve “Top-down” olmak üzere 2 temel yaklaşım bulunmaktadır. Top-down yaklaşımda, büyük hacimli materyal kademe kademe nano boyutlu malzemelere ayrıştırılırken; Bottom-up yaklaşımda ise atomlar ya da moleküller birleştirilerek nanometre aralığında molekül yapılar oluşturulmaktadır (Narayanan and Sakthivel, 2010; Golinska et al., 2014). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik metodolojiler kullanılarak küresel, tel, tüp, çubuk, kafes, nanoküp, üçgen ve çokgen şekillerde, farklı boyut ve yüzey özelliklerine sahip AuNP'lerin sentezlenmesi mümkündür. Bottom-up yaklaşımda kimyasal ve biyolojik yöntemler yaygın olarak kullanılırken; Top-down yaklaşımda ise sentezlenen nanopartiküllerin şekil ve boyut dağılımının kontrol edilmesi zor olduğundan kullanımı kısıtlıdır (Ahmad et al., 2013, Shedbalkar et al., 2014; Abadeer and Murphy, 2016).

2.3.1 Fiziksel yöntemler ile AuNP sentezlenmesi

AuNP'lerin sentezlenmesinde sonoliz, mikrodalga, ultrason, ultraviyole, tohum çekirdekleme (seeding growth), lazer ablasyon/fotoablasyon tekniği gibi çok çeşitli fiziksel yöntemler bulunmaktadır. Ancak bu yöntemlerde enerji ihtiyacı oldukça yüksek

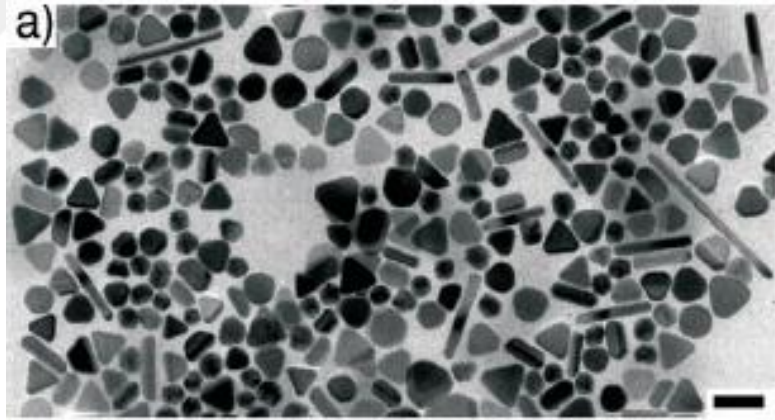
olduğundan sürdürülebilir yöntemler değildir ve pahalı ekipmanlara gereksinim duyulmaktadır. Radyasyona maruz kalınması, yüksek maliyet gibi olumsuzlukların yanı sıra çöktürme hızı düşük olduğundan düşük verimli ürün elde edilmesi söz konusudur (Daniel and Astruc, 2004; Korbekandi et al., 2009; Narayanan and Sakthivel, 2010; Eskandari-Nojehdehi et al., 2016).

2.3.2 Kimyasal yöntemler ile AuNP sentezlenmesi

Kimyasal yöntemler, fiziksel yöntemlere kıyasla daha ucuz ve elde edilen ürün açısından daha yüksek verimde olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile büyük ölçekli üretim mümkün olmasına rağmen hem elde edilen ürün açısından hem de uygulanan proseste çeşitli güçlükler ve kısıtlar bulunmaktadır.

İndirgeyici ve dengeleyici ajanlar varlığında altın tuzlarının AuNP'lere indirgenmesi kimyasal yöntemler arasında sıklıkla tercih edilendir. Kolloidal altın nanopartiküllerin sentezini açıklayan ilk bilimsel rapor 1857'de altın klorür sıvısının karbon disülfid ve fosfor ilavesi ile indirgenerek yakut renk elde edilmesinin keşfiyle başladı (Faraday, 1857). 1951'de Turkevitch ve arkadaşlarının altın klorür sıvısını tek fazda sodyum sitrat ile indirgemesi ve 20 nm boyutunda AuNP'ler sentezlenmesi, 1973'te Frens ve arkadaşlarının çözeltideki sodyum sitrat miktarının değiştirilmesiyle reaksiyonun kontrol edilebilirliğini ve farklı boyutlarda AuNP'lerin (15 – 150 nm) sentezini bildirmesi, 1994'te Brust – Schiffrin yöntemi olarak bilinen ultra küçük AuNP'leri stabilize etmek için tiyol ligandlarından yararlanılarak iki fazlı bir sentezin geliştirilmesiyle devam etmektedir. Her iki yöntemde de reaksiyona giren stabilizör ajanlar varlığında, Au^{+3} iyonlarının indirgenmesi sonucunda AuNP'ler sentezlenir. Turkevich yönteminde, kloraurik asit $H(AuCl_4)$ su içerisinde süspanse haldeyken sodyum sitrat eklenir ve kaynatılır. Böylece 15-150 nm boyut aralığında AuNP'ler oluşur. Fakat bu AuNP'ler tuz çözeltilerinde kararlı değildir ve kümelenme eğilimini önlemek amacıyla stabilize edici ajanların kullanımı (sitrat, askorbik asit, tiyol, polivinilalkol, polietilenglikol, karbometilselüloz vb) gerekmektedir. Ancak kullanılan bu stabilizatörlerin partikül yüzeyinde oluşturduğu safsızlıklar (yoğun sitrat, klorür, ketoglutarat, asetat gibi yan ürünler) biyolojik ve medikal uygulamalarda kullanım kısıtı getirmekte ve partiküllerin polimerler ile kaplanma gereksinimini ortaya çıkarmaktadır. Brust-Schiffrin yönteminde ise faz transfer kimyasalı olarak tolüen kullanılır. Tolüen içerisinde süspanse halde bulunan $H(AuCl_4)$ çözeltisine

sodyum borohidrit (NaBH_4) ve tiyol eklenerek reaksiyon gerçekleştirilir. Üretilen AuNP'ler 1-5 nm boyutlarında, oldukça kararlı ve polar olmayan çözücüler içerisinde çözünebilir yapıdadır. Ancak kimyasal reaksiyonun kontrol altında tutulma gücü sebebiyle sentezlenen AuNP'ler farklı boyutlarda ve şekillerde (polidispers, çok dağılımlı) olabilmektedir (Bkz **Şekil 2.1.**). Bunun sonucunda maliyetli ve zahmetli ayırma-saflaştırma basamaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. AuNP'lerin, boyut, şekil ve kristal yapısı doğrudan optik, fiziko-kimyasal ve elektronik özelliklerini belirlediği için sentezlenen AuNP'lerin, aynı şekil ve yakın boyutlarda (monodispers, tek dağılımlı) olması oldukça önemlidir. Aksi takdirde homojen dağılıma sahip olmayan nanopartiküllerin kullanımı uygulamalarda çeşitli güçlüklerle ve kısıtlara sebep olmaktadır. Ayrıca polar olmayan çözücülerin ve toksik kimyasalların kullanılması, reaksiyon esnasında istenmeyen yan ürün oluşumu (reaksiyon boyunca açığa çıkan “aktif çamur” olarak nitelendirilen atık) göz önüne alındığında hem çalışan personel hem de çevre için tehdit oluşturmaktadır (Daniel and Astruc, 2004; Korbekandi et al., 2009; Balasubramanian et al., 2010; Narayanan and Sakthivel, 2010; Thakkar et al., 2010; Li et al., 2011, Arvizo et al., 2012; Yeh et al., 2012; Cormode et al., 2013; Mieszawska et al., 2013; Shedbalkar et al., 2014; Singh et al., 2019).



Şekil 2. 1 Kimyasal yöntem ile polidispers AuNP'lerin TEM görüntüsü-bar 100 nm (Hanauer et al., 2007)

2.3.3 Biyolojik yöntemler ile AuNP sentezlenmesi

Bakteri, maya, fungus, alg, aktinomiset hücreleri ve bitki özleri ile intrasellüler (hücre içi) veya ekstrasellüler (hücre dışı) şekilde metal nanopartiküller (altın, gümüş, bakır, çinko, kadmiyum, paladyum gibi) sentezlenmektedir (Hulkoti and Taranath, 2014; Lokina et al., 2014; Shedbalkar et al., 2014). Fiziksel ve kimyasal yöntemler de karşılaşılan dezavantajlar göz önüne alındığında; AuNP'lerin sentezlenmesinde alternatif bir yaklaşım

olarak biyolojik sistemlerin kullanımı büyük ilgi görmektedir (**Tablo 2.1**). Mikroorganizmaların zengin çeşitliliği ve varoluşlarından gelen sentez potansiyelleri göz önüne alındığında AuNP sentezi için potansiyel biyofabrikalar olarak nitelendirilmektedirler. Mikroorganizmalar, biyomineralizasyon, biyosorbsiyon, kompleksleşme, çökelme ya da hücre içi biriktirme işlemleri gibi mekanizmalarla metal iyonlarını detoksifiye ederler. Bahsedilen bu doğal savunma mekanizmaları sayesinde metal iyonlarının indirgenmesiyle nanopartiküllerin biyosentezi gerçekleşmektedir (Narayanan and Sakthivel, 2010; Shedbalkar et al., 2014; Hulkoti and Taranath, 2014; Shaalan et al., 2016).

Metal iyonları mikroorganizmaların yüzeylerine bağlı fonksiyonel amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve tiyol grupları tarafından adsorbe edilir ve metal iyonlarının indirgendiği ilk evresi “hızlı”, metal iyonlarının hücre zarından sitoplazmaya taşındığı ve hücre içi birikimin gerçekleştiği ikinci evre ise “yavaş” olarak tanımlanmaktadır (Kalabegishvil et al., 2013). AuNP'lerin hücre içi sentezlenmesinin ardından serbest kalması ek bir adım gerektirdiği için hücre dışı sentezlenmesi büyük bir avantaj sağlamaktadır (Derakhshan et al., 2012). Hücre dışı sentezde, hücre tarafından fermentasyon ortamına salgılanan; proteinler, enzimler (kitinaz, amilaz, proteaz, lipaz, katalaz, nitrat redüktaz ve tirozinaz), amino asitler, peptitler, organik asitler, antimikrobiyal metabolitler, pigmentler gibi biyolojik bileşenlerin altın iyonlarını $Au^{+3} \rightarrow Au^0$ indirgemesiyle AuNP'ler oluşmaktadır. İndirgeme işleminde rol oynayan bu bileşenlerin aynı zamanda (içerdikleri fonksiyonel gruplar sayesinde) nanopartikül yüzeyini kaplaması sonucu daha kararlı yapıda ve iyi dağılım gösteren partiküllerin sentezi de söz konusudur (Golinska et al., 2014; El Batal and Tamie, 2015).

Tablo 2. 1 Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen AuNP ile ilgili çalışmalar

Mikroorganizma / Sentez	Şekil	Boyut (nm)	Kaynaklar
Hücre içi/dışı sentez			
<i>Candida albicans</i>	Küresel	5	Ahmad et al., 2013
<i>Aspergillus sydowii</i>	Küresel	10	Vala et al., 2015
Hücre duvarı			
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Oktahedral	>100	Beveridge and Murray, 1980
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM3589	Altıgen	15	Agnihotri et al., 2009
<i>Rhizopus oryzae</i>	Küresel	10	Das et al., 2009
<i>E. coli</i> K12	Nanoplate	50	Srivastava et al., 2013
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Küresel	>50	Varia et al., 2016
Hücre içi sentez			
<i>Lactobacillus</i> sp	Altıgen	20-50	Nair and Pradeep, 2002
<i>Rhodococcus</i> sp	Küresel	5-15	Ahmad et al., 2003a
<i>Shewanella algae</i>	Çok dağılımlı	10-20	Konishi et al., 2007
<i>Pichia jadinii</i>	Küresel	<100	Gericke and Pinches, 2006
<i>E. coli</i> DH5α	Küresel	25±8	Du et al., 2007
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Küresel	40	Nangia et al., 2009
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>viridis</i>	Çok dağılımlı	10-60	Binupriya et al., 2010
<i>Brevibacterium casei</i>	Küresel	10-50	Kalishwaralal et al., 2010
<i>Geobacillus</i> sp.	Altıgen	5-50	Correa-Llanten et al., 2013
<i>Acinetobacter</i> sp. SW30	Çok dağılımlı	20±10	Wadhwani et al., 2014
<i>Lactobacillus casei</i> sp. JCM1134	Altıgen	60	Kikuchi et al., 2016
<i>Trichoderma</i> sp.	Kübik	50-100	Saravanakumar et al., 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Küresel	20-25	Srinath et al., 2018
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> IFO 12388	Küresel	10-30	Liu et al., 2020
<i>Streptomyces viridogens</i> HM10	Küresel	18-20	Balagurunathan et al., 2011
<i>Streptomyces djkartensis</i> B-5	Çok dağılımlı	2-25	Biglari et al., 2014
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Küresel	15-30	Waghmare et al., 2014
Hücre dışı sentez			
<i>Fusarium oxysporum</i>	Küresel	20-40	Mukherjee et al., 2002
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>	Küresel	10-20	He et al., 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Küresel	15-30	Husseiny et al., 2007
<i>Bacillus licheniformis</i>	Kübik	10-100	Kalishwaralal et al., 2009
<i>Penicillium</i> sp.	Küresel	30-50	Du et al., 2011
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Çok dağılımlı	12	Fayaz et al., 2011
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Çok dağılımlı	10-60	Mishra et al., 2011
<i>Shewanella oneidensis</i>	Küresel	12±5	Suresh et al., 2011
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Küresel	50-70	Rajasree and Suman, 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Küresel	20	Apte et al., 2013
<i>Fusarium oxysporum</i>	Çok dağılımlı	22	Thakker et al., 2013

Mikroorganizma / Sentez	Şekil	Boyut (nm)	Kaynaklar
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Küresel	20	Magdi ve Bhushan, 2015
<i>Gordonia amarae</i>	Küresel	15-40	Bennur et al., 2016
<i>Cladosporium oxysporum</i>	Küresel	72±21	Bhargava et al., 2016
<i>Salmonella typhirium</i>	Küresel	45	Ghorbani et al., 2016
<i>Rhizopus oryzae</i>	Küresel	16-43	Kitching et al., 2016
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Küresel	53.8	Jafari et al., 2018
<i>Gordonia amicalis</i> HS-11	Küresel	5-25	Sowani et al., 2016
<i>Bhargavaea indica</i> DC1	F-Shape	106	Singh et al., 2016
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Küresel	10-15	Prema et al., 2016
<i>Aspergillus flavus</i>	Küresel	12	Abu-Tahon et al., 2020
<i>Cladosporium</i> sp.	Küresel	5-10	Munawer et al., 2020
<i>Acinetobacter</i> sp. GWRVA25	Küresel	15±10	Nadhe et al., 2020
<i>Penicillium janthinellum</i> DJP06	Küresel	1-40	Pareek et al., 2020
<i>Thermomonospora</i> sp	Küresel	30-60	Torres-Chavolla et al., 2010
<i>Thermomonospora</i> sp.	Küresel	8	Ahmad et al., 2003b
<i>Thermoactinomyces</i> spp. 44Th	Çok dağılımlı	5-60	Kalabegishvil et al., 2013
<i>Thermomonospora</i> spp. 67 Th	Çok dağılımlı	15-55	Kalabegishvil et al., 2013
<i>Mycobacterium</i> sp. BRS2A-AR2	Küresel	5-55	Camas et al., 2018
<i>Streptomyces</i> sp. ERI-3	Küresel/silindir	80-100	Zonooz et al., 2012
<i>Streptomyces cavouresis</i> KF974778	Küresel	50	Kumar et al., 2016
<i>Streptomyces</i> sp.	Küresel	10±14	Skladanowski et al., 2016
<i>Streptomyces griseoruber</i>	Çok dağılımlı	5-50	Ranjitha and Rai, 2017
<i>Streptomyces</i> sp. MBRC-82	Küresel	20-80	Manivasagan et al., 2015
<i>Streptomyces</i> sp.	Çok dağılımlı	10-100	Manivasagan and Oh., 2015
<i>Streptomyces fulvissimus</i> isolate U	Çok dağılımlı	20-100	Soltani et al., 2015
<i>Streptomyces cyaneus</i> Alex - SK121	Küresel	6-20	El-Batal and Tamie, 2015
<i>Streptomyces</i> sp. NK52	Çok dağılımlı	10-100	Prakash et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp LK-3	Çok dağılımlı	5-50	Karthik et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. VITDDK3	Çok dağılımlı	70-150	Gopal et al., 2013
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> strain BDUS 49	Çok dağılımlı	2-10	Sadhasivam et al., 2012
<i>Streptomyces griseus</i>	Küresel	50	Derakhshan et al., 2012

Gram pozitif bakteriler arasında yaygın bir grup olan aktinomisetler bugüne kadar genel olarak yeni sekonder metabolitlerin kaynağı olarak görülmekte başta antibiyotik, antitümör, immunsuppressor ve biyolojik açıdan aktif diğer moleküllerin taranmasında ve endüstriyel üretimlerinde kullanılmaktadırlar. Toprak, sediment ve denizel ortamlardan izole edilebilen, miselyal yapı gösteren, yüksek G+C içeriğine sahip ve günümüzde antibiyotik endüstrisinin temelini oluşturan bu organizmalar, aynı zamanda yüksek ticari değere sahip çok çeşitli hücre dışı enzimleri de üretme kabiliyetindedir (Ensign, 1992; Kumar et al., 2016). Aktinomisetlerin metal nanopartikül (Au, Ag) biyosentezinde de potansiyele sahip olduklarının keşfedilmesiyle, hem hücre içi hem hücre dışı sentezde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Altın tuzlarının aktinomisetler üzerinde toksik olmadığı, hatta partikül oluşumundan sonra da hücrelerin gelişmeye devam ettiği bildirilmektedir (Ahmad et al., 2003b; Kalabegishvil et al., 2013; Hulkoti and Taranath, 2014; Manivasagan et al., 2015).

Mikrobiyal sentez sürecinde inkübasyon koşullarının değiştirilerek farklı şekil ve boyutta AuNP'lerin sentezlendiği rapor edilen çok sayıda çalışma mevcuttur (**Tablo 2.1**). Sentezlenecek AuNP'lerin şekil ve boyut dağılımının kontrolü için inkübasyonu etkileyen parametrelerin optimizasyonu oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında da AuNP'lerin biyosentezinde etkili parametrelerin boyut-bağımlı optimizasyonu istatistiksel deney tasarımı ile gerçekleştirildi.

Mikrobiyal AuNP sentez sürecini etkileyen parametreler;

- pH
- Sıcaklık
- Maruz kalma/inkübasyon süresi
- Metal iyon (tuz) derişimi
- Biyokütle büyüme fazı ve besiyeri bileşenleri
- Enzimatik süreçler
- Mikroorganizmanın türü (Korbekandi et al., 2009; Narayanan and Sakthivel, 2010; Sadhasivam et al., 2012; Barabadi et al., 2014).

2.4 Geleneksel ve İstatistiksel Optimizasyon

Deneysel çalışmalarda sonuçları etkileyen her bir deneysel koşul “faktör, parametre veya bağımsız değişken” olarak adlandırılmakta, kontrol edilen ve kontrol edilemeyen olarak sınıflandırılmaktadır. Mikrobiyal üretimler besiyeri bileşenlerinin kompozisyonu, pH, sıcaklık, iyon dengesi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Nagata and Chu, 2003). Bu süreçlerin optimizasyonunda geleneksel (OVAT) ve istatistiksel (Deney tasarımı) olmak üzere iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemde süreç üzerinde etkili her bir faktörün süreç üzerindeki etkisinin incelenmesinde “Her seferinde bir değişkenin (one variable at a time-OVAT)” değiştirilmesi ve diğer faktörlerin sabit tutulması söz konusudur. Bu yöntem faktörlerin bireysel etkilerini ortaya koymasına rağmen birbirleriyle olan etkileşimleri ve tüm faktörlerin aynı anda süreç üzerindeki etkisi hakkında bilgi verememektedir. Bu nedenle geleneksel yöntem birden fazla faktörün etkili olduğu optimizasyon süreçlerinde, optimum noktaların belirlendiği tatmin edici düzeyde güvenilir bir modellemeye izin veremez. Yanı sıra önemli oranda zaman alan, çok sayıda deneme gerektiren ve dolayısıyla maliyetin de arttığı bir yöntemdir.

İstatistiksel yaklaşımlar (Deney tasarımı) 19. yüzyılın başlarında geliştirilen, aynı anda birden fazla faktörün değerlerinin sistematik şekilde değişimine ve sonuç/yanıt üzerindeki etkilerin yorumlanmasına izin veren, iki veya üç boyutlu analize imkan tanıyan, deney sayısını, süresini ve maliyetini azaltan, kaynakların verimli kullanılmasına, şans faktörünü içermeyen daha az deneme ile geniş kapsamlı ve güvenilir sonuçların elde edilmesine olanak sağlayan yöntemlerdir. Deneysel tasarımlar; tarama, optimizasyon ve modelleme aşamalarından oluşmaktadır (Montgomery, 2001; Carlet et al., 2004; Mandenius and Brundin, 2008; Wang and Wan, 2009; Kalishwaralal et al., 2010; Khuri and Mukhopadhyay, 2010).

2.4.1 Yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM)

Yanıt Yüzeyi Metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM) ilk kez 1951 yılında Box – Wilson tarafından tanımlanan ve biyoproses optimizasyonlarında sıklıkla kullanılan bir istatistiksel yöntemdir. Myers ve Montgomery (1995), Yanıt Yüzeyi Metodolojisini, “Proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem” olarak tanımlamıştır.

RSM süreci genellikle üç aşamadan oluşur:

- 1) Süreç üzerinde etkili faktörlerin belirlenmesi ardından istatistiksel olarak tasarlanan deneylerin gerçekleştirilmesi
- 2) Faktörlerin süreç üzerinde (yanıt/response) oluşturdukları etkilerin matematiksel bir modelde katsayıların tahmini
- 3) Optimizasyonun yanıtı tahmin etmesi ve modelin yeterliliğinin kontrol edilmesi

RSM, bir dizi kontrol edilebilir deneysel faktör ile elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Her bir faktörün süreç üzerindeki bireysel etkileri (daha baskın, daha duyarlı gibi), süreci etkileyen faktörlerin birbiriyle olan etkileşimleri ve bu etkileşimlerin sonuca olan etkisini ikinci dereceden polinomial veya üssel denklemler ile ortaya koyan etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde temel amaç uygun modelin elde edilmesi, ardından deneysel sonuçları etkileyen faktörlerin optimum seviyelerinin belirlenmesidir. Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD), Box–Behnken Tasarımı, Doehlert Tasarımı ve D–Optimal Tasarımlar istatistiksel optimizasyonda en yaygın kullanılan RSM tasarımlarıdır (Myers and Montgomery, 2009; Castillo, 2007; Salihu et al., 2011).

2.4.2 Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design - CCD)

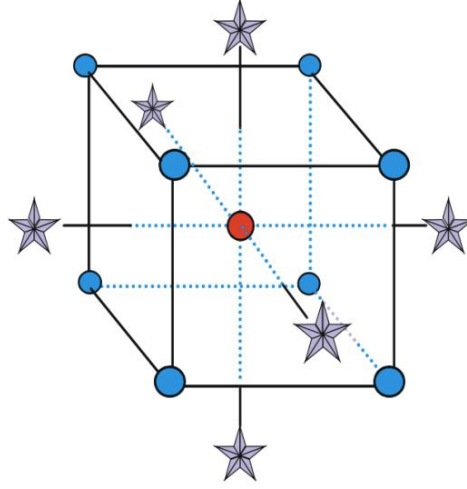
Box ve Wilson tarafından geliştirilen Merkezi Kompozit Tasarımı (CCD) RSM yöntemleri içerisinde ikinci dereceden polinom modeli oluşturmak amacıyla sıklıkla tercih edilen istatistiksel bir yöntemdir. Bu yöntem beş tasarım noktasını içermekte ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) (Şekil 2.2'de) ve lineer denklemler yerine ikinci dereceden denklemlerin kullanılmasıyla optimum noktaların belirlenmesini sağlamaktadır (Carlet et al., 2004; Khuri and Mukhopadhyay, 2010).

CCD tasarımının bileşenleri;

- Faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel tasarım noktaları; minimum -1 ve maksimum $+1$ seviyelerinin olası kombinlerinden oluşmaktadır
- Aksiyel/Star tasarım noktaları; ikinci dereceden terimlerin oluşturulması amacıyla faktör sayısına bağlı olarak değişen ve merkez noktasından tüm yönler $\pm\alpha$ kadar uzaklıkta noktalardır

- Merkez tasarım noktası; deneysel hatayı azaltmayı amaçlayan tekrarlanan deneyleri temsil etmektedir

Tasarımda önerilen deney sayısı $= 2^k + 2k + n_0$ eşitliği ile hesaplanmaktadır. Bu eşitlikte; k: bağımsız değişkenleri, n_0 : merkez noktasında tekrarlanan deney sayısını göstermektedir (Myers and Montgomery, 2009).



Şekil 2. 2 Üç faktörlü bir CCD tasarımının şematik görünümü (Bhattacharya, 2021)

CCD tasarımında faktörlerin etkilerini gösteren ikinci dereceden polinom modeli aşağıdaki gibidir:

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^k B_i X_i + \sum_{i=1}^k B_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} B_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Y= Yanıt

B_0 = Sabit

B_i = Lineer/Doğrusal katsayı

B_{ii} = Quadratic/Karesel katsayı

B_{ij} = İnteraktif katsayı

X_i = Kodlanmış faktör seviyesi

ε = Error/Hata

2.5 Altın Nanopartiküllerin (AuNP) Biyomedikal Alanda Uygulamaları

Günümüzde AuNP'ler sahip olduğu yenilikçi ve eşsiz fonksiyonel özellikleri sayesinde tıp alanında başta kanser olmak üzere pek çok hastalığın erken teşhis ve daha etkin tedavisinde, görüntüleme, ilaç ve gen taşıma sistemleri, biyosensör ve aşı uygulamalarında kullanılmakta ve araştırılmaktadır.

Altın nanopartiküllerin;

- Optik özelliğinin - Yüzey plazmon rezonansının (Surface Plasmon Resonance, SPR) ayarlanabilirliği
- Yüzeylerine bağlanabilen farklı fonksiyonel gruplar ile modifikasyonlarının kolaylığı
- Kimyasal maddelere karşı yüksek dirençleri, inert ve kararlı yapıları
- Küçük parçacık boyutu nedeniyle geniş yüzey-hacim oranına sahip olmaları
- İstenilen boyut ve şekillerde sentezlenebilmeleri
- Biyouyumlu olmaları
- Yüksek dozda bile düşük toksisiteye sahip olmaları ve
- Karsinojenik olmamaları

medikal alanda tercih edilmelerinin başlıca nedenleridir (Ghosh et al., 2008; Das et al., 2009; Llevot and Astruc, 2012; Xu et al., 2012; Ahmad et al., 2013; Cormode et al., 2013; Zhao et al., 2014; Singh et al., 2019).

Kanser tedavisinde uygulanan cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yöntemlere alternatif oluşturan nanoteknoloji uygulamalarında kanserle mücadelede moleküler görüntüleme, moleküler tanı, hedefe yönelik tedaviyi içeren uygulamalarda AuNP'ler tercih edilmektedir. AuNP'ler tarafından ışığın ısıya verimli şekilde dönüştürülebilmesi sayesinde Fototermal ablasyon/Fotodinamik terapi ile hastalıklı veya enfekte dokuların oldukça spesifik termal ablasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Lazer ışınlaması altında, altın nanoçubuklar, nanoküreler, nanokabuklar ve nanokafesler tümör tedavisinde kullanıldığında kanser hücrelerinin apoptozu rapor edilmektedir (Zharov et al., 2006; Chen et al., 2007; Gannon et al., 2008; Lu et al., 2009).

AuNP'ler sahip oldukları SPR özelliği sayesinde görüntüleme uygulamalarında takip edilebilir, karasız ilaçları veya zayıf çözünür görüntüleme kontrast maddelerini koruyabilir ve vücudun hücre ve dokularına verimli bir şekilde iletilmesini kolaylaştırabilmektedir (Nehl et al., 2006; Kumar et al., 2007; Murphy et al., 2008; Zhang et al., 2009). Yanı sıra X-Işını radyasyonu emme yeteneğinde olduklarından, kanser radyasyon tedavisinin geliştirilmesinde ve/veya tanısal CT (Bilgisayarlı tomografi) taramalarında görüntüleme kontrastını artırmak amacıyla da kullanılmaktadırlar (Dreaden et al., 2012).

AuNP'lerin yüksek bağlanma kapasiteleri sayesinde çeşitli gruplar ile fonksiyonelleştirilmesi yapılabilir. Örneğin proteinler ile güçlü etkileşimlerinin sonucu olarak spesifik bir antikor ile yüzeyi kaplanan partiküllerin hücre yüzeyindeki antijenlerin tespiti veya hastalık teşhisi için prob olarak kullanımı, antikorlar ile etiketlenmiş AuNP'lerin belirli hücreleri işaretlemek için immünogold etiketleme çalışmaları, hastalıkların tespitinde altın nanoprobolar (DNA) (Park et al., 2002), kanserli hücrelerin tespit edilmesinde (Huang, 2006; Mukherjee et al., 2007), immüno assaylerde floresan bazlı immünokimya çalışmalarındaki *in vitro* ve *in vivo* tanı ve görüntüleme çalışmaları sayılabilir (Faulk and Taylor, 1979; Ghosh et al., 2008; Triulzi et al., 2008). AuNP'ler diğer küçük moleküllere göre daha küçük olduklarından çok daha farklı ve çok daha hızlı mekanizmalarla hücrelerle etkileşime girerler. Hedef bölgeye gen, biyolojik veya farmakolojik moleküllerin taşınması/dağıtımı, ilaç salım sistemleri ve hücre tiplerinin hedeflenmesinde ideal adaylardır (Salata, 2004; El-Sayed et al., 2005; Huang, 2006; Mukherjee et al., 2007; Patra, 2007; Wijaya et al., 2009). En önemli özellikleri ise belirli bir hasta veya hastalık için ihtiyaca göre fonksiyonelleştirilen AuNP'ler eş zamanlı hedefleme, teşhis ve terapötik etkiye izin verecek şekilde tek bir yapıda birleştirilebilir (Dreaden et al., 2012). Nanopartiküllerin kan ve lenfoid organlarda hem immünostimülatör hem de immünsupresif etkilere sahip olabildiği gösterilmiştir (Pantic et al., 2011).

Nanoteknoloji uygulamalarının aşı sistemlerinde kullanımı birçok alanı dönüştürmekte ve etkili aşılar geliştirmek için önceki kısıtlara alternatif yeni bilgiler sağlamaktadır. AuNP'ler hücresel bileşenlere benzer boyutlarından dolayı biyofiziksel ve biyokimyasal modları taklit edebilmesi sayesinde antijenin antijen sunan hücreler tarafından hedeflenmesini sağlayan aşı taşıma sistemleri veya adjuvanlar olarak doğal bağışıklığın aktivasyonunu arttıran ve minimal toksisiteye karşı güçlü bağışıklık tepkisi oluşturan yeni fırsatlar sunmaktadır (Shen et al., 2018; Falahati et al., 2019).

2.6 Aşılama ve Aşı Çeşitleri

Modern tıp tarihindeki en başarılı halk sağlığı müdahalelerinden biri olan aşılar, dünya çapında bulaşıcı hastalıkların önlenmesine karşı en etkili strateji olmaya devam etmektedir. İlk defa Edward Jenner (1796) tarafından çiçek aşısının bulunmasından itibaren difteri, tetanoz ve kızamık gibi çeşitli hastalıkların önlenmesinde iki yüzyılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Aşıların geliştirilmesiyle dünya çapında çiçek hastalığı yok edilmiş, çocuk felci ve difteri gibi ölümcül bulaşıcı hastalıkların ise neredeyse ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Aşılar, hem profilaktik hem de terapötik kullanımları ile enfeksiyonlar, kanser ve diğer hastalıkların tedavisi için büyük bir potansiyele sahiptir (Mutwiri et al., 2007; Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

Aşılanmanın altında yatan temel ilke, bireyin belirli bir patojene karşı spesifik olarak korunması, güçlü ve uzun süreli immün yanıt oluşturmaktır. Aşılar, bağışıklık tepkisini başlatır, antijen sunan hücreleri (APC'ler) aktive eder ve böylece antijene karşı koruyucu bir adaptif (kazanılmış) bağışıklık oluşturulur (Pasquale et al., 2015). Aşılama ile elde edilen bağışık yanıtın etkinliği; i) antijene, ii) formülasyonda bulunan adjuvan veya taşıyıcıya, iii) primer ve sekonder bağışıklama zamanlarına, iv) uygulama yolu ve dozuna ve v) bağışıklanan bireyin immün durumuna bağlıdır (Newman et al., 1995). Antijenin, etkili bir şekilde APC'ler tarafından alınması, işlenmesi, ardından güçlü T hücresi tepkilerini indükleyebilmesi aşı tasarımı hedeflenen en önemli unsurdur. Dendritik hücreler ve makrofajlar kazanılmış immün yanıtları başlatan ve kontrol eden böylece bağışıklık veya tolerans ile sonuçlanan immün yanıtın oluşmasında önemli rolü olan farklı işlevlere sahip ana APC'lerdir. (Cruz et al., 2012; Niikura et al., 2013; Zhao et al., 2014; Boraschi and Italiani, 2015).

Günümüzde mevcut aşı çeşitleri;

- Canlı zayıflatılmış aşılar (atenüye aşılar)
- İnaktif aşılar
- Toksoid aşılar
- Alt birim/subunit (rekombinant DNA teknolojisi, konjuge aşılar, polisakkaritler, proteinler ve peptitler) aşılardır (Dai et al., 2019).

Geleneksel aşılar, sadece gerekli koruyucu antijenleri sağlamakla kalmayıp aynı zamanda konakçının immün yanıtını arttıran patojenik bileşenleri de içermektedir. Mikroorganizmanın hastalık oluşturmayacak şekilde zayıflatıldığı (atenüye aşı) ancak çoğalma yeteneğinin hala devam ettiği zayıflatılmış canlı aşılar, genellikle doğal enfeksiyonun oluşturduğuna en yakın şekilde immün sistemi uyarır, güçlü ve uzun süreli bir immün yanıt oluşturur. Bu nedenle adjuvan kullanımı gerektirmez ve genellikle tez doz uygulamaları yeterlidir. Ancak immün bağışıklığı baskılanmış bireylerde hastalığa ya da ciddi semptomlara neden olabilir. Yaygın olarak kullanılan diğer bir aşı çeşidi ise ısı veya kimyasal işlemler ile etkisiz hale getirilen patojenin tam hücre olarak kullanıldığı inaktif aşılardır. Mikroorganizmanın çoğalma yeteneği yok edilmiş olmasına rağmen immün sistem tarafından fark edilecek bileşenleri bulunmaktadır. İnaktif aşılar uzun bir güvenlik geçmişine sahiptir. Canlı aşılar göre daha zayıf immünojen özellikte olduklarından belirli aralıklarda birkaç doz tekrarlanmaları ve etkinliklerini artırmak için adjuvan ile birlikte kullanılmaları gerekmektedir. Yeterince zayıflatılmış ve humoral (salgısal) bağışıklık tepkisini uyarabilen toksinler (endotoksinler ve ekzotoksinler) ile hazırlanan toksoid aşılar da mevcut aşı türleri arasındadır. Toksinler enfeksiyona ait semptomların çoğunu oluşturur ancak uzun süreli bir koruyuculuk sağlanması için adjuvanlar ile birlikte kullanılması ve aşılamanın periyodik olarak tekrarlanması gerekmektedir. Subunit aşılar da ise mikroorganizmanın belirli bileşenleri saflaştırılarak immünojen olarak kullanılır. Bağışıklık sistemi zayıf bireyler dahil olmak üzere ihtiyaç duyan herkese uygulanabilmektedir (Mutwiri et al., 2007; Dai et al., 2019).

Zayıflatılmış canlı aşılar, inaktif aşılar ve toksoid aşılar enfeksiyonlara karşı başarılı olmasına rağmen canlı ya da ölü mikroorganizma ve/veya mikroorganizmaya ait bileşenleri içermesi nedeniyle istenmeyen ve hatta toksik yan etkilere neden olabilmektedir. Son yıllarda araştırmalar sadece gerekli protein veya peptit antijenlerini kullanmaya odaklanmıştır. Patojenlerden spesifik olarak saflaştırılan moleküller veya rekombinant üretilen proteinler ile hazırlanan subunit aşılar, canlı veya inaktif aşılar kıyasla mikroorganizma ilişkili riskleri önleyebilir nitelikte olduğundan daha güvenlidir ancak daha az immünojen etkileri olduğundan enfeksiyonlara karşı uzun süreli koruma sağlamak için güçlendirilmelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Mutwiri et al., 2007; Dai et al., 2019).

Antijenlerin saflaştırılarak bağışıklık sistemine sunulması aşı ile ilgili komplikasyonları büyük ölçüde azaltmasına rağmen saflaştırılan antijenler doğal konformasyonunu kaybetmekte, tek başına daha hassas hale gelmekte ve yeterli immün yanıt oluşturmamaya zayıf immünojen özellik göstermektedir. Biyosentetik, kimyasal ve rekombinant DNA teknikleri ile günümüzde üretilen aşılar da kullanılan antijenlerin çoğu immün sistemi uyaramamaktadır. Bağışıklık sisteminin etkin ve yeterli uyarılmaması sonucu uzun süreli ve etkin bağışıklanma gerçekleşmemektedir. Bu tepkileri artırmak üzere güçlü immünojen özelliğe sahip adjuvanların ve yeni antijen taşıma sistemlerinin tasarlanmasına ve geliştirilmesine artan şekilde gereksinim vardır (Smith et al., 2015; Chauhan et al., 2017; Shen et al., 2018). İmmün tepkinin oluşması için eksojen antijenin APC'ler tarafından yutulması (fagositoz, endositoz), ardından işlenmesi ve büyük dokuyuymuluk kompleksi (MHC, majör histocompatibilty complex) moleküllerine bağlı olarak yüzeylerinde sunulması gerekmektedir. Bu işlem, T lenfositlerinin aktivasyonunu ve aşılama koruyucu bağışıklığın temeli olan belleğin (hafıza) üretimi ile kazanılmış bağışıklığın başlatılmasını indükler. APC'nin antijen alımı ve sunumu etkin kazanılmış bağışıklık için kritiktir (Xu et al., 2012). Dendritik hücreler ve makrofajlar koruyucu bağışıklığın başlatılmasında yer alan başlıca APC'lerdir.

2.7 Aşı Adjuvanları ve Etki Mekanizmaları

Adjuvan Latince “Adjuvare” yani yardımcı olan, güçlendiren, çoğaltan, artıran sözcüklerinden gelmektedir. Antijenin, hümmoral ve/veya hüccresel immün yanıtını artırmak amacıyla aşılara eklenen veya antijen taşıma sistemleri olarak kullanılan maddelerdir (Ramon, 1924; Pasquale et al., 2015). Adjuvan etki ilk kez 1916 yılında Le Moignac ve Pinoy tarafından mineral yağ içerisinde *Salmonella typhimurium* süspansiyonu kullanılarak gösterildi. İkinci önemli adım ise 1926 yılında Glenney ve arkadaşlarının alüminyum tuzları (alum) ile çöktürölmüş difteri toksoidinin, toksoid çözeltisine göre immün yanıt oluşturmakta çok daha etkili olduğunu gösterdiği çalışmalarıdır. Böylece alüminyum preparatlarının adjuvan olarak geliştirilmesinin yanı sıra antikor oluşturan pek çok madde ve formölasyon da incelenerek yeni adjuvanların araştırılmasına başlandı. **Tablo 2.2'**de genel olarak kullanılan adjuvan örnekleri sunulmaktadır.

Adjuvanlar, makrofajlar ve dendritik hücreler olan APC'lere doğrudan veya dolaylı olarak etki ederler. Adjuvanların seçimi aşının immünojenitesini artırma potansiyeline,

kullanılan antijen tipine, aşı alıcısının türüne ve uygulama yoluna bağı olarak değışmektedir. Adjuvanlar konakçada immün yanıt oluşturmak için tek ya da çoklu etki mekanizmaları sergileyebilirler (Awate et al., 2013; Ghimire, 2015; Chauhan et al., 2017).



Tablo 2. 2 Adjuvan çeşitleri (Yurdakök ve İnce, 2008)

Adjuvan Tipi	Adjuvan	Örnekleri
Mineral tuzları	Alüminyum hidroksit Alüminyum fosfat Kalsiyum fosfat	Alhydrogel™, Rehydralgel®, Adju-Phos™, Rehydraphos™, Calcium Phosphate Adjuvant
Mikroorganizma kaynaklı	Muramil dipeptid (MDP) analogları Lipopolisakkaritler (LPS) Bakteriyel ekzotoksinler Endotoksin Bakteriyel DNA Flagellin	Murabutide, Threonly-MDP, Kolera toksini (CT)™ <i>E. coli</i> heat labil toksin (LT), Monofosforil lipid-A (MPL®), CpG oligonükleotidleri Flagellin komponentleri FljB
Partiküller	Biyoparçalanır polimer mikropartiküller İmmünostimülatör kompleksler Lipozom, virozom, proteozomlar	Polilaktid co-glikolid partikül (PLG) ISCOMATRIX®
Emülsiyonlar	Freund's adjuvanı (incomplete ve complete) Metabolize edilebilir emülsiyonlar	Montanide® ISA 51 MF59, AS03, SAF, Montanide® ISA 720
Saponinler	Tensoaktif bileşikler Non-iyonik blok kopolimerler Polifosfazen	QS-21, Quil A, Rb1 L121 PCPP
Sentetik	LPS-temelli sentetik bileşikler İmidazokuinolin benzeri moleküller Sentetik polinükleotidler	RC259 E5564, İmiquimode, Resiquimode
Sitokinler	İnterferon (IFN-γ, IFN-α) İnterlökin (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, GM-CSF)	Poly A:U, Poly I:C
Genetik	Sitokin genleri Kostimülatör molekül genleri	IL-12, IL-2, IFN-γ, CD40L

Adjuvanların başlıca dört etki mekanizması bulunmaktadır.

Depo Etkisi: Adjuvanların bilinen en eski ve en yaygın mekanizmalarından biridir. Uygulama bölgesinde tutulan (depo edilen) antijenlerin yavaş salınmasıyla bağışıklık sisteminin sürekli uyarılması ve antikor üretiminin artışı sağlayan mekanizmadır. Alum, MF59 ve IFA depo etkisi ile çalışan adjuvanlardır.

Model Tanıma Reseptör (PRR, Patern Recognition Receptors) Moleküllerin Aktivasyonu: Doğal bağışıklığın bir parçası olan PRR'ler, “patojene özgü moleküler modelleri (PAMPS)” tanıyabilmekte ve doğal immüniteyi uyararak kazanılmış bağışıklık tepkisinin oluşmasını sağlamaktadır. TLR ve nükleotid oligomerizasyon bölgesi (NOD) benzeri reseptörler en önemli PRR'lerdir.

İnflamazom Aktivasyonu: Partikül adjuvanlar uygulama bölgesinde lokal doku hasarına ve hücre ölümüne neden olur. Bu hasar sinyalleri doğal immünitenin aktivasyonunu tetikler ve ardından kazanılmış bağışıklık uyarılır. Birçok adjuvan uygulama bölgesinde pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı indüklemektedir. Alum, inflamazom aktivasyonu ile etkili olan bir adjuvandır.

Büyük Doku Uygunluk Kompleksi Sunumu (MHC, Major Histocompatibility Complex): MHC molekülleri, APC'ler üzerinde bulunan membran proteinleridir. APC'ler tarafından hücre içine alınan antijen MHC molekülleri üzerinde T hücrelerine sunulur. MHC molekülleri üzerindeki antijen, spesifik T hücre reseptörüne (TCR) bağlanarak aktive olur ve aktivasyon sonrası çeşitli sitokinler salınır. MF59 ve IFA MHC sunumu ile etkili olan adjuvanlardır.

Başarılı bir adjuvanın taşıması gereken özellikler;

- Toksik ve karsinojen olmamalı
- Lokal veya sistemik reaksiyonlara sebep olmamalı
- Safılaştırılan antijenlerin dayanıklılığını ve immünojenitesini artırmalı
- Antijene özgü kısa sürede, daha güçlü ve uzun süreli immün yanıt oluşturmali

- Bağışıklık tepkisini ve hızını arttırması sonucunda, aşı dozlarında bulunması gereken antijen miktarını ve aşılama sayısını azaltmalı
- Azaltılan aşılama sayısı ve doz ile maliyeti düşürülmeli böylece ekonomik katkı sağlamalı
- Yeni doğan, yaşlı, immün yetmezliği olan kişilerde aşının etkinliğini arttırmalı
- Antijenlerin mukoza tarafından alınımını güçlendirmeli (mukozal immüniteyi uyarmalı)
- Hücresele ve/veya humoral immüniteyi uyarmalı
- Kombine aşılar da antijen kompetisyonunun (yarışmasının) önlenmesine yardımcı olmalı

şeklinde sayılmaktadır (O'Hagan et al., 2000; Singh et al., 2002; Pasquale et al., 2015; Chauhan et al., 2017).

Aşı adjuvanları üzerinde çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen hayvan aşılarında kullanım için lisanslı çok sayıda adjuvan varken insan aşılarında en yaygın kullanıma sahip onaylı adjuvan alüminyum hidroksit tuzlarının jeli olan alumdur. Bunun yanında az sayıda aşı formülasyonlarının içinde bulunan diğer adjuvanların onayı ise ürün ile birlikte verilmektedir. Lisanslı aşıların içerdikleri adjuvanlar **Tablo 2.3**'de sunulmaktadır (Yurdakök ve İnce, 2008). Alüminyum tuzları içeren süspansiyonlar ve mikobakteri içeren ve/veya içermeyen mineral yağ emülsiyonları 1920'lerden beri kullanılmakta olan konvansiyonel adjuvanlardır. Halihazırda alum, MPL monofosforil lipit A ve su içinde yağ emülsiyonu MF59 klinik uygulamalarda kullanılan lisanslı aşı adjuvanlarıdır (Eickhoff and Myers, 2002; Boraschi and Italiani, 2015). Alum dışında 1990'ların ortasında aşı sistemlerinde ilk kullanılan lisanslı diğer bir adjuvan hepatit A aşısında kullanılan virozom (küresel fosfolipid katmanları) sistemlerdir (Boraschi and Italiani, 2015; Pasquale et al., 2015). Alum, aşı antijenlerine karşı humoral bağışıklık tepkilerini (IgG1 antikor) etkin şekilde artırabilen bir adjuvan olmasına rağmen (bağışıklık yanıtı Th2 tipi) hücresele bağışıklık tepkilerini (Th1 tipi immün yanıtı) nadiren oluşturabilmekte veya indükleyememekte sonuç olarak uzun süreli bağışıklık sağlayamamaktadır. Alum kullanımı çeşitli aşı uygulamalarında yetersiz kalmasına rağmen klinik olarak onaylanmış olması, aşı formülasyonlarına dahil edilme kolaylığı ve nispeten düşük maliyetli olması

sebebiyle baskın olarak kullanımı devam etmektedir. Lisanslı formülasyonlarda alüminyum hidroksit esaslı alhidrogel ve alüminyum hidroksifosfat bazlı adju-phos adjuvanları en yaygın kullanılanlardır. Freund's adjuvanı ise son derece güçlü aktiviteye sahip olmasına rağmen ciddi lokal reaksiyonları indüklediğinden insanlar için kullanılmamaktadır (HogenEsch, 2002; Lindblad, 2004; Wang et al., 2008; Zhao et al., 2014; Kumar et al., 2015; Madera et al., 2016; Mold et al, 2016).

İmmün sistemi uyarıcı adjuvanların bazıları da mikrobiyal bileşenlerdir. Çok sayıda çalışmada patojenlerden elde edilen korunmuş bazı moleküller spesifik olarak konakçı reseptörlerine bağlanır, oluşturulan formülasyonlar doğal bağışıklık tepkilerini uyarır ve kazanılmış bağışıklığı geliştirdiği bildirilmektedir. Mikrobiyal lipopolisakkarit (LPS), Tamamlanmış Freund's Adjuvanı (CFA) mikobakteriyel bileşen, tek sarmallı RNA, sentetik Oligodeoksinükleotit (ODN) ve metillenmemiş CpG motiflerini içeren bakteriyel DNA içerikleri de aşı adjuvanları olarak kullanılmaktadır (Merritt and Johnson, 1965; Davis et al., 1998; Singh and O'Hagan, 2002).

Polarize Th1 tipi bağışıklık yanıtı, antijene CFA veya CpG DNA eklenmesiyle oluşturulurken; Th2 antikor tepkileri alum veya eksik Friends adjuvanı (IFA) tarafından indüklenebilmektedir (Yip et al., 1999; Cribbs et al., 2003). Bu nedenle bazı adjuvanların kombinasyonları kullanılarak Th1 ve Th2 yanıtlarını aynı anda oluşturmak mümkündür.

Tüm bu bahsedilenlerden yola çıkarak etkili bir aşı formülasyonunun tasarlanmasında hümmoral ve hüccresel immün tepkileri bir arada indükleyebilen, uzun süreli koruyucu bağışıklık oluşturabilen aynı zamanda yan etkisi az, hem güvenli ve etkin yeni/alternatif adjuvanların araştırılmasına hem de antijen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine her zaman ihtiyaç vardır.

Tablo 2. 3 Lisanslı aşı adjuvanları (Gül ve Yurdakök Dikmen, 2019)

Aşı	Ticari Adı - Firma	Adjuvan
Difteri ve tetanoz aşısı (DT)	Difteri ve adsorbe tetanoz toksoidi USP - Sanofi Pasteur	Alüminyum potasyum fosfat
DT aselüler boğmaca (DBaT)	Tripedia - Sanofi Pasteur	Alüminyum potasyum fosfat
Hemofilus influenza tip B (HIB)	Pedvax HIB - Merck	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
DBaT + HIB	TriHibit - Sanofi Pasteur	Alüminyum potasyum fosfat
Hepatit B	Recombivax HB - Merck	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit B	Engerix-B - GSK	Alüminyum hidroksit
Hepatit B + HIB	Comvax - Merck	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit A	Havrix - GSK	Alüminyum hidroksit
Hepatit A	Epaxal - Crucell	Virozom
Hepatit A + Hepatit B	Twinrix - GSK	Alüminyum hidroksit/fosfat
Konjuge pnömokok aşısı	Prevnar - Wyeth	Alüminyum fosfat
İnfluenza aşısı	Fluad - Wyeth	MF59
İnfluenza aşısı	Inflexal V - Crucell	Virozom
Human Papilloma Virus (HPV) aşısı	Gardasil - Merck	Alüminyum hidroksifosfat sülfat
Hepatit B	Fendrix - GSK	ASO4 (MPL + Alüminyum tuzu)
Hepatit B	Supervax – Dynavax Europe	RC529

2.8 Nanoteknoloji ve Aşı Uygulamaları

Biyoteknoloji ve malzeme bilimlerinin hızlı gelişmesiyle, nanomalzemeler aşı formülasyonlarında da önemli oranda rol oynamaya başladı. “Nanotaşıma/Nanovaccinology” profilaktik ve terapötik aşıların geliştirilmesine yönelik giderek büyüyen bir alandır. Nanomalzemeler, aşı/antijen taşıma sistemleri ve adjuvanlar olarak hücrel ve humoral bağışıklığın etkin şekilde uyarılması için tasarlanmaktadır (Zaman et al., 2013; Kumar et al., 2015).

Nanopartiküller, nispeten biyolojik olarak bozunabilir olmaları, biyouyumlu yapıları ve minimal toksisite gibi sahip oldukları özellikleri nedeniyle aşı çalışmalarında yoğun ilgi görmektedir. Farklı kimyasal bileşime, şekil ve boyuta sahip çeşitli nanopartiküller yüzey modifikasyonunun tasarlanmasına, spesifik olarak hücrel hedefleme, tatmin edici farmakokinetik etki gibi sunduğu olanaklar sayesinde geleneksel aşı formülasyonlarına karşı güvenli ve etkili alternatifler olarak geliştirilmektedir (Boraschi and Italiani, 2015; Hofmann et al., 2015).

Aşı çalışmalarında güçlü immün tepkilerin aktivasyonu ve antijenin APC'lere verimli şekilde iletilmesi en önemli konudur. Etkin bir aşı, immün sistemi indükleyecek bir antijeni ve aynı zamanda antijenin APC'lere hedeflenmesini sağlayan etkin bir taşıma sistemine sahip olmalıdır. Nanopartiküller, hem antijen stabilitesini ve immünojenitesini artıracak adjuvanlar hem de antijen alınması, işlenmesi ve sunulması için gerekli etkin taşıma sistemleri ve moleküllerin spesifik olarak hücre içi hedeflenmesine olanak sağlayan şekilde tasarlanabilmektedir. Nanopartiküllerin, taşıma sistemlerinde kullanımı ve depot etkisi bilinmekte, yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin hücreler tarafından alınması APC'lerin aktivasyonu, sitokin ve kemokin salınımının indüksiyonu olmak üzere bağışıklık tepkilerini uyardığı bildirilmektedir (Boraschi and Italiani, 2015; Marques Neto et al., 2017; Shen et al., 2018).

Geleneksel aşılarla kıyasla nanopartikül temelli aşı sistemlerinin sağladığı avantajlar;

- Nanopartiküller ile antijen ve/veya immünohistimülasyon ajanlarının birlikte verilmesi aşıların immünojenitesini artırır

- Antijenlerin sitozolik taşınması için tasarlanmış partiküller, antijenin çapraz sunumu ve MHC-II sunumu artırır, böylece sitotoksik T lenfosit hücrelerini uyarmış ve yanıtlarını teşvik etmiş olur
- Nanopartiküller, APC'ler tarafından kolayca fagosit edilebilir ve işlenebilirler
- Partiküllerin yüzeyleri üzerinde antijenlerin çok değerlikli sunumu arttırılmış hümmoral immun yanıt için B hücresi reseptörlerine çapraz bağlanma için izin verir
- Nanopartiküllerin, fonksiyonel moleküller ve/veya hedefleme ligandları ile yüzey modifikasyonlarının yapılabilmesi, lenfoid organlara ve APC'lere özgü hedefleme sistemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlar
- Adjuvan dozunu azaltma imkânı sağlar
- Raf ömrünü uzatır ve termal stabilite sağlar

(Hubbel et al., 2009; Xu et al., 2012; Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).

2.8.1 Nanopartikül ve Biyosistem/APC Etkileşimleri

Aşı tasarımımda hedeflenen APC'ler, kazanılmış bağışıklık yanıtlarını başlatan ve kontrol eden böylece immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynayan Dendritik hücreler (DC) ve makrofajlardır. Dendritik hücreler, hümmoral tepkileri indüklemenin yanı sıra eksojen antijenleri CD+8 T hücrelerine sunabilmekte ve böylece virüs enfekte veya tümör hücrelerinin temizlenmesinden sorumlu hüccresel immün yanıtın indüklenmesini de sağlamaktadırlar (Cruz et al., 2012; Niikura et al., 2013).

Nanopartiküllerin biyolojik sistemler ile etkileşimlerini; boyutları, yüzey yükü, hidrofobik-hidrofilik özellikleri dahil fizikokimyasal özellikleri, yüzey modifikasyonları, plazma proteinleri ve hücre yüzeyi reseptörleri gibi parametreler belirlemektedir (Bachmann and Jennings, 2010; Zhao et al., 2014). Nanopartiküller, boyut bakımından hüccresel bileşenlere gösterdiği benzerlik nedeniyle, hüccresel endositoz mekanizmasını (özellikle pinositoz ile) kullanarak canlı hücrelere girebilirler. Partikül temelli aşılar, genel olarak APC'ler tarafından kolaylıkla tanınmakta ve etkin bir şekilde alınmaktadır (Zhao et al., 2014). Bağışıklık sistemi hücrelerinin bulunduğu (özellikle B ve T hücreleri) lenf düğümü, aşılamada hedeflenen en önemli organlardan biridir. Nanopartiküllerin boyutu, lenfatik kılcal damarlara girişi, lenf düğümlerindeki dağılımı ve tutulmayı belirleyen en

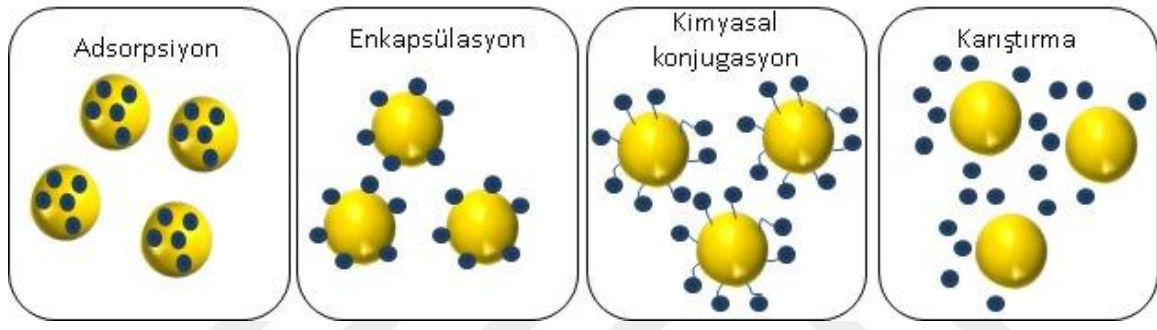
kritik parametredir 10-100 nm boyut aralığına sahip nanopartiküller hücre dışı matrise kolayca nüfuz edebilir ve APC'ler tarafından alınarak lenf düğümlerine gidebilirler. 10 nm'den küçük partiküller ise kılcal kan damarlarının içerisine girebilirken; 100 nm'den büyük boyutlu partiküller ise uygulama noktasında kalır ve orada bulunan APC'ler tarafından alınırlar (Cruz et al., 2012; Zhao et al., 2014). APC'ler ve nanopartiküller arasındaki etkileşimin diğer bir önemli parametresi de yüzey yüküdür. Hidrofilik olanlara kıyasla hidrofobik partiküllerin daha güçlü bir immün yanıt oluşturduğu bilinmektedir. Partiküllerin APC'ler tarafından alınımının büyük ölçüde bağlı olduğu diğer bir parametre ise nanopartikül-APC arayüzünün şeklidir. İğne şekilli polimer nanopartiküllerin hücre zarında geçici permeabilizasyonu teşvik ettiği bildirilmektedir (Shen et al., 2018).

2.8.2 Nanopartikül ve Antijen Etkileşimleri

Etkin bir taşıma sistemi için; antijeni yoğunlaştırmalı ve degradasyona karşı korumalıdır. Dendritik hücreler tarafından verimli alımı gerçekleşmeli ve sitokin üretimini teşvik ederek güçlü bir immün yanıt oluşturacak özellikte olmalıdır. Nanopartiküller antijen degradasyonunu ve alınımını iyileştirmesinin yanında antijenin APC'lere hedeflenerek verilmesini sağlayarak antijen alınımının artırılmasını ve antijenlerin yavaş ve kontrollü salınımını da sağlamaktadırlar. Nanopartikül ve antijen içeren aşı formülasyonlarında, nanopartiküller bağışıklık sisteminin hücrelerine antijen verebilir, yani antijen ile nanopartikül bağışıklık hücresi tarafından birlikte alınır ve hücre içinde serbest bırakılır veya nanopartiküller geçici bir taşıma sistemi olarak işlev görür, antijeni korur ve daha sonra hedef konumda salınmasını sağlar (Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).

Nanopartiküllerin taşıma sistemi veya adjuvan olarak işlev görmesi için antijen ile nanopartikülün birleştirilmesi gerekmektedir. Bu işlem, *i.* basit fiziksel adsorpsiyon, *ii.* kimyasal konjugasyon, *iii.* kapsülleme gibi yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (**Şekil 2.3**). Antijenin nanopartikül üzerine adsorpsiyonu genellikle yük veya hidrofobik etkileşimlere dayalı yapılmaktadır. Silika, altın, kalsiyum fosfat gibi sert yapılı nanopartiküllerin bu şekilde antijen ile bağlanması sağlanır ancak nanopartikül ve antijen arasındaki etkileşim nispeten zayıf olacağından antijen ve nanopartikülün *in vivo* da ayrışabileceği göz ardı edilmemelidir. Kimyasal konjugasyonda antijenler, nanopartiküllerin yüzeyine kimyasal çapraz bağlarla bağlanır, hücre tarafından nanopartikül ile birlikte alınır. Kapsülleme yönteminde ise nanopartikül sentezi sırasında antijen ile nanopartikül öncülleri karıştırılır

ve nanopartiküller oluşurken antijenlerin bu şekilde kapsüllenmesi sağlanmış olur. Hücre tarafından alınan yapıdaki antijenler ise sadece nanopartiküllerin ayrışmasıyla serbest bırakılmaktadırlar. Bu nedenle kimyasal konjugasyon veya kapsülleme yöntemlerinde nanopartikül ve antijen arasında daha güçlü etkileşim sağlanmaktadır. Soft materyallerden oluşan nanopartikül taşıma sistemlerinde (virüs benzeri partiküller-VLPs, immün sistemi uyarıcı kompleksler- ISCOM, ISCOMATRIX, lipozom gibi) kimyasal konjugasyon yoluyla antijen ve nanopartikülün bağlanması tercih edilirken; sert materyallerden oluşan (silika, altın, kalsiyum, fosfat gibi) nanopartikül taşıma sistemlerinde ise basit fiziksel adsorpsiyon ile antijen ve nanopartikülün bağlanması sağlanmaktadır (Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).



Şekil 2. 3 Nanopartikül ve antijenin bağlanma yöntemlerinin şematik gösterimi

2.9 Aşı Uygulamalarında Kullanılan Nanopartiküller

Son yıllarda aşı adjuvanlarının standardizasyonu ve yeni adjuvanların geliştirilmesine verilen önem giderek artmaktadır. Biyolojik güvenlikleri göz önüne alınarak, antijenlerin taşınmasında ve immün sistemin uyarılmasında yaygın olarak;

- i. Polimerik nanopartiküller (2-1000 nm)
- ii. Lipozomlar (100-400 nm)
- iii. İmmün sistemi uyarıcı kompleksler [ISCOM (40 nm) ve ISCOMATRIX]
- iv. Emülsiyonlar (50-600 nm)
- v. Virüs benzeri partiküller (VLPs) (20-800 nm)
- vi. Self-assembled proteinler (10 nm)
- vii. İnorganik nanopartiküller (2-1000 nm)

etkin ve güvenli antijen taşıyıcı sistemler ve adjuvanlar olarak nano aşı (nanovaccine) teknolojisinde ümit vaat etmektedir (Cruz et. al., 2012; Zhao et. al., 2014; Shen et al., 2018; Hayat and Darroudi 2019).

2.9.1 Polimerik nanopartiküller

Polimerler, biyolojik olarak uyumlu olmaları, düşük biyodegradasyon hızı, çeşitli kimyasal yapıları, canlı dokularla olan özel etkileşimleri ve doğada yüksek oranda bulunmaları göz önüne alındığında aşı uygulamaları için oldukça cazip malzemelerdir. Polimerik nanopartiküller, antijen alımının iyileştirilmesi, yavaş/kontrollü salımı, immünojenitenin artırılması ve gelişmiş stabilite gibi avantajlara sahiptir. Hedeflenen hücrelere verilmek üzere antijeni tutarlar yanı sıra yavaş biyodegradasyon hızları nedeniyle antijenin uzun süreli salınımını sürdürürler. Aşı formülasyonlarında adjuvanların hazırlanmasında; kitosan, PGA (γ -poliglutamik asit), aljinat, pullulan, inülin, PEG (poli etilen glikol), PLGA (poli Laktik-ko-Glikolik Asit), PLG (poli d, l-Laktid-ko-Glikolid), PLA (poli Laktik Asit), polistiren kullanılan doğal ve sentetik polimerlerdir (Wang et al., 2008; Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).

2.9.2 Lipozomlar

Biyolojik olarak parçalanabilmesi, toksik olmaması, antijeni biyolojik ortam koşullarından koruyarak APC'lere taşınması ve APC'ler tarafından etkin şekilde alınması, biyoyumlu ve vücutta stabil kalmaları sebebiyle klinik kullanım için kapsamlı şekilde incelenmektedir. Yanı sıra üretimi ve ölçek büyütülmesi kolay olan lipozomlar, hücrelerdeki vezikülleri taklit eden çift ya da çoklu lipid tabakalardan oluşan küresel nanopartiküllerdir. Hidrofilik ve hidrofobik yapıların, doğru koşullar altında suda kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşan 30-1000 nm boyutlarındaki taşıyıcı sistemlerdir. Klinik öneme sahip çeşitli bileşiklerin, lipozom yapısındaki iç kısmın/çekirdeğin sulu faz içerisine hapsolması ya da çift tabakalı membran yapısına yüklenmesiyle taşınması gerçekleşmektedir. Antijen taşıma sistemi olarak istenilen özelliklerde modifiye edilebilen mükemmel platformlardır. Inflexal V ve Epaxal gibi bir dizi lipozom sistemi insan kullanımı için onayladır (Zhao et al., 2014; Boraschi and Italiani ,2015; Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

2.9.3 İmmün sistemi uyarıcı kompleksler (ISCOM ve ISCOMATRIX)

Antijen, kolesterol, saponin (Quil A) ve fosfolipidlerin hidrofobik bağlarla uygun sitokiyometride kendiliğinden birbirine tutunarak oluşan yaklaşık 40 nm büyüklüğünde kafes benzeri küresel nanopartiküllerdir. Lipozomlardan daha rijit ve kararlı yapıları vardır. Aşı teknolojisinde ISCOM'lar taşıma sistemleri yerine güçlü adjuvanlar (yapıda bulunan saponin nedeniyle) olarak kullanılmaktadır. Yalnızca veteriner aşılarında kullanılan ISCOM'ların hem hücrel hem humoral immün yanıtı arttırdığı bildirilmektedir. ISCOMATRIX'ler ise ISCOM'lara benzer ancak antijen içermeyen yapılardır. ISCOM'lar yaklaşık 40 yıldır incelenmekte ve sentetik aşı olarak oldukça güçlü olduğu gösterilmiş olsa da enjeksiyon bölgesinde istenmeyen reaksiyonları indüklemesi sebebiyle uygulamaları hayvan aşıları ile sınırlıdır. ISCOM'lar birçok Avrupa ülkesinde influenza virüsüne karşı atlar için lisanslı aşılar ve ayrıca At Herpes Virüs Tip 2'ye (EHV-2) karşı bir alt birim aşıda kullanılmakta, insan aşılarında kullanımı ile ilgili çalışmalar ise halen sürmektedir (Zhao et al., 2014; Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

2.9.4 Emülsiyonlar

Aşıların verilmesinde adjuvan olarak kullanılan bir diğer nanopartikül türü emülsiyonlardır. Su içinde yağ veya yağ içinde su formlarının oluşturulmasıyla hazırlanan, damlacık boyutu 50 - 600 nm arasında değişen yapılardır. Emülsiyon içerisinde antijenin depo edilmesi ve yavaş salımı ile adjuvan etki sağlanmaktadır. Emülsiyonların, basit bir şekilde antijenler ile karıştırılması ve/veya partikül içerisinde antijenleri tutabilmesi sebebiyle nanoaşılar büyük potansiyele sahiptir. 20'den fazla ülkede güvenli ve güçlü bir aşı adjuvanı olarak lisanslanan AS03 ve MF59 mevsimsel ve pandemik influenza aşılarında 1997'den beri yaygın olarak kullanılan su içinde yağ emülsiyonudur (Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).

2.9.5 Virüs benzeri partiküller (VLPs)

Virüs benzeri parçacıklar (VLP), kapsid proteinlerinin kendi kendine bir araya getirilmesiyle oluşturulan, enfeksiyöz nükleik asit içermeyen, biyouyumlu nanopartiküllerdir. VLP'ler, boyutları 20 nm ila 800 nm arasında değişen çeşitli virüslerden farklı teknolojiler ile üretilebilirler. Viral yapının gücünden faydalandıkları için ideal aşı

sistemleridir ancak enfekte eden bileşenlerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. VLP'ler, tek veya çoklu viral protein kombinasyonları oluşturularak patojenik salgınlara karşı hızla yapılandırılabilir. VLP'ler sentetik aşılardan kadar iyi çalışır, VLP'lerin hızlı ve etkili bir şekilde işlenmesiyle güçlü ve uzun süreli immün yanıt oluşturabilmekte hatta adjuvan ile birlikte verilmediğinde dahi güçlü bağışıklık tepkilerini indükleyebilmektedir. Nanoaşılamada, VLP temelli aşılardan pazara ulaşan ilk nanopartikül aşılarıdır ve sağlıklı insanlarda da güvenli kullanıma sahiptir. İlk VLP aşısı Hepatit B'ye karşı 1986 yılında ticarileşmiş, 2006'da İnsan Papilloma Virüsü (HPV) ve 2011'de Hepatit E için insanlarda kullanımı onaylanmıştır (Zhao et al., 2014; Boraschi and Italiani, 2015; Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

2.9.6 Self-assembled/kendiliğinden toplanan proteinler

VLP yaklaşımından hareketle, proteinlerin kuaterner yapısından faydalanılarak kendiliğinden bir araya gelmesiyle yapılandırılmaya çalışılan nanopartikül temelli aşılardan bir çeşididir. Örneğin, prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, 10 nm boyutlarında neredeyse küresel içi boş kafes benzeri kendi kendine toplanabilen proteinlerdir. Ferritinler, sağlam termal ve kimyasal kararlılık gösterdiklerinden immünojenlerin taşınmasında oldukça uygun yapıdaki nanopartiküllerdir. Ayrıca ferritin her biri 3 katlı eksen simetrisine sahip 8 ünitelerden oluştuğu için, trimerik antijenlerin sunumu için uygun bir yapı iskelesidir. İnfluenza aşılarının ana antijeni olan hemagglutinin (HA) ile genetik füzyon yolu ile birleştirilen ferritin nanopartiküllerinin *in vivo* yapılan çalışmada mevcut ticari bir aşı ile karşılaştırıldığı, ferritin nanopartikül aşısı hayvanların daha güçlü düzeyde bağışıklık tepkisi oluşturduğu bildirilmiştir (Kanekiyo et al., 2013; Zhao et al., 2014).

2.9.7 İnorganik nanopartiküller

İnorganik nanopartiküllerin birçoğu biyobozunur olmamasına rağmen, sert yapıları, kontrol edilebilir sentezlenmeleri ve antijenler ile çok yönlü yüzey modifikasyonu sağlamaları nedeniyle nanoaşılamada yeni aşı sistemlerinin tasarlanması için umut vaat eden malzemelerdir. Metal nanopartiküllerin adjuvan özellik sergilediği, hücre alımı teşvik ettiği, APC aktivasyonunu sağladığı, sitokin üretimi ve humoral bağışıklık tepkisine neden olduğu çalışmalarla rapor edilmektedir. Aşı formülasyonlarında kullanılan inorganik nanopartiküller, yapısal olarak çekirdeğinde bulunan inorganik bir katı nanopartikülün

çeşitli yöntemlerle antijen ile konjuge edilmesiyle oluşturulmaktadır (Zhao et al., 2014; Hofmann et al., 2015; Orłowski et al., 2018; Shen et al., 2018).

In vitro ve *in vivo* uygulamalarda en yaygın kullanılan inorganik nanopartiküller;

- Alüminyum nanopartiküller (AlNP)
- Silika nanopartiküller (SiNP)
- Kalsiyum fosfat nanopartiküller (CaPNP)
- Karbon nanopartiküller/nanotüpler (CNP)
- Altın nanopartiküller (AuNP) (Zhao et al., 2014; Shen et al., 2018).

Alüminyum nanopartiküller (AlNP): Uzun yıllardır Amerika Birleşik Devletleri ve pek çok ülkede aşılarda antijene özgü bağışıklık tepkilerini güçlendirmek için insanlarda yaygın olarak kullanılan lisanslı adjuvan alum'dur [alüminyum hidroksit $\text{Al}(\text{OH})_3$ ve alüminyum fosfat $\text{Al}(\text{PO})_4$ tuzları]. Alüminyum tuzları zayıf adjuvanlardır, sadece hümmoral immün yanıtı indükleyebilmektedir. Sitotoksik T lenfosit hücrelerini uyarıcı etkileri bulunmamakta yanı sıra alüminyum bileşikleri oral ya da intranazal uygulamalar için kullanılamamaktadır. Mukozal IgA tepkisini tetikleyemediği gibi bazı bireylerde IgE cevabını artırarak alerjik reaksiyonlara da neden olmaktadır (Singh and O'Hagan, 2002). Alüminyum adjuvanlarının en önemli yan etkisi enjeksiyon bölgesinde granülom oluşturmastır. Yerel ağrı, enflamasyon, şişlik, enjeksiyon bölgesinde ülser ve nekrozda görülebilmektedir. Alüminyum vücuttan böbrekler yoluyla atılır ancak böbrek fonksiyonlarında bir bozukluk olduğunda vücutta birikir. Yüksek alüminyum düzeylerinin özellikle beyin ve kemik dokularını etkilediği, nörolojik semptomlara yol açtığı bildirilmektedir (Aguilar and Rodriguez, 2007).

Silika nanopartiküller: Bu grup etkili antijenlerin verilmesi için 50 ila 200 nm boyutlarında sentezlenerek hem nano taşıyıcılar hem de adjuvanlar olarak aşı uygulamalarında, *in vivo* antijen salınımı, seçici tümör hedefleme ve gerçek zamanlı multimodal görüntüleme gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. PCV (Porcine circovirüs) tip 2 ORF2 proteini taşıma sistemi olarak kullanıldığı çalışmada farelerde hem hümmoral hem hücresel bağışıklık tepkisini indüklediği bildirilmektedir. Partikül boyutu ve

şekli gibi yapısal parametreleri ayarlanabilen, hücrelerle etkileşiminin iyileştirilmesi ve hücrel alımının artırılması amacıyla yüzey modifikasyonları (silanol grupları) gerçekleştirilebilen partiküller olmasına rağmen sentezleri esnasında kullanılan indirgeyici ajanlar ve stabilizatörlerden kaynaklanan toksisiteyi biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalardaki en kritik problemdir (Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

Kalsiyum fosfat nanopartikülleri (CaPNP): Bu grup DNA aşılı ve mukozal bağışıklık için uygun adjuvanlar olup aynı zamanda antijenik proteinler için bağlanma merkezi olarak ta işlev görmektedir. Biyolojik olarak emilebilen bileşenlere ayrışabilmesi, *in vivo* da toksik olmayan ve biyoyumlu yapısı, belirli koşullar altında kalsiyum klorür, dibazik sodyum fosfat ve sodyum sitrat karıştırılarak 50-100 nm boyutlarında sentezlenebilmesi ve yüzey modifikasyon kolaylığı sağlaması nedeniyle aşı uygulamaları için umut vaat eden diğer bir inorganik nanopartiküllerdir. Fizyolojik koşullar altında stabil olan CaPNP'ler viral olmayan DNA vektörleri olarak ta kullanılmaktadır. Yüzey modifikasyonu yapılan 80 nm büyüklüğündeki CaPNP'lerin karaciğerdeki genleri hedefleyebildiği, DNA'yı hem *in vitro* hem *in vivo* DNaz'dan koruyabildiği ve memeli hücrelerine daha etkili bir transfeksiyon sergilediği bildirilmiştir. Geniş klinik uygulamalara sahip CaPNP'ler bazı aşılar için alüminyum adjuvanlarına alternatif olarak araştırılmaktadır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda CaP agregatlarının yüksek oranda antikor titreleri ürettiği ve viral enfeksiyonlarda alum adjuvanından daha yüksek koruma sağladığı rapor edilmektedir (Smith et al., 2015; Shen et al., 2018).

Karbon nanopartiküller/nanotüpler (CNP): Fulleren, grafen gibi çeşitli karbon nanopartikül formları ve karbon nanotüpler (100 – 1000 nm uzunluğunda ve 0,8 – 2 nm çapında) farklı aşı türleri için taşıyıcı sistemler veya adjuvan kullanımı için incelenmektedir. Antijenlerin APC'lere verilmesi için antijen taşıyıcıları olarak kullanılan karbon nanopartiküllerin humoral bağışıklık tepkisini uyardığı, karbon nanotüplerin mükemmel bir biyoyumluluğa sahip olduğu, B ve T lenfositleri ve makrofajlar tarafından hızla alınabildiği ve hücre canlılığı üzerinde ihmal edilebilir bir toksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Shen et al., 2018).

Altın nanopartiküller (AuNP): Biyoyumlu yapıları, oldukça kolay modifiye edilebilir yüzeyleri ve sahip oldukları eşsiz optik özellikleri (SPR) nedeniyle aşılama konusunda AuNP özel bir ilgi ile araştırılmaktadır. AuNP'ler, 1 ila 150 nm boyut aralığında farklı

şekillerde (çubuk, küresel, kübik) sentezlenebilen nanopartiküllerdir. Sahip oldukları hem boyut hem de şekil farklılıkları nedeniyle farklı sitokin yollarını uyarmakta ve bağışıklık tepkilerinin oluşması üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. AuNP'lerin önemli oranda sitotoksik olmadan, protein ve DNA ileten aşı taşıma sistemleri olarak kullanımı hem kanser terapisinde ve bulaşıcı hastalıklarda aşı adjuvanı hem de kolloidal altının antijenler ile birleşmesi ile oldukça spesifik antikorları indükleyerek hümmoral ve hüccresel bağışıklık tepkisini uyardığı yapılan birçok çalışmada rapor edilmektedir (**Tablo 2.4**) (Chen et al., 2010; Wang et al., 2011; Gregory et al., 2012; Niikura et al., 2013; Kumar et al., 2015; Shen et al., 2018; Sekimukai et al., 2020).

Altın nanopartiküller, sadece partikül formülasyonları olarak değil aynı zamanda hümmoral ve sitotoksik tepkiler oluşturma kapasiteleri sayesinde de immün sistemi uyarabilmektedir. AuNP'ler immün sistemi uyarıcı kapasiteye sahip ve aşı geliştirmenin tüm aşamalarında çeşitli reaksiyonları indükleyebilir niteliktedir. Nanopartiküllerin APC'lerin işlevleri üzerindeki etki mekanizmaları, boyut, şekil ve yük gibi özellikleri ile doğrudan ilişkilidir ve aşı verimliliği üzerinde oldukça kritiktir. Nanopartiküllerin adjuvantisiteye, immünomodülasyona nasıl etki edeceği veya nanopartikül ile formüle edilen antijene karşı tolerans konusunda hala çok çeşitli araştırmalar sürmektedir. Yapılan çalışmalar Th1 ve Th17 tepkisinin oluşumunda AuNP'lerin rolü olduğunu göstermektedir (Zhao et al., 2014; Marques Neto et al., 2017).

AuNP'ler antijen taşıma sistemleri ve/veya adjuvanlar olarak kullanımında sahip oldukları başlıca dikkat çeken özellikleri;

- İnert yapıları sayesinde tek başına antikor tepkisi oluşturmaması
- Geniş yüzey-hacim oranına sahip olmaları nedeniyle yüzeylerine fazla miktarda antijen bağlanması ve bu sayede APC'ler ile etkileşimin artması sonucunda yüksek yoğunlukta antijen sunma imkânı sağlamaları
- Makrofajlar tarafından hüccresel alımı ile hücrede aktivasyonlara neden olabilmesi (adjuvan potansiyeli)
- Fonksiyonel gruplar ile konjüge edilebilmesi,
- Kontrol edilebilir şekil ve boyuta sahip olmasıdır.

AuNP'ler mevcut özellikleri sayesinde aşı tasarımlarında (**Tablo 2.4**) oldukça esnek ve özelleştirilebilir bir yaklaşım sunmaktadır (Daniel and Astruc, 2004; Chitrani et al., 2006; Jain et al., 2007; Bastus et al., 2009; Kumar et al., 2015; Boraschi and Italiani, 2015). AuNP'ler, protein epitoplarında bulunan kükürt grupları tarafından oksidasyona maruz kalabilir ve antijen ile konjugasyonu sağlayabilir. Kararlı yapıları sayesinde aşamalı olarak yüzeylerine ekleme yapılarak kompleks iskeleler oluşturulabilir. Bu şekilde sağladığı kolay yüzey modifikasyonları ile yeni partikül aşılarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Gregory et al., 2013). AuNP'lerin tiyollere, disüfidlere ve aminlere güçlü bağlanma afinitesi, biyosensör ve ilaç dağıtımı dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamaların geliştirilmesinde yararlı olan biyomoleküllerle (örneğin DNA ve antikorlar) konjugasyonunu da kolaylaştırır (Balasubramanian et al., 2010).

Nanopartiküllerin tasarımında ilstenen özellikleri sağlamak için, parçacık biyodağılımının, antijen iletiminin, immünoestimülatör veriminin ve genel bağışıklık tepkisinin modülasyonu üzerinde etki gösteren bileşim, boyut, yüzey yükü ve yüzey özelliklerine odaklanılmalıdır. Aşı adaylarının tasarımı ve geliştirilmesi için rasyonel bir yaklaşımdan faydalanmak için yeni ilerlemeler giderek arttıkça, patojenlerin biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerini taklit etmek ve toksisiteleri olmadan güçlü bağışıklık tepkisi oluşturmak için sentetik parçacıkların tasarım kriterlerini daha iyi anlıyoruz (Shen et al., 2018).

Tablo 2. 4 Aşı tasarımlarında kullanılan kimyasal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin indüklediği bağışıklık tepkileri

<i>In vitro</i> Uygulamalar					
Au Şekil – Boyut	Adjuvan	Konjuge Edilen Antijen	Hücre Hattı	Bağışıklı Tepkisi	Referans
20-40 nm küresel 40 nm nanoçubuk, 40 nm kübik	-	WNVE protein (West Nile Virus)	BMDC RAW264.7 Fare	IgG titreleri ve IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , GM-CSF salım seviyelerinde artış	Niikura et al., 2013
21-57 nm nanoçubuk	-	Rekombinant RSV (Respiratory Syncytial Virus) F protein	PBMCs/ MDDCs	T hücrelerinin proliferasyonunun indüklenmesi	Stone et al., 2013
15 nm küresel	-	MUC-I protein	Murine Peritoneal Makrophages	IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α salım seviyelerinde artış	Mocan et al., 2015
23 nm küresel	-	PCV2 (Porcine Circovirus type 2) kapsid proteini	RAW264.7/ DC2.4 Fare	IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ düzeylerinde artış	Ding et al., 2017
18 nm küresel	-	H3N2/HA (Hemagglutinin)/FliC (TLR-5 agonist flagellin)	JAWS II/ BMDC	IL-6, IL-12, TNF- α salınım seviyelerinde artış	Wang et al., 2017
24 küresel	-	SGSH (shikimoly guanidinylated) ve GSH (guanidinylated thiol) ligand	B16F10 Fare	IL-4, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ salınım seviyelerinde ve CD8+ spesifik T hücre yanıtında artış	Gulla et al., 2018
20-40 nm küresel 28-40 nm nanoçubuk	-	uPIC (polyinosinic-polycytidylic acid)	BMDC	IL-1 β , TNF- α , IFN- β salınım seviyelerinde artış	Tazaki et al., 2018
<i>In vivo</i> Uygulamalar					
15 nm küresel	-	<i>Yersinia pestis</i> F1-antigen	Fare	IgG1ve IgG2a titrelerinde, CD4+ ve CD8+ hücrelerinin aktivasyonunda ve IFN- γ salım seviyelerinde artış	Gregory et al., 2012
40 nm küresel	-	PfCSP (<i>Plasmodium falciparum</i> Circumsporozoite protein)	Fare	IgG, IgM, IgA titrelerinde ve CD8+ hücrelerinin aktivasyonunda artış	Kaba et al., 2012
15 nm küresel	-	Tüberkülin	Kobay (Guinea Pigs)	Mikobakter türlerine karşı yüksek antikor seviyeleri	Staroverov and Dykman, 2013
25-40 nm küresel	<i>Asparagus racemosus</i> ekstraktı	TT (<i>Clostridium tetani</i> toksoidi)	Fare	IgG, IgA titrelerinde artış	Barhate et al., 2014
12 nm küresel	CpG/DNA	M2e (Membran matrix protein 2)	Fare	IgG1 ve IgG2a titrelerinde artış	Tao et al., 2014

1,5-2 nm küresel	Advax	LLO ₉₁₋₉₉ (Listeriolysin O peptit)	Fare	CD4+, CD8+ spesifik T hücre yanıtı ve IL-12, TNF- α ve IFN- γ düzeylerinde artış	Rodriguez – Del Rio et al., 2015
30 nm küresel, 50 nm yıldız, 60 nm kafes, 30-40 nm prizma	-	Pfs 25 yüzey proteini (<i>Plasmodium falciparum</i>)	Fare	Küresel ve nanoyıldız AuNP'ler antikor titrelerinde yüksek artış	Kumar et al., 2015
100 nm küresel	-	R2575S antijeni (Rekombinant Spike glikoprotein)	Fare	T hücre yanıtı ve antikor titrelerinde yüksek artış	Chen et al., 2016
15 nm küresel	Freund's adjuvan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Flagellin 1-161 proteini	Fare	IgG titrelerinde artış	Dakterzada et al., 2016
7-14-28 nm küresel		OVA	Fare	CD8+ spesifik T hücrelerinin yanıt artışı	Kang et al., 2017
12 nm küresel	CpG	M2e (Membran matrix protein 2)	Fare	IgG titresinde artış	Tao et al., 2017
2 nm küresel	-	Neoglikoprotein ve T-helper peptit	Fare	IL-2, IL-4, IL-5, IL-17, IFN- γ seviyelerinde ve IgG titresinde artış	Vetro et al., 2017
50 nm nanoçubuk	-	rSm2 proteini (<i>Schistosoma mansoni</i> rekombinant protein)	Fare	CD4+, CD8+ spesifik T hücre yanıtı, IL-1 β ve IFN- γ salınım seviyelerinde ve antikor titrelerinde artış	Assis et al., 2018
2.3 nm küresel	-	HIV1 peptit	Fare	CD4+, CD8+ spesifik T hücre yanıtı artışı IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF- α , IL-1 β salım seviyelerinde artış	Climent et al., 2018
15 nm küresel	-	<i>Escherichia coli</i> EHEC spesifik LomW ve EscC antijenleri	Fare	IgA ve IgG titrelerinde yüksek artış	Sanchez Villamil et al., 2019
15 nm küresel	-	TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus) antijen	Fare	IL-6, IFN- γ , IL-1 β salımı	Staroverov et al., 2019
2-10 nm küresel	-	OVA protein	Fare	IgG1 ve IgG2a titrelerinde artış	Yang et al., 2019
15 nm küresel	-	GAS (Group A <i>Streptococcus</i>) antijen	Fare	Antikor titrelerinde artış	Pitirollo et al., 2020
40 nm ve 100 nm küresel	-	SARS-CoV Spike protein	Fare	IgG yanıtı indüklenmesi IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TNF- α , IFN- γ	Sekimukai et al., 2020
15 nm küresel	CpG	<i>Burkholderia pseudomallei</i> spesifik proteinleri Hcp1, FlgL, OpcP, OpcP1, OmpW	Fare	IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ düzeylerinde ve antikor titrelerinde artış	Tapia et al., 2020

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereçler

3.1.1. Mikroorganizmalar ve hücre hatları

Türkiye'nin farklı bölgelerinden ve farklı kaynaklardan daha önce tamamlanan TUBİTAK projeleri kapsamında izole edilen ve ACTIN OCC Aktinomiset Kültür Koleksiyonuna (The World Federation for Culture Collections, WDCM No: 952) kayıtlı laboratuvarımızda mevcut karasal ve denizel kökenli yaklaşık 1000 Aktinomiset (*Actinobacteria*) izolatı içerisinde **Tablo 3.1**'de sunulan 30 mezofil aktinomiset izolatı çalışma kapsamında kullanılmak üzere örneklem farklılığı dikkate alınarak seçildi.

Adjuvan potansiyelinin değerlendirilmesi aşamasındaki *in vitro* hayvan hücre kültürü denemelerinde makrofaja farklılaşan U937 (Monosit Benzeri İnsan Histiositik Lenfoma Hücreleri) ve L929 (Fare Deri Fibroblast Hücreleri) hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatları bölümümüz Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses laboratuvarlarından temin edildi.

Tablo 3. 1 Çalışmada AuNP biyosentezi için değerlendirilen aktinomiset izolatları

İzolat Kodu	İzole Edildiği Kaynak	Örneklem Bölgesi
2M2	Toprak	Eskişehir
M73-1	Toprak	Çanakkale/Biga
M65-2	Toprak	Çanakkale/Bayramiç
M137-SY2	Toprak	Konya/Selçuklu
M125-2	Kanalet suyu	Aydın/İmamköy
M33-12	Toprak	Balıkesir/Sındırgı
M33-C	Toprak	Balıkesir/Sındırgı
2M6	Toprak	Eskişehir
2M10	Toprak	Eskişehir
M46-6	Sediment	Balıkesir/Ayvalık
2SM-24	Deniz sünger (Aplysina aerophoba)	Çanakkale/Saros
M137-2	Toprak	Konya/Selçuklu
M137-KT-13	Toprak	Konya/Selçuklu
M138-S-2A	Toprak	İzmir
6SM-81	Deniz sünger (Chondrilla nucula)	Antalya/Kaş
6SM-123	Deniz sünger (Dysidia awara)	Antalya/Kaş
5SM-03	Deniz sünger (Sarcotragus foeditus)	İzmir/Teos
6SM-51	Deniz sünger	Antalya/Kaş
4SM-06	Deniz sünger (Sarcotragus foetidus)	Balıkesir/Ayvalık
4SM-02	Deniz sünger (Spirastrella cunctatrix)	Balıkesir/Ayvalık
M44-1	Toprak	İzmir/Bostanlı
M43-1	Toprak	İzmir/Bostanlı
M33-7	Toprak	Balıkesir/Sındırgı
M7	Toprak ve çamur	İzmir/Seferihisar
M33-14	Toprak	Balıkesir/Sındırgı
3SM-03	Deniz sünger (Ircinia sp.)	Çanakkale
3SM-04	Deniz sünger (Ircinia sp.)	Çanakkale
2SM-05	Deniz sünger (Chondrosia reniformis)	Çanakkale/Saros
M127-2	Kükürtlü termal su	Aydın/İmamköy
M137-5	Toprak	Konya/Selçuklu

3.1.2 Besin Ortamları

Soya Mannitol Agar (SFM)

Aktinomiset izolatlarının aktivasyonu ve spor süspansiyonu hazırlanmasında aşağıda reçetesi verilen SFM agar besin ortamı kullanıldı (Kieser et al., 2000).

Bileşen	Miktar
Soya unu	20 g
Mannitol (Merck Millipore, 1059820500)	20 g
Agar (Fluka, 05039)	20 g
Destile su	1 L

Bileşenler destile su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı ve 1 M NaOH (Merck, 1064981000) ile pH 8,0'e ayarlandı. Hazırlanan besin ortamı 1,1 atm basınç altında, 121°C'de 15 dk otoklav ile steril edildi. Ardından laminar akışlı kabin içerisinde aseptik koşullarda tek kullanımlık steril petrilere döküldü (~10-15 ml) ve katılaştıran besin ortamları kullanılıncaya kadar +4°C'de stoklandı.

MGYP Broth (Malt özütü - Glukoz - Maya Özütü - Pepton)

MGYP broth (sıvı besiyeri) kültürün gelişmesini destekleyen oldukça zengin içerikli bir besiyeridir (Birla et al., 2013). AuNP biyosentezinde kullanılacak Aktinomiset izolatlarının sıvı kültür fermentasyonunda aşağıda reçetesi verilen MGYP broth besin ortamı kullanıldı.

Bileşen	Miktar
Malt özütü (Bacto, 218610)	3 g
Maya özütü (Merck Millipore, 1037530500)	3 g
Glukoz (Merck Millipore, 1083421000)	10 g
Pepton (Merck Millipore, 1072140500)	5 g
Destile su	1 L

Bileşenler destile su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı ve 1 M NaOH tamponu ile pH 8,0'e ayarlandı. Hazırlanan besin ortamı 1,1 atm basınç altında, 121°C'de 15 dk otoklav ile steril edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de stoklandı.

Gliserol - Maya Özütü Agar (GYA)

Aktinomiset izolatlarının saflık kontrolünde aşağıda reçetesi verilen GYA besin ortamı kullanıldı (Atlas, 2004; Oskay et al., 2004).

Bileşen	Miktar
Gliserol (Merck Millipore, 1370031000)	50 ml
Maya özütü (Merck Millipore, 1037530500)	5 g
K ₂ HPO ₄ (Merck Millipore, 1051041000)	0,1 g
Pepton (Merck Millipore, 1072140500)	25 g
Agar (Fluka, 05039)	20 g
Destile su	950 ml

Bileşenler destile su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı ve 1 M NaOH tamponu ile pH 8,0'e ayarlandı. Hazırlanan besin ortamı 1,1 atm basınç altında, 121°C'de 15 dk otoklav ile steril edildi. Ardından laminar akışlı kabin içerisinde aseptik koşullarda tek kullanımlık steril petrilere döküldü (~10-15 ml) ve katılaştıran besin ortamları kullanılıncaya kadar +4°C'de stoklandı.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute-1640)

Hücre kültürü çalışmalarında RPMI 1640 (Gibco, 52400) besin ortamı, U937 insan monosit hücrelerinin çoğalmaları ve büyümeleri amacıyla kullanıldı.

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

Sentezlenen AuNP sitotoksikite testi çalışmalarında L929 hücrelerinin çoğalmaları ve büyümeleri amacıyla %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren EMEM (Sigma, M4655) besin ortamı kullanıldı.

3.1.3 Çözelti, tampon ve kimyasallar

DNA izolasyonu

Lizis tamponu: Genomik DNA izolasyonu için hazırlanan bu tamponun bileşenleri aşağıda verilmiştir. Tris-HCl ve EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) pH 8'de ultra saf su içerisinde homojen çözünmesinin ardından NaCl ve SDS (sodyum dodesil sülfat) eklenerek tüm bileşenlerin homojenizasyonu sağlandı (Liu et al., 2000).

Bileşen		Miktar
Tris – HCl	(Bioshop, TRS002500)	400 mM
EDTA	(Bioshop, EDT001500)	60 mM
NaCl	(Merck Millipore, 1064040500)	150 mM
SDS	(Appllichem, A42590250)	% 1
Ultra saf su		100 ml

Potasyum asetat tamponu: Aşağıda bileşenleri verilen bu tampon genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Potasyum asetat üzerine glisyal asetik asit eklenmesinin ardından destile su ile son hacim tamamlandı ve bileşenlerin homojenizasyonu sağlandı (Liu et al., 2000).

Bileşen		Miktar
Potasyum asetat (5 M)	(Sigma Aldrich, P1190500)	60 ml
Glisyal asetik asit	(Merck Millipore, 1000632511)	11,5 ml
Destile su		28,5 ml

Tris-Borat-EDTA tamponu (TBE) (5x/L): Genomik DNA izolasyonu işlemlerinde, agaroz jel hazırlanması ve agaroz jel elektroforezinin yürütülmesinde Tris-Borat-EDTA tamponu kullanıldı. pH 8 olarak ayarlanan 0,5 M EDTA çözeltisine tris ve borik asit aşağıda miktarları belirtilen şekilde eklendi ve bileşenlerin homojenizasyonu sağlanarak hazırlandı. 5X konsantrasyonda hazırlanan TBE tamponu 1X konsantrasyonuna destile su ile seyreltilerek kullanıldı (Liu et al., 2000).

Bileşen		Miktar
Tris	(Merck Millipore, 1083820500)	54 g
Borik asit	(Merck Millipore, 100165500)	27,5 g
EDTA	(Bioshop, EDT001500)	20 ml

- İzopropil alkol/2-Propanol (Merck Millipore, 1096342511)
- Etanol (VWR BDH Chemicals)
- Lizozim (PanReac AppliChem, A4972)
- Tris-Etilendiamin Tetraasetik Asit/TE Tamponu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve jel elektroforezi

- 10X reaksiyon tamponu (ABM, VG0910)
- $MgCl_2$ (ABM, VG0510)
- dNTP karışımı (10 pM) (Applied Biosystems, N8080260)
- 27 F primeri (10 pmol) (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')
- 1492 R primeri (10 pmol) (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG AG-3')
- Taq DNA polimeraz (ABM, 40917)
- Agaroz (Sigma, A5093)
- Marker DNA ladder 1 kb Plus Opti DNA (ABM, G248)

AuNP sentezi ve konjugasyon

Altın tuzu ($HAuCl_4$) çözeltisi: Moleküler ağırlığı 339,79 g olan Altın tuzu/Gold III chloride hydrate/ $HAuCl_4$ (Sigma-Aldrich, 254169) çalışmada kullanılmak üzere 10^{-1} M (100 mM), 10^{-2} M (10 mM), 10^{-3} M (1mM), 10^{-4} M (0,1 mM) ve 10^{-5} M (0,01 mM) konsantrasyonların da hazırlandı. Tartılan altın tuzu destile su içerisinde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı ve 0,1 M NaOH tamponu ile deney tasarımında öngörülen pH ayarlaması yapıldı.

Fosfat tamponu (PBS) çözeltisi: AuNP-BSA (bovine serum albümin, sığır serum albumin) konjugatı hazırlanmasında PBS tamponu kullanıldı. BSA ana stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmak üzere 1 M PBS tamponu aşağıda miktarları belirtilen şekilde eklendi ve bileşenlerin homojenizasyonu sağlanarak hazırlandı.

Bileşen	Miktar
NaCl	(Merck Millipore, 1064040500) 8 g
KCl	(Merck Millipore, 1049360250) 0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	(Merck Millipore, 1065851000) 1,44 g
KH ₂ PO ₄	(Merck Millipore, 1048730250) 0,24 g
Destile su	1 L

BSA ana stok çözeltisi: AuNP-BSA konjugatı oluşturma aşamasında kullanılmak üzere 10 mg/ml konsantrasyonunda ana stok BSA (Affymetrix, 10857) çözeltisi (0,01 M PBS tamponu içerisinde) hazırlandı.

Kolloidal altın (40 nm) (BBI Solutions, EM.GC40): Denemelerde kontrol örneği olarak kullanıldı.

FITC (Fluorescein isothiocyanate) işaretli BSA (Sigma, A 9771): AuNP hücresel alım çalışmalarında kullanıldı.

Protein kit (Bradford analizi) (Merck Millipore, 1103060500): Tüm çalışma boyunca toplam protein tayininde kullanıldı.

In vitro hücre kültürü çalışmaları

- Fetal Sığır Serum (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11A)
- L-glutamin (Biochrom, K0283)
- Penisilin/Streptomisin (Biosera, XC-A4122)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, P1585)
- Tripan mavisi solüsyonu (Sigma, T-6146)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, D2650)
- MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma, M5655)
- Lipopolisakkarit (Sigma, L2630)
- Alum (alüminyum tuzu, ATAFEN firmasından temin edildi)
- IL-6 (interlökin 6) Human ELISA Kit (Invitrogen, 88-7066-22)
- TNF- α (tümör nekroz faktör alfa) Human ELISA Kit (Invitrogen, 88-7346-22)
- DAPI (6-diamidino-2-phenylindole) Fluoromount – G (SouthernBiotech, 0100-20)
- Metanol (Merck, 1133512500)
- Tween 20 (Bio SB, 0046)

3.1.4 Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Otoklav	Hirayama, HG-80
Laminar Akışlı Kabin Class II	NUAIRE NU-425-400 E Biological Safety Cabinet
Laminar Akışlı Kabin Class II	Heraeus, Hera Safe Klas II
Çalkalamalı inkübatör	ZHICHENG Incubator Shaker
Mikroplate karıştırıcı	Heidolph/Titramax 100
İnkübatör	Nüve ES-500
İnkübatör	Memmert Incubator IN450
CO ₂ 'li inkübatör	Heraeus, Hera Cell
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5415 R
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810 R
Mikro santrifüj	Hettich, Mikro 20
Hemositometre	Neubauer
Inverted mikroskop	Olympus CK 40
PCR	TECHNE TC-3000X
Nanodrop	Thermo Nanodrop 1000
Agaroz jel elektroforez sistemi	VWR, 730-1692
Mikro plate okuyucu	Bioteck, ABD
UV Spektrofotometre	Optizen, 5U4709-129046-00
UV Spektrofotometre	Agilent Technologies ZEN3600
Hassas terazi	Shimadzu, ATX224
pH metre	HANNA Instruments HI-2211
Vorteks	VWR International, Almanya
Otomatik Mikropipetler	Brand Transferpette
Su banyosu	GFL
Manyetik karıştırıcı	IKA
Mikro dalga fırın	Arçelik MD 574s
Buzdolabı	Vestel, Türkiye
Derin Dondurucu	Vestel, FT-280
Derin Dondurucu (-86°C)	Thermo Scientific
Zeta - Sizer	Malvern Nano ZS

3.2 Yöntemler

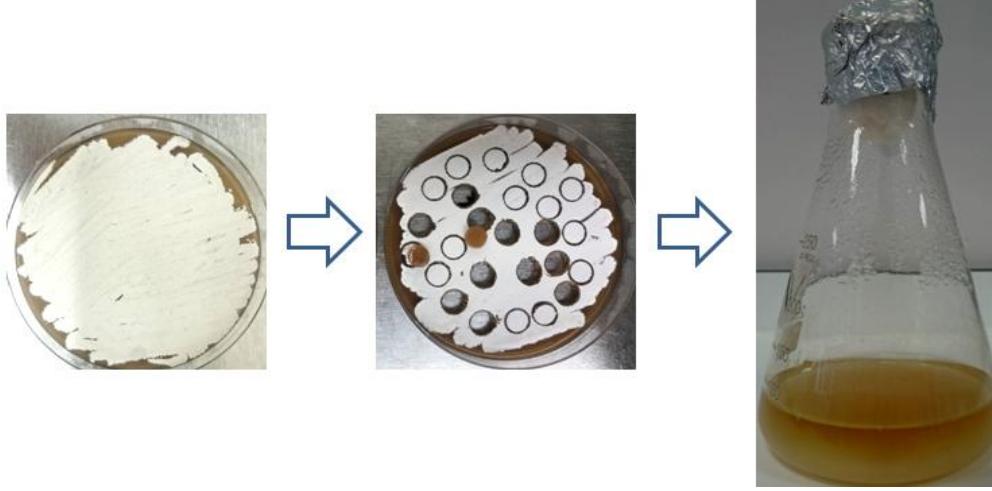
3.2.1 Aktinomiset izolatlarının aktivasyonu, saflık kontrolü ve stoklanması

Seçilen Aktinomiset izolatların aktivasyonu ve stok spor süspansiyonu hazırlanmasında SFM agar kullanıldı (Kieser et al., 2000). Bakteri stoklarından (-20°C) alınan 10-20 µl hacim SFM agar besiyeri üzerine yayma plaka yöntemi (Shepherd et al., 2010) ile ekildi ve petriler 28°C'de 5-7 gün inkübe edildi. Aktifleştirilen izolatlar saflık kontrolü amacıyla GYA agar besiyeri üzerine çizgi ekim yöntemi ile tekrar ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübasyon bırakıldı. Petrilerdeki tek koloni görünümleri ve mikroskopik inceleme ile saflıkları değerlendirildi.

Çalışma stoklarının oluşturulması amacıyla saflık kontrolü tamamlandıktan sonra izolatlar tekrar SFM agar besiyerine inoküle edildi ve 28°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonlandırılmasının ardından gelişen sporlar steril %20'lik gliserol ile ıslatılmış pamukla aseptik koşullar altında Class II kabin içerisinde toplandı, pamuk enjektör içerisine yerleştirilerek gliserol içerisine alınan sporlar steril bir kriyo tüp içerisine sıkıldı ve ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklandı.

3.2.2 Altın nanopartikül (AuNP) biyosentezi tarama çalışmaları

Tez kapsamında ilk aşamada 30 aktinomiset izolatı ile AuNP biyosentez tarama çalışması gerçekleştirildi. Bunun için SFM agar besin ortamında aktifleştirilen her bir kültürden ~6 mm çapında 4 parça alınarak 100 ml MGYF sıvı besiyeri içeren erlenlere (250 ml) aseptik koşullarda inoküle edildi (**Şekil 3.1**). Kültür 28°C'de 150 rpm çalkalama hızında 96 saat inkübe edildi. Ardından misellerin kültür sıvısından uzaklaştırılması amacıyla 10000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Üst sıvılar toplandı ve 0,22 µm por çapına sahip steril selüloz asetat şırınga filtre ile filtrasyon işlemi gerçekleştirildi. Böylece AuNP biyosentezinde kullanılmak üzere hücresiz fermentasyon sıvısı (HFS) elde edildi (Zonooz et al., 2012; Skladanowski et al., 2016).



Şekil 3. 1 Aktinomiset izolatından biyokütle üretimi

HFS kullanılarak AuNP sentezinde farklı kaynaklardaki yöntemler modifiye edildi. Bunun için HFS ile 10^{-3} M HAuCl_4 (altın tuzu) çözeltisi (pH 8) eşit hacimde (1:1 v/v) cam tüplerde karıştırılarak (Manivasagan et al., 2015; Bennur et al., 2016) 80°C su banyosunda çözeltinin renk değişimi gözlenene kadar inkübasyona (~ 40 dk) bırakıldı (Sowani et al., 2016). İnkübasyonun sonunda biyosentez çözeltileri 400-800 nm aralığında spektrofotometrede tarandı ve 500-550 nm arasında SPR (surface plasmon resonance) spektrumu veren örnekler tespit edildi. Aday izolatın seçiminde;

- i) Belirlenen SPR bandı
- ii) Gözlenen renk değişimi (kırmızı, turuncu, menekşe/mor)
- iii) İzolatın üreme hızı ve misel miktarı
- iv) Melanin üretimi

durumu dikkate alındı

Bu kriterleri sağlayan izolatlar içerisinde nihai üreticinin belirlenmesi amacıyla nanopartiküllerin bazı karakterizasyon [UV-Vis spektrofotometresi ile tarama ve absorpsiyon, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntü alma ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile partikül boyut ve dağılımı] çalışmaları yapıldı (Bkz. 3.2.6). Bu aşamada gerçekleştirilen 80°C su banyosu ile yapılan inkübasyon AuNP sentezine aday izolatların hızlı bir şekilde taranması amacıyla tercih edildi. HFS'dan gelen enzim ve proteinler

denatüre olana kadar sentez gerçekleşti ve tpplerde renk değişimi gözlendi. Mikrobiyal AuNP sentezinde enzimlerin iş gördüğü dikkate alındığında, izolatlar 28°C'de kltive edildiğinden devam eden biyosentez çalışmalarında inkübasyon 28°C'de gerçekleştirildi (Manivasagan et al., 2015).

3.2.3 Aday izolatların AuNP biyosentezi ve karakterizasyonu

Tarama alışması sonrası seçilen izolatlar ile sentezlenen AuNP'lerin daha ayrıntılı karakterizasyonları yapıldı. Bunun için ilk aşamayı geçen aday izolatlar ile tekrar 3.2.2'deki gibi fermentasyonlar gerçekleştirildi, HFS elde edildi ve AuNP biyosentezi gerçekleştirildi. Bunun için eşit hacimlerde HAuCl₄ zeltisi (10⁻³ M derişiminde) ile HFS'ları karıştırıldı ve karanlıkta 28°C 150 rpm'de 96 saat inkübe edildi (Manivasagan et al., 2015). Inkbasyonun sonlandırılmasının ardından sentezlenen AuNP'lerin (mikrobiyal AuNP=mAuNP) UV-Vis spektrofotometresi ile SPR taraması, ortalama boyut dağılımları DLS analizi ile incelendi (Bkz. 3.2.6) ve mikrobiyal AuNP biyosentezinde kullanılacak izolatın seçimi gerçekleştirildi.

3.2.4 Aktinomiset izolatının dizi analizi ve filogenetik tanılanması

3.2.4.1 Genomik DNA izolasyonu

Mikrobiyal AuNP biyosentezinde kullanılan Aktinomiset izolatının dizi analizi ve filogenetik tanılanması için ilk aşamada genomik DNA izolasyonu yapıldı. Genomik DNA izolasyonu; Liu et al., (2000) tarafından önerilen yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi.

- Aktinomiset hücreleri MGYT besiyerinde 28°C 150 rpm'de 36-48 saat inkübe edildi.
- Fermentasyon sıvısından 1,5 ml hacim steril Eppendorf tüplere alındı, 7000 g'de 5 dk santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve ardından st sıvı uzaklaştırıldı.
- Pelletlerin zerine 0.01 mg lizozim eklendi ve 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
- Ardından pelletler üzerine 500 l lizis tamponu [400 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, %1 SDS] ilave edildi, homojen karışım sağlandı ve 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası 150 l potasyum asetat tamponu

(pH 4,8) eklendi ve karıştırıldı (Eppendorflar 10 kez alt üst edildi ve düşük hızda vorteks yapıldı).

- Örnekler 12000 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve üst faz steril yeni bir Eppendorf tübe aktarıldı.
- Aktarılan üst faz üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edildi ve örnekler 12000 g'de 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Bu basamakta DNA çöktürüldü ve üst faz nazikçe uzaklaştırıldı.
- Örnekler üzerine (çöken DNA) 300 µl %70'lik soğuk etanol eklendi, 10000 g'de 4°C'de 1 dk santrifüj ardından üst faz tekrar nazikçe uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında pellet kurumaya bırakıldı (yaklaşık 10 dk).
- İzole edilen DNA 50 µl TE tamponu içerisinde süspanse edildi ve daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.4.2 Genomik DNA'nın miktar, saflık ve bütünlük değerlendirmesi

İzole edilen genomik DNA'nın bütünlüğü %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edildi. Yanı sıra nükleik asitlerin A260/A280 nm dalga boyu oranları nanodrop cihazı (Thermo/Nanodrop 1000) ile ölçülerek saflık kontrolü ve konsantrasyon tayini yapıldı.

Elektroforez esnasında ve jel hazırlanmasında TE tamponu kullanıldı. 1 g agaroz 100 ml 1X TE tamponu içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla çözdürülerek homojen karışımı sağlandı. Ardından soğumaya bırakılan (yaklaşık 45-50 °C'ye) jel içerisine son konsantrasyonu 1µl/100ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi ve jel tırağının yerleştirildiği elektroforez kasetine döküldü. Jelin donması (yaklaşık 30 dk) sonrası tarak çıkarıldı. Agaroz jel üzerindeki ilk kuyuya marker olarak 1 kb Plus Opti-DNA standardı, diğer kuyulara 10 µl izole edilen DNA ile 4 µl yükleme tamponu karıştırılarak yüklendi. Örnekler 100 voltta 40-60 dk süreyle yürütüldü ve ardından UV altında bantlar görüntülendi.

3.2.4.3 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Aktinomiset izolatının filogenetik analizi için korunmuş 16S ribozomal DNA dizisini kodlayan gen bölgesi hedeflendi. 16S rDNA bölgesi dizi analizi için 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492 R primeri (5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') universal primer çifti kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. PCR karışımı aşağıda verilen bileşenlerin toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde sırasıyla PCR tüpüne eklenmesi ile hazırlandı. PCR amplifikasyon koşulları; ilk denatürasyon 94°C'de 30 sn (1 döngü), ardından 30 döngü şeklinde her döngüde I. 94°C'de 30 sn, II. 49°C'de 30 sn, III. 72°C'de 90 sn ve son polimerizasyon 72°C'de 45 sn (1 döngü) olarak gerçekleştirildi.

Bileşen	Miktar
Ultra saf su	31,95 µl
10X reaksiyon tamponu	5,0 µl
MgCl ₂	4,8 µl
dNTP karışımı (10 pM)	1,0 µl
27 F primeri (10 pmol)	1,0 µl
1492 R primeri (10 pmol)	1,0 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Kalıp DNA (50 ng)	5,0 µl

3.2.4.4 Dizi analizi ve filogenetik ağaç

PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi RefGen'den (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi) hizmet alımı ile yapıldı. PCR ürünleri Centricon® purifikasyon kiti kullanılarak saflaştırıldı ve ABI 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile dizi analizi gerçekleştirildi. Elde edilen diziler NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak analiz edildi ve kayıt altına alınarak GenBank erişim numarası alındı. Çoklu dizi analizi Bio Edit sequence alignment editor v7.0.5 (Isis Pharmaceutical Inc.) programı ile gerçekleştirildi ve filogenetik ağaç, filogenetik analiz programı MEGA v4.0 ile çizildi. Ağaç oluşturulurken Neighbour-joining yöntemi ve 3000 bootstrap değeri kullanıldı.

3.2.5 *Streptomyces* sp. M137-2 ile AuNP biyosentez optimizasyonu

Yapılan çalışmalarda mikrobiyal AuNP biyosentezinde pH, sıcaklık, metal iyon (tuz) derişimi, inkübasyon süresi, mikroorganizma türü ve biyokütle/HFS miktarı gibi faktörlerin sentezlenen partikül boyutu üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmektedir (Korbekandi et al., 2009; Narayanan ve Sakthivel, 2010; Sadhasivam et al., 2012). Bu aşamada istatistiksel deney tasarımı yaklaşımı ile yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology-RSM) kullanılarak pH, HAuCl₄ (tuz derişimi) ve inkübasyon süresinin optimizasyonu yapıldı. Ancak öncesinde faktörlerin alt-üst limitlerinin belirlenebilmesi amacıyla OVAT (One Variable at A Time) çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.5.1 OVAT (one variable at a time) denemeleri

Her seferinde bir parametrenin değiştirilmesi ve diğerlerinin sabit tutulması şeklindeki geleneksel optimizasyon yaklaşımı (OVAT) ile pH ve inkübasyon süresi için denemeler gerçekleştirildi. Diğer faktör olan HAuCl₄ derişimi için literatürde yaygın kullanılan 10⁻² ve 10⁻³ M değerleri dikkate alındı (Zonooz et al., 2012; Gopal et al., 2013; Manivasagan et al., 2015) ve 10⁻³ M'da sabit tutuldu. HFS miktarı ise yöntem gereği 1:1 v/v olarak kullanıldı, inkübasyon sıcaklığı 28°C ve çalkalama hızı 150 rpm'de sabit tutuldu.

pH: AuNP biyosentezini gerçekleştiren enzimlerin köken aldığı mikroorganizmaya göre farklı pH'larda etkinliğinin değişeceği göz önünde bulundurularak geniş bir aralık tarandı. Çalışmada HAuCl₄ derişimi (10⁻³ M) ve inkübasyon süresi (96 saat) sabit tutuldu ve kullanılan aktinomiset izolatlarının alkalifilik doğası dikkate alınarak pH değerleri 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12'ye ayarlandı ve 28°C'de 150 rpm çalkalama hızında 96 saat karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi: Literatür verilerinde aktinomisetler ile yapılan çalışmalarda inkübasyon sürelerinin 12-120 saat arasında değiştiği gözlemlendi (Sadhasivam et. al., 2012; Zonooz et. al., 2012; Ahmad et. al., 2013; Kumar et. al., 2016). AuNP biyosentezinde yapılan ön deneme çalışmalarında izolata ait HFS ile HAuCl₄ çözeltisi eşit hacimlerde (1:1 v/v) karıştırıldı. Bu denemede pH (8) ve HAuCl₄ 10⁻³ M derişiminde sabit tutularak 120

saat karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı ve 12. saatten itibaren örnekler gözlemlendi. İnkübasyon sonunda örneklerin spektrofotometrik ölçümleri ve SEM analizleri yapıldı.

Elde edilen veriler dahilinde faktörlerin alt-üst seviyeleri belirlendi ve istatistiksel optimizasyon çalışmasına geçildi.

3.2.5.2 AuNP biyosentezinin istatistiksel optimizasyonu

Mikrobiyal AuNP (mAuNP) biyosentezinde etkili olan faktörlerden her birinin nanopartikül boyutu üzerine bireysel etkileri ve faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi için istatistiksel deney tasarımı yanıt yüzeyi metodolojisi (Response Surface Methodology - RSM) Design Expert Software 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) programı kullanılarak yapıldı.

Aktinomisetler nötrden alkali ortama kayan pH değerlerinde iyi gelişim gösteren (istisna suşları hariç) organizmalardır. Bu bilgi ışığında ve OVAT deneme sonuçları dikkate alınarak pH etkisinin 6-10 değerleri arasında incelenmesine karar verildi (Sadhasivam et al., 2012; El-Batal and Tamie, 2015). Literatürde kullanılan 10^{-2} ve 10^{-3} M HAuCl_4 (Zonooz et al., 2012; Gopal et al., 2013; Manivasagan et al., 2015) derişimi biraz daha genişletilerek 10^{-1} M ve 10^{-5} M aralığında incelendi. OVAT denemelerinde inkübasyon süresi sonuçları değerlendirildiğinde sürenin 48-96 saat aralığında incelenmesine karar verildi.

AuNP biyosentezinde etkili olduğu daha önce belirlenen 3 bağımsız değişkenin (pH, süre ve tuz derişimi) bireysel ve/veya ikili etkileri ile bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimlerin süreç/proses (nanopartikül boyutu) üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve optimum düzeylerinin belirlenmesi için merkezde 6 tekrarı içeren 2^3 -Tam faktöriyel Merkezi Kompozit Tasarımı (Central Composite Design-CCD) seçilerek deney tasarımı yapıldı. Tasarım matrisinde 8 faktöriyel, 6 aksiyal ve merkezde 6 tekrar noktası olmak üzere toplamda 20 deney tasarımını içeren model elde edildi (**Tablo 3.2**).

Tablo 3. 2 CCD (Merkezi Bileşen Tasarımı) modeline göre önerilen deney tasarımı

Deney no	A:pH (pH)	B:HAuCl₄ Derişimi (mM)	C: İnkübasyon süresi (saat)
1	8.00	50.01	72.00
2	8.00	50.01	72.00
3	9.19	20.28	57.73
4	8.00	100.00	72.00
5	9.19	20.28	86.27
6	8.00	50.01	48.00
7	8.00	50.01	72.00
8	8.00	50.01	72.00
9	6.00	50.01	72.00
10	6.81	20.28	86.27
11	6.81	20.28	57.73
12	6.81	79.73	86.27
13	9.19	79.73	86.27
14	8.00	50.01	72.00
15	6.81	79.73	57.73
16	8.00	50.01	96.00
17	8.00	50.01	72.00
18	10.00	50.01	72.00
19	9.19	79.73	57.73
20	8.00	0.01	72.00

Bölüm 3.2.2'de anlatılan şekilde gerçekleştirilen fermentasyon çalışmalarından sonra HFS miktarı (1:1 v/v), çalkalama hızı (150 rpm) ve sıcaklık (28°C) sabit tutularak programın verdiği koşullarda gerçekleştirilen AuNP sentezinin ardından yanıt olarak partikül boyutu kullanıldı. Önerilen modelin istatistiksel açıdan hesaplanan değerlere uygunluğu regresyon katsayısı (R^2) analizi, modelin deney sonuçlarına uygunluğu Fischer testi (F-testi), sonuçların güvenilirliği ve her bir parametrenin etkinliği varyans analizi (ANOVA) ile test edildi.

3.2.5.3 Doğrulama deneyleri

CCD modelinin uygulanabilirliğini ve deneylerin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla doğrulama deneyleri gerçekleştirildi. Program tarafından önerilen 30 farklı doğrulama deneyinden (**Tablo 3.3**) 3 deneme deseni azaltma yapılarak seçildi ve AuNP biyosentezi gerçekleştirildi. Doğrulama deneyleri seçiminde aşağıdaki kriterler dikkate alındı.

- i)* En az altın tuzu kullanılan ilk 10 deney deseni (1, 19, 12, 25, 20, 4, 13, 30, 10 ve 3)
- ii)* <50 nm boyutunda nanopartikül veren 6 desen (20, 3, 13, 25, 4 ve 30)
- iii)* En kısa inkübasyon süresine sahip 4 desen (3, 13, 20 ve 30)
- iv)* İki farklı pH şartı gerektiren 3 desen (3, 13, ve 30)

Sentezlenen AuNP'lerin boyut ve dağılımı SEM ve DLS analizi ile incelendi. Deneysel veriler ve regresyon eşitliğinden elde edilen veriler kıyaslanarak, sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarının programın verdiği %95 güven aralığı (Confidence Interval-CI) ve tahmin aralığının minimum ve maksimum değerleri arasında olup olmadığı kontrol edildi.

Tablo 3. 3 Doğrulama deneyleri

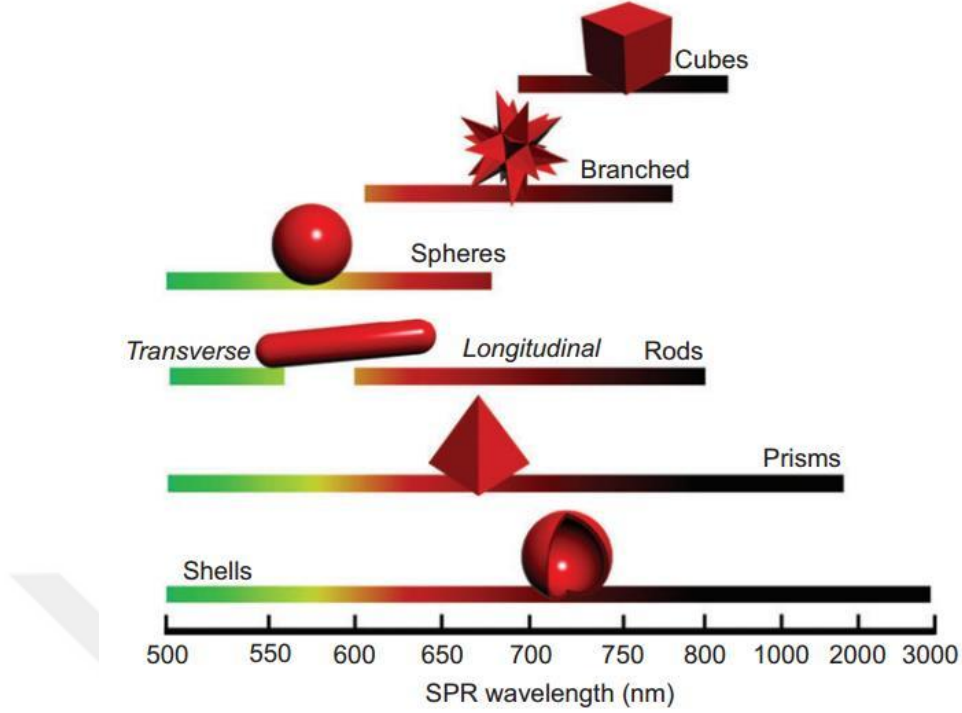
	İnkübasyon koşulları			AuNP (nm)	Güven aralığı değerleri	
	pH	HAuCl ₄ (mM)	İnkübasyon süresi (saat)	Beklenen	%95 CI Düşük	%95 CI Yüksek
1	6,85	21,84	67,41	86,07	65,77	117,46
2	7,07	76,40	77,08	73,27	58,57	94,30
3	7,39	39,43	58,49	46,72	39,92	55,43
4	8,69	36,60	80,22	49,47	42,06	59,03
5	9,14	68,58	80,67	72,82	58,21	93,72
6	8,53	59,32	61,91	46,05	39,39	54,57
7	7,29	67,10	65,26	53,58	45,21	64,52
8	7,21	73,67	73,55	62,99	51,84	78,17
9	6,89	67,54	80,16	69,46	56,01	88,41
10	8,88	38,46	82,73	53,44	44,95	64,61
11	7,29	55,58	69,43	47,98	40,84	57,18
12	7,25	23,63	80,25	62,00	50,76	77,44
13	7,39	37,37	67,62	47,49	40,54	56,42
14	8,85	77,70	60,73	72,32	57,83	93,05
15	8,32	60,75	78,08	44,13	37,85	52,13
16	7,73	62,40	65,84	44,43	38,08	52,51
17	8,55	75,41	59,24	58,78	48,65	72,46
18	6,94	70,23	81,00	70,00	56,53	88,96
19	7,49	23,46	75,97	56,11	46,48	69,09
20	7,84	33,26	70,12	44,64	38,22	52,84
21	7,64	53,11	78,28	42,48	36,49	50,08
22	8,07	61,97	66,03	43,36	37,21	51,19
23	9,17	55,94	80,49	63,89	51,74	80,89
24	7,24	47,28	81,10	48,17	40,94	57,50
25	7,54	30,17	83,18	49,05	41,65	58,62
26	7,94	76,93	80,70	55,02	45,57	67,76
27	9,16	78,29	76,40	94,39	71,18	131,13
28	7,83	75,90	75,77	54,19	45,09	66,36
29	7,44	55,19	65,55	45,11	36,62	53,41
30	8,73	37,57	72,27	49,91	42,38	59,65

3.2.6 AuNP karakterizasyon çalışmaları

Altın nanopartiküllerin birçok teknik kullanılarak karakterizasyonu yapılmaktadır. Fakat karakterizasyonda tek bir teknik kullanmak yeterli olmadığından birden fazla tekniğin bir arada kullanılması önerilmektedir. Çalışma kapsamında uygulanan karakterizasyon teknikleri bu başlık altında sunulmaktadır.

3.2.6.1 UV-Vis spektroskopisi

UV-Vis Spektroskopisi AuNP karakterizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Nano boyutlu metal partiküllerin (Au, Ag, Cu), 360-700 nm arasındaki dalga boylarında özel ışık absorpsiyon özelliği bulunmaktadır. Mie teorisi, elektromanyetik dalgaların (ışık) küresel partiküllerin yüzeylerinden geri saçılması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu teoriye göre eğer bir elektromanyetik frekansın dalga boyu, karşılaştığı küresel nanopartikülün çapından daha küçükse, nanopartikül yüzeyinde bulunan serbest elektronların titreşimi artar, rezonans salınımını indükler ve bu fenomen “Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)” olarak adlandırılır (Mie, 1976; Boisselier and Astruc, 2009; Zheng et al., 2012). Plazmon bandı frekansının küresel ve küresel olmayan (çubuk, prizma, üçgen, tetrapod, küp) morfolojilerdeki altın nanopartiküllerin farklı olan SPR etkisi **Şekil 3.2**'de görülmektedir. AuNP'lerin büyüklüğünün değişmesiyle de farklı renklerde ışık saçılması sonucu çeşitli renkler gözlenmektedir (Huang et al., 2006; Boisselier and Astruc, 2009; Chanana and Liz-Marzan, 2012). Küresel AuNP'ler spektrofotometre ölçümlerinde karakteristik olarak 500-550 nm aralığında SPR bandı vermekte ve çözeltilerin renkleri ise partikül boyutuna göre kırmızı, mor, kahverengi veya turuncu olabilmektedir (Yeh et al., 2012; Elahi et al., 2018).



Şekil 3. 2 Farklı şekillerdeki AuNP'lerin ana SPR bantları (Chanana and Liz-Marzan, 2012)

Bu çalışmada mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin ve AuNP-BSA konjugatlarının karakterizasyonu ve stabilite çalışmalarında UV-Vis spektroskopisi kullanıldı. Ayrıca AuNP biyosentezi boyunca sentez ortamının renk değişimi (sarıdan, pembe-kırmızı-mor tonlara dönüşümü) gözlemlendi ve fotoğraflandı.

Sentezlenen AuNP'lerin optik analizinde HFS karşı ölçüm alınırken, AuNP-BSA konjugatlarının incelenmesinde ise analiz öncesi yıkama işlemi uygulandı.

Yıkama protokolü; bu aşamada iki kat fazla hacimde UPS (ultra saf su) içeren Eppendorflara (1:2 v/v hacimde, 1000 ml UPS içerisine 500 µl örnek) AuNP-BSA konjugatları aktarıldı, 13000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı nazikçe uzaklaştırıldı, dibe çöken AuNP-BSA konjugatları temiz başka Eppendorf tüp içerisinde toplanarak üzerine son hacim 1 ml olacak şekilde UPS eklendi.

Örnekler tek kullanımlık küvetlere (1 ml) alındı. Spektrofotometrede 400-800 nm dalga boyu arasında tarama yapılarak SPR bandı belirlendi ve absorbans ölçüldü.

3.2.6.2 Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy - SEM)

Taramalı elektron mikroskopisi, katı örneklerin mikro ve nano yapılarının karakterizasyonu amacı ile kullanılan yöntemlerden biridir. Elektron mikroskopları, ışık mikroskoplarının görünür ışık kullanmasına benzer şekilde görüntüleme için elektronları kullanır. Yüksek voltaj ile hızlandırılan elektron demeti tarafından örnek yüzeyinin taranması, elektronlar ile örnek atomları arasındaki etkileşimlerin dedektör sistemler tarafından algılanarak ekrana aktarılması prensibine dayalı çalışmaktadır (Suzuki, 2002; Johal, 2011). Sentezlenen AuNP'lerin ve hazırlanan AuNP-BSA konjugatlarının agregasyon, şekil, ortalama boyut aralığı ve dağılımı (monodispers veya polidispers) hakkında bilgi edinmek ve yanı sıra protein koronasını görselleştirmek amacıyla SEM analizi gerçekleştirildi.

Sentezlenen AuNP'lerin biyosentez ortamından ayrılması ve AuNP-BSA konjugatlarının saflaştırılması amacıyla yıkama protokolü (Bkz. 3.2.6.1) uygulandı. Kolloidal çözeltilerden 5 µl alüminyum folyo üzerine aktarıldı, 55°C'de örneklerin kuruması sağlandı ve analiz gerçekleştirildi.

AuNP-BSA konjugatlarının karakterizasyonu ve mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin (mAuNP) yüzeyindeki protein koronasını görmek amacıyla (350.000x büyütmede) örnekler incelendi. Aynı büyütmede kimyasal yöntem ile sentezlenen ticari AuNP'ler (tAuNP) ve onların BSA ile konjuge (tAuNP-BSA) edilen örnekleri de incelenerek karşılaştırıldı. Örnekler yukarıda bahsedilen aynı yıkama protokolü uygulanarak analiz için hazırlandı. Analiz, hizmet alımı kapsamında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü – Tümleşik Araştırma Merkezi'nde (İYTE - TAM) ve Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) gerçekleştirildi.

3.2.6.3 Dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering - DLS) analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), 1 nm ile 10 µm aralığındaki polimerlerin, proteinlerin ve diğer nano ve mikro partiküllerin boyut dağılımını karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. DLS tekniği kullanılarak sıvı bir ortam içerisinde yüzen veya askıda kalan partiküllerin, ortamdaki diğer partiküllerin/çözücü moleküllerin

bombardmanı ile rastgele oluşturduğu Brownian hareketinin hızı ölçülür ve partikül boyutu ile ilişkilendirilir. Numune üzerine lazer ışığı gönderilerek ve numunedeki partiküllerden saçılan ışık detektör üzerine düşürülür. Saçılan ışık yoğunluğunun/şiddetinin zamana karşı değişiminin ölçülmesi temeline dayalı bir tekniktir. Partikülün hareketine, büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığına bağlı olarak saçılan ışığın şiddeti değişmektedir. DLS yöntemi ile hidrodinamik çap ve molekül ağırlığı, dağılım indeksi, partikül boyutu ve dağılımı, difüzyon katsayısı ve izoelektrik nokta tayini gibi özellikleri saptanabilmektedir (Patri et al., 2006; Baalousha and Lead; 2007; Sapsford et al., 2011).

Nanopartiküllerin kolloidal çözeltiler içerisindeki davranışlarını incelemek açısından DLS analizi yapılması oldukça önemlidir ve Zeta-sizer cihazları kullanılarak ölçüm yapılmaktadır. Sentezlenen AuNP'lerin ortalama boyut dağılımı, polidispersite indeks (PdI) değerinin saptanması ve stabilite çalışmalarında (AuNP ve AuNP-BSA konjugatları) zeta potansiyelinin ölçülmesi amacıyla DLS analizi gerçekleştirildi. DLS analizi için AuNP biyosentez çözeltisinden 1 ml polistiren küvet içerisine alındı ve Zeta sizer cihazı ile ölçüm yapıldı. Boyut dağılımı ve polidispersite indeks (PdI) değerinin saptanmasının ardından elde edilen veriler CCD tasarımında yanıt olarak kullanıldı. Analiz Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarında bulunan Zeta – Size Nano ZS (Malvern) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.6.4 Fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

IR spektroskopisi görünür bölge ile mikrodalga bölgesi arasında kalan enerjinin moleküller veya kimyasal gruplar tarafından soğurulmasının ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Madde yapısını ve fonksiyonel grupları analiz etmek için kullanılır. IR spektrometresi ile kullanılan cihazın aksesuarlarına bağlı olarak katı, sıvı ve gaz haldeki numuneler analiz edilebilmektedir. Bu yöntemle bilinmeyen malzemelerin yapısı nitel olarak tanımlanabildiği gibi, kompleks bir karışımdaki bileşenlerin nicel ölçümleri de yapılabilmektedir. IR spektroskopisinde herhangi bir bileşiğin yapısı hakkında bilgi sahibi olmak, moleküllerin yapısını aydınlatmak veya yapısındaki değişiklikleri incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Bileşiğin alınan IR spektrumu ile yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri, yapının aromatik veya alifatik olduğuna dair bir bilgi edinebilmektedir (Cantor and Schimmel, 1980; Ulman et al., 2013).

Proteinlerin serbest amin, karboksil veya fosfat grupları yoluyla AuNP'ler ile etkileşime girdiği ve kolaylıkla bağlanabildiği bilinmektedir. Yüzeye bağlanan protein molekülleri hem indirgeyici hem de stabilize edici ajanlar olarak işlev görmektedir (Das et al., 2009; Lokina et al., 2014). Mikrobiyal sentezin doğası gereği hücresiz fermentasyon sıvısından (HFS) gelen indirgeyici/stabilize edici biyomoleküllerin ve aynı zamanda AuNP-BSA konjugatlarının karakterizasyonunda, AuNP'lerin yüzeyindeki BSA varlığını belirlemek amacıyla IR Spektroskopisi yöntemi kullanıldı.

Bunun için HFS, AuNP, AuNP-BSA ve tek başına BSA içeren örnekler -50°C 'de 0,020 mbar vakum altında 24 saat liyofilize edildi. Örnekler tekrar nem tutmaması amacıyla analiz zamanına kadar desikatörde bekletildi. $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ aralığında spektrumu çekilen örneklerin sergilediği piklerin temsil ettiği fonksiyonel gruplar literatürden belirlendi (Mocan et al., 2015; Shanmugasundaram et al., 2017; Yang et al., 2019). Analiz, Perkin Elmer Spectrum Two modeli cihaz ile gerçekleştirildi.

3.2.6.5 X-ışını kırınım difraktometresi (X-Ray Diffraction - XRD) analizi

XRD yöntemi, ultraviyole ışınlardan daha kuvvetli fakat gamma ışınlarından daha zayıf enerjili X ışınlarının kristal yapılı maddeye nüfuz etmesi sonucu, kristal fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X ışınlarını karakteristik olarak kırması ve bir kırınım profili oluşturması prensibine dayanmaktadır. Kırınım olayında kristal düzlemine gönderilen X-ışınları kristal yüzeyinin altındaki atom düzlemlerine kadar ulaşır ve atomlar tarafından bu ışınlar saçılır. Ancak X ışınları kristal düzlemlerine herhangi bir açı ile çarparsa kırınım gerçekleşmez ve bir kırınım (difraksiyon) piki gözlenmez. X ışını demetinin kristal düzlemlere Bragg açısı olarak bilinen belirli bir açı ile çarpması ve kırınım olayı Bragg kanununa dayalı fiziksel bir model oluşturulması ile mümkün olmaktadır. XRD analizi, katı ve toz örneklerin kristal yapısı, kristal yönelimi, kristal formu veya kristal fazı hakkında bilgi sağlamakta ve basit inorganik tuzlardan, kompleks biyolojik moleküllerin analizine kadar pek çok alanda kullanılmaktadır (Johal, 2011; Zanchet et al., 2011). Analiz için örneklere Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi yıkama basamağı uygulandı. Ardından -50°C 'de 0,020 mbar vakum altında 24 saat liyofilize edilen örnekler analiz zamanına kadar desikatörde bekletildi. Analiz hizmet alımı kapsamında Philips X'Pert Pro modeli cihaz ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü – Tümleşik Araştırma Merkezi'nde (İYTE - TAM) gerçekleştirildi.

3.2.6.6 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

XPS nanopartiküllerin yüzey bileşimleri hakkında hem niceliksel hem de niteliksel bilgi veren oldukça hassas bir tekniktir. Analizde X-Işınları numuneye gönderilir, numuneden çıkan fotoelektronlar dedektör tarafından toplanır ve enerjileri ölçülür. Gönderilen X ışınları, numuneye mikron derinliğinde nüfuz edebilir ancak enerji kaybı olmadan dışarı atılan fotoelektronlar, numunenin sadece en üst 10 nm'lik kısmından gelebilmektedir. Fotoelektronların ölçülen kinetik enerjileri X-Işınlara enerjisinden çıkarıldığında elektronların bağlanma enerjilerini verir. Bağlanma enerjileri, her bir atomun kendine özgü enerji seviyesi için spesifik olduğundan bu teknikle örnek yüzeyinde bulunan elementler tespit edilebilmekte ve nispi miktarları da belirlenebilmektedir. Yüzeydeki atom türlerinin belirlenmesinin yanı sıra, XPS bu atomların oksidasyon durumları hakkında da bilgi verebilmektedir (Daniel and Astruc 2004; Tai et. al., 2011; Chevrier et al., 2012).

Analiz için örnekler Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi yıkama basamağı uygulandı. Ardından örnekler -50°C'de 0,020 mbar vakum altında 24 saat liyofilize edildi ve analiz zamanına kadar desikatörde bekletildi. Cihaz H ve He dışındaki tüm elementler hakkında ve malzeme yüzeyinden 0-10 nm aralığında girişim yaparak malzemenin kimyasal yapısı hakkında bilgi vermektedir. Mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin yüzeyinin kültür sıvısından gelen protein yapıdaki bileşenler ile kaplı olması nedeniyle numunenin aynı bölgesine Argon iyon demeti bombardmanı ile 10-20-50-100 ve 200 nm derinliğinde aşındırma yapıldı. Analiz hizmet alımı kapsamında Thermo Scientific K-Alpha modeli cihaz ile Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (MATAL) gerçekleştirildi.

3.2.7 AuNP ve AuNP-BSA konjugatının stabilitesi

Zeta potansiyelinin ölçümü partiküllerin stabilitesi hakkında bilgi sağlamaktadır. Zeta potansiyeli, partikül ile partikülün içinde bulunduğu sıvı arasında oluşmakta, partiküller arasında itme ve çekme kuvvetlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Sıvı ortam içerisindeki belli bir yüke sahip olan partikül, süspansiyon içerisindeki aynı yüke sahip iyonları iterken; farklı yüke sahip iyonları ise çeker. Bu itme ve/veya çekme kuvvetleri sonucunda yüklü partikül yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşmakta ve ardından yüklü

partikül yüzeyinden dışa doğru yayılan bir yüzey oluşmaktadır. Yayılan bu yüzey içerisinde “kayma yüzeyi” olarak adlandırılan bir sınır bulunmaktadır. Yüklü partikül ve onun etrafında bulunan iyonların kayma yüzey sınırına kadar olan kısmı tek bir parça olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyindeki potansiyel “Zeta Potansiyeli – ζ (+/-mV)” olarak adlandırılır ve hem partikül yüzey yapısından hem de içerisinde bulunduğu sıvı ortamdan etkilenir (Baalousha and Lead; 2007; Clogston and Patri, 2011; Sapsford et al., 2011).

Stabilite çalışmasında hem sentezlenen AuNP'ler hemde AuNP-BSA konjugatlarının değerlendirilmesi gerçekleştirildi. Sentezlenen AuNP 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi yıkanarak son hacim 1 ml olacak şekilde UPS içerisine alındı. Uzun süre depolanan örneklerin stabilite değerlendirmesinde koloidal AuNP çözeltisi tek kullanımlık kılcal küvet içerisine aktararak -150 mV ve +150 mV aralığında zeta potansiyeli ölçümü yapıldı. UV-Vis spektroskopisi ile 400-800 nm dalga boyu arasında tarama yapıldı.

AuNP-BSA konjugatlarının stabilite değerlendirilmesinde ise *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında kullanılan % 10 FBS içeren RPMI 1640 besin ortamına aktararak stabilitesi test edildi. Hazırlanan örnekler 37°C'de 12 saatten 72 saate kadar inkübe edildi. Ardından örnekler 12 saatlik periyotlarda 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi yıkanarak son hacim 1 ml olacak şekilde UPS içerisine alındı. Ardından tek kullanımlık kılcal küvet içerisine aktararak -150 mV ve +150 mV aralığında zeta potansiyeli ölçüldü ve UV-Vis spektroskopisi ile 400-800 nm dalga boyu arasında tarama yapıldı. Analiz Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü bünyesinde Biyomimetik Mikrosistemler Laboratuvarında bulunan Zeta – Size Nano ZS (Malvern) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.8 AuNP miktar tayini

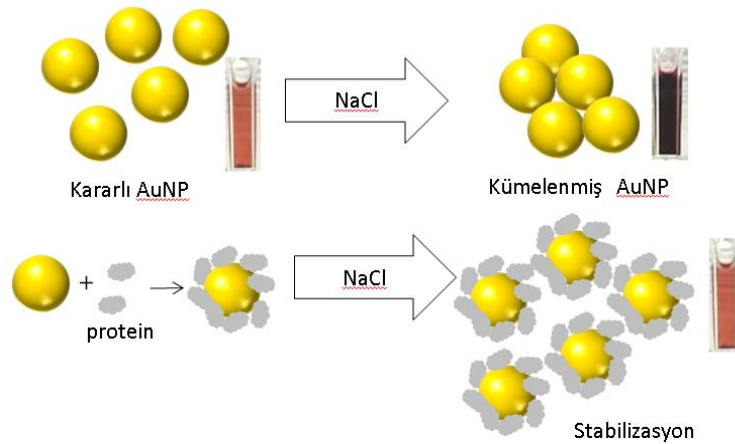
Mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin miktarının tayininde referans olarak ticari firmadan (BBI Solutions, EM.GC40) temin edilen AuNP'ler (kimyasal yöntem ile sentezlenen) kullanıldı. Üretici firma tarafından belirtilen 40 nm boyutunda, küresel ve mililitresinde 9.00×10^{10} nanopartikül bulunan koloidal altın sıvısı referans alınarak standart eğri çıkarıldı. Koloidal altın sıvısından iki katlı seri seyreltme yapıldı, 527 nm'de absorpsiyon ölçülerek standart eğri grafiği çizildi ve formülünden ml'deki mikrobiyal altın nanopartikül miktarı belirlendi.

3.2.9 AuNP-BSA konjugatı oluşturma ve saflaştırma

3.2.9.1 Kritik flokülasyon konsantrasyonu

BSA, insan serum albümine olan yapısal ve fonksiyonel benzerliği, düşük maliyetli olması, geniş kullanım potansiyeline sahip olması ve zayıf immünojenite göstermesi nedeniyle çalışma kapsamında model antijen olarak tercih edildi (Tsai et al., 2011; Dykman et al., 2018).

Altın nanopartiküllerin biyomoleküller ile konjuge edilmesinde nanopartiküllerin, molekül ile stabil olduğu konsantrasyonun belirlenmesi “Kritik Flokülasyon Konsantrasyon Testi (Critical Flocculation Concentration, CFC)” ile yapılmaktadır. AuNP ile BSA konjugatlarının kritik flokülasyon konsantrasyonunun belirlenmesinde koloidal halde bulunan ticari AuNP (tAuNP) (40 nm) ve çalışma kapsamında sentezlenen mikrobiyal AuNP'ler (mAuNP) (43-46 nm) kullanıldı (Dykman et al., 2018). Koloidal altın solüsyonuna tuz çözeltisi (1.7 M NaCl) eklenerek kümelenmenin gözlemlendiği konsantrasyon belirlenmektedir (Şekil 3.2). Böylece kümelenmenin görüldüğü konsantrasyonun bir üst değeri kullanılarak AuNP başına gerekli minimum protein miktarı/minimum antijen miktarı belirlenmekte ve bu işlem “Gold Number” olarak isimlendirilmektedir. Koloidal altının rengi olan pembe/kırmızı tonlardan mavi/mor renge döndüğü konsantrasyon, kritik flokülasyon konsantrasyonu olarak nitelendirilmektedir (Xie et al., 2003; Dykman et al., 2018).



Şekil 3. 3 AuNP'lerin tuz ile flokülasyonunun şematik gösterimi

AuNP'ler ile BSA konjugatının oluşturulmasında basit karıştırma (simple mix) yöntemi uygulandı.

- Altın nanopartiküllerin saflaştırılmasında, hem ticari AuNP'lerin (tAuNP) içerisinde bulunduğu çözeltinin (üretici firmanın kullandığı çeşitli stabilize edici ajanlar) hem de mikrobiyal AuNP'lerin (mAuNP) üretim basamağından kaynaklı fermentasyon ortamından gelen bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla yıkama basamağı uygulandı. Her iki gruba ait kolloidal altın çözeltilerinden 500 µl alınarak içerisinde 1 ml UPS bulunan Eppendorflara aktarıldı (yıkama işlemi 1:2 v/v hacimde gerçekleştirildi) ve 13000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından üst sıvı nazıkçe uzaklaştırıldı ve dibe çöken AuNP'ler temiz bir Eppendorf tüp içerisinde toplandı.
- tAuNP kolloidal çözeltisi içerisinde her ml için tahmini 9.00×10^{10} altın nanopartikül bulunduğu firma tarafından belirtilmektedir. Buradan yola çıkılarak, eşit oranda AuNP içermesi gereğiyle optik dansitesi (OD) eşit olacak şekilde mAuNP çözeltileri hazırlandı. Kolloidal altın çözeltilerinin (1 ml de), tAuNP için 527 nm'de ve mAuNP için 546 nm'de absorbansı 0,5 olacak şekilde ayarlandı.
- Kolloidal özelti içinde bulunan altın nanopartiküllerin nispeten homojen dağılımını sağlamak için aralıklarla vorteks uygulandı ve ardından 96'lık mikro plate kuyularına 200 µl AuNP özelti eklendi.
- Altın nanopartiküller ile konjuge edilecek BSA özeltisi (10 mg/ml) 0,01 M fosfat tamponlu tuz (PBS) özeltisi (pH 7,4) ile hazırlandı.
- Kritik flokülasyon konsantrasyonunun belirlenmesi için kuyulardaki BSA konsantrasyonu; 500-1,95 µg/ml aralığında iki katlı seri seyreltme işlemi yapılarak 9 seyreltme olacak şekilde hazırlandı (Homojen dağılım sağlanması için sürekli up-down yapıldı). Kontrol olarak ise sadece kolloidal altın çözeltisi kullanıldı.
- Ardından kapağı kapatılan ve parafilm ile sarılan mikro plate, 450 rpm'de 2 saat süre ile mikroplate çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından tüm kuyulara 1,7 M NaCl özeltisi eklendi, 5 dakika sonra kuyulardaki flokülasyon durumu incelendi ve AuNP'ler ile konjuge edilecek minimum antijen (BSA) miktarı belirlendi.

3.2.9.2 Konjugat oluşturma ve saflaştırma

Konjugatların hazırlanmasında; 1 ml kolloidal altın solüsyonlarının optik yoğunluğu 0,5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 200 µl AuNP solüsyonunda son konsantrasyon 62,5 µg/ml olacak şekilde BSA eklendi (Dykman et al., 2018). Konjugasyonun gerçekleşmesi için 450 rpm'de 2 saat süre ile karanlık ortamda mikropate çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı ve ardından yıkama işlemi gerçekleştirildi. Konjugatların saflaştırılmasında ise mikro plate kuyularından toplanan AuNP-BSA konjugatları iki kat fazla hacimde UPS içeren Eppendorflara aktarıldı (1:2 v/v hacimde, 1000 ml UPS içerisine 500 µl konjugat) ve 13000 g'de 4°C'de 30 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. st sıvı nazikçe uzaklaştırıldı, dibe çöken AuNP-BSA konjugatları başka bir Eppendorf içerisinde toplanarak *in vitro* alışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de stoklandı.

3.2.10 AuNP-BSA konjugatının karakterizasyonu

BSA ile konjuge edilen mAuNP'lerin bu kısımda belirtilen teknikler kullanılarak karakterizasyon çalışmaları yapıldı. AuNP'lerin proteinler ile kolaylıkla ve gcl etkileşime girdiği bilinmektedir (Das et al., 2009; Lokina et al., 2014). AuNP'lerin SPR etkisi nanopartikül yüzeyindeki değişikliklere duyarlıdır. Partikül yüzeyi fonksiyonelleştirilmeden önce ve sonra gözlenen SPR spektrumları farklılık göstermekte ve bu plazmonik kaymalar (dalga boyu genişliği ~5-15 nm) nanopartikül yüzeyinin işlevselliği hakkında bilgi vermektedir (Kannan et al., 2011).

Bu amaçla AuNP'lerin yüzeyine adsorbe edilen BSA proteini ile olan etkileşimi UV-Vis spektroskopisi (Bkz. 3.2.6.1) ve FT-IR analizi (Bkz. 3.2.6.4) ile değerlendirildi. SEM analizi ile AuNP-BSA konjugatlarının agregasyon durumu, ortalama boyut aralığı gözlendi (Bkz. 3.2.6.2).

3.2.10.1 Toplam protein tayini

Biuret, Bradford, BCA (Bikinkoninik asit/Bicinchoninic acid) ve Lowry yöntemleri konsantrasyonu bilinmeyen biyolojik örneklerdeki toplam protein miktarının tayininde kantitatif protein ve proteomik analizlerin yapılması için kullanılmaktadır. Tüm bu

yöntemlerdeki ortak nokta proteinler ile yönteme spesifik reaktifler arasında oluşan reaksiyonların absorbanstaki değişikliklerinin ölçümüne dayalıdır (Ho et al., 2014).

AuNP'ler ile BSA konjugatının oluşturulmasında partikül yüzeyine adsorbe olan toplam protein miktarının tayini Bradford analizi ile gerçekleştirildi. Analiz  retici firmanın (Merck Millipore) prosedürüne göre uygulandı. Test 0.01-0.1 mg/ml konsantrasyon aralığında gerçekleştirildi. BSA ile standart protein çözeltisi hazırlandı ve standart eğrisi çıkarıldı. 0.1 mg/ml konsantrasyonda standart BSA ana stok çözeltisi hazırlandı. Bu stoktan 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ve 0.1 mg/ml konsantrasyonlarında seri seyreltmeler yapıldı. AuNP-BSA konjugatların saflaştırılmasında yıkama basamağında gerçekleştirilen santrifüj işlemi ardından başka Eppendorf tüpler içerisinde toplanan üst sıvılardan 25  l örnek ile 250  l Bradford reaktifi tek kullanımlık küvetlerde karıştırıldı, oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra spektrofotmetre ile 595 nm'de absorbans ölçüldü. Üst sıvılarda mevcut olan AuNP yüzeyine adsorbe olmayan BSA miktarı standart eğri grafiğinden hesaplandı ve konjugat hazırlama başlangıç BSA konsantrasyonundan çıkarılarak AuNP yüzeyine adsorbe olan BSA miktarı tayin edildi.

3.2.11 mAuNP'lerin sitotoksitesinin ve adjuvan potansiyelinin değerlendirilmesi

mAuNP'lerin biyoyumlulukları 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile L929 (fare deri fibroblast hücreleri) ve makrofaja farklılaşan U937 (monosit benzeri insan histiositik lenfoma hücreleri) hücre hatları kullanılarak analiz edildi. mAuNP'lerin adjuvan potansiyeli, aşı adjuvanı olan alum ile karşılaştırmalı olarak makrofaja farklılaşan U937 hücrelerinin ürettiği proinflamatuvar IL-6 (interlökin 6) ve TNF-  (Tümör nekroz faktör alfa) sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Ayrıca mAuNP'lerin makrofaj hücreleri tarafından alımları konfokal mikroskop ile incelendi.

3.2.11.1 U937 hücre kültürü

Hücrelerin   zd r lmesi ve pasajlanması

- -86 C'de çalışma stoğundan 1 adet U937 monosit hücre kriyot p  37 C su banyosunda çözdürüldü.

- Çözünen hücrelerin üzerine 2 ml iki kez inaktive edilmiş %10 FBS (Fetal Sığır Serum) eklenerek 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 4°C'de 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminin ardından üst sıvı uzaklaştırıldı, pellet %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besin ortamı ile süspanse edilerek hücre kültürü flaskına alındı ve %90 üzerinde nemliliğe sahip 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Hücre kültüründen alınan örneklerle tripan mavisi ile hücre sayımı sonucu %90 üzeri canlılıkta ve $3-5 \times 10^6$ canlı hücre/ml hücre yoğunluğuna ulaşıldığında (yaklaşık 3-4 gün) son hücre konsantrasyonu 5×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde pasajlama yapıldı.

Hücre sayımı

- Hücre sayımı için seyreltme faktörü 1:10 olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Bunun için 1,5 ml'lik mini santrifüj tüpüne 50 µl %0,4'lük tripan mavisi çözeltisi ve 400 µl PBS eklendikten sonra sayım yapılacak hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Süspansiyon köpük oluşturmayacak şekilde dikkatlice homojenize edildi.
- Neubauer hemositometresi ve lamel %70'lik etil alkol ile temizlendi ve 50 µl boyanmış hücre solüsyonu hemositometre lamı ile lameli arasına yavaşça pipetlendi. Mikroskopun 10X objektifi kullanılarak dört büyük karedeki canlı ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılarak mililitredeki canlı ve ölü hücre sayısı aşağıda verilen denklem kullanılarak belirlendi.

$$\text{Hücre konsantrasyonu (hücre/ml)} = \frac{\text{Dört büyük karede sayılan toplam hücre sayısı}}{4} \times 10^4 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

Hücrelerin dondurularak uzun süreli stoklanması

- Sayımı yapılan hücrelerin dondurularak stoklanması amacıyla her ampule 1 ml dondurma vasatı içerisinde 5×10^5 hücre/ml konsantrasyonda hücre olacak şekilde hücre dondurma vasatı [(%90 serum + %10 DMSO) içerisine eklendi ve

homojenize edildi.

- Hücre süspansiyonu kriyotüplere (1 ml) aktarıldı ve -86°C derin dondurucuda 1 gece bekletildikten sonra sıvı azot tankına alındı.

3.2.11.2 U937 insan monosit hücrelerinin makrofaja farklılaştırılması

DMSO, retinoik asit, vitD3, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), IFN-gamma gibi çeşitli uyaranlardan yalnızca herhangi biri ya da birkaçının kombinasyonu kullanılarak indüklenen monositlerin olgun makrofajlara farklılaştığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (Baek et al., 2009). En güçlü tümör teşvik eden ajanlardan biri olan PMA ile hücreler uyarıldığında, hücreler monositik farklılaşmaya maruz kalırlar. Bu şekilde hücreler tipik monosit/makrofaj morfolojisini kazanır, yapışkan hale gelir, farklılaşma ile ilgili antijenleri ifade eder ve proliferate olamazlar (çoğalamazlar) (Verhoeckx et al., 2004). Çalışmada U937 insan monosit hücreleri makrofajlara farklılaştırmak amacıyla PMA uygulaması yapıldı. Bunun için;

- Kültive edilen U937 insan monosit hücreleri 96'lık mikro plaka kuyularına 5×10^4 hücre/göz, 4 kuyulu cam hücre kültürü slaytlarına (hücresel alım) ise 5×10^4 hücre/göz olacak şekilde eklendi ve PMA uygulaması öncesi 37°C'de 2 saat inkübasyona/dinlenmeye bırakıldı.
- Ardından her kuyuya final konsantrasyonu 16 nM olacak şekilde PMA eklendi ve makrofaja farklılaşması için 20 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Debelec Butuner et al., 2012). Inkübasyon sonunda makrofaja farklılaşmanın doğrulanması için yapışık kümeler ışık mikroskobu ile gözlemlendi.
- PMA içeren besin ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen RPMI 1640 besin ortamı ile 2 kez yıkandı.
- Yıkama işleminin ardından 96 plaka için 100 µl, 4 kuyulu cam hücre kültürü slaytları için ise 500 µl taze serum içeren RPMI 1640 besin ortamı eklendi ve hücreler 6 saat inkübasyona/dinlenmeye bırakıldı. Bu şekilde makrofaja farklılaştırılan hücreler, *in vitro* hayvan hücre kültürü denemelerinde yapılacak sitotoksikite testi, sitokin seviyelerinin belirlenmesi ve hücresel alım deneylerinde kullanılmak üzere deney gruplarının eklenmesine hazır hale getirildi.

3.2.11.3 L929 hücre kültürlerinin hazırlanması

Sentezlenen altın nanopartiküllerin sitotoksosite testi için L929 hücre hattı kullanıldı. Bunun için;

- Önceden -86°C'de stoklanan L929 hücreleri 37°C su banyosunda çözündürüldü.
- Çözünen hücrelerin üzerine eklenerek FBS eklenerek 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 4°C'de 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminin ardından üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0,1 penisilin-streptomisin içeren EMEM besin ortamı ile süspanse edilerek hücre kültürü flaskına alındı ve %90 üzerinde nemliliğe sahip 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Hücreler kültür kabının yaklaşık %80 yüzeyini kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasaj işlemi gerçekleştirildi.
- Kültür kabındaki eski besin ortamı uzaklaştırıldı ardından hücreler Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen PBS ile 1 kez yıkandı ve tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin kalkması için flask 5 dk 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından hücre süspanسیونuna serumlu besin ortamı eklendi, homojenize edildi, santrifüj tüpüne toplandı ve 4°C'de 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- Hücre sayımının ardından, 96'lık mikro plaka kuyularına 1x10⁴ hücre/göz konsantrasyonda hücre olacak şekilde L929 hücrelerin ekimi yapıldı ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. Böylece hücreler sitotoksosite testi için kullanılmak üzere deney gruplarının eklenmesine hazır hale getirildi.

3.2.11.4 Sitotoksosite testi

Mikrobiyal yöntem ile sentezlenen altın nanopartiküller ve BSA ile oluşturulan konjugatların (mAuNP-BSA), *in vitro* hücre kültürü denemelerinde uygulanacak konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla öncelikli olarak sitotoksosite deneyleri gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalar ile elde edilen veriler ışığında sitokin seviyelerinin belirlenmesi ve nanopartiküllerin hücresel alım çalışmalarında da deney gruplarında aynı konsantrasyonda mAuNP kullanıldı. Yanı sıra ticari olarak temin edilen altın

nanopartiküller (tAuNP) ve BSA ile oluşturulan konjugatlarının da (tAuNP-BSA) konsantrasyonu aynı olacak şekilde hazırlandı.

Hücre canlılığının/sitotoksitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek kolorimetrik yöntemlerden biri olan MTT [3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi kullanıldı. Bu yöntem tetrazolyum tuzu olan MTT'nin (sarı renk), formazana indirgenerek suda çözünmeyen formazan kristallerine (mor renk) dönüşmesi esnasında oluşan renk değişiminin spektrofotometrik okuma ile canlı/ölü hücre sayısının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Proliferasiyona uğrayan hücrelerin artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyum halkası kırılır ve formazan kristallerine indirgenir. Yalnızca canlı hücreler renk değişimi meydana getirebilirken, ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneğine sahip olmadığından (mitokondrieleri aktif değil) herhangi bir renk değişimine neden olmazlar. Sitotoksitesi değerlendirilecek maddenin uygulanmadığı kontrol (negatif) grubundaki hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, maddenin uygulandığı hücrelerin canlılığı kontrol grubuna göre belirlenir (Tokur ve Aksoy, 2017; Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

Sitotoksiste çalışmalarında L929 fare deri fibroblast hücreleri ve makrofaja farklılaşan U937 insan monosit hücreleri kullanılarak ISO 10993-5:2009 (EN) standart prosedürüne uygun şekilde MTT testi yapıldı. Pozitif kontrol (PC) olarak %50 v/v DMSO kullanılırken, negatif kontrol (NC) olarak besin ortamı kullanıldı.

mAuNP ve mAuNP-BSA, yüksek konsantrasyondan başlanarak düşük konsantrasyona kadar (5×10^{11} – 1×10^9 NP/ml) makrofaja farklılaşan U937 hücrelerine uygulandı. Bu test sonucu toksik olmadığı belirlenen iki farklı konsantrasyon seçilerek diğer deney grupları ile pozitif ve negatif kontrol grupları bir arada kullanılarak sitotoksiste testi tekrar gerçekleştirildi (**Tablo 3.4**).

L929 hücreleri üzerinde yalnızca mAuNP grubunun sitotoksik etkisi değerlendirildi. Sitotoksiste testinin yapılması amacıyla hücrelerin bulunduğu 96'lık mikro plaka kuyularına sırasıyla 2×10^{11} , 1×10^{11} , 5×10^{10} , 2×10^{10} , 1×10^{10} , 5×10^9 , 2×10^9 ve 1×10^9 NP/ml konsantrasyonlarında mAuNP eklenerek biyoyumluluk 24 saat boyunca aşağıda protokolü sunulan MTT ile test edildi ve hücreler üzerindeki sitotoksik etki istatistiksel

olarak değerlendirildi. Kontrol grubu olan BSA konsantrasyonu, kritik flokülasyon konsantrasyonu testinde saptanan AuNP'lerin etrafına bağlanabilen minimum protein miktarı olarak belirlendi ve *in vitro* denemelerde tüm gruplarda aynı konsantrasyon (62,5 µg/ml) kullanıldı.

Bağışıklık indüksiyonunu arttırdığı bilinen ve yaygın olarak kullanılan diğer bir kontrol grubu olan alüminyum tuzu (alum) içine literatürden belirlenen 50 – 1000 µg/ml aralığında farklı konsantrasyonların sitotoksik etkisinin değerlendirildiği bir ön deneme çalışması yapıldı (Parween et al., 2011; Ghimire et al., 2012; Mold et al., 2016). Sitotoksisite testinin yapılması amacıyla makrofaja farklılaşan U937 hücrelerinin bulunduğu 96'lık mikro plakanın ilk kuyusuna 500 µg/ml konsantrasyonda alum eklendi ve 31,25 µg/ml konsantrasyona (5. kuyu) kadar iki katlı seri seyreltme yapıldı. Uygulanan grupların biyoyumlulukları 24 saat boyunca aşağıda protokolü sunulan MTT ile test edildi ve hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler ışığında toksik olmayan konsantrasyon belirlendi ve *in vitro* denemelerde tüm gruplarda aynı konsantrasyon (250 µg/ml) kullanıldı. Alum-BSA konjugatı oluşturulurken belirlenen alum ve BSA konsantrasyonları kullanıldı.

MTT protokolü

- Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS çözeltisi ile hazırlanan MTT solüsyonu (5 mg/ml) filtreden (0,22 µm por çaplı) geçirilerek steril edildi ve Eppendorflara porsiyonlanarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de stoklandı.
- U937 makrofaj hücreleri ve L929 hücrelerinin ortamına sitotoksisitesi değerlendirilen deney grupları eklenerek 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca muamele edildi.
- Ardından kuyulara %10 MTT çözeltisi içeren serumsuz besin ortamı eklendi ve 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde 3 saat daha inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından üst sıvı uzaklaştırıldı ve her kuyuya 100 µl DMSO eklendi.
- 96'lık mikro plaka oda sıcaklığında 5 dk 300 rpm'de çalkalandıktan sonra 570 nm'de spektrofotometre ile hücre canlılığı kolorimetrik olarak ölçüldü (Gerlier and Thomasset, 1986).
- Tüm denemeler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, ABD) programı ile

değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı ve önem düzeyleri Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 3. 4 U937 hücreleri için sitotoksosite testi deney grupları

Gruplar	Test edilen bileşik
Mikrobiyal AuNP	mAuNP (3×10^{10} NP/ml) mAuNP (6×10^{10} NP/ml)
Ticari AuNP	tAuNP (3×10^{10} NP/ml) tAuNP (6×10^{10} NP/ml)
AuNP ve BSA konjugatları	mAuNP – BSA (3×10^{10} NP/ml) mAuNP – BSA (6×10^{10} NP/ml) tAuNP – BSA (3×10^{10} NP/ml) tAuNP – BSA (6×10^{10} NP/ml)
Kontrol grupları	BSA (62,5 µg/ml) Alum (250 µg/ml) Alum (250 µg/ml) - BSA (62,5 µg/ml) DMSO (Pozitif Kontrol Grubu-%100 ölü) Madde uygulaması yapılmayan hücreler (Negatif Kontrol Grubu-%100 canlı)

3.2.11.5 Sitokin seviyelerinin belirlenmesi

Patojenler ve/veya tehlike sinyalleri ile aktive olan makrofajlar, doğal bağışıklık tepkisinin ana bileşeni olan sitokin ve kemokin salınımını serbest bırakırlar. Sitokinler ve kemokinler, yaşam için hormonlar ve nörotransmitterler kadar önemli olan, hücreler arası iletişime aracılık eden güçlü sinyal molekülleridir. Sitokinler, çeşitli uyarılara karşı yanıt olarak özel hücreler tarafından salgılanan, hedeflenen hücrelerin davranışını etkileyen, hücrel düzenleyici proteinlerdir. Belli bir sitokin vücuttaki çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanabilir ancak aynı biyolojik etkiyi gösterir. Bu moleküller, lokal ve sistemik inflamasyonun düzenlenmesinden hücrel proliferasyona, metabolizmaya, kemotaksiye ve doku onarımına kadar çeşitli süreçleri yönetmektedir. Sitokinlerin birincil işlevi inflamasyonu düzenlemektir ve bu nedenle hücrel ve humoral bağışık yanıtın gelişiminde hayati rol oynarlar. Proinflamatuvar (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23 ve TNF- α) ve antiinflamatuvar (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β ve IFN- α) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Makrofajlar inflamatuvar uyarılara maruz kaldıklarında TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-12 gibi sitokinlerin salınımını başlatarak ilk immün yanıtı oluştururlar (Abbas et al., 2012; Arango Duque and Descoteaux, 2014; Murray and Stow, 2014).

Bu çalışmada adjuvan potansiyelinin araştırılmasında IL-6 ve TNF- α sitokin seviyelerinin belirlenmesi ELISA testi ile gerçekleştirildi. Bunun için TNF- α ve IL-6 sitokinlerine özgü hazırlanan TNF- α Human (Invitrogen, 88-7346-22) ve IL-6 Human (Invitrogen, 88-7066-22) ELISA kitleri ticari olarak temin edildi. Sitotoksosite çalışmaları ile uygulama konsantrasyonları belirlenen deney grupları ve kontrol grupları (**Tablo 3.5**) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına uygun olarak ELISA testi gerçekleştirildi. Bunun için;

- *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin ortamına 14 farklı deney grubu eklendi, 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde pozitif kontrol grubu Lipopolisakkarit (LPS) haricindeki diğer gruplar 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.
- LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan bir endotoksindir ve dokulara nüfuz ettiğinde akut inflamasyona neden olmaktadır. Makrofaj hücreleri LPS ile hızla indüklenerek pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar sitokin salınımı gerçekleştirmektedir. Sitokin seviyelerinin saptanmasında çalışmalarımızın kontrolünü sağlamak amacıyla makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin ortamına pozitif kontrol grubu olarak 10 ng/ml LPS eklendi ve 6 saat boyunca inkübasyona bırakıldı (Bastus et al., 2009; Debelec Butuner et al., 2012).
- İnkübasyonun ardından sitokin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmak üzere kuyulardaki şartlandırılmış besin ortamları (conditioned media/CM) aseptik koşullarda steril Eppendorflara toplandı, 4°C' de 1 dk 1400 rpm'de santrifüj edildi.
- Ölçüm kitlerinde belirtilen şekilde önce standart kuyuları ardından deney grupları prosedür doğrultusunda hazırlandı.
- Tüm denemeler üç tekrarlı gerçekleştirildi ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, ABD) programı ile değerlendirildi. Deney grupları arasındaki farkların istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı ve önem düzeyleri Tukey testi ile değerlendirildi.

Tablo 3. 5 Sitokin seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan deney grupları

Gruplar	Test edilen bileşik
Mikrobiyal AuNP	mAuNP (3×10^{10} NP/ml) mAuNP (6×10^{10} NP/ml)
Ticari AuNP	tAuNP (3×10^{10} NP/ml) tAuNP (6×10^{10} NP/ml)
AuNP ve BSA konjugatları	mAuNP – BSA (3×10^{10} NP/ml) mAuNP – BSA (6×10^{10} NP/ml) tAuNP – BSA (3×10^{10} NP/ml) tAuNP – BSA (6×10^{10} NP/ml)
Kontrol grupları	BSA (62,5 µg/ml) Alum (250 µg/ml) Alum (250 µg/ml) - BSA (62,5 µg/ml) LPS (Pozitif Kontrol Grubu) U937 - PMA (Negatif Kontrol Grubu) U937 hücresi (Kontrol grubu)

3.2.11.6 Nanopartiküllerin hücresel alımı (cellular up take)

Sentezlenen mAuNP'ler ile hazırlanan AuNP-BSA konjugatlarının adjuvan potansiyelinin araştırılmasına yönelik bir diğer çalışmada makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri tarafından hücresel alım testidir. Optik görüntüleme, doku morfolojisinin, moleküler fonksiyonunun ve metabolizmasının aydınlatılmasını kapsayan bir tekniktir. AuNP'ler SPR nedeniyle yoğun absorpsiyon ve saçılma özelliklerine sahiptir. Bu durum, AuNP'lerin boyut, şekil, yapı, gömme ortamının kırılma indeksine bağlı olarak değişmekte ve optik görüntüleme sistemlerinde kontrast oluşturma özelliği kazandırmaktadır. Buradan yola çıkarak hücre görüntüleri monokromatik lazer ışınlarını kullanan optik görüntüleme sistemi olan konfokal mikroskop (DIC/Diferansiyel Girişim Kontrastı ayarı ile donatılmış) ile incelendi. Hem monokrom ışık altında hemde DAPI (mavi) ve FITC (yeşil) filtreleri kullanılarak aynı bölgelerden alınan hücre görüntüleri toplandı ve karşılaştırıldı.

- AuNP-BSA konjugatının hücresel alımının mikroskop görüntülemesinde tespit edilmesi/izlenmesi amacıyla FITC (fluorescein isothiocyanate) işaretli BSA kullanılarak Bölüm 3.2.9'da anlatılan şekilde konjugatlar hazırlandı.
- Bölüm 3.2.11.2'de anlatıldığı gibi 4 kuyulu cam hücre kültürü slaytlarında makrofaja farklılaşan U937 insan monosit hücreleri hazırlandı (Niikura et al.,

2013; Orłowski et al., 2018).

- U937 makrofaj hücrelerinin ortamına **Tablo 3.6**'da sunulan deney grupları eklenerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca muamele edildi.
- Muamele ardından hücreler PBS ile 3 kez yıkandı ve fiksasyon işlemine geçildi. Hücreleri lam üzerine tespit etmek amacıyla sırasıyla 5 dk metanol ve 30 sn aseton ortamlarında bekletildi. Ardından PBS ile 5 dk yıkanan örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Hücre çekirdeklerini mikroskop altında görselleştirmek amacıyla DNA'nın adenin-timin zengin bölgelerine güçlü şekilde bağlanan ve tipik olarak kromozomal floresan ışığa sağlayan DAPI ile hücreler boyandı. Örneklerin üzerine 20 µl immersiyon-DAPI eklendi ve lamların üzeri lamel ile kapatıldı.
- Konfokal mikroskopta DAPI ve FITC filtreleri ile monokrom ışık altında alınan görüntüler toplandı, karşılaştırıldı ve ImageJ programı (National Institutes of Health, USA) ile analiz edildi. Analiz hizmet alımı kapsamında Zeiss LSM 880 cihazı ile İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Tablo 3. 6 Nanopartiküllerin hücresel alımının belirlenmesindeki deney grupları

1. Kuyu	2. Kuyu	3. Kuyu	4. Kuyu
U937 hücresi	FITC – BSA	3x10 ¹⁰ NP/ml mAuNP – BSA	6x10 ¹⁰ NP/ml mAuNP – BSA

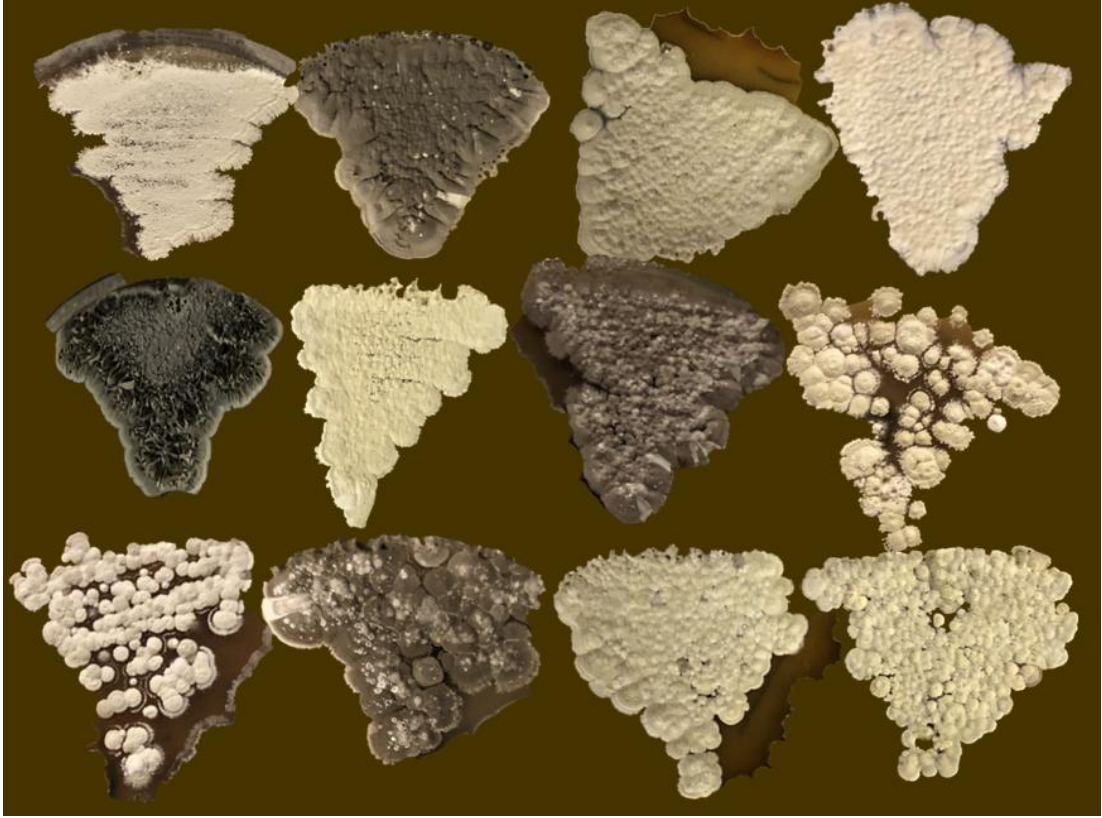
3.2.11.7 Alum-BSA konjugatlarının hazırlanması

- Alum – BSA konjugatlarının hazırlanmasında eşit hacimde (1:1 v/v) alum (ana stok 45 mg/ml) ve BSA (10 mg/ml) karıştırıldı.
- Tüm deney gruplarında eşit konsantrasyonda antijen bulunması amacıyla kritik flokülasyon testi ile belirlenen konsantrasyonda BSA alum tuzlarına adsorbe edildi. Otoklav ile steril edilen alum ve filtreden (0,22 µm por çaplı) geçirilerek steril edilen BSA damla damla aseptik koşullarda eklendi ve 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırıldı (Kim and Lee, 2007; Parween et al., 2011; Cain et al., 2013).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Aktinomiset İzolatlarının Aktivasyonu, Saflık Kontrolü ve Stoklanması

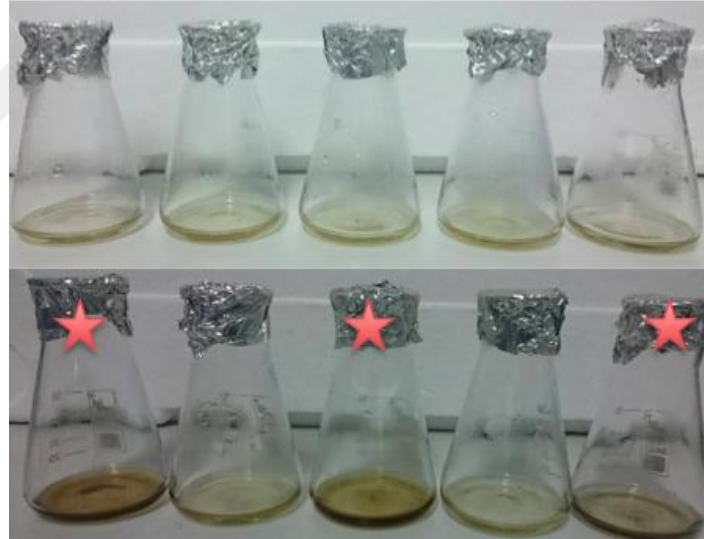
Çalışmada kullanılmak üzere farklı bölgelerden izole edilmiş 30 aday aktinomiset (*Actinobacteria*) izolatu SFM besiyerinde aktive edildi ve GYA besiyerinde tek koloni görünümüleri ile safsızlıkları kontrol edildi. Ardından SFM besiyerinde üretilen izolatların sporları toplanarak çalışma stokları oluşturuldu. Çalışılan izolatların bazılarına ait koloni görünümüleri **Şekil 4.1**'de sunulmuştur.



Şekil 4. 1 Aktinomiset izolatlarından bazılarının SFM agarda morfolojisi 1. sıra soldan sağa; 5SM-03, 2SM-05, 4SM-06, M43-1. 2. sıra soldan sağa; M33-14, 4SM-02, M46-6, M7, 3. Sıra soldan sağa M65-2, 137-KT-13, M33-12, 2M-10

4.2 AuNP Biyosentezi Tarama Çalışmaları

Literatürde aktinomisetler ile yapılan çalışmalar incelendiğinde; biyokütle (misel) kullanılarak hücre içi ya da hücre dışı fermentasyon sıvısı (HFS) kullanılarak hücre dışı AuNP biyosentezinin gerçekleştirildiği görüldü (**Tablo 2.1**). Aktinomisetler tarafından metal nanopartiküllerin sentezinin ağırlıklı olarak hücre dışı gerçekleştiği yayınlanan bir derlemede rapor edilmiştir (Golinska et al., 2014). Hücre içi sentez ilave saflaştırma basamakları gerektirdiğinden tez kapsamında AuNP biyosentezinde HFS kullanılması tercih edildi. Yöntem 3.2.2. bölümünde anlatıldığı şekilde MGYP sıvı besiyerine (sarı renk) inoküle edilen 30 izolatın fermentasyonunun ardından HFS'ları toplandı ve bazı kültür sıvılarının organizmaların sentezledikleri farklı metabolik bileşenler nedeniyle farklı renklerde (koyu kahverengi) olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.2**).

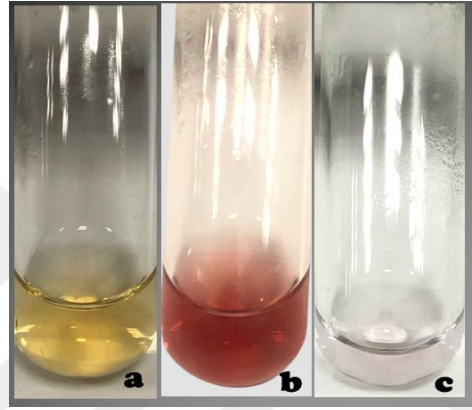


Şekil 4. 2 MGYP sıvı besiyerinde kültürasyon sonrası biyokütlenin uzaklaştırıldığı kültür sıvılarından bazıları - (*) Melanin üreticileri

Aktinomisetler doğal ve sentetik ortamlar üzerinde çeşitli pigmentlerin üretilmesi ile karakterize edilen organizmalardır. Doğal melaninler, bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda fenolik veya indolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşturulan yüksek moleküler ağırlıklı koyu kahverengi veya siyah pigmentlerdir. UV – Vis spektroskopisi taramalarında 200 – 300 nm aralığında en yüksek seviyede absorpsiyon vermesi ve görünür bölgeye doğru absorpsiyon giderek azalması melaninin

karakteristik özelliğidir (Tarangini and Mishra, 2013). **Şekil 4.2'**de sunulan farklı izolatlara ait HFS içerisinde bazı melanin üreticileri de görülmektedir.

İzolatlara ait HFS'ları HAuCl_4 çözeltisi ile 80°C su banyosunda inkübasyonu sonrası **Şekil 4.3'**te AuNP biyosentezini gösteren değişim sunulmaktadır. Biyokütle üretimi esnasında fermentasyon sıvısına salgılanan biyolojik moleküller sayesinde (amino asitler, peptitler, proteinler, organik asitler ve çeşitli metabolitler) altın tuzlarının (HAuCl_4) $\text{Au}^{+3} \rightarrow \text{Au}^{+0}$ indirgenmesi sonucu inkübasyon sonrası renk değişimleri gözlenmektedir (Golinska et al., 2014).

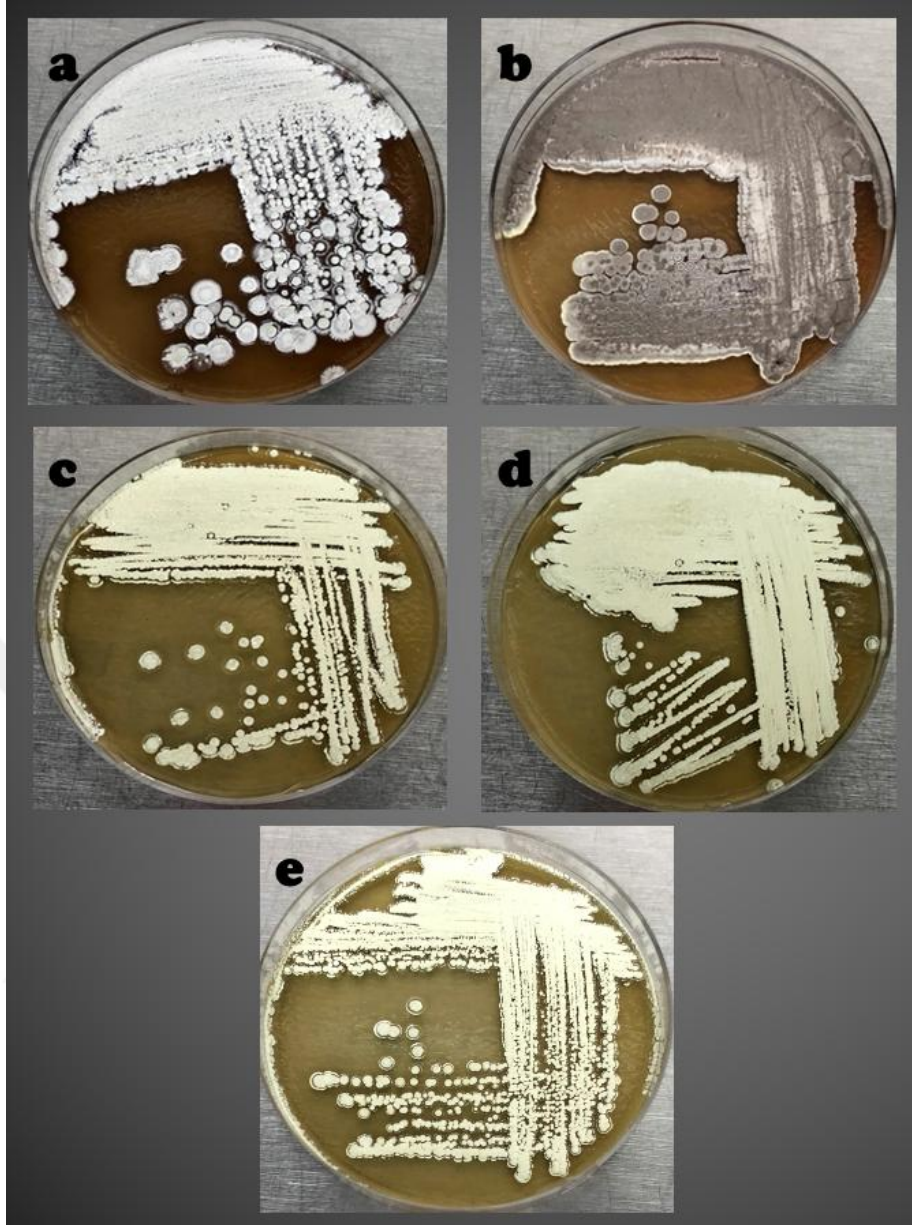


Şekil 4. 3 AuNP biyosentezi a) hüresiz fermentasyon sıvısı b) sentezlenen AuNP c) kontrol grubu (sadece HAuCl_4 çözeltisi)

AuNP biyosentezi sonrası UV-Vis spektrofotometre ile 400-800 nm aralığında tarama sonrası farklı dalga boylarında (200-300 nm) girişim veren melanin üreticisi 13 izolat, 500-550 nm aralığında SPR bandı veren örnekler ve bu örneklerin 550 nm'deki absorpsanları belirlendi (**Tablo 4.1**). Bu veriler değerlendirildiğinde melanin üreten izolatlar ileri çalışmalar için elendi. Literatürde düz üçgen morfolojideki altın nanopartiküllerin yeşil tonlarda renge sahip olduğu rapor edilmektedir (Jain et al., 2007). Çalışmada küresel AuNP'lerin sentezi hedeflendiğinden, M65-2 kodlu izolatın biyosentez çözeltisinin 600 nm'de SPR bandı vermesi ve yeşil tonlarında olması nedeniyle bu izolat da ileri çalışmalar için elendi. **Diğer aday 16 izolatın 550 nm'de absorpsan değerleri incelendiğinde yüksek AuNP biyosentez potansiyeli olduğu düşünülen, yanı sıra yüksek büyüme hızına ve biyokütle miktarlarına sahip 5 izolat; M137-2, 6SM-123, 5SM-03, 4SM-02 ve 3SM-03 ileri çalışmalar için seçildi (Şekil 4.4).**

Tablo 4. 1 İzolatların melanin üretim durumu, spektrofotometrik tarama sonucu ve 550 nm'de absorpsanları

	İzolat	Melanin	500-550 nm tarama	Absorpsan (550 nm)
1	2M2	-	+	1,096
2	M73-1	-	+	0,560
3	M65-2	-		-
4	M137-SY2	Var		-
5	M125-2	Var		-
6	M33-12	-	+	0,789
7	M33-C	Var		-
8	2M6	Var		-
9	2M10	-	+	0,802
10	M46-6	-	+	0,396
11	2SM-24	Var		-
12	M137-2	-	+	1,127
13	M137-KT-13	-	+	0,824
14	M138-S-2A	Var		-
15	6SM-81	-	+	0,990
16	6SM-123	-	+	1,044
17	5SM-03	-	+	1,043
18	6SM-51	Var		-
19	4SM-06	Var		-
20	4SM-02	-	+	1,353
21	M44-1	Var		-
22	M43-1	-	+	0,968
23	M33-7	Var		-
24	M7	-	+	0,834
25	M33-14	Var		-
26	3SM-03	-	+	1,026
27	3SM-04	-	+	0,730
28	2SM-05	-	+	0,936
29	M127-2	Var		-
30	M137-5	Var		-



Şekil 4. 4 Seçilen aktinomiset izolatlarının SFM agarda morfolojisi a) M137-2, b) 3SM-03, c) 4SM-02, d) 5SM-03, e) 6SM-123

4.3 Aday İzolatların AuNP Biyosentezi ve Karakterizasyonu

Bu aşamada seçilen 5 aday izolat ile AuNP biyosentezi bölüm 3.2.2'de anlatılan şekilde tekrarlandı ve ardından biyosentez çözeltilerinin (**Şekil 4.5**) UV-Vis spektroskopisi ile SPR noktaları ve DLS analizi (Zeta sizer) ile de partikül boyut dağılımı belirlendi (**Tablo 4.2**).



Şekil 4. 5 Aday izolatlar tarafından sentezlenen AuNP çözeltilerinin (cam tüp içinde) görünümü

Tablo 4. 2 Aday izolatlar tarafından sentezlenen AuNP'lerin ortalama boyut dağılımları ve optik analizi

İzolat	Z-Average	SPR Bant
4SM-02	84,88 nm	534
	72,43 nm	531
	80,36 nm	531
5SM-03	85,28 nm	533
	83,04 nm	534
	82,12 nm	530
M137-2	67,34 nm	536
	66,06 nm	536
	64,96 nm	534
3SM-03	88,90 nm	541
	93,18 nm	541
	85,53 nm	540
6SM-123	62,51 nm	530
	88,45 nm	534
	92,47 nm	538

Küresel AuNP'ler koloidal çözeltilerde çekirdek boyutu 1 nm'den 100 nm'ye doğru büyüdükçe bir dizi renk (kırmızı, mor, kahverengi, turuncu) sergiler ve genellikle 500-550 nm arasında partikül boyutuna göre yüzey plazmon absorpsiyon zirvesi (SPR bant) gösterir (Yeh et al., 2012; Elahi et al., 2018). Tez çalışmasında seçilen 5 aday izolatın optik analizinde SPR bant ortalamasının 535 nm olması küresel formda nanopartikül sentezlendiğinin göstergesi oldu. Aday izolatlar içerisinde M137-2 izolatı ile yapılan biyosentezde en küçük boyuta sahip (66.12 ± 1.19 nm) AuNP'lerin elde edildiği belirlendi. **Literatürde 20-60 nm aralığındaki AuNP'lerin biyolojik moleküllere bağlanma ilginliklerinin yüksek olması (Torres- Chavolla et al., 2010; Jianrong et al., 2004) ve**

ileri çalışmalarda AuNP ile antijen molekülünün bağlanma durumu göz önüne alınarak bu aralığa en yakın boyutlarda AuNP biyosentezini gerçekleştiren M137-2 izolatı ileri çalışmalar için seçildi.

4.4 M137-2 İzolatının Tanılanması

4.4.1 Genomik DNA izolasyonu, miktar, saflık ve bütünlük değerlendirmesi

M137-2 izolatına ait 3 tekrarlı genomik DNA izolasyonu ile elde edilen DNA'nın çöktürülmesi sonrası nükleik asitlerin saflık kontrolleri nanodrop cihazı ile ölçüldü (**Tablo 4.3**).

Tablo 4. 3 Nükleik asitlerin saflık kontrolü

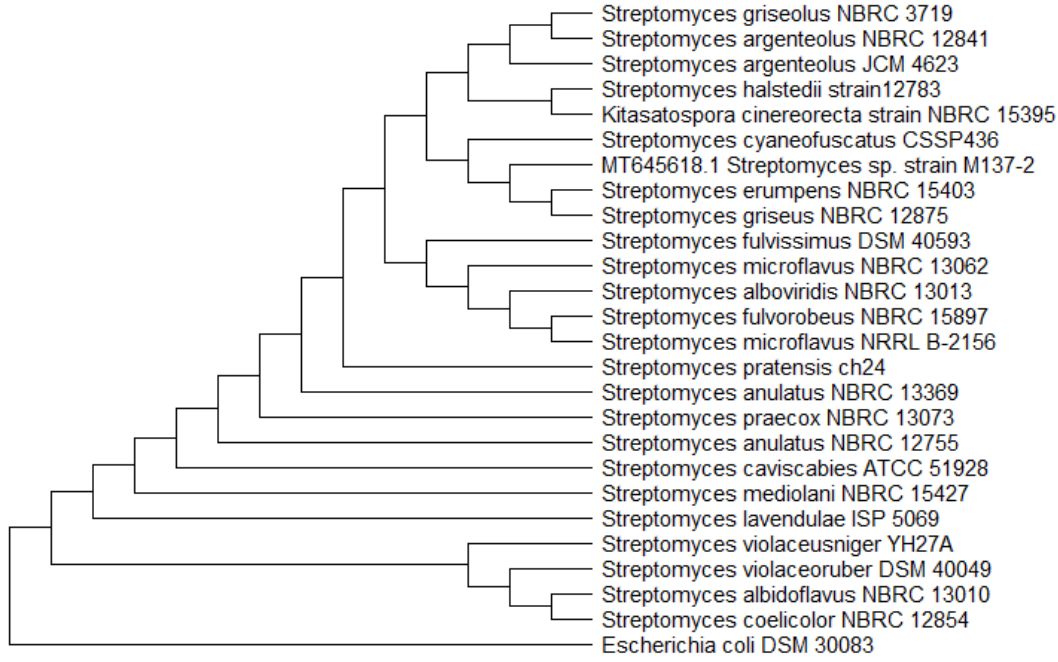
Örnek No	ng/μl	A(260/280)	A(260/230)
1	78,240	1,813	0,972
2	293,57	1,860	1,252
3	98,712	1,750	1,246

4.4.2 PCR, dizi analizi ve filogenetik ağaç

PCR sonrası elde edilen rRNA gen bölgesinin 27F ve 1492 R primerleri ile elde edilen kısmi dizi analizi (**Tablo 4.4**) RefGen firmasının hizmet alımı yolu ile yaptırıldı. DNA dizileri hizalandı, referans organizmalar tespit edildi, Neighbour-joining yöntemi ve 3000 bootstrap değeri kullanılarak MEGA v4.0 programı ile filogenetik ağaç çizildi (**Şekil 4.6**). NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bulunan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) MEGABLAST analizi ile nükleotid veri bankasında dizi karşılaştırması yapılarak izolatın *Streptomyces* cinsine ait olduğu belirlendi. *Streptomyces* sp. M137-2 olarak isimlendirilen izolata ait kısmi rDNA dizisi NCBI GenBank veri tabanına “MT645618” erişim numarası ile kaydedildi.

Tablo 4. 4 *Streptomyces* sp. M137-2 izolatının 16S rDNA kısmi dizisi

27F
GCACACTGTATACCGAACCACCAAGGGGGGCACCATCTCTGATGCTTTCCGGTATTATGTCAAGCCTT GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAAATAAAGCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT CCTTTGAGTTTTAGCTTGCGGCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACG ACGTGGAATGTCGCCAACACTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGAAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTT CGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCC TCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCC CGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAAGCCGCCTACGAG CTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT TAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCG AAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCTGCTG TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTAC CCGTCGTCGCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTTCACCGC CGGAGCTTTTAACCCCGTCCCATGCGGGACAGAGTGTATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTT GTCCCAGAGTGAAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTAATCCACCCCGAAAGG CTTCATCGTCGACTGCAGGTAAGCACCCCCCCCCCGCGT
1492 R
CCCGCCGGGTCCACCTTCGACAGCTCCCTCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCG ACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCT GCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAGTACGACCGGCTT TTTGAGATTGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCATTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCC AAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCT GTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACT TAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGG GCACCATCTCTGATGCTTTCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAA GCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTC CCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTC CCAACGTTAGACGGCGTGGAAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAG CGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGC TACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCTAGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTT AAGCCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAGCCGCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGAC ACGCTTGCGCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG



Şekil 4. 6 M137-2 izolatının 16S rDNA dizi analiz sonucuna dayanılarak çizilen filogenetik ağaç (3000 bootstrap)

4.5 *Streptomyces* sp. M137-2 ile AuNP Biyosentezinin Optimizasyonu

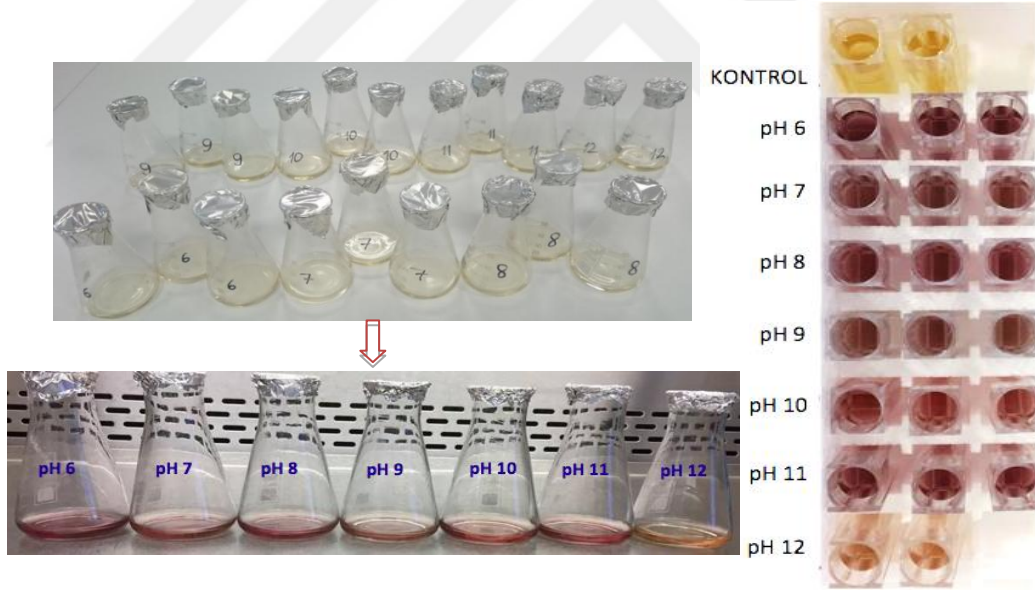
4.5.1 OVAT denemeleri

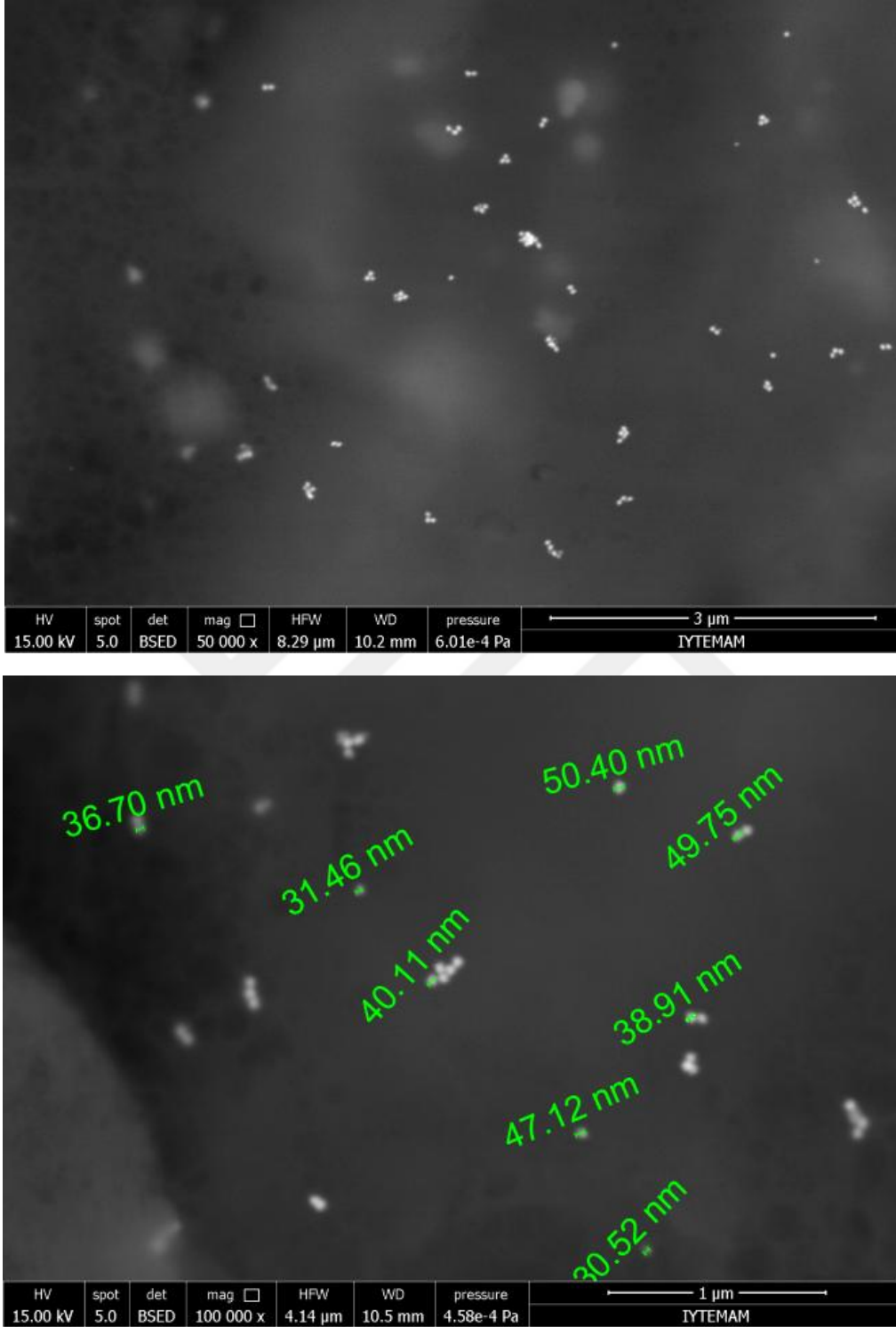
AuNP biyosentezinde, nanopartikül boyutu üzerinde etkili olan 3 bağımsız değişkenin değerlendirilmesi ve optimum düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada öncelikle *Streptomyces* sp. M137-2 kullanılarak OVAT denemeleri gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışması öncesinde bağımsız değişkenlerin min ve max değer aralığını belirlemek amacıyla geleneksel OVAT yaklaşımı uygulanması, sonuçların daha makul ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Hamid and Said, 2018).

Altın tuzu (HAuCl_4) konsantrasyonu sabit tutularak pH (6-12) ve inkübasyon süresinin (12-120 saat) incelendiği OVAT denemelerinde sentezlenen AuNP'lerin spektrofotometrik ölçümleri ve SEM analizi ile şekil ve boyut dağılımı incelendi (**Tablo 4.5, Şekil 4.7, Şekil 4.8**).

Tablo 4. 5 *Streptomyces* sp.M137-2 HFS ile sentezlenen AuNP'lerin optik analizi

pH	SPR Bant	Absorbans
6	557 nm	0,360 $\pm$ 0,019
7	561 nm	0,296 $\pm$ 0,010
8	560 nm	0,313 $\pm$ 0
9	563 nm	0,228 $\pm$ 0,012
10	557 nm	0,218 $\pm$ 0,017
11	558 nm	0,269 $\pm$ 0,014
12	560 nm	0,074 $\pm$ 0,004

**Şekil 4. 7** Farklı pH'larda (6-12) hazırlanan HAuCl_4 çözeltisi ile eşit hacimde karıştırılan hücresiz fermentasyon sıvılarının inkübasyon sonrası gözlenen renk değişimleri



Şekil 4. 8 Sentezlenen AuNP'lerin SEM görüntüleri ve nanopartikül boyutları

Aynı konsantrasyonda altın tuzu (10^{-3} M) kullanılarak farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen biyosentez sonrası en verimli (**Tablo 4.5**) üretimlerin pH 6, 7 ve 8'de

gerçekleştiği belirlendi. Farklı pH denemelerine ait görseller **Şekil 4.7**'de sunulmaktadır. Ayrıca biyosentez çözeltilerinin hiçbirinde 48. saatten önce renk değişimi gözlenmedi ve 120. saatte doğru giderken kümelenme nedeniyle renkler kırmızı tondan mor/siyah tonlarına değişmeye başladı. **Elde edilen sonuçlar AuNP sentezinin pH 11'den sonra azaldığını gösterdiğinden pH için 6-10 aralığı, inkübasyon süresi için ise 48 - 96 saat aralığının optimizasyonda kullanılmasına karar verildi.** Benzer şekilde Aktinomisetler ile yapılan nanopartikül biyosentez çalışmalarında inkübasyon süresinin genellikle 24-96 saat arasında değiştiği bildirilmektedir (Golinska et al., 2014). HAuCl_4 derişiminin alt ve üst limitleri ise literatür bilgileri ışığında 10^{-1} - 10^{-5} M olarak belirlendi. **Farklı pH şartlarında sentezlenen AuNP'lerin SEM analizi gerçekleştirildiğinde pH 7 ve 8 şartlarında 30-50 nm boyutlarında monodisperse (tek dağılımlı) ve küresel AuNP varlığı gösterildi (Şekil 4.8).** Ayrıca farklı pH şartlarında sentezlenen AuNP'lerin küresel morfolojide olduğu SEM görüntülerinde belirlendi. Literatürdeki optimizasyon çalışmaları incelendiğinde geleneksel OVAT yaklaşımının kullanıldığı, istatistiksel bir optimizasyon çalışması yapılmadığı ve sentezlenen partikülün boyut ve şeklinde organizmanın türü, pH, inkübasyon süresi ve altın tuz konsantrasyonunun etkili faktörler olduğu görülmektedir. Literatürde aynı biyotransformasyon koşullarında *Thermoactinomyces* spp. 44 Th ve *Thermomonospora* spp. 67 Th suşlarının farklı boyutlarda küresel AuNP sentezlediği rapor edilmiştir (Kalabegishvil et al., 2013). *Rhodopseudomonas capsulata*'nın kullanıldığı diğer bir çalışmada ise oda sıcaklığında pH 7'de inkübe edildiğinde 10-20 nm boyutunda küresel AuNP'ler; pH 4'de ise üçgen (50-400 nm) ve küresel (10-50 nm) bir arada AuNP sentezlendiği bildirilmektedir (He et al., 2007). Sadhasivam ve ark. (2012), *Streptomyces hygroscopicus* strain BDUS 49 miselleri ile sentezlenen AuNP'lerin morfolojisi üzerinde pH ve reaksiyon süresinin etkisini incelediği çalışmada faktörlerin birbirine bağlı olduğunu, nötr pH'da monodispers yapıda küresel AuNP'ler (2-10 nm) sentezlenirken pH düşürüldüğünde ise farklı boyut aralığında beşgen ve altıgen çok dağılımlı AuNP'lerin sentezlendiğini bildirdiler. *Streptomyces* sp. NK52 izolatına ait HFS ile gerçekleştirilen farklı pH (2 - 3 - 4 - 5), tuz konsantrasyonu (0.5 - 1 - 1.5 - 2 mM) ve sıcaklıklarda (10 - 20 - 30 - 40°C) 10 – 100 nm boyutlarda küresel, üçgen, altıgen polidisperse AuNP'lerin sentezlendiği, optimum koşulların ise pH 4, 2 mM altın tuzu ve 40°C olduğu bildirilmektedir (Prakash et al., 2013). *Streptomyces* sp. ERI-3 HFS ile sentezlenen AuNP proses optimizasyonunda pH, altın tuz konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığı ve süresi incelendiğinde oldukça geniş boyut dağılımına sahip (10-200 nm) küresel ve silindirik AuNP'lerin sentezlendiği, optimum koşullarda (pH 6, 3mM altın tuzu, 30°C ve 12 saat) ise

10-30 nm boyutlarında küresel AuNP sentezi bildirilmektedir (Zoonoz et al., 2012). *Streptomyces hygroscopicus* miselleri ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında optimum pH 7'de, 10^{-3} ve 10^{-4} mM derişimlerindeki altın tuzu çözeltilerinin diğer düşük derişimlerdeki çözeltilere kıyasla daha iyi AuNP sentezlendiği ve 15-30 nm boyutlarında monodispers küresel AuNP'lerin sentezlendiği rapor edilen çalışmalardandır (Waghmare et al., 2014).

4.5.2 AuNP biyosentezinin istatistiksel optimizasyonu

Mikrobiyal AuNP sentezinin istatistiksel optimizasyonunda bağımsız değişkenler olan pH ve inkübasyon süresi için OVAT denemeleri ile, HAuCl_4 derişimi için ise literatür bilgileri ışığında eşik değerleri belirlendi (**Tablo 4.6**). İstatistiksel optimizasyonda bağımsız değişkenlerin bireysel ve birbirleri ile olan etkileşimleri Design Expert (version 7.0.0) programı kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 4. 6 CCD (Merkezi Bileşen Tasarımı) model tasarımı için bağımsız değişkenlerin alt-üst değerleri

Faktör/Parametre	Alt Limit	Üst Limit
pH	6	10
HAuCl_4 Derişimi (mM)	0,01	100
İnkübasyon süresi (saat)	48	96

CCD matrisine göre deneyler gerçekleştirildi, sentezlenen AuNP'lerin ilk olarak UV-Vis spektroskopisi ile optik analizi gerçekleştirildi, DLS analizi ile ortalama parçacık boyutları ölçülerek programa yanıt olarak girildi. CCD modelin sunduğu tasarımda 20 deney içerisinde 6 tekrar deneyini temsil eden 1, 2, 7, 8, 14 ve 17 numaralı deneylerde sentezlenen AuNP'lerin sırasıyla 33,04, 33,11, 40,96, 45,77, 44,23 ve 34,63 nm oldukları ve ortalama boyutun da $38,62 \pm 5,75$ nm olduğu belirlendi. Bu sonuçlarla uyumlu olarak makro görüntüler ve SPR spektrumları incelendiğinde verilerin ve renklerin birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir (**Tablo 4.7** ve **Şekil 4.9**). Altın tuzu (HAuCl_4) konsantrasyonunun en az (deney 20) ya da sınıra yaklaşan pH değerlerinde (deney 9, 15,

18, 19) ve inkübasyon süresinin 96 saate yaklaştığı (deney 12, 13) deneylerde AuNP'lerin sentezinin gerçekleşmediği görülmektedir.

SPR etkisi takip edilerek AuNP'lerin şekil ve boyutuna bağlı olarak değişen ışık absorpsiyonu arasında güçlü bir korelasyon kurulmaktadır (Husseiny et al., 2007; Zheng et al., 2012; Dykman and Khlebtsov, 2012). CCD denemeleri sonrası farklı deney koşullarında farklı boyut ve miktarlarda AuNP sentezi gerçekleştiği, sentez sonrası erlenlerde biyosentez sıvılarının literatür ile uyumlu olarak açık sarıdan, turuncu, pembe, kırmızı, mor renk tonlarına değişimi gözlemlendi (Şekil 4.9).

Tablo 4. 7 CCD deney tasarımı ve yanıtları ile spektrofotometrik tarama sonuçları

Deney	Faktör 1 A: pH	Faktör 2 B: HAuCl ₄ (mM)	Faktör 3 C: İnkübasyon (saat)	Yanıt: AuNP boyut (nm)	Spektrofotometrik tarama (nm) ve Absorbans
1	8.00	50.01	72.00	33.04	522 - 0,794
2	8.00	50.01	72.00	33.11	524 - 1,061
3	9.19	20.28	57.73	99.77	553 - 0,471
4	8.00	100.00	72.00	71.90	548 - 5,250
5	9.19	20.28	86.27	82.14	557 - 0,398
6	8.00	50.01	48.00	43.79	545 - 1,402
7	8.00	50.01	72.00	40.96	530 - 1,370
8	8.00	50.01	72.00	45.77	525 - 0,819
9	6.00	50.01	72.00	157.9	Pik yok
10	6.81	20.28	86.27	98.69	551 - 0,026
11	6.81	20.28	57.73	72.29	541 - 0,389
12	6.81	79.73	86.27	132.4	Pik yok
13	9.19	79.73	86.27	130.7	Pik yok
14	8.00	50.01	72.00	44.23	531 - 1,559
15	6.81	79.73	57.73	195	Pik yok
16	8.00	50.01	96.00	46.97	532 - 1,990
17	8.00	50.01	72.00	34.63	530 - 1,291
18	10.00	50.01	72.00	175.3	Pik yok
19	9.19	79.73	57.73	143.9	Pik yok
20	8.00	0.01	72.00	173	Pik yok



Şekil 4. 9 CCD deney tasarımı sonucu her bir deney koşulunda elde edilen AuNP biyosentez sıvılarının görünümü

Mikrobiyal AuNP biyosentezinde gerçek yanıt fonksiyonunun (nanopartikül boyutu) tahmin edilmesinde, Design Expert programı tarafından öngörülen birçok fonksiyonu içeren ikinci dereceden (kuadratik) denklem elde edildi ve önerilen modelin doğruluğu varyans analizi (ANOVA) ile test edildi. İstatistiksel verilerin değerlendirilmesinde programın önerdiği dönüşüm (Box-Cox Plot for Power Transformations-transform-inverse sqrt-reciprocal) denklemin kök değeri alınarak $y' = 1/\sqrt{y} + k$ yapıldı (Yapılan dönüşüm, y recommend transform inverse square root - lambda=-0.5). %95 güven aralığında model değişkenlerinin p değerinin anlamlılık düzeyi olan Prob>F değerinin $\alpha=0.05$ 'ten küçük olan değişkenlerin anlamlı olduğu, 0.1'den büyük olan model terimlerinin ise anlamsız olduğu kabul edilmektedir (Box et al.,1978). p değerinin anlamlılık düzeyi olan $\alpha=0.05$ 'ten küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir ancak **Tablo 4.8'**de görüldüğü gibi her değişken için Prob>F değeri 0.05'ten küçük değildir ve çok sayıda anlamsız model terimi olduğunda hiyerarşiyi desteklemek için gereksiz olanların çıkarılması böylelikle modelde azaltma yapılarak modelin iyileştirilmesi mümkündür.

ANOVA sonuçlarında görüldüğü gibi F değerleri $\alpha=0.05$ 'ten küçük çıkan ve AuNP'lerin boyutu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkisi olan bağımsız değişkenlerden pH (faktör A) ve H₂AuCl₄ derişiminin (faktör B) ana etkilerinin kareleri (kuadratik etki) A² ve B² model üzerinde istatistiksel olarak anlamlıdır.

İnkübasyon süresinin (faktör C) ise model üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü ve bu nedenle C, AC, BC ve C² bağımsız değişkenleri modelden çıkarılarak model üzerinde iyileştirme yapıldı. Geliştirilen modelin ANOVA sonuçları **Tablo 4.9'**da sunulmaktadır.

Tablo 4. 8 İlk modelin ANOVA sonuçları

Source	Sum Squares	of df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	0.022	9	2.432E-003	7.39	0.0022	significant
A-pH	3.959E-007	1	3.959E-007	1.204E-003	0.9730	
B-HAuCl ₄ derişimi	6.117E-005	1	6.117E-005	0.19	0.6754	
C-inkübasyon süresi	1.125E-006	1	1.125E-006	3.420E-003	0.9545	
AB	5.069E-005	1	5.069E-005	0.15	0.7029	
AC	3.195E-005	1	3.195E-005	0.097	0.7617	
BC	8.538E-005	1	8.538E-005	0.26	0.6215	
A ²	0.015	1	0.015	44.57	<0.0001	
B ²	9.026E-003	1	9.026E-003	27.44	0.0004	
C ²	6.676E-004	1	6.676E-004	2.03	0.1847	
Residual	3.289E-003	10	3.289E-004			
Lack of fit	2.574E-003	5	5.148E-004	3.60	0.0930	not significant
Pure Error	7.150E-004	5	1.430E-004			
Cor Total	0.025	19				
R-Squared (R ²)	0.8694					
Adj R-Squared	0.7518					
Pred R-Squared	0.1715					
Adeq Precision	7.057					

Tablo 4. 9 İyileştirilen modelin/sadeleştirilen ANOVA sonuçları

Source	Sum Squares	of df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	0.021	4	5.262E-003	19.13	<0.0001	significant
A-pH	3.959E-007	1	3.959E-007	1.439E-003	0.9702	
B-HAuCl ₄ derişimi	6.117E-005	1	6.117E-005	0.22	0.6440	
A ²	0.014	1	0.014	51.57	<0.0001	
B ²	8.630E-003	1	8.630E-003	31.38	<0.0001	
Residual	4.125E-003	15	2.751E-004			
Lack of fit	3.411E-003	10	3.411E-004	2.39	0.1748	not significant
Pure Error	7.150E-004	5	1.430E-004			
Cor Total	0.025	19				
R-Squared (R ²)				0.8361		
Adj R-Squared				0.7924		
Pred R-Squared				0.4890		
Adeq Precision				10.683		

Mikrobiyal AuNP biyosentezinde nanopartikül boyutu üzerinde önemli etkiye sahip faktörlerin bireysel ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin etkileri istatistiksel olarak değerlendirildi. Kodlanmış ve gerçek faktörler cinsinden ifade edilen aşağıda verilen

denklemler elde edildi. Denklemlerde Y (nm): nanopartikül boyutunu, A, B ve C sırasıyla; pH değeri (pH), H₂AuCl₄ (altın tuzu) derişimi (mM) ve inkübasyon süresini (saat) ifade etmektedir.

Kodlanmış faktörler cinsinden elde edilen denklemde 1.0/Sqrt (nanopartikül boyutu)

$$Y = +0.16 - 1.703E-004A - 2.116E-003B - 0.031 A^2 - 0.024B^2$$

Gerçek faktörler cinsinden 1.0/Sqrt (nanopartikül boyutu)

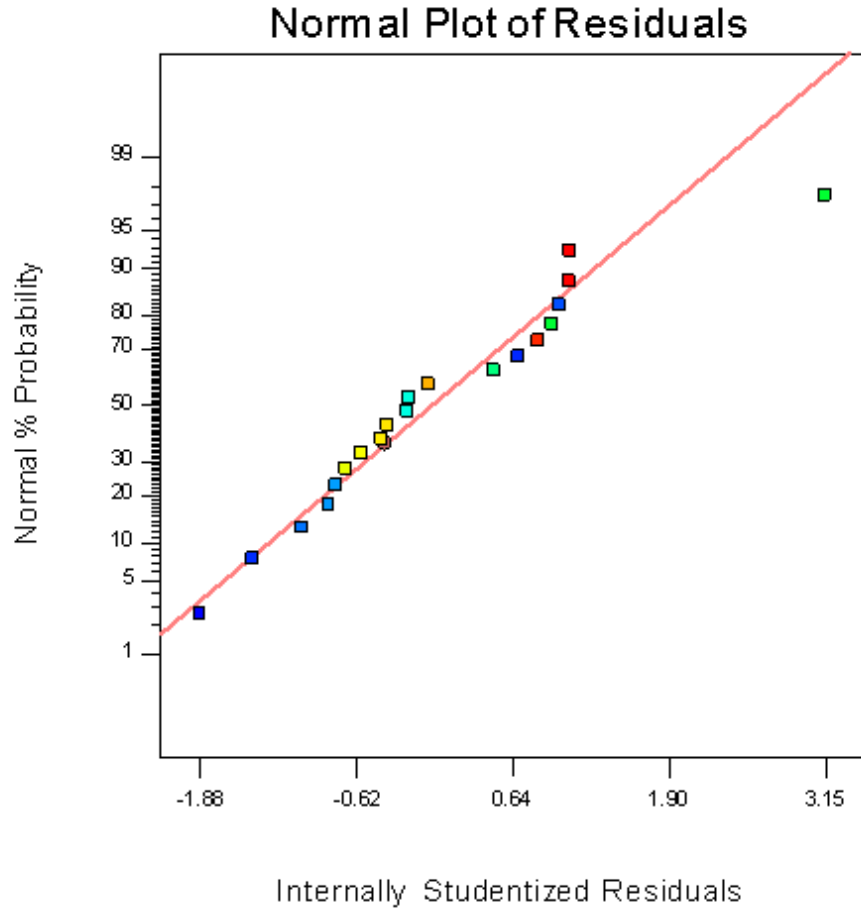
$$Y = -1.32023 + 0.35305 * pH + 2.68456E-003 * \text{tuz konsantrasyonu} - 0.022075 * pH^2 - 2.75548E-005 * \text{tuz konsantrasyonu}^2$$

ANOVA testi sonuçlarında F ve p değerleri modelin mikrobiyal AuNP biyosentezini etkileyen faktörlerin optimizasyonunda kullanılabilecek başarılı bir model olduğunu, p değerinin <0,0001 ve F değerinin 19.13 olması modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ve modelin şans eseri oluşmasının %0,01 gibi çok düşük olasılıkla mümkün olduğunu göstermektedir.

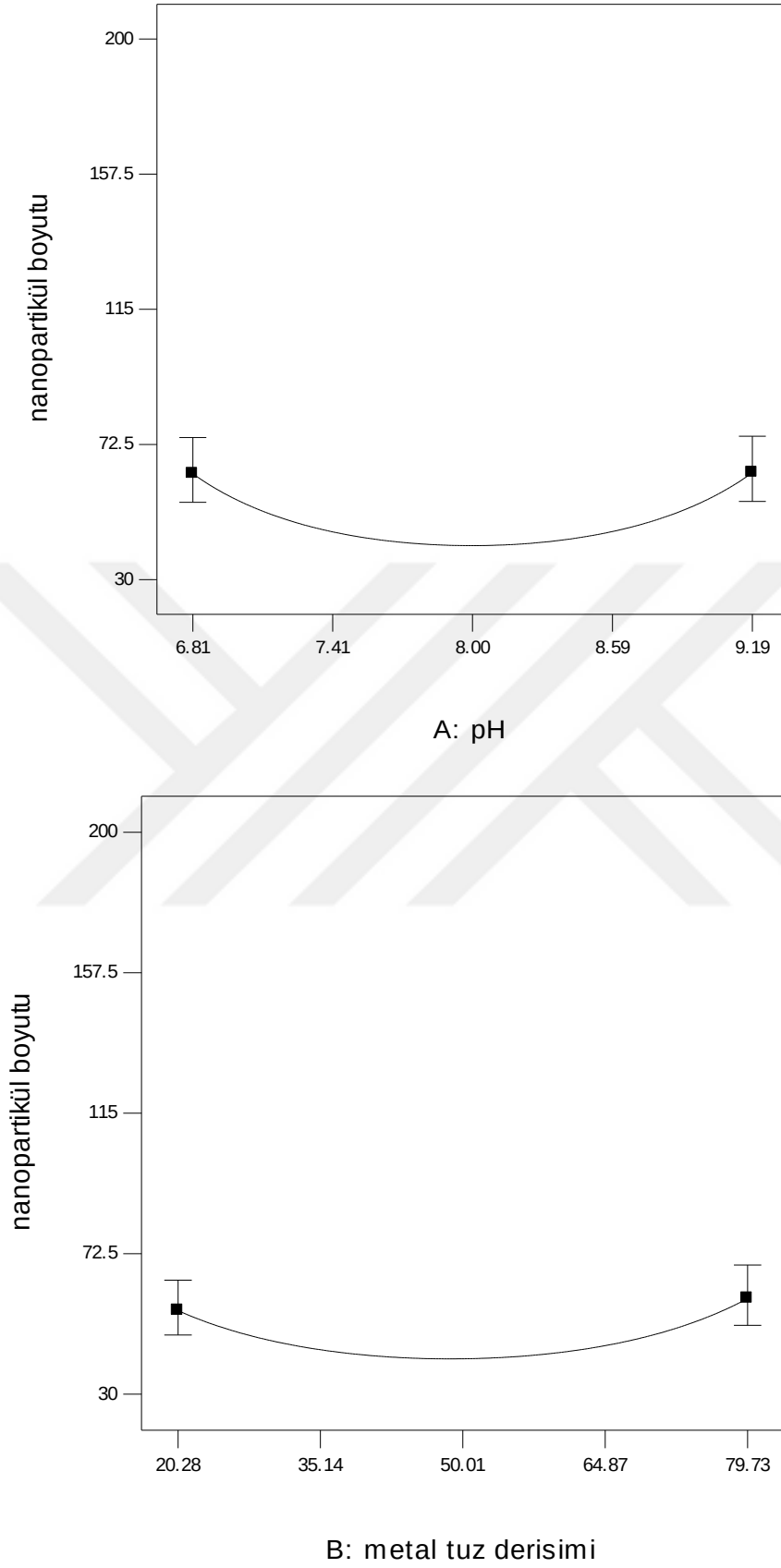
R² değeri her zaman 0 ile 1 arasındadır ve 1'e ne kadar yakın olursa deneysel (gerçek) veriler ile tahmin edilen değerler arasındaki korelasyonun iyi olduğunu ifade etmektedir (Thompson 1982; Castillo, 2007). Modelde R² değerinin 0.8361 bulunması modelin güven aralığı sınırları içerisinde yer aldığını göstermektedir. Standart sapma, regresyon katsayısı ve düzeltilmiş regresyon katsayısı değerleri de hesaplanmıştır. Adeq. Precision değerinin 4'ten büyük olması istenen bir durumdur ve modelde belirlenen 10.683 tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir bir değerdir (Noordin et al., 2004).

Modelin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise *Lack of fit* testidir. Lack of fit değerinin anlamsız (not significant) olması istenen bir durumdur, istatistiksel olarak anlamsız olan Lack of fit sonuçları model ile uyumaktadır. *Lack of fit* değerinin anlamlı (significant) olması modelin değişkenler arasındaki etkileşimi ifade edemediğini göstermektedir (Myers and Montgomery, 1995; Kansal et al., 2005; Box and Draper, 1987). Tahmin edilen değerler ile deneysel veriler yeterli miktarda uyuyorsa sadece modelin doğasında bulunan rastgele hatalar yansıtılmaktadır. Oluşturulan modelde değer anlamsız olarak bulundu.

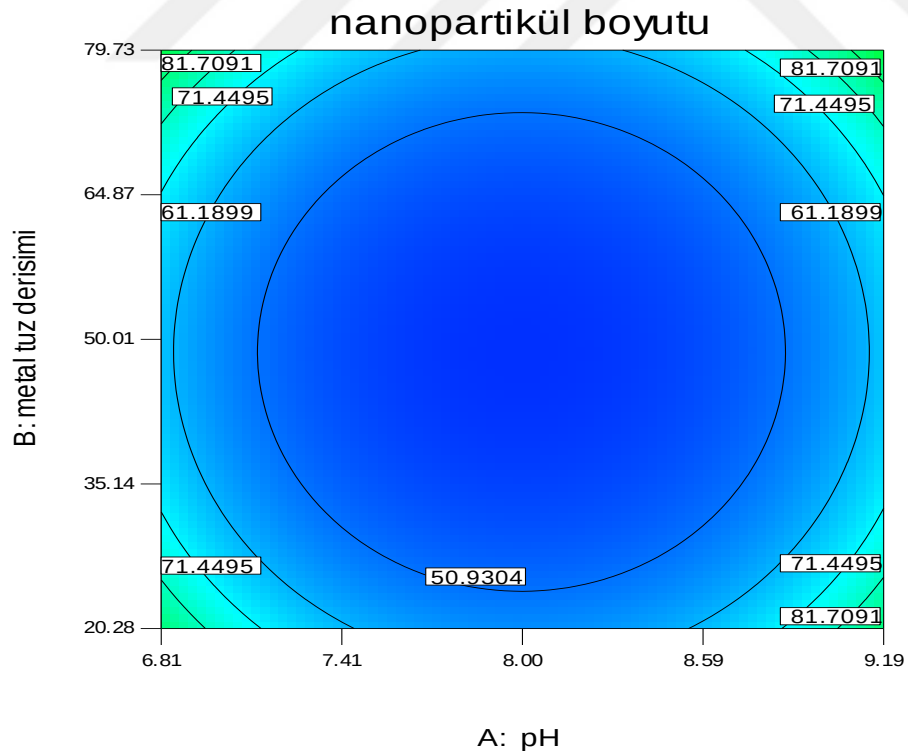
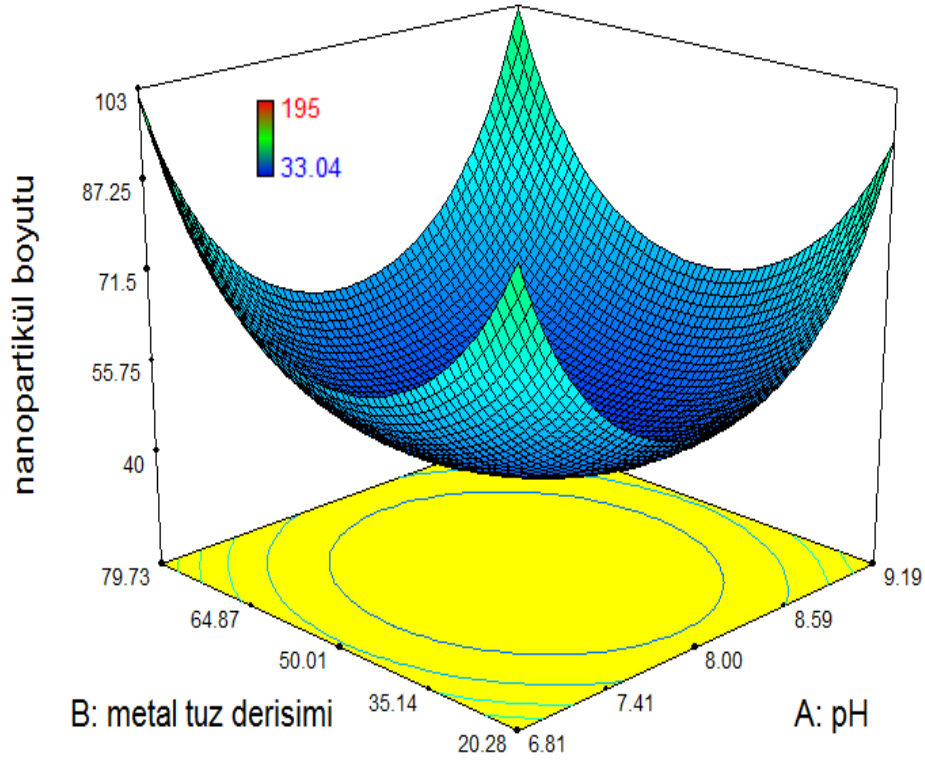
Design Expert programı, model üzerinde etkisi incelenen bağımsız değişkenlerin 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) grafiklerinin değerlendirilmesini de mümkün kılmaktadır. 2B grafikler, faktörlerin yanıt üzerindeki bireysel etkileri hakkında bilgi sağlarken 3B grafikler faktörlerin birbirleri ile olan etkileşimleri ve birlikte süreç üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Lineer hata dağılım grafiği (Şekil 4.10) modelin uygunluğunu desteklemekte, her faktörün bireysel etkilerinin incelendiği tek faktör grafikleri Şekil 4.11'de görülmektedir. Faktörlerin birbiriyle olan etkileşimleri, nanopartikül boyutu üzerine olan etkileri ve optimizasyon noktaları Şekil 4.12'de sunulan 3B yüzey yanıtı grafiklerinde görülmektedir. Tez çalışmasında sentezlenen nanopartikül boyutunun 50 nm'den küçük olması hedeflendi ve grafiklerde görülen mavi bölgeler küçük boyutlu nanopartikülleri temsil etmektedir.



Şekil 4. 10 Lineer hata grafiği



Şekil 4. 11 AuNP boyutu üzerinde etkili olan bağımsız değişkenlerin bireysel etkileri; a) pH, b) Altın tuzu derişimi



Şekil 4. 12 AuNP boyutu üzerinde etkili olan bağımsız değişkenlerin birlikte etkileri; pH ve tuz konsantrasyonu

Birden fazla değişkenin birlikte etkileşimlerinin yorumlanabilmesi genellikle 3 eksenli kontur grafikleri (3B grafikler) ile sağlanmaktadır. Yapılan çalışmada model 3 faktör üzerinden geliştirildiği halde iki faktörün değişiminin sonucu nasıl etkilediği yorumlandı.

OVAT yaklaşımında, deney seti üzerinde etkili parametrelerden her seferinde bir parametrenin değiştirilmesi, diğerlerinin sabit tutulması bağımsız değişkenlerin bireysel ve birbirleri ile olan etkileşimlerinin deney setine etkilerini ve optimum koşulların belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır (Montgomery, 2001). İstatistiksel deney tasarımı yaklaşımları, geleneksel optimizasyon yöntemlerine göre deney sayısını, süresini ve maliyetini azaltan, daha az deneme ile şans faktörü içermeyen, geniş kapsamlı ve daha güvenilir sonuçlara ulaşmayı sağlamaktadır (Carlet et al., 2004; Khuri and Mukhopadhyay, 2010). **Bu çalışmada az sayıda deneme ile sentezlenen nanopartiküllerin boyutu üzerinde istatistiksel olarak etkili olan parametrelerin optimum noktaları pH 8, altın tuz konsantrasyonu (HAuCl₄) 10⁻³ M ve inkübasyon süresi 72 saat olarak belirlendi.**

4.5.3 Doğrulama deneyleri

CCD modelinin uygulanabilirliğini ve deneylerin tekrarlanabilirliğini test etmek amacıyla program tarafından önerilen 30 farklı doğrulama deney matrisi içerisinde 3 deney tasarımı seçildi. Gerçekleştirilen doğrulama deneyleri sonuçları **Tablo 4.10**'da sunulmaktadır. Deneysel verilerin beklenen/tahminlenen değerlere yakın olduğu ve aynı zamanda %95 güven aralığı değerleri arasında olduğu belirlendi.

Tablo 4. 10 Doğrulama deneyleri

	İnkübasyon koşulları			AuNP (nm)		Güven aralığı değerleri	
	pH	HAuCl ₄ (mM)	İnkübasyon süresi (saat)	Beklenen	Deneysel	%95 CI Düşük	%95 CI Yüksek
1	7,39	39,43	58,49	46,72	44,14	39,92	55,43
2	7,39	37,37	67,62	47,49	50,93	40,54	56,42
3	8,73	37,57	72,27	49,91	54,42	42,38	59,65

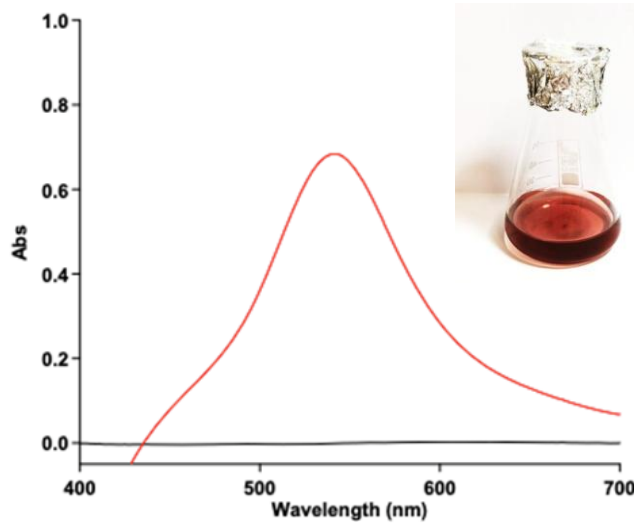
CCD matrisine göre gerçekleştirilen mikrobiyal AuNP sentezinin optimizasyon çalışmasında nanopartikül boyutu yanıt olarak kullanıldı. **Elde edilen sonuçlar AuNP'lerin biyosentezini etkileyen faktörlerin optimizasyonu için oluşturulan bu modelin güvenilirliğini ve önerilen modelin doğruluğunu kanıtlandı.**

4.6 AuNP Karakterizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra belirlenen optimum noktalarda *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile AuNP'ler sentezlendi. Elde edilen AuNP'lerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek şekil, boyut, dispersite, yüzey kimyası, kristal yapı ve stabilite değerlendirmesi yapıldı.

4.6.1 SPR Spektrumu (UV-Vis spektroskopisi)

Streptomyces sp M137-2'e ait HFS içerisinde yer alan çeşitli biyolojik moleküllerin etkisi ile **altın tuzlarının (HAuCl_4), altın nanopartiküllere indirgenmesi sonucu başlangıçta sarı renkli olan reaksiyon karışımının inkübasyonun ardından yakut kırmızı renk aldığı** gözlemlendi ve sentezlenen AuNP'lerin spektrofotometrik taraması sonrası **SPR spektrumu 541 nm olarak belirlendi (Şekil 4.13)**. Küresel AuNP'ler spektrofotometre ölçümlerinde karakteristik olarak 500-550 nm aralığında SPR bandı vermekte ve çözeltilerin renkleri ise partikül boyutuna göre kırmızı, mor, kahverengi veya turuncu olabilmektedir (Yeh et al., 2012; Elahi et al., 2018).



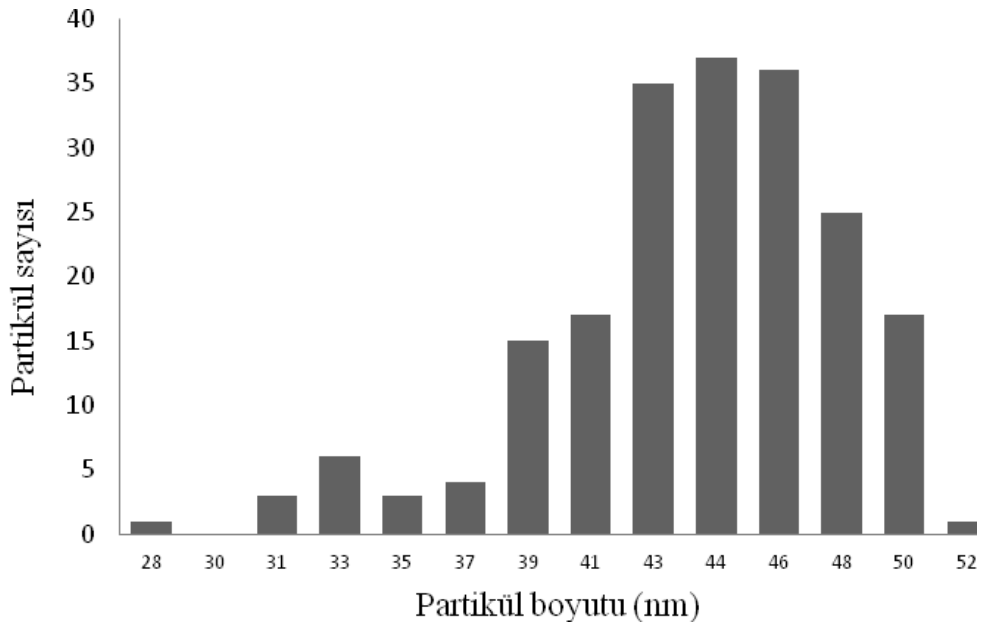
Şekil 4. 13 *Streptomyces* sp. M137-2'e ait AuNP biyosentez çözeltisinin SPR spektrumu

Metal nanopartiküller (Au, Ag, Cu) belirli dalga boylarında ışık tarafından uyarıldığında (ışık ile olan güçlü etkileşimleri sayesinde), metal yüzeyindeki iletim elektronlarının titreşimiyle gelişmiş bir elektromanyetik alan oluşmakta, titreşim partiküllerin boyutuna ve şekline bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Uyarılmanın ardından partikül yüzeyinden gelişen toplu salınım, UV-Görünür bölgede karakteristik optik absorpsiyon spektrumları/bantları (SPR) oluşturmakta ve bu optik özellik spektroskopi teknikleri ile belirlenmektedir. Bu AuNP'lerin başta tıp ve medikal alan olmak üzere kullanım potansiyellerini oluşturan başlıca özelliktir (Sastrey et. al., 2003; Boisselier and Astruc, 2009; Zeng et al., 2011; Shedbalkar et. al., 2014; El-Batal and Tamie, 2015). Nanopartiküllerin SPR bant yoğunluğu ve dalga boyu, nanopartikülün metal tipi/türü, şekil ve boyutu, yüzey bileşimi, kümelenme durumu, dielektrik sabiti, reaksiyon karışımı bileşimi ve ortamın kırılma indisi gibi faktörlere bağlı olarak değişmekte ve nanopartikül yüzeyindeki elektron yükünün yoğunluğunu etkilemektedir (Njoki et al., 2007; Huang and El-Sayed, 2010). Yapılan farklı mikrobiyal sentez çalışmalarında farklı boyut ve şekilde elde edilen AuNP'lerin SPR spektrumları 500-550 nm arasında değiştiği rapor edilmektedir. Hussein ve ark. (2012) tarafından küresel AuNP'lerin sulu çözeltilerde büyüklüklerine göre kahverengi, turuncu, kırmızı veya mor renkli olduklarını ve boyutlarına göre de 500-550 nm arasında absorpsiyon piki verdiğini bildirdiler. Çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 90271, Strain 1, Strain 2 suşları tarafından sırasıyla 40 ± 10 , 15 ± 5 , 25 ± 15 nm boyutlarında küresel AuNP'ler sentezlendiği, spektrofotometrik ölçümlerde 543 nm, 531 nm, 540 nm'de pik verdikleri ve parçacık boyutu büyüdükçe çözelti renginin pembeden mor/maviye doğru kaydığı bildirilmektedir. *Rhodococcus* sp. misellerinden hücre içi sentezlenen 5-15 nm boyutlarındaki küresel AuNP'lerin 540 nm civarında (Ahmad et al., 2003a), *Thermomonospora* sp. biyokütlesinden sentezlenen küresel AuNP'lerin 520 nm'de (Ahmad et al., 2003b), *Thermomonospora* türlerine ait miseller ile yapılan bir çalışmada, *T. curvata*, *T. fusca*, *T. chromogena* tarafından sentezlenen 30-60 nm boyutlarında dağılım gösteren AuNP'lerin sırasıyla 537 nm, 535 nm ve 544 nm'de en yüksek absorpsiyonu (Torres-Chavolla et al., 2010) ve benzer şekilde *Streptomyces viridogens* strain HM10 misellerinden sentezlenen AuNP'lerin 18-20 nm boyutlarında ve 549 nm'de (Balagurunathan et al., 2011) absorpsiyon noktası (SPR bandı) gözlemlendiği rapor edilen çalışmalardır. Ayrıca *Streptomyces griseus* (Derakhshan et al., 2012), *Streptomyces* sp. ERI-3 (Zonooz et al., 2012) ve *Gordonia amicalis* HS-11 (Sowani et al., 2016)

izolatlarına ait HFS kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin küresel, monodispers SPR bantlarının 540 nm'de gözlendiği rapor edilmektedir. *Streptomyces cavouresis* KF974778 (Kumar et al.,2016) izolatına ait HFS ile yapılan çalışmada 517 nm'de absorbans piki veren ve ortalama 50 nm boyutlarında, *Streptomyces cyaneus* Alex – SK121 (El-Batal and Tamie, 2015) izolatına ait HFS ile 525 nm'de SPR bandı gözlenen küresel AuNP'lerin, *Streptomyces fulvissimus* U izolatı (Soltani et al., 2015) ile 550 nm'de boyutları 20-50 nm aralığında dağılım gösteren küresel ve üçgen, *Streptomyces* sp. MBRC-82 (Manivasagan et al., 2015) izolatı tarafından ise 20-80 nm aralığında partikül boyutuna sahip 531 nm'de absorbans piki veren kübik ve küresel AuNP'lerin sentezi diğer bildirilen çalışmalardır.

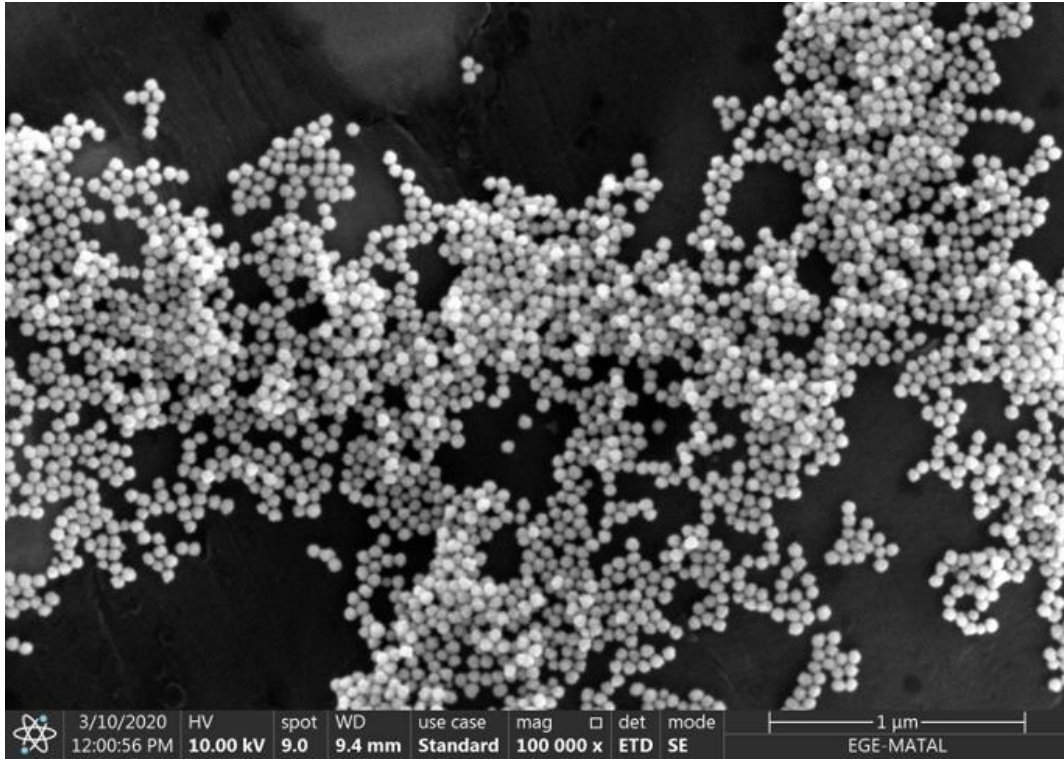
4.6.2 Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy - SEM)

SEM mikrograflarından 250 partikül boyutu ölçülerek Şekil 4.14'te sunulan partikül boyutu histogram grafiği elde edildi. ***Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin SEM görüntülerinde, küresel, tek tip morfolojiye (monodispers) ve 30-50 nm boyut dağılımına sahip ortalama ~43 nm boyutlarında olduğu belirlendi. (Şekil 4.15).**



Şekil 4. 14 AuNP'lerin boyut dağılımı

Aktinomisetler ile hücre içi ya da HFS kullanılarak yapılan AuNP biyosentez çalışmalarında ağırlıklı olarak küresel ve 5-100 nm boyutlarında dağılım gösteren AuNP'lerin sentezlendiği bildirilmektedir. Özellikle *Streptomyces* türleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde ise elde edilen bulgularla uyumlu hücre dışı ve monodisperse üretimler bulunmasına rağmen ağırlıklı polydisperse üretim rapor edildiği görülmektedir. Monodisperse üretimler ise bu çalışma ile uyumlu olarak küresel nanopartikülleri rapor etmektedirler (**Tablo 2.1**).



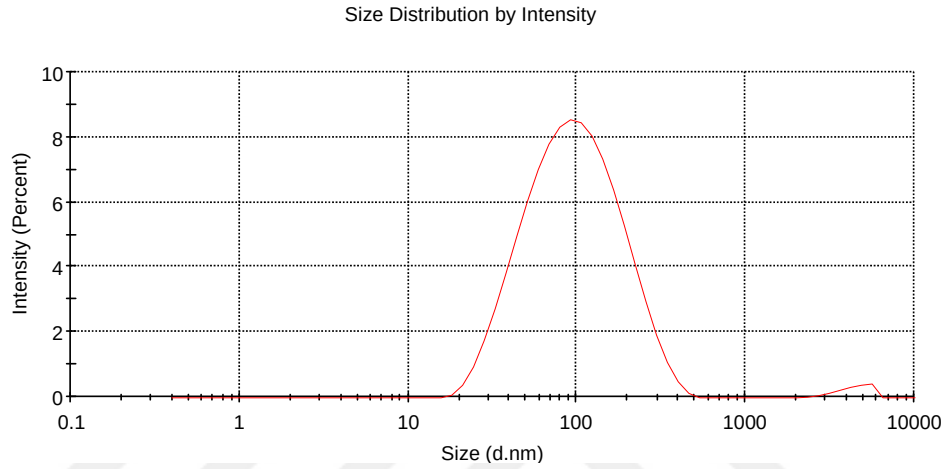
Şekil 4. 15 *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin 100.000 büyütmedeki görünümü

4.6.3 Monodispersite (Dynamic Light Scattering - DLS)

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'ler için Polidispersite indeksi **PdI: 0,281** ve sonuç kalitesi iyi olarak ölçüldü (**Şekil 4.16**). PdI hazırlanan formülasyondaki farklı boyutlardaki partiküllerin toplam partikül sayısına oranını temsil eder. PdI ne kadar düşük olursa partiküller o kadar monodispers dağılıma sahip olur/ya da diğer bir deyişle partiküller ne kadar monodispers dağılıma sahipse PdI o kadar düşük değerde olur. PdI değeri 1'in altında olan formülasyonlarda nanopartiküller, geniş olmayan ve homojen partikül boyut dağılımına sahip, 1 olan formülasyonlar ise çok geniş partikül

boyut dağılımına sahiptir ve partiküller kümelenme eğilimindedir (Atkins and De Paula, 2010; Mishra et al., 2014; Srinath and Rai, 2015).

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 79,42	Peak 1: 112,1	98,4	71,29
Pdl: 0,281	Peak 2: 4418	1,6	913,9
Intercept: 0,897	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality	Good		

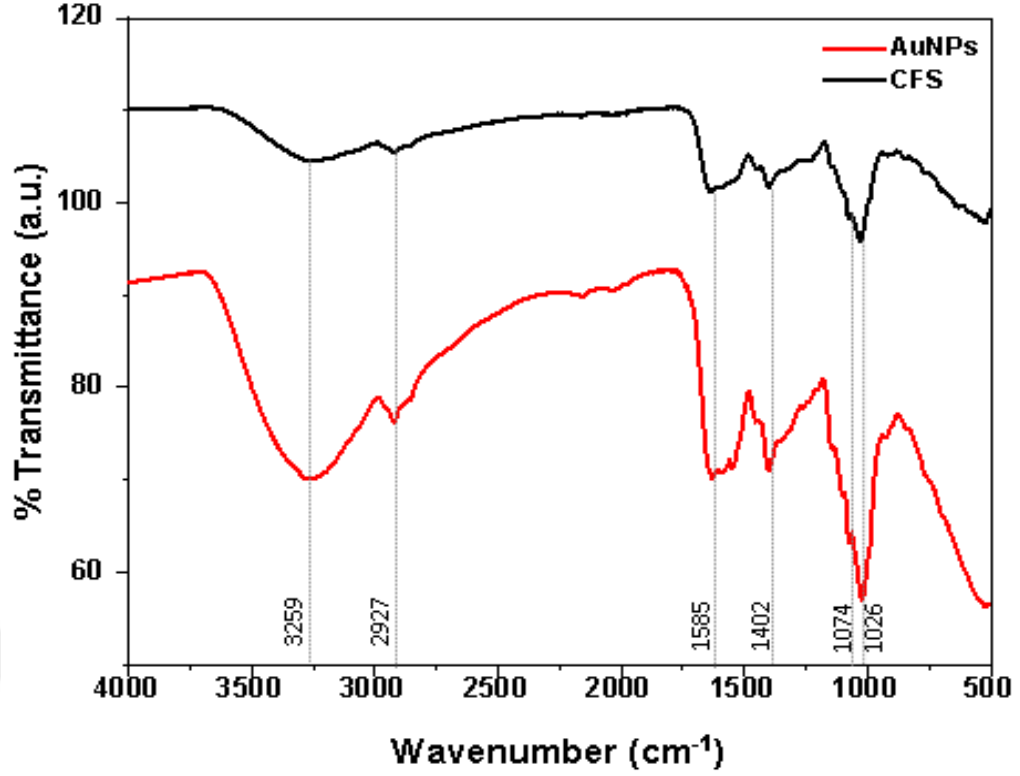


Şekil 4. 16 *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin DLS analizi

Biyolojik yöntemle sentezlenen AuNP'lerin çevresinin organik bileşenler ile kaplanması ve/veya tüm yöntemler ile sentezlenen AuNP'lerin *in vitro/in vivo* ortamda ve/veya serum ortamındaki proteinler tarafından kaplanması sonucu hidrodinamik çapında önemli değişiklikler gözlenmesi beklenir ve genellikle çapta da artış gözlenir (Kasthuri et al., 2009; Prathna et al., 2011; Srinath and Rai, 2015). DLS yöntemi ile boyut ölçümünde metalik çekirdeğin gerçek boyutu ile birlikte partikül etrafını saran capping ve/veya stabilize eden ajanların da kalınlığının (corona) ölçüldüğü bilinmektedir (Sujitha and Kannan, 2013). Bu nedenle DLS analizlerinde ölçülen boyut hidrasyon tabakası nedeniyle genellikle elektron mikroskopunda gözlenen çekirdek çapından/boyuttan daha büyüktür. Nanopartiküllerin yüzeyinde oluşan protein koronası sebebi ile zeta sizer parçacık boyut analizinde ölçülen nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik çapı, TEM ve/veya SEM görüntülerine daha büyük ölçülmektedir (Bastus et al., 2009; Pamies et al., 2014; Baskaran et al., 2016; Dagata et al., 201; Wang et al., 2015; Xie et al., 2017).

4.6.4 Fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

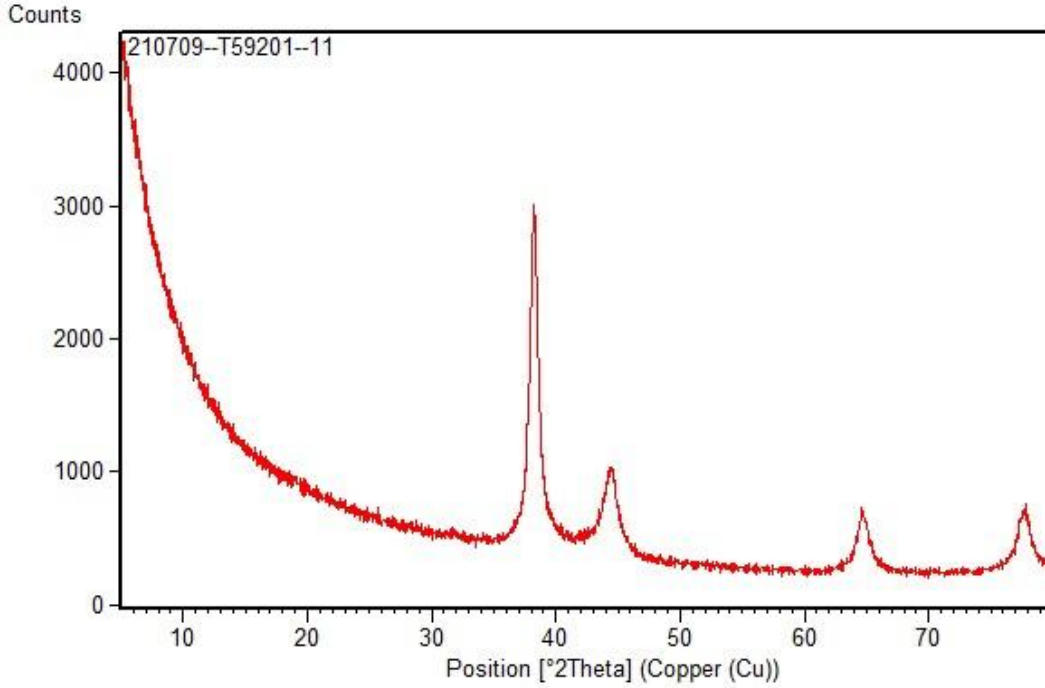
Streptomyces sp. M137-2 ile sentezlenen AuNP'ler ve HFS'na ait FT-IR spektrumları incelendiğinde sırasıyla 3259 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} , 1585 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} ve 1026 cm^{-1} bölgelerinde bantlar gözlemlendi (Şekil 4.17). Örneklerle ait $3650\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ civarındaki güçlü geniş bölge alkoller ve fenolik bileşiklerdeki fonksiyonel hidroksil gruplarının O-H bağları ve N-H bağları arasındaki titreşimleri, 2927 cm^{-1} 'deki ortalanmış pik metilenin C-H bağlarının gerilmesini temsil eder. 1585 cm^{-1} ve 1074 cm^{-1} 'deki pikler polipeptitlerin, proteinlerin birincil ve ikincil amin gruplarına karşılık gelir (Mishra et al., 2011; Maliszewska et al., 2017; Singh et al., 2019; Usman et al., 2019). 1402 cm^{-1} 'deki bant alkol ve hidroksil bileşiklerinin O-H bükülmesine atfedilir (Nandiyanto et al., 2019; Satpathy et al., 2020). Çalışma kapsamında elde edilen FT-IR spektrumları literatür ile uyumludur. Organik bileşiklerin ve proteinlerin nanopartiküllerin indirgenmesindeki ve stabilizasyonundaki rolü araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Mukherjee et al., 2008; Das et al., 2021). Proteinlerin, proteinlerdeki serbest amin grupları veya sistein kalıntıları yoluyla AuNP'lere bağlanabildiği bilinmektedir (Gurunathan et al., 2014; Shedbalkar et al., 2014). Hücre dışı fermentasyon sıvısında bulunan proteinler ve metabolitler, sentezlenen AuNP'ler için stabilize ve kaplama ajanı olarak işlev görmektedir (Ghosh et al., 2021). **Elde edilen FT-IR spektrumları, AuNP'lerin indirgenmesi ve stabilizasyonunu sağlayan HFS'nda bulunan hücre dışı metabolitlerin ve proteinlerin aynı zamanda nanopartiküllerin yüzeyini kapladığı ve böylece UV-Vis spektrumu kayması, SEM görüntülerindeki protein korona oluşumu (Şekil 4.25), DLS ve SEM arasındaki boyut farklılıkları ve amid bağlarına özgü piklerin varlığı ile doğrulandı.**



Şekil 4. 17 Mikrobiyal AuNP'ler ve *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS'ye (CFS) ait FT-IR analizi

4.6.5 X-ışını kırınım difraktometresi (X-Ray Diffraction - XRD) analizi

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin kristal yapısı XRD analizi ile doğrulandı. Sentezlenen AuNP'lere ait X-ışını kırınım deseni Şekil 4.18'de sunulmaktadır. 2θ pozisyonunda kristal elemental altına özgü standart yüzey merkezli kübik yapı (fcc - face center cubic) (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerine karşılık gelen sırasıyla 38.17° , 44.43° , 64.66° ve 77.68° dört güçlü kırınım tepe noktası gözlemlendi. **XRD analizi sonucu nanopartiküllerin kristal yapısı tayin edildi ve Au varlığı doğrulandı.** Elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilen *Streptomyces* sp. ile sentezlenen AuNP çalışmalarında bildirilen Bragg açısı kırınım pikleri ile uyumludur (Balagurunathan et al., 2011; Gopal et al., 2013; Manivasagan and Oh., 2015; Soltani et al., 2015; Kumar et al., 2016; Skladanowski et al., 2016).



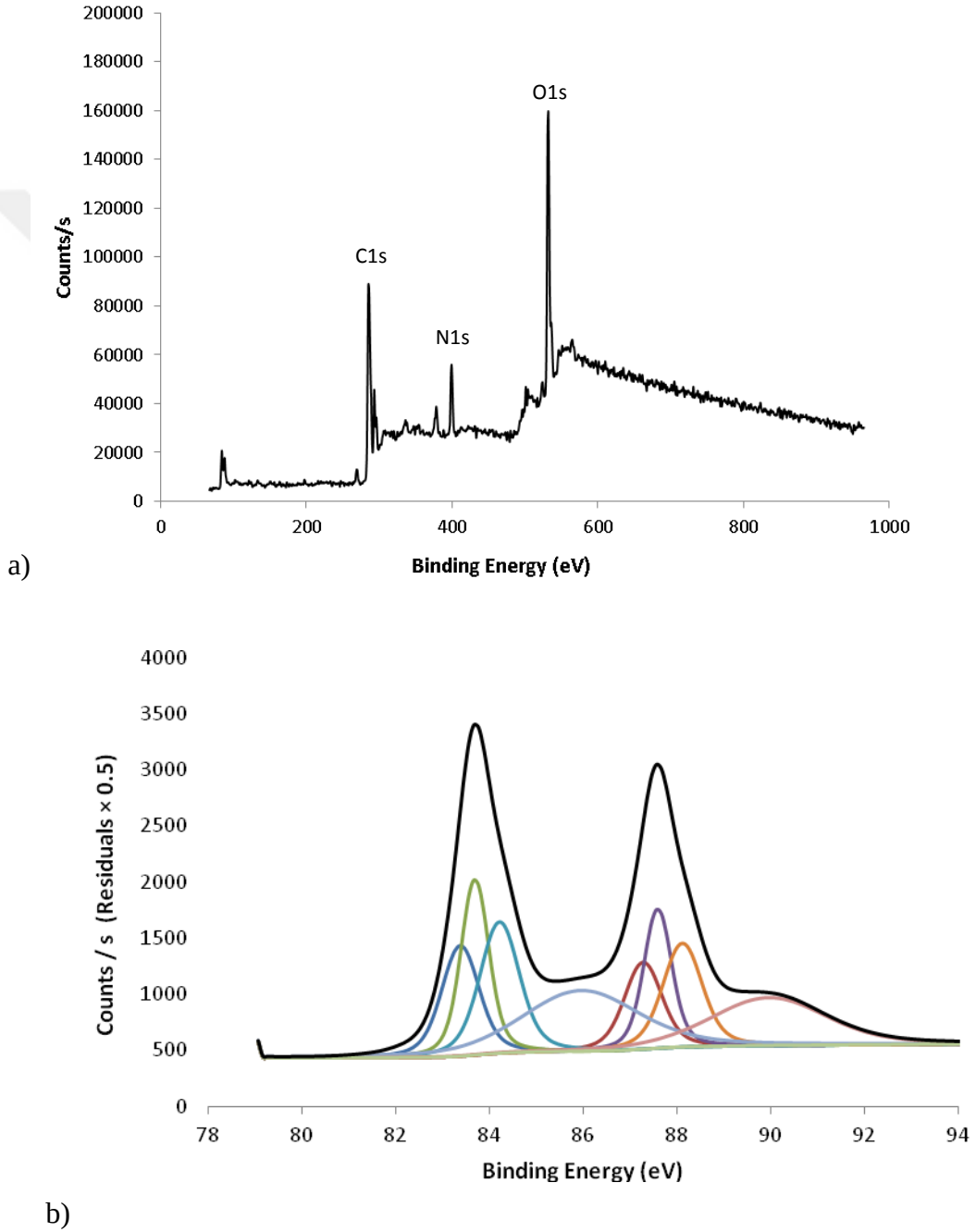
Şekil 4. 18 *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin XRD grafiği

4.6.6 X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin yüzey bileşimi XPS analizi ile karakterize edildi. Mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin yüzeyinin protein korona ile kaplı olması ve aynı zamanda fermentasyon ortamından gelen aktif bileşenlerin de (protein, enzim, amino asit, peptid, pigment) yüzeyde bulunması nedeniyle 10-20-50-100 ve 200 nm derinliğinde Argon iyon demeti ile yüzey aşındırması yapıldı. Numunenin aynı noktasına yapılan bombardıman sonucunda Au elementinin yüzdesel miktarının giderek arttığı gözlemlendi. **Yapılan XPS analizi ile C (287.87 eV), N (399.74 eV), O (532.13 eV), Na (1071.61 eV), Mg (1305.24 eV), P₂ (132.77 eV), S₂ (161.96 eV), Cl₂ (198.33 eV), K₂ (293.22 eV), Au4f 5 (87.68 eV) ve Au4f 7 (83.67 eV) elementlerinin bağlanma enerjileri ve spektrumları (Şekil 4.19a) belirlendi.**

Metalik altının karakteristiği olan Au⁺³'ün indirgenmesiyle Au⁰'a karşılık gelen Au4f 5 87.68 eV'lik ve Au4f 7 83.67 eV'lik tepe noktalarına sahip spektrumlar gözlenmesi (Şekil 4.19b) Au varlığını kanıtladı (Chevrier et al., 2012; Tao et al., 2014; Naraginti, 2017). Biyolojik yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin yüzeyinde diğer

elementlerin varlığı beklenen bir durumdur ve birçok çalışmada rapor edilmektedir (Lin et al., 2005; Huo et al., 2014; Pajovic et al., 2015; Maliszewska et al., 2017). Singh et al. (2019) tarafından benzer şekilde sentezlenen AuNP'lerin yüzeyinin organik moleküller ile kaplı olduğu, elemental kompozisyonu ve yüzey bileşenleri karakterize edildiğinde C (287.71 eV), N (400.73 eV), O (532.88 eV), S₂ (163.28 eV), P₂ (133.91 eV) ve Au4f (88.10 eV) tarama spektrumlarının varlığı bildirilmektedir.



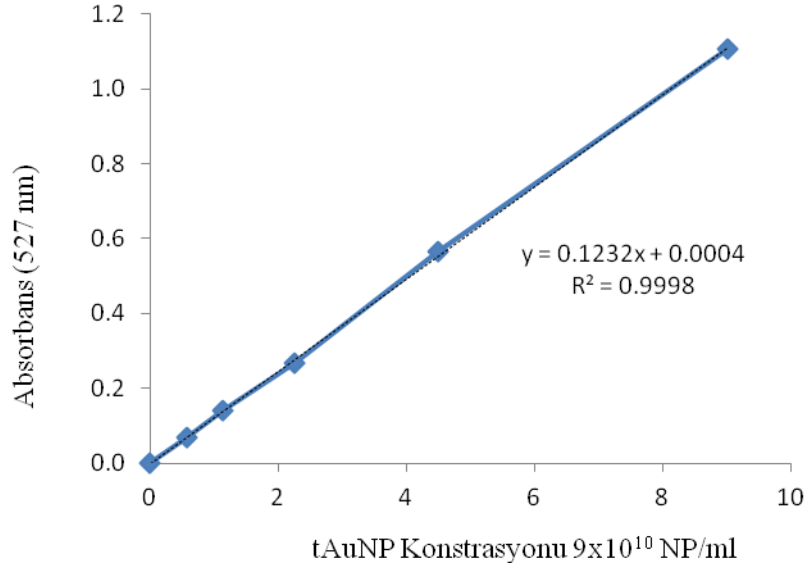
Şekil 4. 19 AuNP XPS spektrumları a) Geniş tarama spektrumu, b) Au 4f'nin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları

4.7 AuNP Stabilite Değerlendirmesi

Zeta potansiyeli ölçümü partiküllerin kararlılığı hakkında önemli bilgi sağlamaktadır. Nanopartikülat dispersiyonunun kararlılığı nanopartiküllerin birbiri arasında var olan itici ve çekici kuvvetlerin dengesine bağlıdır. Ölçülen zeta potansiyelinin büyüklüğü mevcut olan itici kuvvetlerin bir göstergesidir ve nanopartikülat dispersiyonunun uzun vadeli stabilitesinin değerlendirilmesi için kullanılır. Tüm partiküllerin karşılıklı itme gücü varsa, dispersiyon kararlı kalacaktır. Bununla birlikte partiküller arasında çok az ve/veya hiç itme gücü olmaması agregasyona yol açmaktadır (Kannan et al., 2011). ***Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin zeta potansiyeli -34.6 ± 2.95 mV ölçüldü.*** Zeta potansiyelleri +30 mV'dan küçük ya da -30 mV'dan büyük olan nanopartiküller yüksek kararlılığa sahiptir. Daha düşük zeta potansiyelleri agregasyon ya da koagülasyonu işaret etmektedir (Larssons et al., 2012; Banerjee and Rai, 2017; Akintelu et al., 2021). Zeta potansiyeli partikülün içinde bulunduğu sıvının pH değeri ile değişmektedir. Zeta potansiyeli, düşük pH değerleri için pozitif ve yüksek pH değerleri için negatiftir (Clogston and Patri, 2011). -mV negatif zeta potansiyeli parçacıkların birbirini ittiğini ve partiküllerin kümelenme eğiliminde olmadığını göstermektedir. Yüksek büyüklükteki potansiyeller artan elektrostatik itme ve dolayısıyla artan kararlılığı göstermektedir. **Bu bilgiler ışığında elde edilen AuNP'lerin iyi bir kararlılığa sahip oldukları belirlendi.**

4.8 AuNP Miktar Tayini

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'lerin adjuvan potansiyelinin değerlendirilmesinde farklı konsantrasyonlarının ayarlanabilmesi için konsantrasyonu bilinen ticari küresel (40 nm) AuNP kolloidal çözeltisinin ml absorbans değerlerine bağlı olarak standart eğrisi çizildi (Şekil 4.20). **Tez çalışması kapsamında sentezlenen AuNP'leri içeren kolloidal altın çözeltisinin ml'sinde $\sim 10,5 \times 10^{10}$ nanopartikül/ml olduğu standart eğri denkleminde hesaplandı.**



Şekil 4. 20 Ticari AuNP (tAuNP) standart eğrisi

4.9 AuNP-BSA Konjugat Oluşturma ve Saflaştırma

Çalışmada AuNP'ler ile konjuge edilecek minimum antijen miktarı (BSA) kritik flokülasyon konsantrasyon testi ile belirlendi. **Tuzla flokülasyon testi sonucunda ticari AuNP (tAuNP) ile hazırlanan konjugatlarda flokülasyon gerçekleşirken *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP (mAuNP) ile hazırlanan konjugatlarda flokülasyonun gerçekleşmediği gözlemlendi.** tAuNP ve mAuNP'ler ile gerçekleştirilen kritik flokülasyon konsantrasyon test kuyuları Şekil 4.21'de sunulmaktadır.

Test öncesi her iki AuNP grubu da yıkama işlemine tabi tutuldu. Kuyulardaki AuNP'lerin üzerine NaCl eklenmesi sonrası yaklaşık 2-3 dk içerisinde antijen miktarının yetersiz kaldığı kuyularda kırmızı/pembe tondan mavi/mor tona değişim gözlemlendi. **Üretici firma tarafından tAuNP kolloidal sıvısına eklenen stabilizasyonu sağlayan ajanların yıkama basamağında uzaklaştırılması sonucunda tAuNP'lerin yüzeylerine BSA kolaylıkla bağlandı ve BSA'nın yetersiz kaldığı konsantrasyonda tAuNP'lerin kümelenmediği gözlemlenirken mAuNP'lerin etrafında bulunan protein korona varlığı tuz ile doğrudan teması önlediğinden hiçbir konsantrasyonda kümelenme/flokülasyon oluşumu gözlemlenmedi.** Bu işlem farklı zamanlarda 5 defa tekrarlandı ve kümelenme nedeniyle renk değişimi hep aynı konsantrasyonda (kuyuda) belirlendi. **tAuNP'ler için kritik flokülasyon konsantrasyonu testi sonucunda flokülasyon konsantrasyonu 15,62**

$\mu\text{g/ml}$ (6. kuyu) ve “Gold Number” konsantrasyonu minimum antijen (BSA) miktarı ise $31,25 \mu\text{g/ml}$ (5. kuyu) olarak belirlendi.

Ancak mAuNP'lerin etrafında sentezlenme aşamasından itibaren oluşmaya başlayan protein korona yapısına BSA'nın daha rahat bağlanabilmesi için (soft korona), BSA'nın suda çözünebilen bir molekül olması ve yıkama basamağında bağlanmayan BSA'nın üst sıvı ile uzaklaşması göz önüne alınarak bir üst konsantrasyonun (4. kuyu) minimum antijen miktarı/Gold Number olarak kullanılması tercih edildi. **Konjugatların hazırlanması için $200 \mu\text{l}$ AuNP solüsyonuna eklenecek minimum antijen miktarı (BSA) $62,5 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi.**



Şekil 4. 21 Kritik flokülasyon konsantrasyon testi

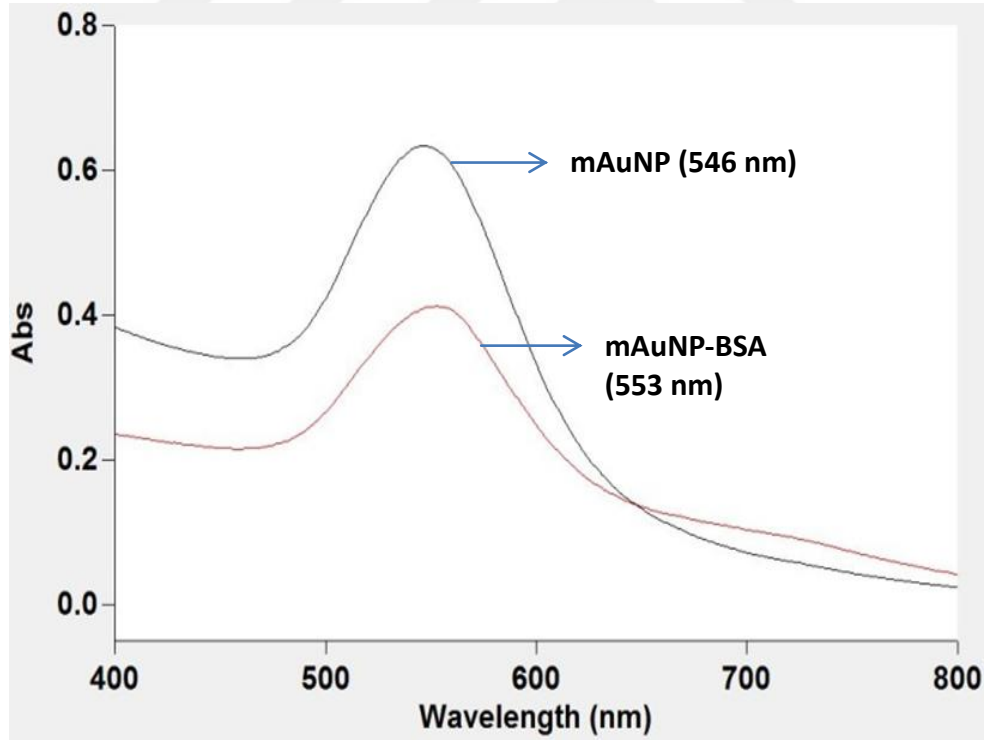
4.10 mAuNP-BSA Konjugatının Karakterizasyon Çalışmaları

4.10.1 SPR-Shift kayması

AuNP'ler kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla birçok biyomolekülün veya fonksiyonel grubun bağlanmasına izin veren yüzey kimyasına sahiptir. Özellikle proteinler ile elektrostatik etkileşimler, hidrofobik çekim, tiyol veya amin gruplarıyla yüksek afinite göstererek etkileşime girerler (Ho et al., 2014). AuNP ile BSA stabil bir kompleks/konjugat oluşturduğunda toplam yük artar. AuNP yüzeyinde adsorbe edilen ve/veya partikül çevresini saran tabakanın hidrodinamik çapta bir artış meydana getirmesi ve dielektrik sabiti doğasındaki değişiklikler sonucunda SPR spektrumlarında optik yoğunluğun kayması gözlenmektedir. AuNP'lerin sahip olduğu bu güçlü SPR etkisi, max absorbans verdiği dalga boyu ve bant genişliği partikül şekli ve büyüklüğü, ortamın kırılma indisi ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (Kannan et al., 2011; Xu et al., 2012; Ho et al., 2014; Tao et al., 2014; Assis et al., 2018).

BSA ile oluşturulan konjugatların literatür ile uyumlu şekilde SPR bandının 546 nm'den 553 nm'ye kaydığı belirlendi (Şekil 4.22). Nitekim literatürde ticari AuNP kullanılarak gerçekleştirilen protein konjugatlarının proteinik molekül yapıya eklendikten sonra SPR bandında kayma olduğu ve bu kaymanın da ortalama 5-23 nm olduğu rapor edilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyumlu olup SPR bandında 7 nm kayma gerçekleşti (Bastus et al., 2009; Gregory et al., 2012; Xu et al., 2012; Ho et al., 2014; Tao et al., 2014; Dakterzada et al., 2016; Kang et al., 2017; Dagata et al., 2017; Assis et al., 2018; Cao et al., 2018).

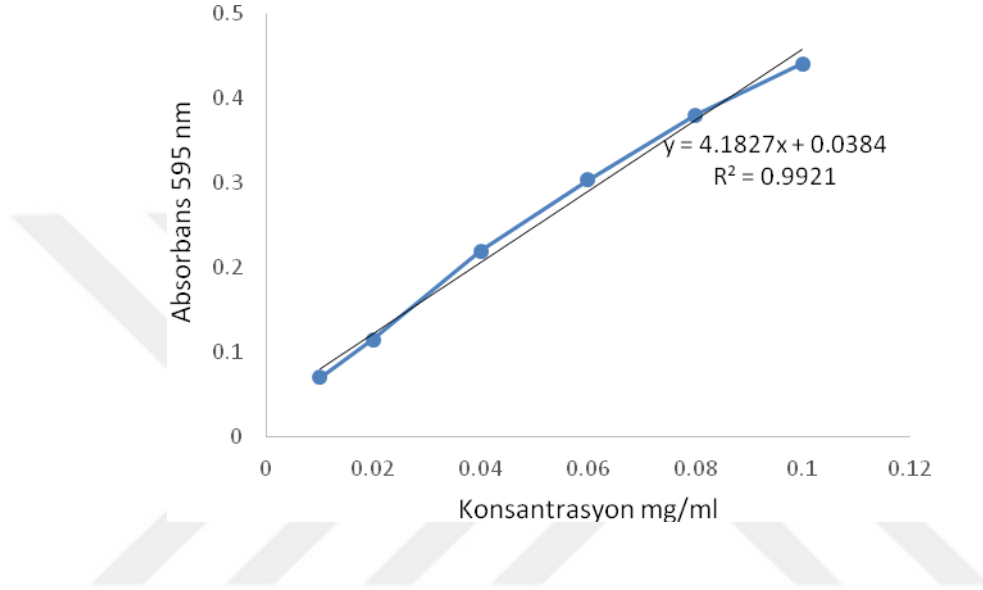
Çalışmada 541 nm'de SPR bandı veren AuNP'ler karakterize edildikten sonra Covid-19 Pandemisi süresince HFS içerisinde karanlıkta ve oda sıcaklığında depolandı (6-8 ay). Pandemi sonrası *in vitro* hücre kültürü denemeleri ile adjuvan potansiyeli araştırılan AuNP'lerin BSA ile konjugat oluşturmada önce tekrar SPR bandı ölçüldü ve HFS içerisinde depolanma etkisi ile SPR 546 nm olarak belirlendi.



Şekil 4. 22 mAuNP ve mAuNP-BSA konjugatının SPR bantları

4.10.2 Toplam protein tayini

BSA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan Bradford standart eğrisi referans alınarak (Şekil 4.23) AuNP yüzeyine adsorbe olmayan BSA miktarı hesaplandı, başlangıç BSA (62,5 µg/ml) konsantrasyonundan çıkarılarak **AuNP yüzeyine adsorbe olan BSA miktarı 30,60 µg/ml olarak tayin edildi.**



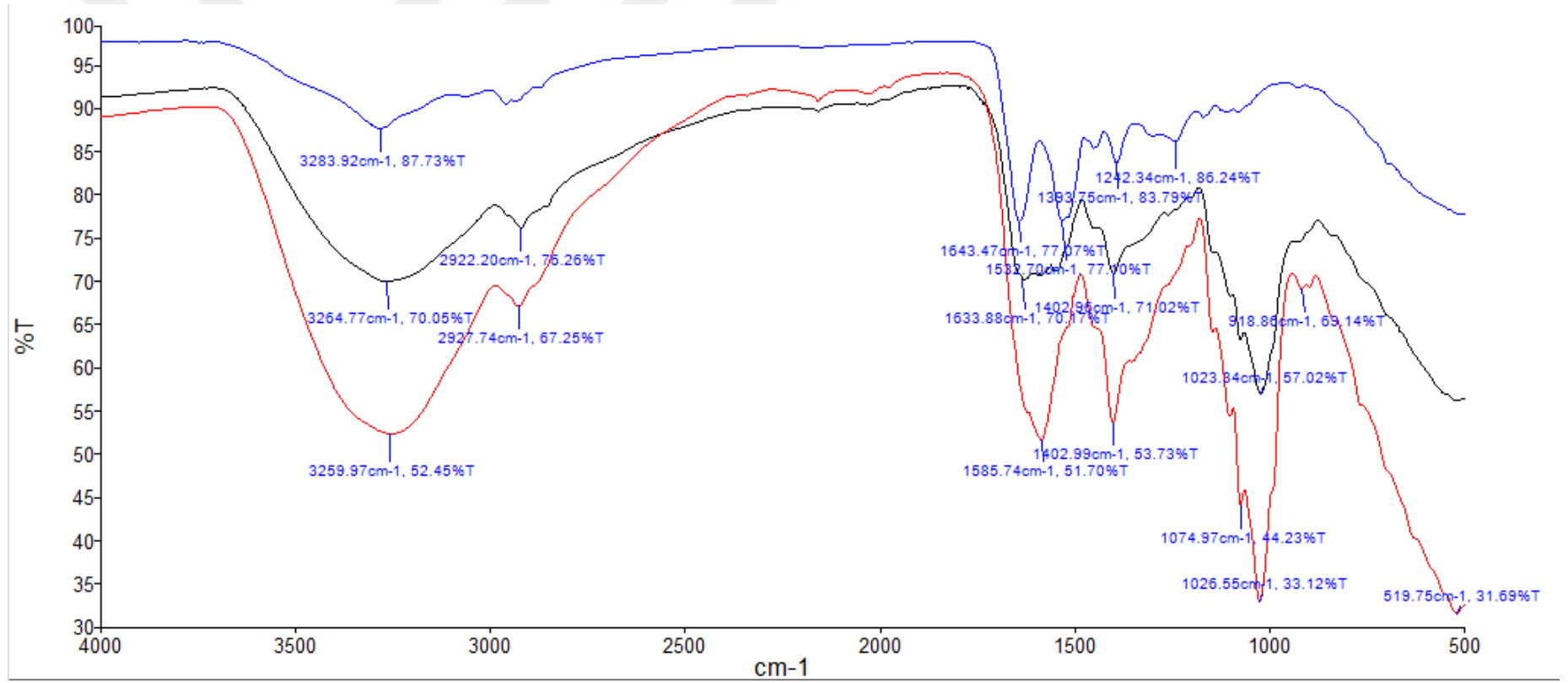
Şekil 4. 23 Bradford Standart Eğrisi

4.10.3 Fourier dönüşümlü-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

BSA, mAuNP ve mAuNP-BSA örneklerine (Şekil 4.24) ait FT-IR spektrumları incelendiğinde 3300 cm^{-1} civarındaki güçlü geniş absorbans alkoller ve fenolik bileşiklerdeki fonksiyonel hidroksil gruplarının O-H bağları ve N-H bağları arasındaki titreşimleri temsil etmektedir (Singh et al., 2010; Mishra et al., 2011; Manivasagan and Oh, 2015; Singh et al., 2019; Usman et al., 2019). 2927 cm^{-1} 'deki pik C-H bağlarının titreşimine karşılık gelmekte ve alkan gruplarını, $2800\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ aralığında gözlenen bant aldehit gruplarının varlığını temsil etmektedir (Lokina et al., 2014; Usman et al., 2019). $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde amid I (karbonil grupları ile ilişkili), $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde amid II (N-H bağlarının bükülmesine karşılık gelmekte) ve daha kompleks olan amid III grupları ise $1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde karakteristik adsorpsiyon bantları oluşturmaktadır. BSA için 1300 cm^{-1} 'deki pik α -helix, $1235\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ arasındaki pik ise β -sheet konformasyonunu içermektedir (Tsai et al., 2011; Shi et al., 2012; Lokina et al.,

2014). 1400 cm^{-1} bölgesindeki pikler protein moleküllerinin amino asit kalıntılarındaki yan grupların varlığını ve C-C gerilmelerini temsil etmektedir. $1033\text{-}1025\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler ise fosfat bağlarının varlığını göstermektedir (Manivasagan and Oh, 2015; Das et al., 2009).



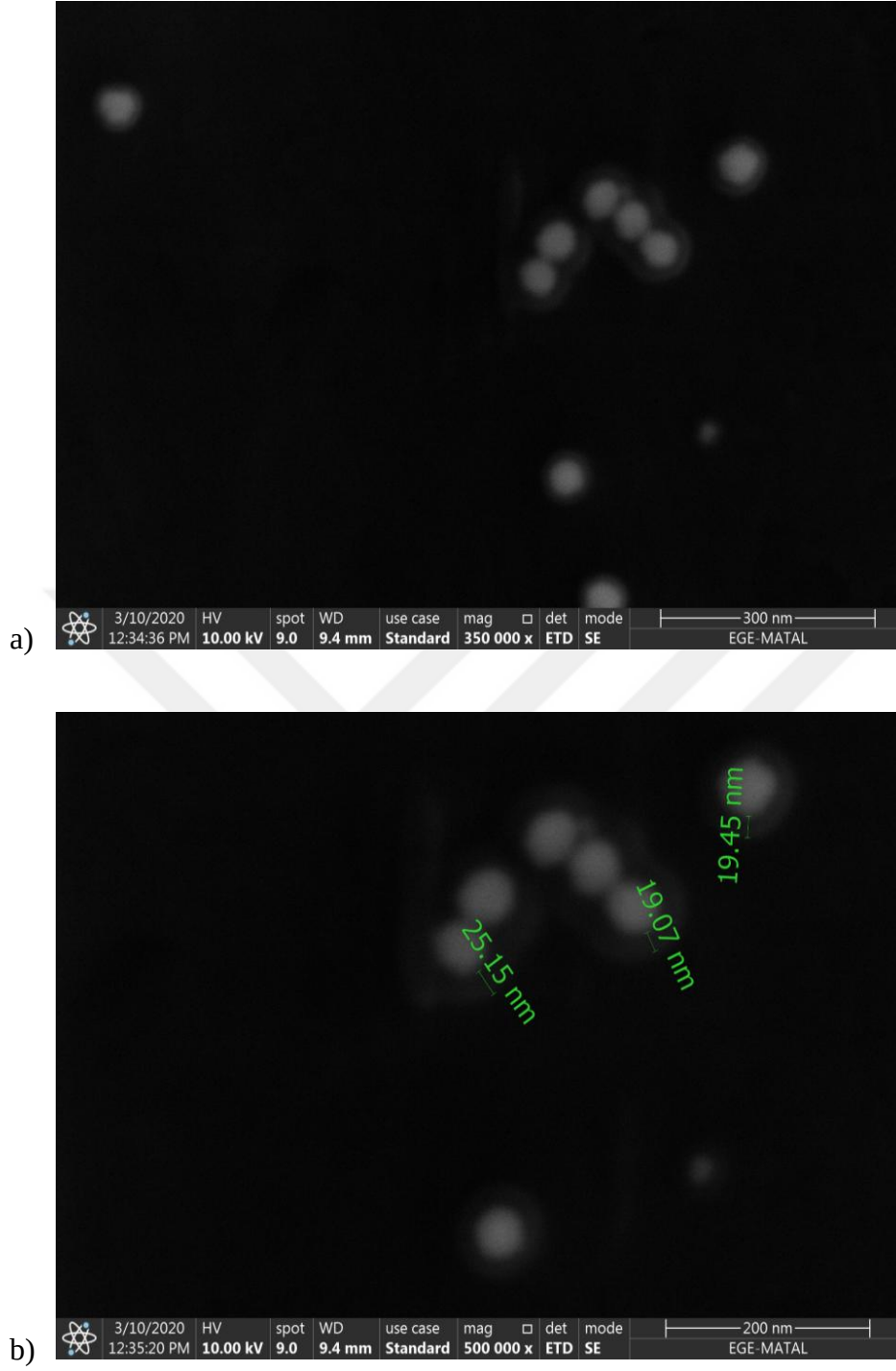


Şekil 4. 24 mAuNP, mAuNP-BSA ve BSA'ya ait FT-IR analizi (Mavi: BSA, Siyah: mAuNP-BSA, Kırmızı: mAuNP)

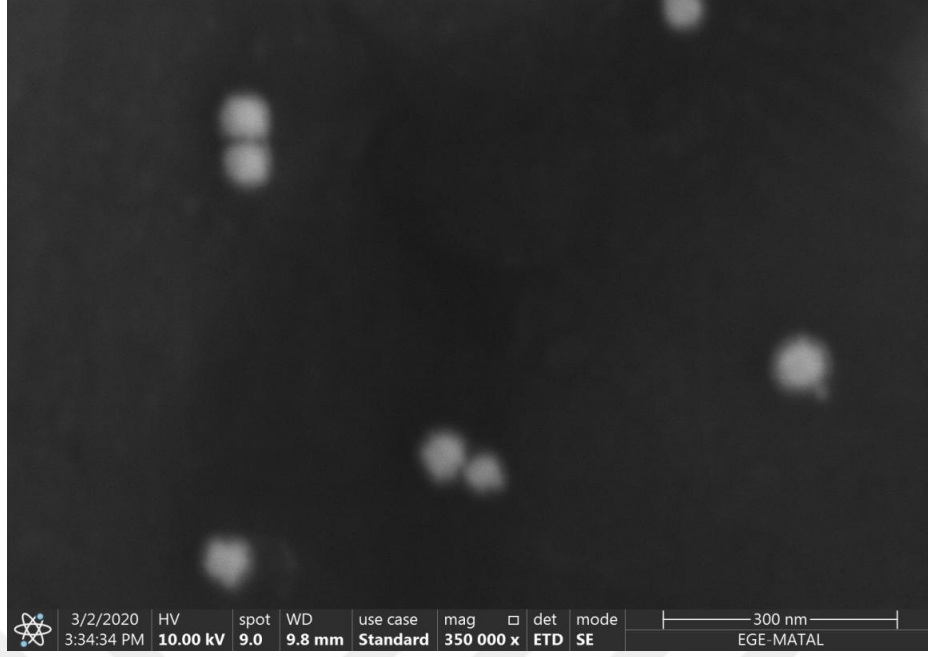
4.10.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen mAuNP'lerin yüzeyinde oluşan protein korona ve kalınlığı **Şekil 4.25**'te görülmektedir. Nanopartiküllerin çevresinde yarı-opak bir zon gözlemlendi ve bu yarı opak bölgenin HFS'dan gelen proteinik içeriğin oluşturduğu protein korona olduğu düşünüldü. Birincil amino gruplarının altın veya gümüş gibi asil metallere güçlü bir şekilde bağlandığı rapor edilmektedir (Torres-Chavolla et al., 2010; Baptista et al., 2008). **Bu çalışmada da benzer şekilde SEM görüntülerinde partikülleri çevreleyen 15-20 nm civarında yarı-opak bir zon (protein korona) gözlemlendi.**

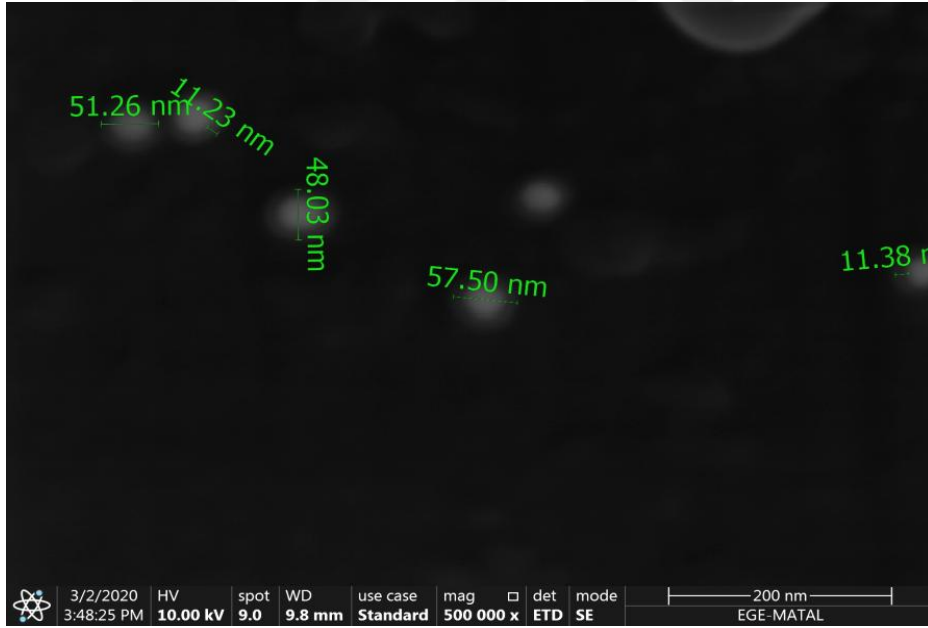
Aynı büyütmede (350 000x) tAuNP'ler incelendiğinde ise partiküllerin protein içeren herhangi bir ortam ile etkileşimi olmamasından kaynaklı protein korona (**Şekil 4.26**) gözlenmedi. tAuNP'lerin BSA ile konjuge edildikten sonra oluşan protein koronası ve korona kalınlığı **Şekil 4.27'de** görülmektedir.



Şekil 4. 25 mAuNP protein koronası ve boyutları a)350000x, b)500000x



Şekil 4. 26 ticari AuNP SEM görüntüsü



Şekil 4. 27 BSA ile konjuge edilen ticari AuNP (tAuNP-BSA), boyutları ve protein koronası

Protein korona nanopartikül ve hücre etkileşimlerinde anahtar role sahiptir. Nanomalzemelerin biyolojik ortamlarda hücreler ve biyolojik moleküler ile (protein) nasıl etkileşime girdiği, bu tür etkileşimlerin nanomalzemelerin istenen biyolojik davranışını tamamen/kısmen nasıl değiştirdiği (laboratuvarda tasarlanan nanopartiküllerin istenen

biyolojik veya kimyasal işlevlerini maskeleyebilir) konusunda bilgiler sınırlıdır. Protein koronasına ilişkin yayınların sayısı son 10 yıl içerisinde artış göstermektedir.

Nanopartiküllerin yüzeyinde oluşan protein korona yapısı, nanopartikülün şekline ve boyutuna, yüzey yüküne, hidrofobikliğine, ortamın pH'ına, nanopartiküllerin (sert-yumuşak) türüne ve aynı zamanda *in vivo* ortamdaki serum proteinlerinin türüne ve etkileşimin doğasına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Nanopartikül yüzeyinde sıkı veya zayıf bir şekilde adsorbe edilen uzun ömürlü protein veya kısa ömürlü protein katmanları, sırasıyla sert korona/hard corona veya yumuşak korona/soft corona olarak kabul edilir. Sert protein korona nanopartiküllerin biyolojik kimliğini oluşturur ve biyolojik aktiviteleri kontrol eder (membran adhezyonu, infiltrasyon mekanizması, hücrel sinyalleşme yolları, biyolojik dağılım ve koruma gibi) (Falahati et al., 2019). Kısaca protein korona nanopartikülün *in vivo* da kaderini belirleyen özellikler taşımaktadır. Vücut içerisine alınan nanopartiküllerde özellikle serum proteinlerinin çevrelerinde birikmesiyle agregasyon gerçekleşebilir veya çözünürlüğün azalmasıyla nanopartiküller dolaşımdan atılarak etkisiz hale getirilebilir (Pederzoli et al., 2017; Falahati et al., 2019; Nikzamir et al., 2021). Protein korona sıklıkla yararlı yüzey fonksiyonlarını örten bir tabaka olarak görülse de bazı durumlarda stabiliteyi arttırdığı belirlenmiştir (Ho et al., 2014). Salvati et al., (2013) tarafında biyolojik ortama aktarılan işlevselleştirilen nanopartiküllerin yüzeylerinde oluşan protein korona nedeniyle hedefleme özgülüğünü kaybettiği bildirilmektedir. Nanopartiküllerin etrafında meydana gelen protein korona yapıları indüklenmiş sitotoksiteden, infiltrasyon mekanizmasına ve hücrel alıma kadar nanopartikül-biyolojik ortam etkileşimlerinde tüm özellikleri etkilemektedir (Falahati et al., 2019).

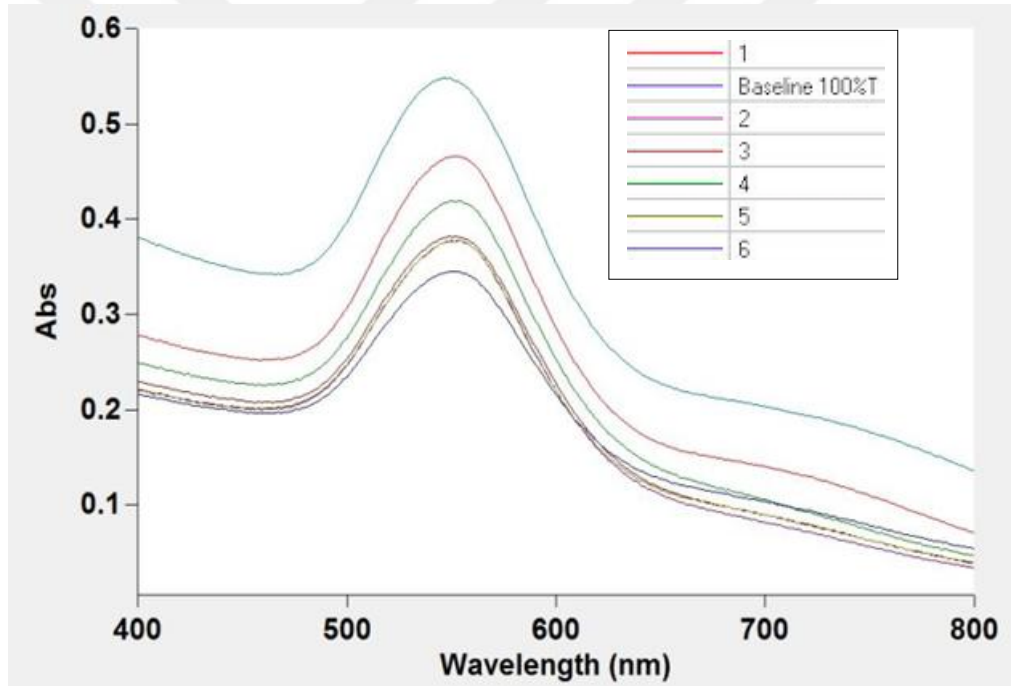
4.11 AuNP-BSA Konjugat Stabilitesi

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS ile sentezlenen AuNP'ler ve BSA ile oluşturulan konjugatların *in vitro* stabilitesi 12 saatte bir hazırlanan örneklerin zeta potansiyeli ölçümü ve UV-Vis spektroskopisi (**Şekil 4.28**) ile değerlendirildi (**Tablo 4.11**). Zeta potansiyelinin -30 mV'dan büyük ve negatif (-mV) ölçülmesi partiküllerin birbirini ittiğini ve kümelenme eğiliminde olmadığını dolayısıyla artan kararlılığı göstermektedir (Larssons et al., 2012; Banerjee and Rai, 2017; Akintelu et al., 2021). **Farklı zaman dilimlerinde periyodik olarak ölçülen SPR bantlarının birbirine olan yakınlığı ve ölçülen zeta potansiyelleri**

AuNP-BSA konjugatlarının RPMI-1640 besin ortamında 72 saat'lik değerlendirmesinde iyi bir karahlığa sahip olduğu gözlemlendi.

Tablo 4. 11 Zeta potansiyeli ölçümleri

Deney Grupları – Stabilitenin Test Süresi (saat)	Zeta Potansiyeli (mV)	SPR Bandı
Au – BSA - 12 saat (6. örnek)	-23,2	550 nm
Au – BSA - 24 saat (5. örnek)	-23,2	554 nm
Au – BSA - 36 saat (4. örnek)	-22,6	554 nm
Au – BSA - 48 saat (3. örnek)	-24,4	552 nm
Au – BSA - 60 saat (2. örnek)	-23,8	554 nm
Au – BSA - 72 saat (1. örnek)	-19,5	552 nm



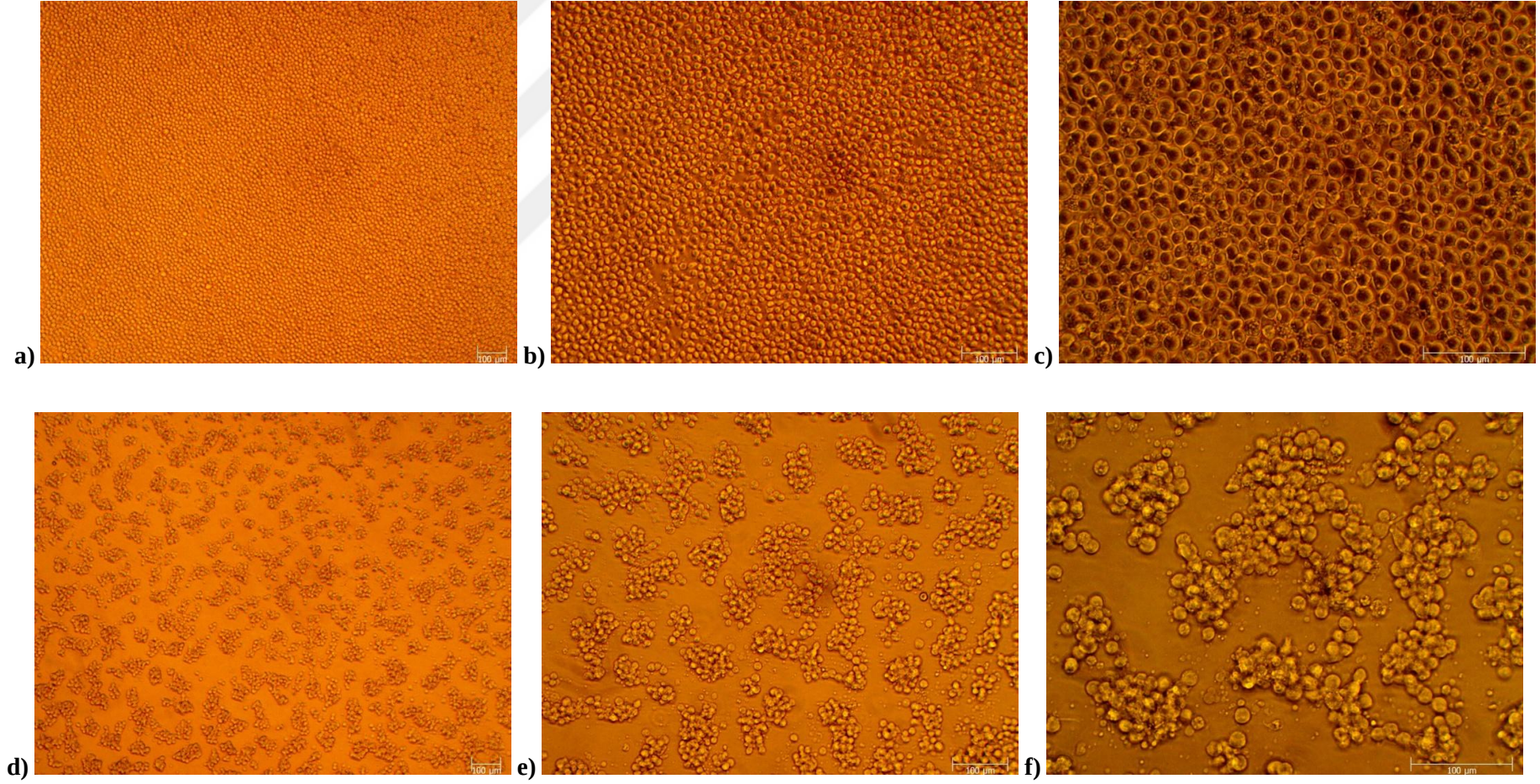
Şekil 4. 28 AuNP-BSA konjugatının 72. saate kadar ölçülen SPR bantları

4.12 *In Vitro* Hücre Kültürü Denemeleri ile mAuNP'lerin Adjuvan Potansiyelinin Değerlendirilmesi

4.12.1 U937 insan monosit hücrelerinin makrofajlara farklılaştırılması

Monositler ve makrofajlar kemik iliğinde bulunan pluripotent hematopoietik kök hücrelerden köken alırlar. Monosit progenitör hücreleri monoblastlara, promonositlere ve son olarak monositlere dönüşür. Monositler kemik iliğini terk eder, kan dolaşımına göç eder, uygun koşullar altında monositler makrofajlara farklılaşır, çeşitli organlara ve vücut boşluklarına rastgele göç ederler (Furth, 1994). Monosit ve makrofajlar için model sistemler olarak U937, HL-60, THP-1 ve Mono Mac 6 insan monositik hücre hatları kullanılmaktadır. U937 ve THP-1 hücreleri, monositik farklılaşmayı ve farklılaşmış hücrelerin sonraki biyolojik fonksiyonlarını araştırmak için en yaygın kullanılanlardır (Baek et al., 2009). Makrofajlar, çeşitli dokularda bulunan doğal bağışıklık sisteminin fagositik hücreleridir. Fagositozun yanı sıra, inflamasyonda da merkezi bir rol oynarlar. Makrofajlar, birincil monositlerden farklılaşmaları sırasında, hem apoptotik hem de enfekte olmuş hücreleri tanımak ve temizlemek için özel reseptörlere sahip hücrelerdir. Apoptotik hücrelerin temizlenmesinde, makrofajlar, fagositoz için hedeflenen hücre tipine bağlı olarak bağımsız ve/veya birbirleriyle işbirliği içinde işlev görürler (Scull et al., 2010; Arango Duque and Descoteaux, 2014).

Çalışmada makrofaj benzeri bir fenotipe farklılaşan monosit benzeri insan histiositik lenfoma hücre hattı U937 hücreleri, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) tarafından indüklenerek monositik farklılaşmaya maruz bırakıldı. U937 insan monosit hücreleri farklılaşmaya maruz kalmadığı doğal koşullarda besin ortamında süspanse halde bulunmaktadır. Hücreler indüklenerek makrofaja farklılaştığında, tipik makrofaj morfolojisi kazanır, yapışkan hale gelir, üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturarak, hücre kültür kabına tutunduğu gözlenir (Verhoeckx et al., 2004). İnkübasyonun ardından Inverted mikroskop altında incelenen U937 insan monosit hücrelerinin makrofaja farklılaştığı (Şekil 4.29) doğrulandı ve PMA içeren besin ortamı uzaklaştırıldı.

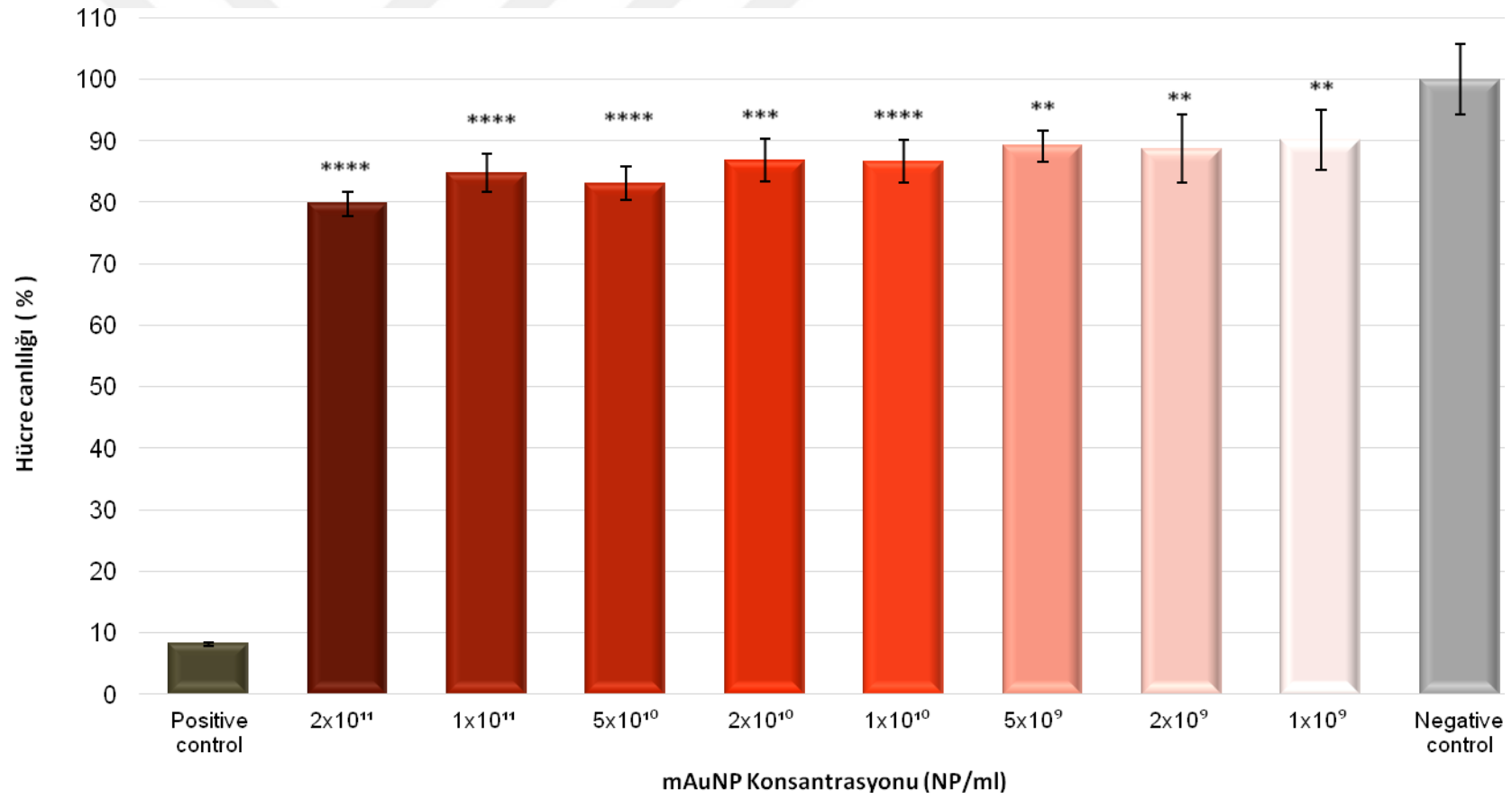


Şekil 4. 29 U937 monosit hücrelerinin sırasıyla a), 10x, b) 20x ve c) 40x büyütmelerdeki mikroskop görüntüleri ve PMA uygulaması ardından makrofaja farklılaşan hücrelerin sırasıyla d)10x, e) 20x ve f)40x büyütmelerdeki mikroskop görüntüleri

4.12.2 Sitotoksisite testi

Streptomyces sp. M137-2'e ait HFS tarafından sentezlenen mAuNP'lerin sitotoksisitesi iki ayrı hücre hattı, L929 (Fare Deri Fibroblast Hücreleri) ve makrofaja farklılaşan U937 (Monosit Benzeri İnsan Histiositik Lenfoma Hücreleri) hücreleri kullanılarak MTT testi ile belirlendi. Yüksek konsantrasyondan başlanarak (2×10^{11} NP/ml) düşük konsantrasyona doğru (1×10^9 NP/ml) geniş bir tarama aralığında, negatif ve pozitif kontrol gruplarının varlığında L929 hücreleri 24 saat boyunca mAuNP'ler ile muamele edildi ve hücrelerin % canlılık oranı değerlendirildi. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan ve kontrol grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırılan mAuNP'lerin varlığında L929 hücreleri % canlılık oranı **Şekil 4.30'da** sunulmaktadır.

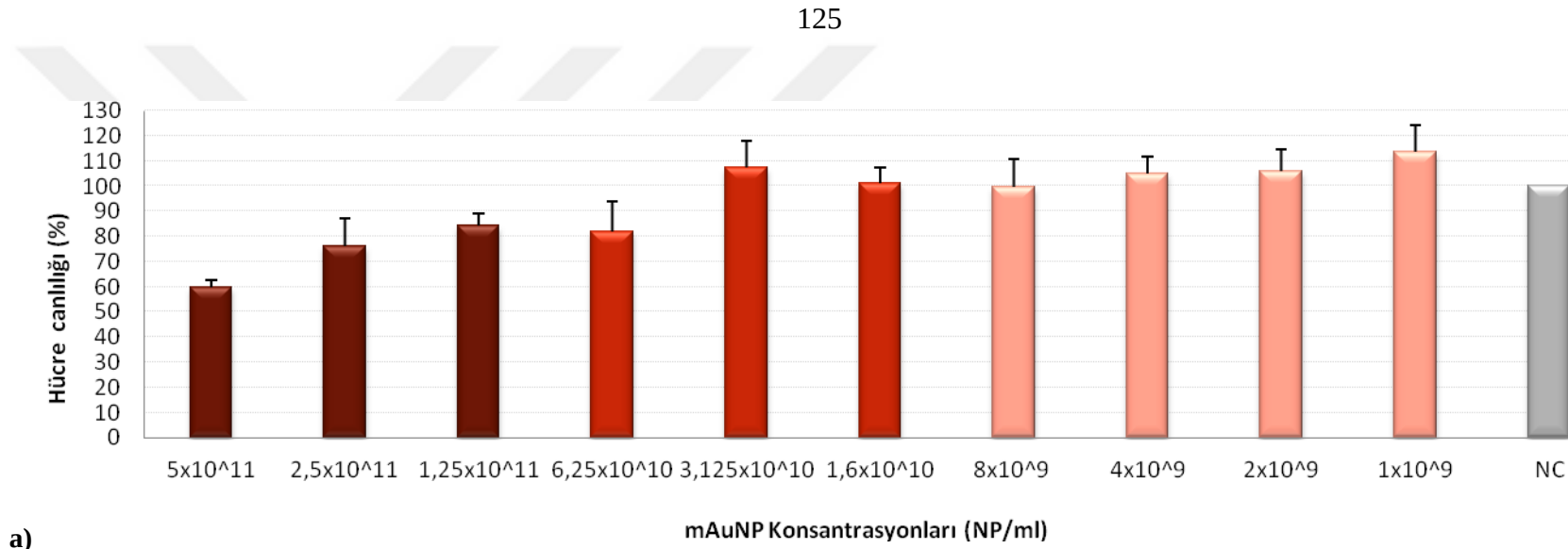
Çalışmada tüm uygulanan mAuNP konsantrasyonlarında L929 hücre canlılığının %80'nin altına düşmediği, ISO 10993-5:2009 (EN) standart prosedürüne göre önerilen %70 canlılık sınırının üzerinde olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar *Streptomyces* sp. M137-2'e ait HFS tarafından sentezlenen mAuNP'lerin yüksek konsantrasyonlarda (2×10^{11} NP/ml) dahi düşük sitotoksik etkisini ve biyolojik olarak uyumluluğunu gösterdi.



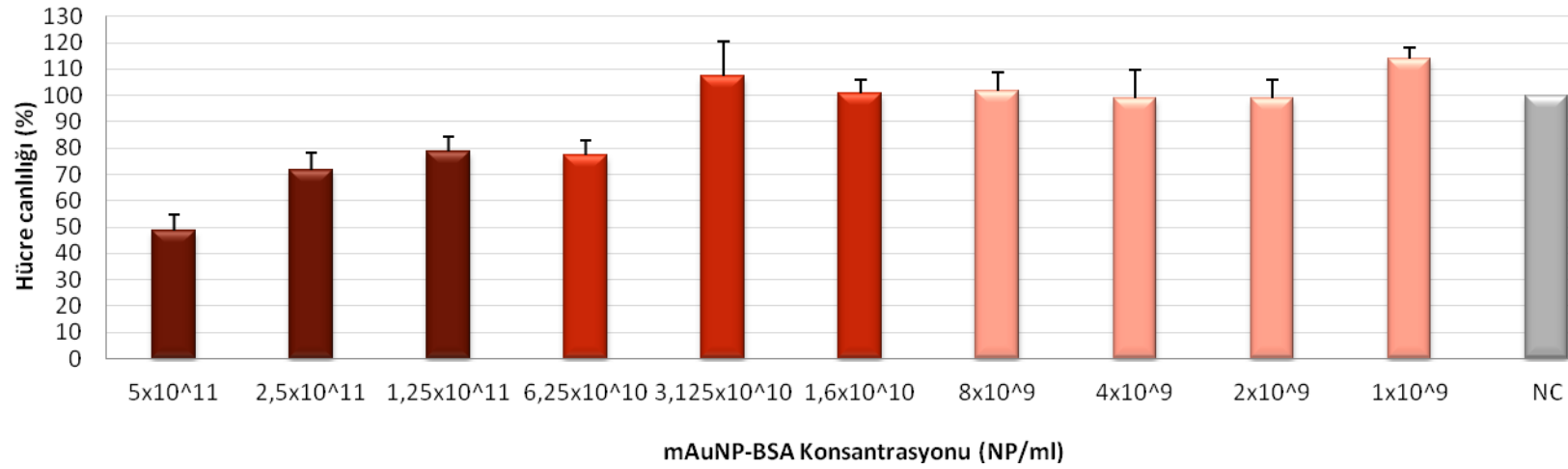
Şekil 4. 30 L929 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda mAuNP sitotoksitesisi

Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri üzerinde mAuNP miktarının en yüksek olduğu 5×10^{11} NP/ml konsantrasyonunda canlılık yaklaşık %60, uygulanan diğer tüm konsantrasyonlarda ise %70 ve üzerinde belirlendi (**Şekil 4.31a**). Benzer şekilde 5×10^{11} NP/ml konsantrasyonda mAuNP içeren mAuNP-BSA konjugatı varlığında makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri %49 diğer tüm konsantrasyonlarda bu değer %70'in üzerinde belirlendi (**Şekil 4.31b**). Genel olarak $1,25 \times 10^{11}$ NP/ml ve altındaki mAuNP konsantrasyonlarında hücre canlılığı %80 ve üzeri belirlenirken, aynı oranın mAuNP-BSA konjugatları için $3,125 \times 10^{10}$ NP/ml ve altındaki konsantrasyonlarda sağlandığı belirlendi. BSA varlığının sitotoksik etkiyi bir miktar arttırdığı da tespit edildi.

mAuNP ve mAuNP-BSA konjugatlarının uygulanan 3×10^{10} NP/ml ve 6×10^{10} NP/ml konsantrasyonlarında hücre canlılığının %75'in altına düşmediği, ISO 10993-5:2009 (EN) standart prosedürüne göre önerilen %70 canlılık sınırının üzerinde olduğu belirlendi. Ticari olarak temin edilen altın nanopartiküller (tAuNP) ve BSA ile oluşturulan konjugatları da (tAuNP-BSA) belirlenen konsantrasyon ile aynı olacak şekilde kullanıldı. Tüm deney grupları ile gerçekleştirilen sitotoksikite testi sonucunda sitokin seviyelerinin belirlenmesi ve nanopartiküllerin hücresel alım çalışmalarında 3×10^{10} NP/ml ve 6×10^{10} NP/ml konsantrasyonlarının uygulanmasına karar verildi.



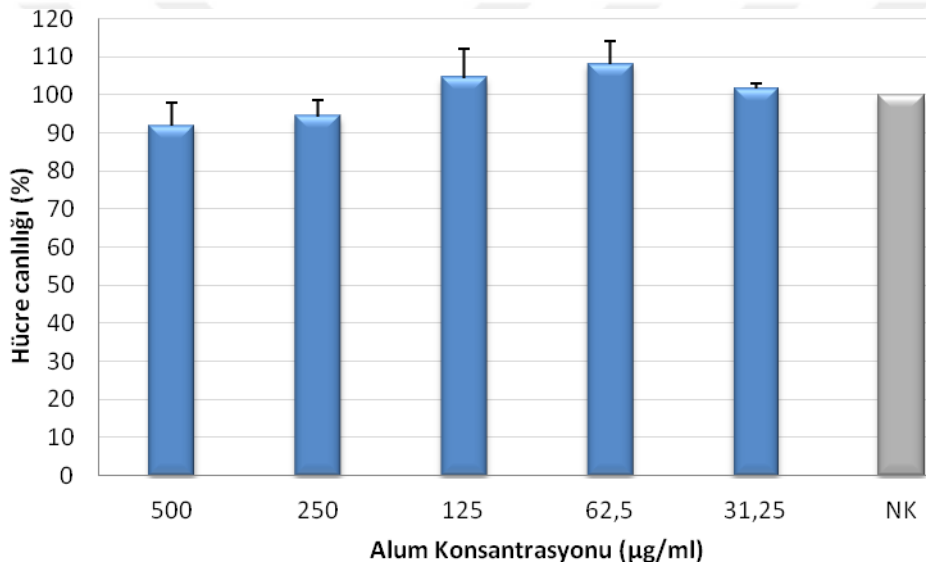
a)



b)

Şekil 4. 31 Makrofaj hücrelerinin (U937) a) mAuNP ve b) mAuNP-BSA konjugatının varlığında hücre canlılığı

Alüminyum hidroksit $\text{Al}(\text{OH})_3$ ve alüminyum fosfat $\text{Al}(\text{PO})_4$ tuzlarının jeli olan alum, tez çalışması kapsamında bağışıklık indüksiyonunu arttırdığının bilinmesi ve yaygın olarak kullanılan lisanslı adjuvan olması nedeniyle sentezlenen mAuNP'lerin adjuvan etkinliğinin değerlendirilmesinde kontrol grubu olarak kullanıldı. Literatür araştırmaları sonucunda alumun adjuvan olarak kullanım konsantrasyonunun 50 – 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralığında olduğu belirlendi (Parween et al., 2011; Ghimire et al., 2012; Mold et al., 2016). Bu nedenle tez çalışması kapsamında alumun farklı konsantrasyonlarda sitotoksik etkisi incelendi ve uygulanan tüm alum konsantrasyonlarında hücre canlılığının %90'nın üzerinde olduğu belirlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4. 32 Makrofaj hücrelerinin alum varlığında hücre canlılığı

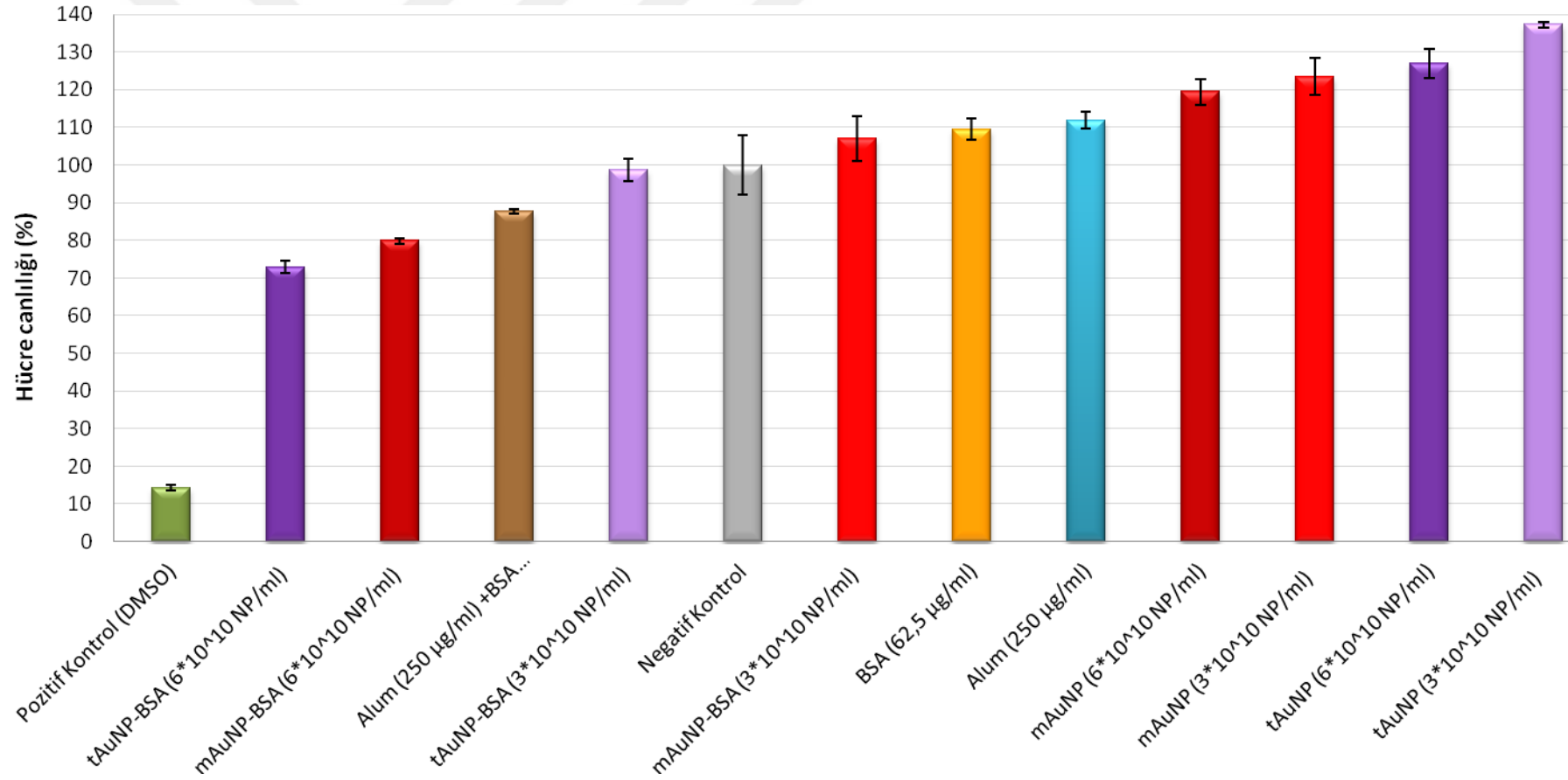
Aşı adjuvanları üzerinde çok sayıda çalışma yapılmasına, çeşitli moleküller ve formülasyonlar incelenmesine rağmen insan aşılarının formülasyonunda kullanılabilen onaylı adjuvanlar alüminyum tuzları (Alum), emülsiyonlar (MF59, AS03) ve virozomlardır. Antikor üretimini indüklemeye yeteneğinde olan bu partikül formülasyonlarından alüminyum tuzları baskın Th2 tepkisini indüklerken, emülsiyonlar ve virozomlar Th1 ve Th2 tepkisini aynı anda indükleyebilmektedir (Marques Neto et al., 2017). Alüminyum tuzları, insan aşılarında en yaygın kullanılan adjuvanlardır. Genellikle antijeni enjeksiyon bölgesinde antijen depo etkisi ile tutar, inflamasyonu indükler. Hümmoral bağışıklık tepkilerini etkin bir şekilde artırır ancak hücrel bağışıklık tepkileri

sınırlıdır. Yanı sıra geçici lokal doku tahrişi de meydana getirmektedir (Lindblad, 2004; Kool et al., 2012). Çalışma kapsamında 6×10^{10} NP/ml ve 3×10^{10} NP/ml konsantrasyonlarında AuNP (mAuNP ve tAuNP) ve AuNP-BSA (mAuNP ve tAuNP ile) konjugat grupları, alum adjuvanı (250 µg/ml), ve negatif kontrol gruplarının makrofaja farklılaşan U937 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri karşılaştırıldı (Bkz. **Tablo 3.4.**). Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri ile 24 saat muamele edilen deney grupları sonucu elde edilen % canlılık oranı **Şekil 4.33**'de sunulmaktadır. Tüm gruplar değerlendirildiğinde canlılık oranının %70 üzerinde olduğu belirlendi. Ticari altın tüm konsantrasyonlarında mikrobiyal altına göre daha düşük toksisite gösterirken her iki AuNP grubunda BSA ile konjugatlarının canlılık oranında düşüş gözlemlendi. **Elde edilen veriler doğrultusunda 3×10^{10} NP/ml ve/veya daha düşük konsantrasyona sahip mAuNP'lerin sitotoksik etkisinin olmadığı ve toksisite açısından değerlendirildiğinde adjuvan olarak kullanım potansiyelinin olduğu belirlendi.**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi One – Way ANOVA Tukey testi ile yapıldı. Deneme grupları ve kontrol grupları kıyaslandığında artış istatistiksel olarak önemli oldu. Aynı zamanda ANOVA analizi R^2 değerinin 1'e olan yakınlığı deneysel verileri anlamlı kılmaktadır (**Tablo 4.12**).

Tablo 4. 12 Makrofaja farklılaşan U937 hücrelerinin sitotoksikite testi ANOVA analizi

F	223.3
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9904



Şekil 4. 33 Makrofaj hücrelerinin deney gruplarındaki hücre canlılığı (%)

Nanomalzemelerin herhangi bir terapötik uygulamadan önce *in vivo* toksisite profilinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Nanotoksikoloji, nanopartiküllerin yalnızca güvenlik değerlendirmesi için bilgi sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda istenmeyen özellikleri ve bunlardan korunma yolları hakkında veri sağlayarak nanotibbin geliştirilmesine yardımcı olan bir disiplindir. Altın nanopartiküllerin biyomedikal alandaki uygulamalarda hastalıkların, teşhis tedavisinde yepyeni bir yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte özellikle terapötik ve tanısal uygulamalarda başarı ölçütü intravenöz veya oral yolla hastalara uygulanan dozun önemli ölçüde toksik profiline bağlıdır. AuNP'lerin sağlık üzerindeki etkileri hakkında çok az bilgi bulunmakta ve bu etkileri toksisite ile ilişkilendiren düzenleyici güvenlik önlemleri ve/veya yönergeler henüz bulunmamaktadır (Anik et al., 2021; Nikzamir et al., 2021).

Birçok çalışmada her ne kadar diğer metal nanopartiküllere kıyasla AuNP'lerin daha düşük toksisitesi tanımlansa da geniş uygulama alanları nedeniyle toksisite hala bir endişe kaynağıdır. Halihazırda literatürde çeşitli çalışmalar AuNP'lerin hiç veya çok düşük toksisiteye sahip olduğunu ve bunun fizyolojik olarak önemsiz olduğunu vurgulasa da birçok çalışma bu ifade ile çelişen sonuçlar ortaya koymaktadır. Bütünsel bir çıkarım yapabilmek için nanopartiküllerin biyolojik ortamlar ile etkileşimlerinden önce ve sonra partiküllerin değişen fizikokimyasal özelliklerinin karakterize edilmesine odaklanılarak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Diğer bir önemli durum ise nanopartiküllerin toksikolojik değerlendirilmesi sırasında uygulanacak dozun, terapötik uygulamalarda kullanılan etkin terapötik dozun belirlenmesi ve deneysel olarak uygulanması gerekmektedir. AuNP'lerin kaplanması ve/veya fonksiyonelleştirilmesiyle toksisitesi, farmakokinetiği değişmekte olup yüzey bileşenlerinin de değerlendirilmesi ihtiyaç duyulan önemli bir diğer konudur (Dykman and Khlebtsov, 2011; Bailly et al., 2019; Fries et al., 2020; Anik et al., 2021; Sani et al., 2021).

AuNP'lerin boyuta (1.5-100 nm) bağlı *in vivo* ve *in vitro* toksisitesinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar olmasına rağmen elde edilen sonuçlar yetersiz kalmaktadır. Uygulanan her madde/molekül yüksek konsantrasyonlarda hücreler için sitotoksik etki yaratabilir, terapötik moleküller dahi yüksek konsantrasyonlarda hücresel işlevlerde dengesizliğe neden olabilmekte ve toksik etkilere yol açabilmektedir. Toksik etki değerlendirilirken asıl sorulması gereken sorular ve düşünülmesi gerekenler; teşhis ve terapötik uygulamalarda hücresel, mitokondriyal ve genomik toksisiteyi indüklemekten hangi konsantrasyonlarda

AuNP'leri kullanabilirim olmalıdır. Konsantrasyonun dışında nanopartikül boyut, şekil ve yüzey kimyası, stabilizasyon amacıyla yapılan kaplamalar, uygulama dozu, yolu/şekli, süresi, *in vivo* ve *in vitro* deney koşullarındaki farklılıklar toksisite profilini etkileyen önemli diğer faktörlerdir. Bu farklılıklardan kaynaklı AuNP'lerin potansiyel toksik etkilerinin değerlendirilmesinde literatür ile spesifik bir karşılaştırma yapmak oldukça zordur (Anik et al., 2021; Sun et al., 2021).

AuNP'lerin sahip oldukları geniş yüzey alan-hacim oranı nedeniyle yüksek kimyasal reaktivite göstermeleri ve tiyol, amin gruplarına bağlanma afinitesinden kaynaklı kolaylıkla biyomoleküller ile etkileşime girebilmeleri sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır. Böylece AuNP'ler hücrelerde toksik etkilere neden olabilecek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebilmektedir. ROS üretimi, iltihaplanma, oksidatif stres ve bunun sonucunda hücre zarı, sitoplazma, mitokondri, nükleus gibi organallerde, hücresel proteinler ve DNA'da hasarlara neden olarak sitotoksik etki yaratmaktadır (Lewinski et al., 2008; Nikzamir et al., 2021). Nano ölçekte, partiküllerin kimyasal bileşimleri, fiziksel özellikleri ve biyokimyasal modifikasyonlarının biyolojik etkilerini *in vivo* şartlar belirler. AuNP'lerin *in vitro* toksisitesi değerlendirilirken oksidatif durum ile ilişkilendirilmekte, ROS üretiminin zamana ve doza bağlı olarak artışı izlenmektedir. Hücre canlılığı testlerinden elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak hücrelerin aşırı ROS üretimi sonucu stresin artmasıyla apoptoz veya nekrozis (fagositoz veya inflamasyon) ile hücre ölümünün gerçekleştiği görülmektedir (Shen et al., 2018; Sani et al., 2021).

AuNP'ler boyutlarına bağlı olarak metabolik reaksiyonlarda katalizör görevi görebilir, diğer ilaçlarla etkileşime girebilir, karaciğer ve dalakta birikerek, 3-4 ayda atılabilir. Biyoetiket, biyosensör ve ilaç taşıyıcısı olarak uygulanan AuNP'lerin özellikle karaciğerde ve dalakta retiküloendotelyal sistem yoluyla yüksek düzeyde biriktiği yaygın olarak kabul görmektedir (detoksifikasyona yardımcı olmaları sebebiyle ilk hedeflenen organlardır). AuNP'lerin hepatotoksiste, sitotoksiste ve toksisiteye neden oldukları, intravenöz uygulamaların ardından karaciğer dokusunda apoptoz ve inflamasyon gözlemlendiği bildirilmektedir. Aşı geliştirme çalışmalarında AuNP'lerin işlevselleştirilmesine yönelik çok sayıda araştırma olmasına rağmen sadece birkaç klinik uygulaması bulunmaktadır (Anik et al., 2021; Sani et al., 2021; Sun et al., 2021). Diğer yandan AuNP'lerin, adjuvan olarak kullanımının toksisiteyi azalttığı, immünojenik aktiviteyi arttırdığı ve aşının depolanma stabilitesini sağladığı, sentetik ve subunit aşılarında

antijen taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığı ve nanopartiküle bağlı bir toksisitenin oluşmadığı da bildirilmektedir (Niikura et al., 2013; Zhao et al., 2014; Martins et al., 2016; Carabineiro, 2017).

AuNP'lerin tıp ve biyomedikal alandaki çeşitli uygulamalarında aktivitelerini arttırmak amacıyla yüzeylerinin stabilize edici ajanlar ile kaplanması ve/veya çeşitli moleküller ile konjuge edilerek fonksiyonelleştirilmesinden kaynaklı partikül yüzeyinde korona tabakası oluşumu, partikül boyutunun artışı, yüzey yükünün değişimi ve dolayısıyla toksik etkisinin değişimi söz konusudur. Yüzeyi anyonik ve katyonik kaplanan AuNP'lerin toksisite profili incelendiğinde, katyonik kaplanan AuNP'lerin hücreler tarafından alınımının iki ila üç kat artış göstermesi ve bu şekilde yüksek konsantrasyondan kaynaklı toksisite sonucu bildirilmektedir. Yüzey modifikasyonunda kullanılan bu moleküllerin eğer uygun şekilde modülasyonu gerçekleştirilirse birçoğu daha düşük sitotoksik etki ile toksisiteyi etkili bir şekilde azaltabilir ve güçlü bir biyolojik dağılım sergileyebilir (Fraga et al., 2014; Shen et al., 2018; Canepa et al., 2021; Sani et al., 2021).

Ancak AuNP'lerin uygulandığı çalışmalarda yüzey modifikasyonu kaynaklı toksisite bildiren çalışmalar da mevcuttur. Connor et al. (2005) tarafından K562 kronik myeloid lösemi hücre hattında AuNP'lerin hücresel alımı ve sitotoksik seviyesinin değerlendirildiği çalışmada, AuNP'lerin hücreler üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ancak CTAB ile fonksiyonelleştirilen AuNP deney grubunun toksik etkisinin CTAB kaynaklı olduğu, sodyum sitrat kaplı AuNP'lerin (15 nm) servikal karsinoma HeLa hücreleri ve U937 insan monositik hücrelerinde dikkate değer sitotoksik etki sergilediği (Sabella et al., 2011), sitrat ve poliamidoamin ile kaplı AuNP'lerin HepG2 hepatoselüler karsinom hücreleri ve PBMC (periferik kan mononükleer hücreleri) hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkisinin varlığı (Martinez Paino et al., 2012) rapor edilen çalışmalardır. Vijayakumar and Ganesan (2012), farklı (sitrat, nişasta, zamk/gum arabic) stabilize edici ajanlar ile kaplanan AuNP'lerin (~20-22 nm) insan prostat kanser (PC-3) ve insan meme kanseri (MCF-7) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada sitrat kaplı AuNP'lerin diğer gruplara kıyasla daha sitotoksik olduğunu bildirdiler.

AuNP'lerin biyolojik sistemlerle etkileşimleri (hücreler tarafından alınması) nanopartiküllerin boyutuna ve yüzey yüküne bağlıdır. AuNP'lerin sahip oldukları geniş yüzey alanı-hacim oranı biyomedikal uygulamalarda partikül boyutunun önemini

vurgulamaktadır. AuNP'ler geniş yüzey alanı- hacim oranı sayesinde kaplandıkları zaman ve/veya ligand eklendiğinde boyutları artar ve dolayısıyla toksisite artar. Bu durum kütle dozajı düşünüldüğünde büyük partiküllere kıyasla küçük partiküllerin daha toksik olmasının sebebi olarak açıklanmaktadır (Chitrani et al., 2006; Khan et al., 2007; Sani et al., 2021). Küçük boyutlu AuNP'lerin (<20 nm) ROS oluşumuna yol açabilen geniş yüzey alanına sahip olduğu, hücre zarındaki lipid katmanlarında kütle kaybına sebep olarak, gözenek oluşturduğu ve membran yapısının bozulmasına sebebiyet verdiği ve böylece daha yüksek toksisite gösterdiği **20 nm ve daha büyük AuNP'lerin hücre zarında herhangi bir hasar oluşturmadığı bildirilmektedir** (Lewinski et al., 2008; Camesano et al., 2011).

10 nm'den küçük AuNP'ler hücre nükleusuna daha kolay girer ve DNA ile etkileşime geçerek daha büyük boyutlu partiküllere kıyasla daha yüksek sitotoksikite sergiler (Pan et al., 2007). Kemirgenlerde (Rodent) yapılan çalışmalarda 50-100 nm boyut aralığındaki AuNP'lerin, 5-15 nm boyutlarındaki AuNP'lere oranla daha düşük toksisite gösterdiği (De Jong et al., 2008; Sonavane et al., 2008; Chen et al., 2009; Kim et al., 2009), 5-10 nm boyutlarındaki AuNP'lerin farelerin karaciğerinde önemli histopatolojik değişikliklere neden olduğu, 20-50 nm boyutlu AuNP'lerin ise minör etkiler gösterdiği bildirilmektedir (Abdelhalim et al., 2011; İbrahim et al., 2018). Benzer şekil küçük boyutlu AuNP'lerin in vitro ve in vivo sitotoksik etki gösterdiği çalışmalar rapor edilmiştir (Pernodet et al., 2006; Pan et al. 2007; Chen et al., 2010). **Bu tez çalışmasında kullanılan 40-50 nm boyutlarındaki AuNP'lerin sitotoksik etki göstermemiş olması literatür verileriyle uyumludur.**

Tao et al. (2014), OVA ve OVA-CpG ile konjüge edilen AuNP'lerin (ortalama 1,5 nm) RAW264.7 mürin makrofaj hücreleri üzerinde hücre canlılığı geniş bir aralıkta (5 – 100 µg/mL) değerlendirildiğinde en yüksek konsantrasyonda dahi belirgin bir hücresel toksisitenin gözlenmediği, düşük sitotoksikite (hücre canlılığı %90 üzeri) sergiledikleri ve biyouyumlulukları; bir diğer çalışmalarında peptit ile konjüge edilen AuNP'lerin (ortalama 1,5 nm) RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği bildirildi (Tao et al., 2015). Bancos et al. (2015) tarafından RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerinde 10 nm ve 300 nm boyutlarındaki AuNP'lerin 0,005-0,01-0,1-1 g/L konsantrasyonlarında 48 saat boyunca sitotoksitesini değerlendirdi. 10 nm boyutlarındaki AuNP'lerin 0,005-0,01 g/L konsantrasyonları (0,1 g/L de canlılık %50'nin üzerinde, 1 g/L konsantrasyonu toksik), 300 nm boyutlarındaki AuNP'lerin ise hiçbir konsantrasyonu toksik etki göstermediği, Chen

and Gao (2017), PEG ve OVA ile fonksiyonelleştirilen 12, 35 ve 60 nm boyutlarındaki AuNP'lerin RAW264.7 makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksitesi incelendiğinde tüm deney gruplarındaki AuNP'lerin ihmal edilebilir bir toksisite gösterdiği (hücre canlılığı %70'in üzerinde) rapor edilen çalışmalardır. RAW264.7 makrofaj hücreleri ve DC2.4 hücreleri farklı konsantrasyonlarda AuNP'lerin (~42 nm) uygulaması ardından en yüksek konsantrasyonda dahi (100 µg/mL) DC2.4 hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkinin gözlenmediği, RAW264.7 makrofaj hücrelerinde ise en yüksek dozda hücre canlılığının yaklaşık %70 ve diğer konsantrasyonlarda %90'nın üzerinde olduğu bildirilen çalışmalar arasındadır (Ding et al., 2017). Kang et al. (2017), OVA ile konjüge edilen 7, 14 ve 28 nm boyutlarındaki AuNP'lerin uygulanan en yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) bile DC2.4 hücre canlılığı üzerinde hiçbir sitotoksik etkisinin gözlenmediği, aşı taşıma sistemi için geliştirilen AuNP'lerin güvenli olduğu bildirilmektedir. Orłowski et al. (2018), JAWSII hücre hattında AuNP'lerin boyut (10, 34, 62 nm) ve konsantrasyona (0.5-1-2.5-5-10 µg/mL) bağlı sitotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmada 10 nm boyutundaki AuNP'lerin sadece 10 µg/mL konsantrasyonda güçlü toksik etkisi bildirildi/önemli oranda apoptoza neden olduğu bildirildi.

Genel olarak küresel metal nanopartiküller toksik değildir ve/veya diğer şekillerdeki partiküllere kıyasla daha az toksisite sergilemektedir (Murphy et al., 2008; Schaeublin et al., 2012). Niikura et al. (2013), BMDC (kemik iliği kök hücreleri) ve RAW264.7 mürin makrofaj hücreleri üzerinde farklı şekil ve boyutlara sahip AuNP'lerin [küresel (20 ve 40 nm), küp (40x40x40 nm), nanoçubuk (40x10 nm)] değişen konsantrasyonlarda (2-4-10 µg/mL) sitotoksik etkisini inceledi. RAW264.7 makrofaj hücrelerinde uygulanan grupların hiçbirinin kontrol grubuna kıyasla sitotoksositeye yol açmadığı, BMDC hücrelerinde ise 10 µg/mL konsantrasyondaki nanoçubukların sitotoksik etkisi rapor edilmektedir. Tazaki et al. (2018), MTAB (4-methylthioamphetamine) ile fonksiyonelleştirilen 20 - 40 nm boyutlarında küresel AuNP'lerin ve 30 - 40 nm boyutlarındaki nanoçubukların farklı konsantrasyonlarının (100-200-400 µg/mL⁻¹) sitotoksik etkisi BMDC hücreleri üzerinde test edildi. Küresel AuNP'lerin ve 30 nm boyutundaki nanoçubukların sitotoksosite göstermediği ancak 200 µg/mL⁻¹ konsantrasyondaki 40 nm boyutlu nanoçubukların hücre canlılığında önemli oranda bir azalma gözlemlendiği (istatistiksel olarak anlamlı) bildirildi. Steckiewicz et al. (2019), yıldız (~215 nm), çubuk (~39/18 nm) ve küresel (~6.3) şekle sahip AuNP'lerin 3 farklı insan hücre hattında, MG63 (osteosarcoma), hFOB (insan fetal osteoblast) ve hTERT-HPNE

(insan pankreas kanalı hücreleri) sitotoksik etkisini değerlendirdiği çalışmasında yıldız şeklindeki AuNP'lerin hücre hatları üzerinde en yüksek toksik etkiyi indüklediğini bildirmektedir. Steckiewicz et al. (2019) tarafından nanoyıldızların hücreler üzerinde en yüksek toksisiteyi indüklediği gözlenirken, Pakravan et al. (2021) çalışmasında hücre canlılığının %90'nın üzerinde olduğu gözlenmektedir.

Bu güne kadar yapılan *in vitro* ve *in vivo* sitotoksisite çalışmaları incelendiğinde bu konuda fikir ayrılıkları olduğu görülmektedir. Bu durum AuNP'lerin toksisitesi hakkında genelleme yapılamayacağı ve sentezlenen her yeni partikülün toksisitesinin değerlendirilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Çünkü nanopartikülün boyut, şekil, yüzey yükü, fonksiyonelleştirmeye bağlı kazandığı özellikler, uygulanan nanopartikül konsantrasyonu, çalışılan hücre hattı ve deney koşullarına bağlı olarak sitotoksisite etkileri farklılık göstermektedir. Literatür verileri incelendiğinde 25-50 nm boyutlarına sahip AuNP'lerin hücreler tarafından alımı ve dokulardaki dağılımının en yüksek seviyede olduğu, 20 nm'den büyük AuNP'lerin düşük seviyede ROS oluşumuna sebep olmasıyla hücre zarında herhangi bir hasar oluşturmadığı genel olarak 30-60 nm boyutlarındaki küresel AuNP'lerin oldukça düşük sitotoksisite sergilediği görüldü. **Bu çalışmada da sitotoksik etkisi değerlendirilen küresel AuNP'lerin ortalama çekirdek boyutları ~43 nm'dir. Geniş tarama aralığında uygulanan mAuNP konsantrasyonlarının L929 hücre canlılığının %80'nin altına düşmediği, makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinde ise hücre canlılığının en yüksek konsantrasyonda (5×10^{11} NP/ml) dahi yaklaşık %60 olduğu belirlendi. Genel olarak BSA ile konjüge edilen mAuNP konjugatlarının sitotoksisitesinin BSA varlığında bir miktar arttırdığı gözlemlendi. mAuNP–BSA konjugatı varlığında makrofaja farklılaşan U937 monosit hücre canlılığı en yüksek konsantrasyonda %49, diğer tüm konsantrasyonlarda ISO 10993-5:2009 (EN) standart prosedürüne göre önerilen %70 canlılık sınırının üzerinde olduğu belirlendi. Bahsedilen çalışmaların tümü kimyasal sentez ile elde edilen AuNP'ler kullanılarak gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada ilk defa mikrobiyal AuNP kullanılarak elde edilen sonuçlar sunulmaktadır.**

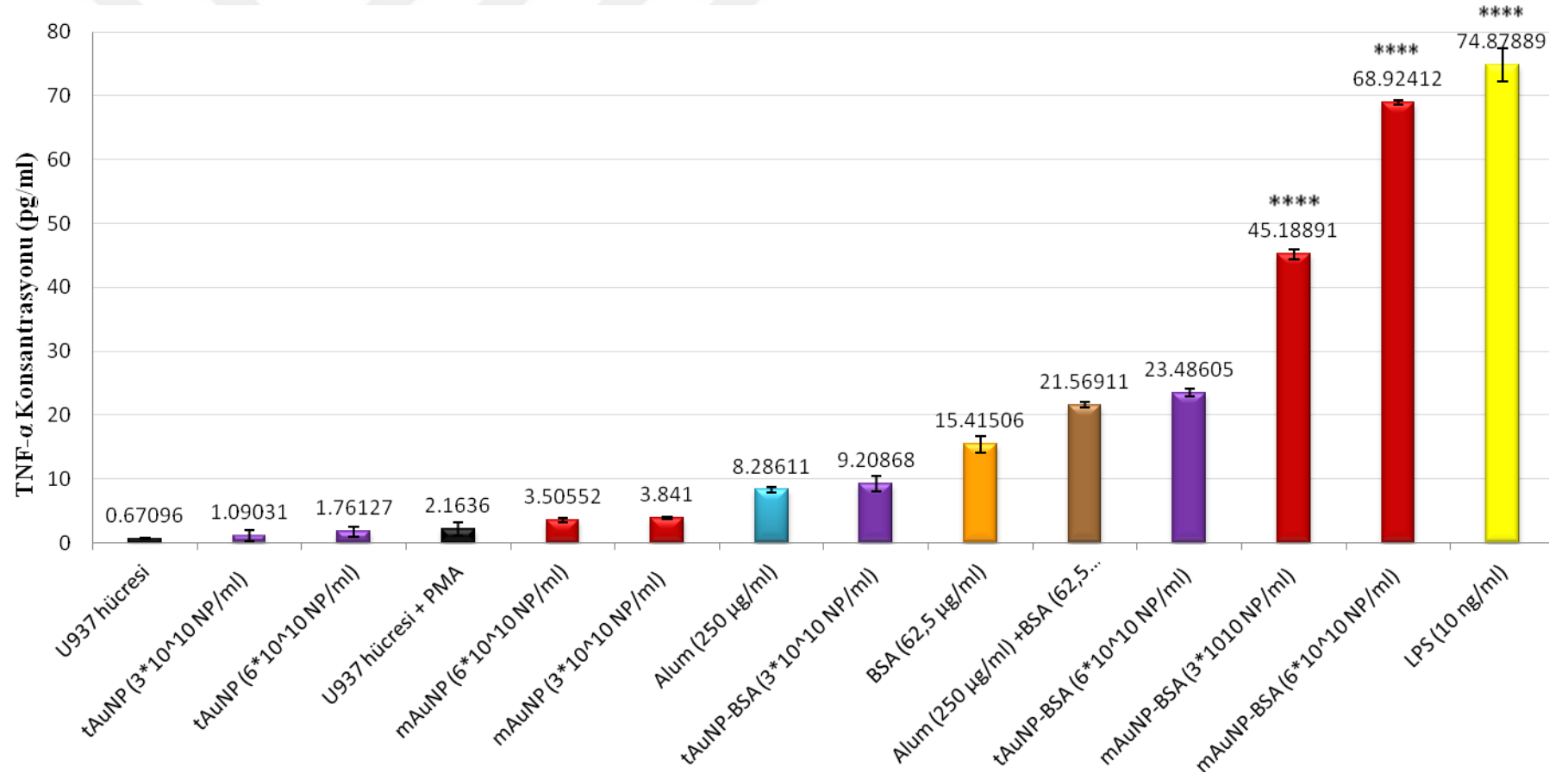
4.12.3 Sitokin seviyelerinin belirlenmesi

Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücreleri üzerinde uygulama yapılan deneme ve kontrol gruplarına ait CM'lerdeki (Şartlandırılmış Ortam/Conditioned Media) sitokin seviyelerinin saptanması Invitrogen firmasının Human TNF- α ve Human IL-6 ELISA kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

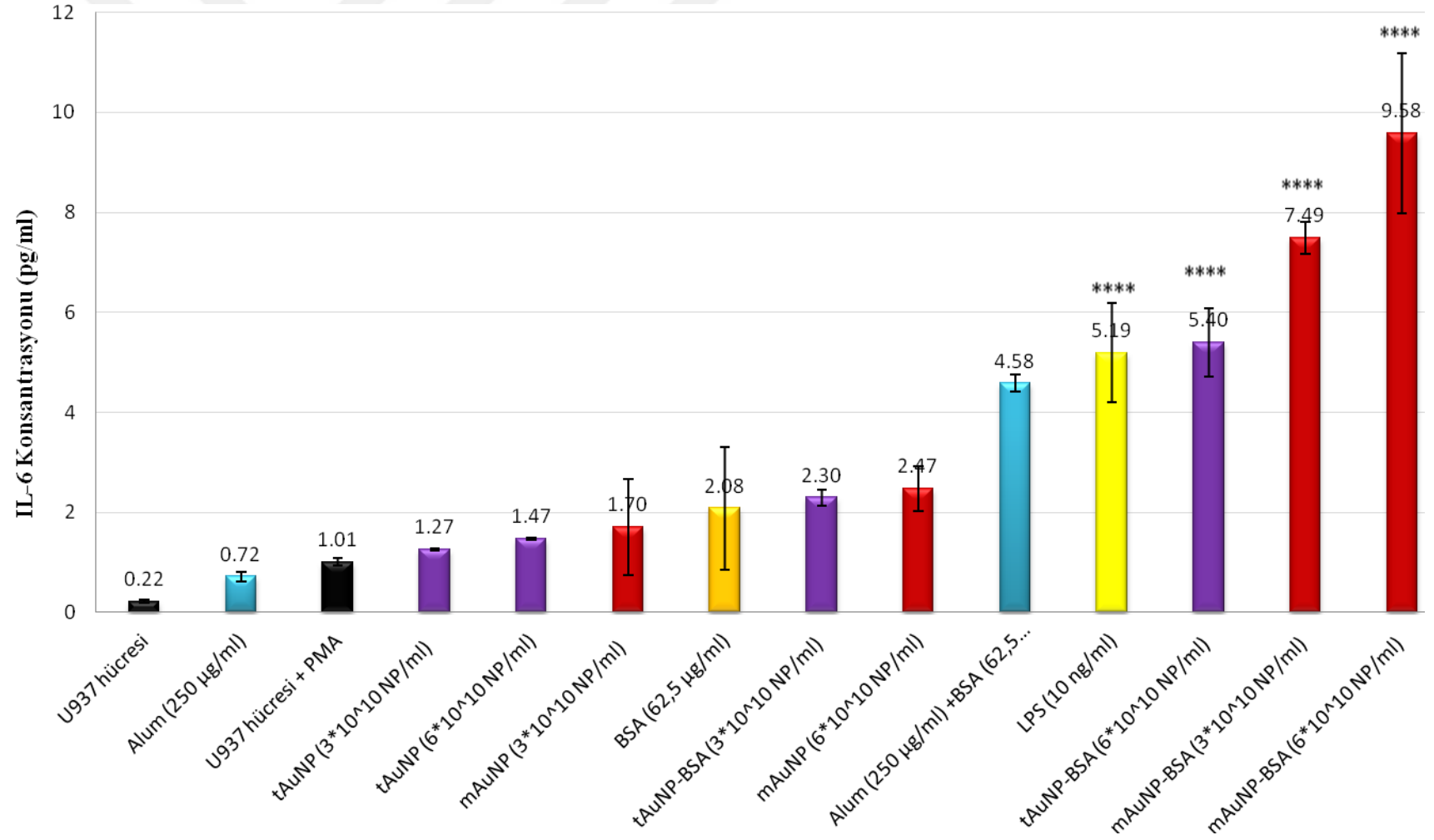
Sitokinler, hücreler arasında iletişime aracılık eden, immun ve inflamatuvar reaksiyonları düzenleyen küçük çözünür proteinlerdir. Esas olarak makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir, ancak polimorfonükleer lökositler (PMN), endotelial ve epitelyal hücreler, adipositler ve bağ dokusu tarafından da üretilebilirler. TNF- α ve IL-6 doğal ve kazanılmış bağışıklığın uyarılmasında, hücre regülasyonu, farklılaşması ve apoptoz süreçlerinde önemli role sahip olan sitokinlerdir (Balkwill, 2000; Abbas et al., 2012). Metal nanopartiküllerin, sitokin ve kemokin üretimini tetiklediği bildirilmektedir. Titanyumoksit nanopartiküllerin, kan damarı endotelial bileşeninden oluşan mimetik sistemlerde proinflamatuvar sitokinler olan IL-6, IFN- γ , TNF- α (Schanen et al., 2009), çinkooksit nanopartiküllerin PBMC'lerin (insan periferik kan mononükleer hücreleri) IL-12, IFN- γ , TNF- α (Hanley et al., 2009) ve AuNP'ler ile stimüle edilen BMDC'lerin IL-6, IFN- γ ve TNF- α (Niikura et al., 2013) üretimini indüklediği rapor edilen çalışmalardır.

İmmün yanıt indüklenmesi için yüzey yükü ve hidrofobiklik önemli parametrelerdir. Nanopartikül yüzeyine fonksiyonel grupların eklenmesi sonucu nanopartiküllerin özellikleri doğrudan etkilenmektedir. Yüksek hidrofobikliğe sahip AuNP'ler doğal immün sistemi aktive etme yeteneğinde olduğu gözlemlendi (Mout et al., 2012; Moyano et al., 2012).

Bu çalışmada U937 makrofaj hücreleri (U937 hücresi - PMA), LPS ve alum içeren gruplar deney setindeki kontrol gruplarıdır (Bkz. **Tablo 3.5**). Mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'ler ve düşük immünojen özellikte olan BSA ile konjuge hale getirilen mAuNP-BSA [(3x10¹⁰ NP/ml) ve (6x10¹⁰ NP/ml)] deney grupları ise adjuvan potansiyelinin değerlendirildiği ana gruplardır. TNF- α konsantrasyonunun istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği (*) deney grupları **Şekil 4.34**'te, IL-6 için ise **Şekil 4.35**'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 34 Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin farklı deney gruplarında TNF- α seviyeleri



Şekil 4. 35 Makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinin farklı deney gruplarında IL-6 seviyeleri

Günümüzde aşı adjuvanı olarak kullanılan alum ile mAuNP-BSA konjugatları kıyaslandığında konjugatlara ait her iki konsantrasyon için de TNF- α sitokin düzeyinde oldukça dikkat çeken anlamlı bir fark görüldü. mAuNP-BSA (3×10^{10} NP/ml) konjugatının tek başına alum ve alum-BSA grubuna göre TNF- α sitokin seviyesini sırasıyla, 5,4 ve 2,09 kat arttırdığı; mAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatının ise 8,32 ve 3,19 kat arttırdığı belirlendi (Şekil 4.34). IL-6 sitokin seviyeleri değerlendirildiğinde **alum-BSA grubuna göre mAuNP-BSA (3×10^{10} NP/ml) konjugatı 1,66 kat, mAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatı 2,12 kat ve tAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatının ise 1,17 kat artış gösterdiği belirlendi (Şekil 4.35).** Hem ticari AuNP (3×10^{10} NP/ml ve 6×10^{10} NP/ml) hem de mikrobiyal AuNP'lerin (3×10^{10} NP/ml ve 6×10^{10} NP/ml) her iki konsantrasyonunun da tek başına immün sistemi uyarmadığı ve sitokin yanıtı oluşturmaması nedeniyle TNF- α seviyelerinde anlamlı bir artış belirlenmedi. **Benzer şekilde IL-6 seviyelerinin düşük olduğu ve grupların birbirine yakınlığı görüldü. tAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatı (23,5 pg/ml) kullanımında ise sonuçlar yaygın olarak günümüzde de adjuvan olarak kullanılan alum içeren alum-BSA (21,6 pg/ml) grubu ile karşılaştırıldığında benzer TNF- α seviyeleri ölçüldü. Çalışmada adjuvan potansiyeli değerlendirilen gruplar, tAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatı ile karşılaştırıldığında ise mAuNP-BSA (3×10^{10} NP/ml) konjugatının 1,92 kat ve mAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatının ise 2,93 kat TNF- α seviyelerini arttırdığı belirlendi.**

LPS, tipik Th1 tipi immün sistemi uyaran, proinflamatuvar sitokinlerin güçlü bir indükleyicisidir. Bu nedenle makrofajları içeren *in vitro* çalışmalarda pozitif kontrol grubu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Heydenreich et al., 2012; Bancos et al., 2015; Assis et al., 2018). **Çalışmada pozitif kontrol grubu olarak kullanılan LPS ile mAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) grubunun ölçülen TNF- α seviyelerinin birbirine olan yakınlığı; IL-6 seviyesi değerlendirildiğinde ise hem mAuNP (3×10^{10} NP/ml) hem de mAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatlarının LPS seviyesini geçtiği, tAuNP-BSA (6×10^{10} NP/ml) konjugatının ise LPS grubu ile benzer sonuç verdiği gözlemlendi.**

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi One – Way ANOVA Tukey testi ile yapıldı. Deneme grupları ve kontrol grupları kıyaslandığında artış istatistiksel olarak önemli oldu. Aynı zamanda TNF- α ve IL-6 seviyelerinin ANOVA analizi R^2 değerlerinin 1'e olan yakınlığı deneysel verileri anlamlı kılmaktadır (Tablo 4.13).

Tablo 4.13 Makrofaja farklılaşan U937 hücrelerinin sitokin testi ANOVA analizi

TNF-α	
F	1266
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9991
IL-6	
F	31.93
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R squared	0.9674

AuNP'lerin şekli ve boyutu immünojenitesi üzerine etkili en önemli değişkenlerdir. Partiküllerin fizikokimyasal özellikleri ayarlanarak oluşturulan bağışıklık tepkisinin immünoestimülatör veya immünomodülatör kapasitesi uyarlanabilmektedir (Marques Neto et al., 2017). APC'lerin kullanıldığı bir çalışmada, altın nanoçubukların, altın nanokürelere ve altın nanokafeslere oranla daha verimli şekilde alındığı ve IL-1 ve IL-18 gibi inflamasyon ilişkili sitokinlerin daha yüksek oranda salgılandığını, diğer yandan altın nanokürelere ve altın nanokafeslerin ise TNF- α , IL-6, IL-12 ve GM-CSF dahil olmak üzere diğer inflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu artırdığı bildirilmektedir. Araştırmacılar, altın nanokürelere inflamatuvar sitokinlerin sinyal yollarında rol oynayabileceğini düşünürken, altın nanoçubukların inflamatuvar aktivasyonla ilişkili olduğunu düşünmektedir (Balasubramanian et al., 2010; Martins 2016). Nanoaşılar ve bağışıklık sistemi hücreleri arasındaki etkileşimler partiküllerin boyutu, şekli, yüzey yükü ve hidrofobikliği gibi özelliklerine bağlıdır. Sonuç olarak bu parametreler, nanoaşıların alımını, antijenitelerini, adjuvan aktivitelerini ve inflamatuvar yanıtı etkileyebilmektedir (Zaman et al., 2013).

Viral enfeksiyonlara karşı yapılan aşı geliştirme çalışmalarında AuNP'ler ile Batı Nil Virüsü (WNV) antijeni (Niikura et al., 2013), influenza virüs matrix 2 proteinin (M2) ekstrasellüler kısmı (Tao et al., 2014), foot-and-mouth disease virüs proteini (pFMDV) 28

amino asit VP1 (Chen et al., 2010) ve kısmen saflaştırılan enteropatojenik domuzla bulaşan gastroenterit virüsü (Staroverov et al., 2011) kullanılarak oluşturulan formülasyonların tümünde hümmoral yanıt indüksiyonu ölçülmesi yoluyla immünojenisitesi değerdendirildiğinde antikor temelli bir immün yanıtın indüklenmesinde AuNP'lerin etkili olduğu görölmektedir. Mutwiri et al (2007) tarafından geliştirilen polifosfazen grubu bir polielektrolit olan PCEP (Poli-di-sodyumkarboksilatoetilfenoksi-fosfazen) adjuvan etkisinin *in vivo* incelediği çalışmada tek başına BSA antijeni ile bağışıklanan farelerin, 2 hafta gibi kısa bir süre sonra BSA'ya özđu toplam IgG antikor titrelerinde artış olduğu, Alum-BSA grubunun uygulamasında ise IgG titrelerinde tek başına BSA grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmediği, alumun BSA antijeni ile adjuvan etkisinin olmadığı bildirilmektedir. **Bu tezde *in vivo* bir değerdendirme yapılmasa da benzer sonuçlar *in vitro* olarak elde edildi.** 10 nm AuNP'ler için $4,9 \times 10^{14}$ (0,005 g/L) ve $9,9 \times 10^{14}$ (0,01 g/L), 300 nm AuNP'ler içinse $6,33 \times 10^{10}$ (0,01 g/L) ve $6,33 \times 10^{11}$ (0,1 g/L) toksik olmadığı için diğer *in vitro* çalışmalarda uygulanan konsantrasyonlardır. RAW264.7 makrofaj hücrelerine, 10 nm $9,9 \times 10^{14}$ AuNP uygulandığında TNF- α seviyesinde önce 1,12 kat artışın daha sonrasında ise seviyenin giderek düştüğu, aynı zamanda apoptotik hücrelerde de önemli bir artış olduğu bildirildi. Burada ki TNF- α seviyesindeki artışın sebebi AuNP'lerin alınması ile hücrelerde sitokin indüklenmesinden ziyade hücrelerin ölümden kaynaklı bir artışa bağlı olmasıdır. 10 nm $4,9 \times 10^{14}$ AuNP uygulandığında ise TNF- α seviyesinde bir farklılık gözlenmediğini, 300 nm AuNP gruplarının TNF- α üretimini ve tüm grupların her iki konsantrasyonu içinde IL-6 ve IL-10 indüklediğini, tek başına AuNP'lerin immün sistemi uyarıcı etkisinin olmadığını bildirildi. Benzer şekilde Zhang ve ark. (2011), 60 nm AuNP'lerin RAW264.7 hücrelerinde TNF- α ve IL-6 seviyelerinde artış göstermediğini bildirmektedir. Partikül boyutunun pulmoner inflamasyon üzerindeki etkisini 50 nm ve 250 nm AuNP'leri *in vivo* değerdendirdiklerinde her iki grubunda hafif bir inflamasyonu indüklediğini, boyuta bağlı olarak tepkide önemli farklılık gözlenmediğini rapor ettiler.

Metillenmemiş CpG motifleri ile konjüğe AuNP'lerin ise RAW 264.7 hücrelerinde hücresele bağışıklık tepkilerini destekleyen güçlü bir TNF- α sekresyonunu indüklediği bildirilmektedir (Krieg et al., 2002; Wei et al., 2012). Assis et al. (2018), *Schistosoma mansoni* parazetine karşı rekombinant Sm29 proteini ile konjüğe edilen altın nanoçubukların bağışıklık tepkisi üzerindeki etkisini *in vivo* ve *in vitro* deneyler ile değerdendirdi. 1×10^{14} NP konsantrasyonunda BHK-21, BMDC ve THP-1 hücrelerinde 16-

24 saatlik sitotoksitesi incelendiğinde hücre canlılığında önemli bir kayıp olmadığı (%90'nın üzerinde canlılık korunmuş) ve altın nanoçubukların güvenliği olduğu bildirildi. Kontrol grubuna (medium, rSm29) kıyasla sitokin profilleri incelendiğinde yüksek seviyede TNF- α , IFN- γ , IL-4 ve IL-5 sekresyonu indüklediği gözlemlendi. Freund adjuvanı ile karşılaştırıldığında ise IFN- γ , IL-4 ve IL-5 sekresyonunun benzer şekilde indüklendiği, TNF- α seviyesinin ise düştüğü gözlemlendi. AuNP'ler, karaciğer, böbrek, akciğer veya dalak gibi birçok organda birikme potansiyelindedir. Altın nanoçubukların *in vivo* analizinde histopatolojik bir olguya rastlanmadığına, aşı tasarımlarının güvenliğine ve formülasyonun tolere edilebilirliğine ayrıca dikkat çekmektedirler. Cao ve ark. (2014), OVA proteinleri ile konjüge edilen 5-10 nm boyutlarındaki küresel AuNP'leri grafen oksit nanopartikülleri ile destekleyerek tasarlanan GO-AuNP-OVA adjuvan sistemini *in vivo* ve *in vitro* deneyler ile hümmoral ve hüccresel immün yanıt üzerindeki etkisini değerlendirdi. HepG2 hücre hattında GO-AuNP-OVA'nın 48 saatlik inkübasyonu sonrası sitotoksite gözlenmediği, sentezlenen adjuvan sisteminin biyouyumlu olduğunu bildirdi. Deri altı enjeksiyon yoluyla bağışıklanan farelerin serumunda antikor titresi, sitotoksik CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin proliferasyonu ve sitokin sekresyonu incelendi. Tek başına OVA grubuna karşı pozitif kontrol grubu olarak Alum-OVA ve GO-AuNP-OVA'nın (yaklaşık dört kat fazla) her ikisinde TNF- α sekresyonunu anlamlı bir şekilde indüklediği görüldü. Tüm deney gruplarında OVA'ya özgü IgG antikor titresinin arttığı, OVA'ya göre Alum-OVA grubunun yaklaşık 7 kat, GO-AuNP-OVA'nın yaklaşık 8 kat arttığı belirlendi. GO-AuNP-OVA'nın, Alum-OVA grubuna kıyasla CD4+ ve CD8+T hücrelerinin proliferasyonu uyarabildiği, IFN- γ sekresyonunu ve RAW 264.7 hücrelerinde etkin şekilde TNF- α sekresyonunu indüklediğini, geliştirilen GO-AuNP-OVA adjuvan sisteminin hümmoral ve hüccresel immün yanıtı uyardığını bildirmektedir. Farelerdeki prelinik çalışma partikül bazlı bir aşı için optimal boyutun 40-50 nm olduğu (Fifis et al., 2004) fikrini doğrulamasına rağmen 300 nm'ye kadar olan partiküllerin fareyi ölümcül influenza enfeksiyonlarına karşı koruyan CD4+ ve CD8+ T hücrelerini indükleyerek immün yanıt oluşturdugunu (Kasturi et al., 2011) bildirilen çalışmalar arasındadır. Niikura ve ark. (2013), farklı boyut ve şekillerdeki AuNP'lerin RAW264.7 makrofaj ve BMDC hücrelerinin sitokin uyarımını inceledikleri çalışmalarında küresel ve küp altın nanopartiküllerin TNF- α seviyelerinin önemli ölçüde indüklendiği ancak nanoçubukların TNF- α sekresyonunu indüklemediği rapor edilmektedir. **Bu tez çalışmasında küresel nanopartiküller ile elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu görölmektedir.**

4.12.4 Altın nanopartiküllerin hücresel alımı (cellular up take)

AuNP'lerin hücreler tarafından alınma miktarı, içselleştirilen partiküllerin kimyasal durumu, hücre içinde yer değiştirme ve hücre içi yapılarla etkileşime girerek işlevlerini etkileme yolları tanı, görüntüleme ve terapötik uygulamalarda aktivitesini anlamak için oldukça önemlidir. Hücreler tarafından alım sürecinin görselleştirilmesi ve/veya alınan partikül miktarının belirlenmesinde kalitatif ve kantitatif analizi için başlıca analitik ve mikroskopik teknikler oldukça çeşitlidir. AuNP'ler özellikle CT (Bilgisayarlı Tomografi), PET (Pozitron Emisyon Tomografi), MR (Manyetik Rezonans Görüntüleme), optik görüntüleme ve ultrason gibi uygulamalarda kontrast sağlaması nedeniyle diğer hücresel bileşenlerden ayırt etmek kolay olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır. Görüntüleme amacıyla SEM, TEM, AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu), floresan mikroskobu, karanlık alan optik mikroskopisi, diferansiyel girişim kontrastı mikroskopisi (DIC), fototermal heterodin görüntüleme yanı sıra birim hücre başına nanopartikül kütlesini ölçmek için/hücre içi Au konsantrasyonunu ölçmek için ICP-MS (Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi), ICP-AES (Endüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektrometrisi) tercih edilen yöntemlerdir (Marquis et al., 2009; Alkilayn and Murphy, 2010; Dykman and Khlebtsov, 2014; Matczuk et al., 2019).

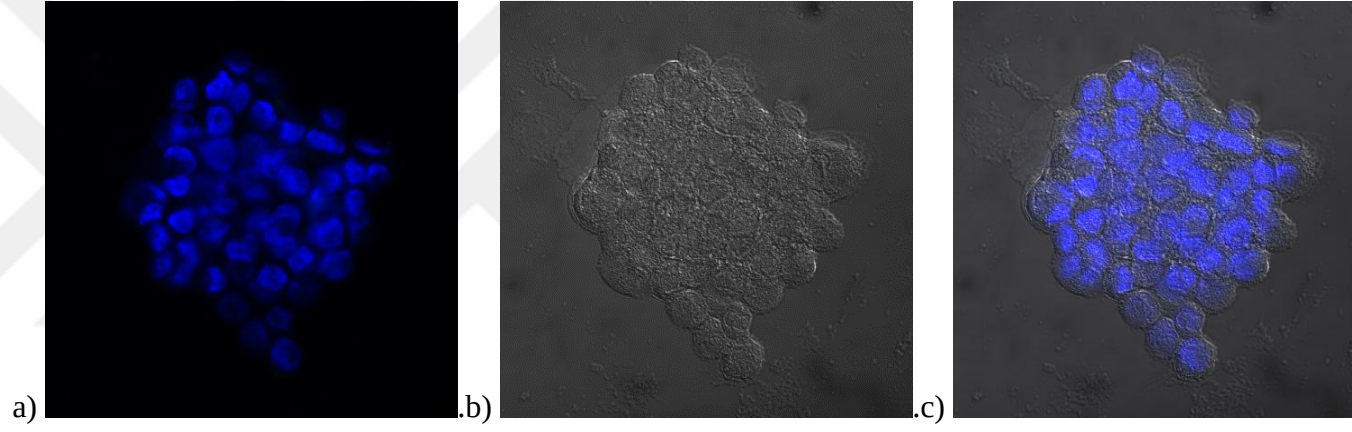
Floresan mikroskopisi, bir floresan boya ile etiketlendikten sonra AuNP'lerin hücre içi akıbetlerini izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak AuNP'ler/altın çekirdek indikatör boya ortamdaki adsorbe edebilme, böylece floresan söndürme veya en aza indirme yeteneğindedir. Bu sayede “Quench Etkisi” yaratarak takibi/izlemeyi engelleyebilir, floresan bazlı deneylerle nanomalzemenin girişimi dikkate alınmalı ve kontrol edilmelidir (Alkilayn and Murphy, 2010; Matczuk et al., 2019).

Adjuvan potansiyeli değerlendirilen AuNP-BSA konjugatlarının U937 makrofaj hücreleri tarafından alımı, floresan işaretli olan FITC-BSA kullanımı ile takip edildi. DIC (Diferansiyel Girişim Kontrastı) ile donatılmış konfokal mikroskopta DAPI ve FITC filtreleri ile monokrom ışık altında incelenerek aynı bölgelerden alınan hücre görüntüleri toplandı ve Image J programı (National Institutes of Health, USA) ile karşılaştırıldı. Nükleusu DAPI ile boyanan hücrelerin DAPI filtresi (mavi), kontrol grubu olan FITC ile işaretli BSA FITC filtresi (yeşil) ve DIC ayarında (bright-field) monokrom ışık altında

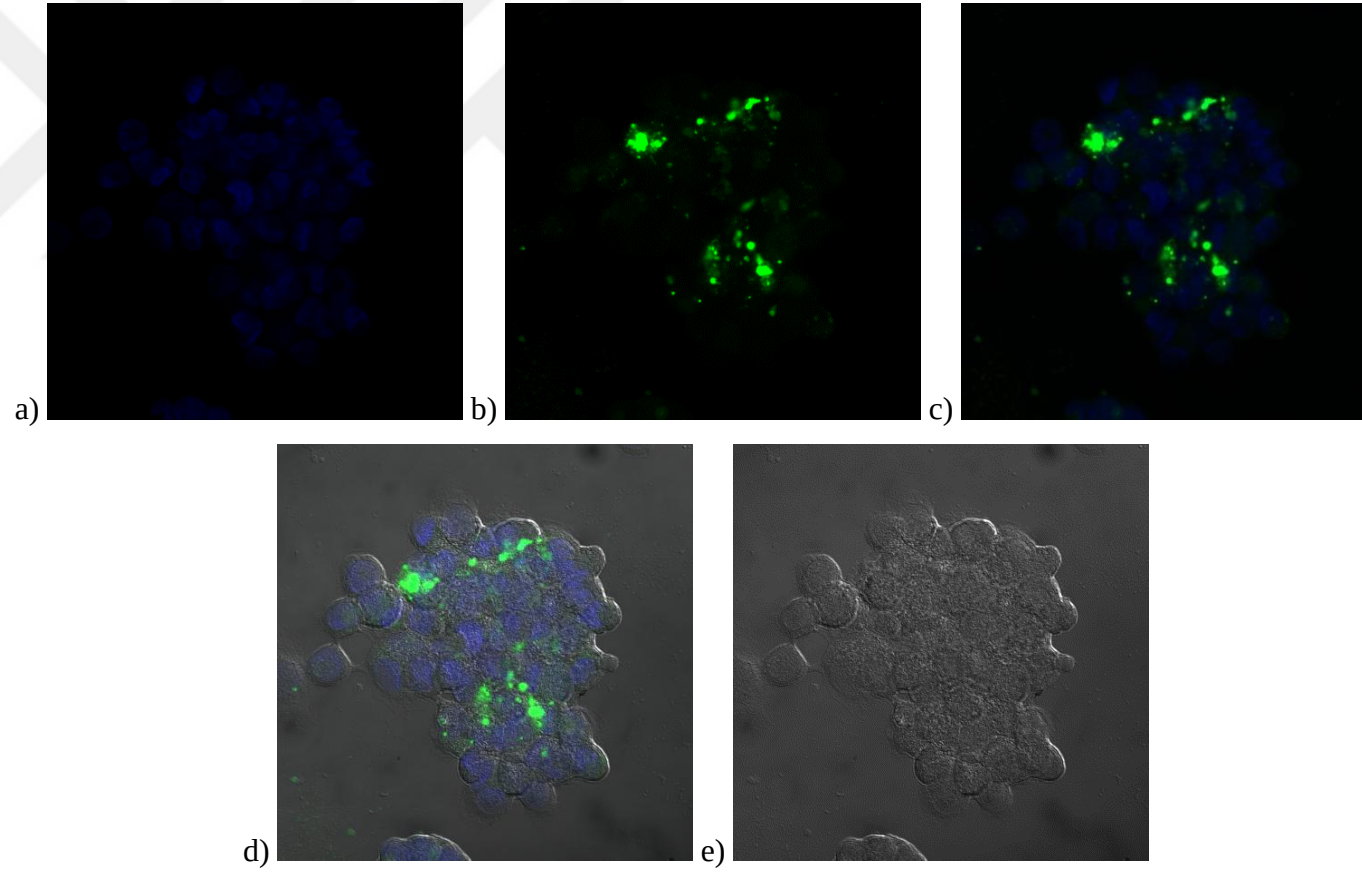
toplanan hücre görüntüleri ve karşılaştırılan halleri **Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38 ve Şekil 4.39**'da sunulmaktadır.

Konfokal mikroskop görüntülerinde hücre nükleuslarının mavi ışığa, etrafında ise FITC etiketlemesi yapılan AuNP-BSA konjugatlarının yeşil floresan ışığa görülmesi istendi ancak AuNP'lerin quench etkisi ile karşılaşıldı. AuNP'lerin hücre alımı DIC mikroskobu altında en iyi kontrastı vermektedir (Gu et al., 2011; Sun et al., 2009). **AuNP-BSA konjugatlarının hücre alımının değerlendirilmesinde DIC mikroskopisi görüntüleri incelendiğinde AuNP içermeyen kontrol gruplarında AuNP'leri işaret eden siyah noktaların görülmediği, 3×10^{10} ve 6×10^{10} NP/ml konsantrasyonlarda AuNP içeren BSA ile oluşturulan konjugatlar ile muamele edilen gruplarda ise siyah kümelenmelerin varlığı gözlemlendi. Şekil 4.38'de 3×10^{10} NP/ml konsantrasyonda AuNP kullanıldığı için hücreler tarafından alınan AuNP-BSA konjugatlarının miktarı daha az gözlenirken, Şekil 4.39'da 6×10^{10} NP/ml konsantrasyonda AuNP kullanıldığı için hücreler tarafından alınan AuNP-BSA konjugatlarının miktarının daha fazla olduğu gözlemlendi. AuNP-BSA konjugatlarının U937 makrofaj hücreleri tarafından fagosite edildiği, hücre zarından geçerek sitoplazmaya nüfuz ettiği ve makrofaj hücrelerinin nükleusu çevresinde lokalize olduğu Şekil 4.38 ve Şekil 4.39'da görülmektedir. Yanı sıra AuNP-BSA konjugatları ile muamele edilmesinin (overnight inkübasyon) ardından hücre morfolojisinin değişmediği de gözlenmektedir.**

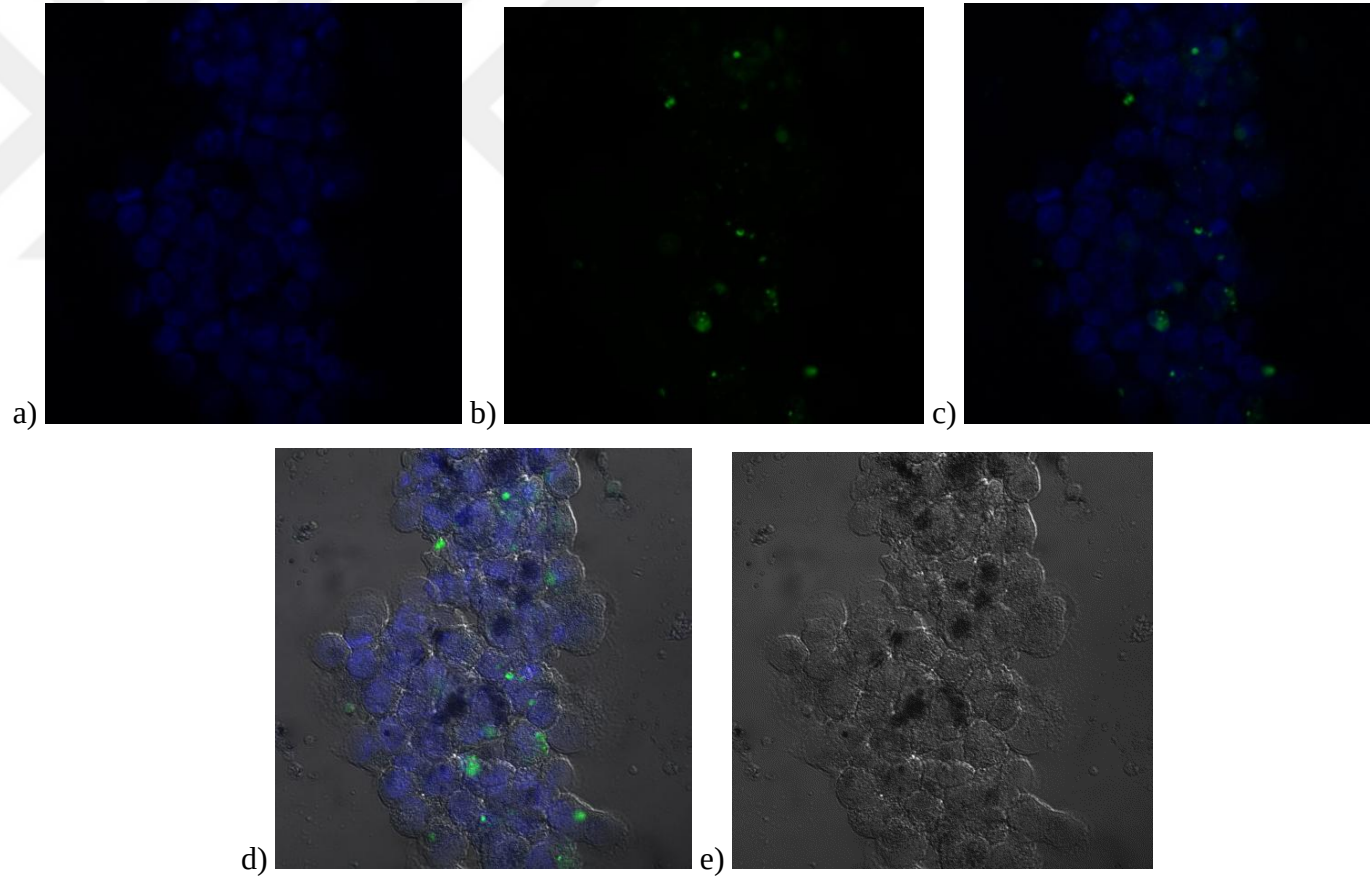
AuNP'lerin hücrelere kendiliğinden kolayca girerek nükleus etrafında kümelenmesi ve/veya endozomlarda hapsedildiği ancak nükleusa penetrasyonu için AuNP'lerin yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi gerekliliği birçok çalışmada rapor edilmektedir. AuNP'lerin optik görüntüleme sistemleriyle tespit edilmesinde DIC mikroskopisi yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Sun et al., (2009), HeLa hücreleri tarafından 40 nm altın nanokürelerin endositoz sürecini video ile kaydettiği, Gu et al. (2011), altın nanoçubukların hücre zarındaki rotasyonel hareketini DIC mikroskopisi ile izlediği rapor edilen çalışmalardır (Shukla et al., 2005; Pernodet et al., 2006; Ryan et al., 2007; Chithrani and Chan, 2007; Nativo et al., 2008; Alkilany et al., 2009). **Bu çalışma ile elde edilen konfokal mikroskop görüntülerinin hücre alımı destekleyen literatür verileri ile uyumlu olduğu ve konjugatların hücreler tarafından alınarak sitoplazmaya yerleştiği görülmektedir.**



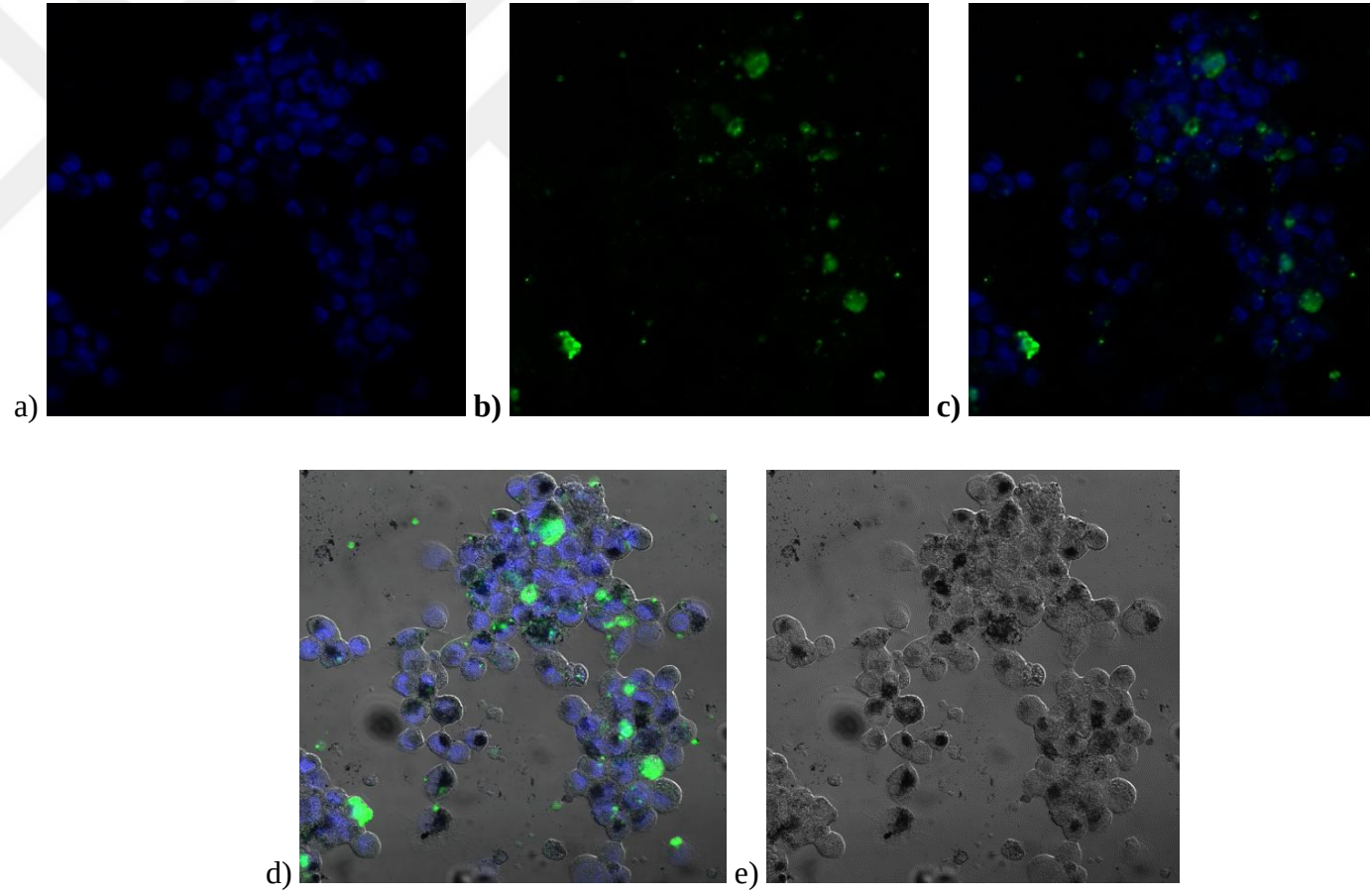
Şekil 4. 36 U937 makrofaj hücrelerinin a)DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b)monokrom ışık altında elde edilen görüntü, c)görüntülerin birleştirilmiş hali



Şekil 4. 37 a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b) FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d) Görüntülerin birleştirilmiş hali, e) Monokrom ışık altında elde edilen görüntü



Şekil 4. 38 FITC-BSA ile konjuge mAuNP (3×10^{10} NP/ml) fagositozu a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b) FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d) Görüntülerin birleştirilmiş hali, e) Monokrom ışık altında elde edilen görüntü



Şekil 4. 39 FITC-BSA ile konjuge mAuNP (6×10^{10} NP/ml) fagositozu a) U937 makrofaj hücrelerinin DAPI ile boyanan nükleuslarının DAPI filtresi (mavi) ile elde edilen görüntüsü, b) FITC işaretli BSA (Kontrol) grubunun FITC Filtresi (Yeşil) ile elde edilen görüntüsü, c-d) Görüntülerin birleştirilmiş hali, e) Monokrom ışık altında elde edilen görüntü

AuNP'lerin hücreler tarafından alım mekanizmasının iyi anlaşılması teşhis, tanı, görüntüleme ve hedeflenen terapötik uygulamalar için verimli nanosistemlerin tasarlanması için oldukça önemlidir. Fagositler, endositoz yoluyla vücuda giren nanopartiküllerle etkileşime giren, nanopartikülleri alan ve içselleştiren/işleyen, konağın inflamatuvar ve immünolojik tepkilerine aracılık eden birincil hücre tipleridir. Bilindiği gibi endositoz, hücrenin, dış materyali hücre zarı ile sararak içselleştirdiği süreci tanımlayan genel bir terimdir. Endositoz; fagositoz, pinositoz (makro ve mikro) ve reseptör aracılı endositoz (klatrin aracılı ve caveola aracılı) olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır (Alkilany and Murphy, 2010; Dykman and Khlebtsov, 2014; Xie et al., 2017; Ding et al., 2018; Matczuk et al., 2019; Srijampa et al., 2019; Kapara et al., 2020). Hücresel alım, hücre tipinin yanı sıra AuNP'lerin boyut, şekil, yüzey yükü (yüzey kaplaması/ fonksiyonelleştirilmesi) ve oluşan protein korona yapısı dahil olmak üzere fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmekte ve endositik yolak kapasitesinde değişimlere sebep olmaktadır (Dykman and Khlebtsov, 2014; Srijampa et al., 2019; Enea et al. 2020).

AuNP'ler hedef dokuya veya organa ulaşmadan önce biyolojik ortamlarda (kan, lenf, mide öz suyu vb) bulunan serum proteinleri ile etkileşime girdiklerinden, hem yapısal hem de konformasyonel değişime uğrar ve *in vivo* koşullar altında nanopartiküllerin etrafı proteinler ile kaplanır. Nanopartiküllerin etrafında oluşan bu “protein koronası” nanopartiküllerin hücreler ile ilk etkileşimini belirleyen ara yüzdür ve hücresel alımı etkileyen dinamik bir tabakadır. AuNP'ler ve APC'ler arasındaki etkileşimde partikülün yüzey kimyası ve net yükü oldukça etkilidir. Fonksiyonelleştirilen AuNP'ler hücre yüzeyindeki reseptörler ile maksimum etkileşime sahip hale gelebildiklerinden reseptör aracılı endositoz yoluyla alınmaktadırlar. **Bu çalışmada da biyolojik sentezleri sırasında AuNP'lerin çevresini kaplayan protein koronanın hücresel alımda muhtemel fonksiyonundan bahsedilebilir.** Bağışıklık hücreleri, epitel hücreler, kanser hücreleri gibi birçok hücre türünün nanopartiküller ile etkileşimi ve endositozu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından, farklı boyut ve şekillerdeki AuNP'ler farklı yüzey grupları ile fonksiyonelleştirilerek, farklı dozlar ve sürelerde farklı hücre hatları üzerinde hücresel alımı incelenmektedir (Ghosh et al., 2008; Jiang et al., 2008; Kannan et al., 2011; Niikura et al., 2013; Dykman and Khlebtsov, 2017; Shen et al., 2018; Matczuk et al., 2019).

AuNP'lerin fagositozunun boyuta bağı olduğu ilk kez 1967'de Scott et al tarafından fark edildi. Nanopartikül boyutu ve şekli hücre alım ve hücre içi dağılımın verimliliğini etkileyen en önemli faktörlerdir. Küçük boyutlu nanopartiküllerin, daha büyük boyuttaki partiküllere kıyasla hücreler tarafından daha yüksek oranda hücre alımı, boyutu 100 nm'den küçük partiküllerin klatrin aracılı endositoz ve/veya caveola aracılı endositoz yoluyla girdiği, 250 nm'den büyük partiküllerin ise fagositoz veya pinositoz yoluyla hücreler tarafından alındığı bildirilmektedir. Anizotropik geometriye sahip çubuk, üçgen, yıldız, küp/kafes, oktahedron, plaka gibi farklı şekillerde AuNP'ler sentezlenmesine rağmen hücre alım çalışmalarında dikkatlerin çoğu küresel AuNP'lere verilmekte ve diğer formlarla karşılaştırıldığında genel olarak hücre alımının en yüksek oranda sonuçlandığı birçok çalışmada bildirilmektedir. AuNP'lerin yüzey yükü, moleküler bağlanma, hidrofobik veya hidrofilik olması gibi özellikleride hücre alımında etkilidir. Monosit türevli dendritik hücreler tarafından elektronegatif partiküllerin, elektropozitif partiküllere kıyasla daha düşük hücre alım verimliliği sergilediği (Fytianos et al., 2015), hidrofilik olanlara kıyasla hidrofobik partiküllerin daha iyi fagosit edildiği, hala tartışılan bir konu olmasına rağmen birçok çalışmada aynı boyut ve şekil özelliklerine sahip nanopartiküller kıyaslandığında katyonik nanopartiküllerin, anyonik nanopartiküllere oranla daha verimli şekilde hücreler tarafından alındığı bildirilmektedir (Ghosh et al., 2008; Jiang et al., 2008; Kannan et al., 2011; Niikura et al., 2013; Dykman and Khlebtsov, 2017; Xie et al. 2017; Shen et al., 2018; Srijampa et al., 2020).

Shukla et al. (2005), RAW264.7 makrofaj hücreleri tarafından 3 nm AuNP'lerin pinositoz yoluyla makrofajlara girdiği ve çoğunlukla lizozomlarda veya perinükleer boşlukta lokalize olduğu, Wang et al. (2010), 45, 70 ve 110 nm boyutlarındaki AuNP'lerin HeLa hücreleri tarafından alımı incelendiğinde 45 nm partiküllerin hücreler tarafından en yüksek seviyede alındığı ancak 110 nm partiküllerin ise ne hücre zarında ne de sitoplazmada bulunmadığı, Rieznichenko et al. (2010), farklı boyutlardaki (10, 20, 30 ve 45 nm) AuNP'lerin hücre alımının değerlendirildiği çalışmada U937 hücreleri tarafından 30 nm AuNP'lerin en aktif (çok hızlı 3–5 dakikada) alımı ve hücre birikim sergilediği, Mironava et al., (2010), dermal fibroblast CF-31 hücreleri tarafından 45 nm boyutlardaki AuNP'lerin, 13 nm boyutlarındaki AuNP'lere oranla beş kat daha etkili bir şekilde alındığı ve nükleusa girmeden büyük lizozomlarda lokalize oldukları bildirilmektedir.

Schaeublin et al. (2012), HaCaT keratinosit hücreleri tarafından küresel AuNP'lerin nanoçubuklara oranla daha fazla alındığını aynı zamanda nanopartikül şeklinin sadece hücre alımı değil hücre yanıtta da önemli rol oynadığını **bu çalışmayı destekler nitelikte** bildirdi. Aynı deneysel koşullarda CTAB ile fonksiyonelleştirilen küresel AuNP'lerin (43 nm), altın nanoçubuklara (38x17nm) kıyasla MDCK II (Madin-Darby köpek böbreği) hücreleri tarafından daha verimli şekilde alındığını ve hücre içinde artan nanopartikül konsantrasyonundan kaynaklı (CTAB'nin artan hücre içi salınımı) küresel AuNP'lerin daha yüksek toksisiteleriyle sonuçlandığını bildirdi (Tarantola et al., 2011).

Ding et al. (2018), farklı boyut ve şekildeki AuNP'lerin (15 nm, 45 nm ve 80 nm küresel, 33x10 nm nanoçubuk, 15 nm nanoyıldız) hücre alımı ve atılımı mekanizmaları üzerindeki etkilerini sistematik olarak insan hepatokarsinoma hücreleri SMMC-7721, insan epitel GES-1 ve 4T1 meme kanseri hücreleri tarafından 24 saate kadar hücre alım kinetiği ICP-AES ile kantitatif olarak değerlendirildi. İnkübasyon süresi arttıkça hücre alım miktarının arttığı, 12 saatten sonra doygunluğa ulaştığı, AuNP'lerin en yüksek alımının GES-1 hücreleri tarafından ve en az alımın 4T1 hücreleri tarafından gerçekleştiği rapor edildi. AuNP'lerin hücre alımı ve uzaklaştırma mekanizmalarında boyut ve şekil özelliklerinin kilit rol oynadığı, 5 farklı tipteki deney gruplarındaki AuNP'lerin endositoz mekanizmasının tamamen farklı olduğu bildirilmektedir.

HeLa hücreleri tarafından küresel AuNP'lerin, altın nanoçubuklara kıyasla daha yüksek verimde hücre alımının gözlemlendiği (Saha et al., 2013), Nambara et al. (2016), üçgen altın nanoparçacıkların benzer yüzey alanına sahip küresel olanlara göre daha etkili hücre alım gösterdiğini ve bu farkın HeLa hücrelerinde RAW264.7 hücrelerinde olduğundan daha belirgin olduğunu bildirilen çalışmalar arasındadır.

Chithrani et al., (2006), antikor ile fonksiyonelleştirilen farklı boyut ve şekle sahip AuNP'lerin hücre alımında kinetik ve doygunluk konsantrasyonlarının büyük ölçüde nanopartiküllerin boyutlarına bağlı olduğunu bildirmekte, yanı sıra biyomedikal uygulamalar için optik özelliklerin ve nanopartiküllerin kimyasal tasarımında da boyutun önemini vurgulamaktadırlar. Sitrat kaplı küresel AuNP'ler (Ortalama 14-30-50-74-100 nm) ve altın nanoçubukların (40x14 nm ve 74x14 nm) HeLa hücreleri tarafından alımının bağlı olduğu durumların incelendiği çalışmada, küresel AuNP'lerin hücreler tarafından en iyi şekilde alımı, optimal partikül boyutunun 40-50 nm ve ilk 2 saat boyunca hücre alımın

önemli ölçüde hızlı olduğu, hücrelerde nanoçubukların birikimi küresel AuNP'lere oranla 3 ve 6 kat daha az olduğu (sırasıyla 40x14 nm ve 74x14 nm) bildirildi. **Araştırmacıların bulduğu optimal boyut aralığı çalıştığımız nanopartikül boyutlarıyla uyumludur.**

Niikura et al. (2013), farklı boyut ve şekillerdeki AuNP'lerin immün yanıt üzerindeki etkisini *in vivo* ve *in vitro* incelediğinde hücreler tarafından altın nanoçubukların, altın nanoküplere oranla daha verimli şekilde, küresel AuNP'lerin ise nanoçubuklardan da yüksek verimde hücresel alımını bildirmektedir. Borran et al. (2018), farklı boyutlarda FITC etiketli AuNP'lerin MCF-7 hücreleri tarafından alınması ve hücre içi **lokalizasyonunu inceledikleri konfokal mikroskop görüntüleri ile bu çalışmada elde edilen görüntüler uyumludur.**

Enea et al. (2020), sitrat ve MUA (11-mercaptoundecanoic acid) kaplı 15 nm ve 60 nm küresel AuNP ve sadece MUA kaplı altın nanoyıldızlardan (~110 nm) oluşan 5 farklı deney grubunu hücresel alımını %2 DMSO ile Hepatosit hücrelere farklılaştırılan HepaRG hücreleri ve PRH (Primer sıçan hepatositleri) hücreleri üzerinde inceledi. PRH hücrelerinin, farklılaşan HepaRG hücreleri ile karşılaştırıldığında AuNP'lerin daha verimli bir şekilde alındığı, AuNP'lere maruz kalma süresinin artmasıyla tüm deney gruplarında hücresel alımın zamana bağlı olarak arttığı gözlemlendi. AuNP'lerin hücresel alımında şeklin etkisi değerlendirildiğinde aynı kaplama ve aynı boyuttaki küresel AuNP'lerin altın nanoyıldızlara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek oranda hücreler tarafından alındığı gözlemlendi. 60 nm küresel AuNP'ler hariç sitrat kaplı partiküllerinde MUA kaplı partiküllere kıyasla daha fazla hücreler tarafından alındığı, 15 nm boyutundaki AuNP'lerin 60 nm boyundakilere oranla hücreler tarafından daha fazla alımı bildirildi. Bu çalışma ile AuNP'lerin hücresel alımında hücre tipinin yanı sıra partikül boyutuna, şekline ve yüzeyine bağlı olduğu etkisi açıkça görülmektedir.

Lee et al. (2019), Yeşil çay özütü kullanılarak üç farklı şekilde (küresel, çubuk, yıldız) sentezlenen ve kitosan ile kaplanan biyojenik AuNP'lerin HepG2 insan hepatoselüler karsinom hücreleri tarafından hücresel alım üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, küresel AuNP'lerin (%58,0) en yüksek oranda hücresel alımının gerçekleştiği, altın nanoçubuk (%52,7) ve nanoyıldızların (%41,5) izlediği bildirildi.

Bu tez çalışması kurgulanırken biyolojik sistemlerde etkili olan 20-60 nm arasındaki boyutlar hedeflenerek üretici bakterinin seçimi yapıldı, optimizasyon çalışmaları sonrasında da 40-50 nm boyutlarında küresel AuNP'ler elde edildi. Ardından adjuvan potansiyelinin değerlendirilmesi işlemlerinde küresel morfoloji, yüzey yapısı ve partikül boyutu açısından literatür ile uyumlu veriler elde edildi. Literatür verileri dahilinde bir genelleme yapmak gerekirse AuNP'lerin endositozunun partikül boyutuna bağlı olduğu sonucu çıkarılmakta, hücre tipine bağlı olarak küresel AuNP'lerin hücre içi alımının maksimum etkinliğinin genellikle 30–50 nm gözlendiği görülmektedir. Bu çalışmada da literatür ile uyumlu olarak 30-50 nm boyutlarında küresel AuNP'lerin U937 makrofaj hücreleri tarafından hücre alımı gösterildi.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Antik çağlardan beri altın ve altın bileşikleri tedavi etme gücüne sahip olduğu düşünülerek birçok hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Nanoteknoloji yaklaşımlarında metal nanopartiküller arasındaki malzemelerin en önemlisi AuNP'lerdir. AuNP'ler bulk haline kıyasla tamamen farklı özellikler gösterir, proteinler, peptitler, antikorlar, oligonükleotitler gibi biyomoleküller ve bakteri, virüs vb. patojenlere güçlü bağlanma yeteneğine sahiptir (Havel et al.,2009).

AuNP'lerin sentezlenmesinde çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır ancak mevcut dezavantajlar (toksik kimyasalların kullanımı, stabilite sorunu, pahalı ekipman, yüksek enerji ihtiyacı gibi) göz önüne alındığında biyolojik sentez yaklaşımı dikkate değer bir alternatif sunmaktadır. Son yıllarda bakteri, fungus, alg ve bitkiler ile yapılan biyolojik sentez yaklaşımı da bu gerekleri sağlama kapasitesi nedeniyle araştırılmaktadır. Farklı ürün ve süreçlerin geliştirilmesinde büyük bir potansiyel taşıyan mikrobiyal biyoçeşitlilik nanopartiküllerin biyolojik indirgenme işlemlerinde de başarılı sonuçlar vermektedir. Mikroorganizmalar, metal iyonlarına maruz kaldığında biyomineralizasyon, biyosorbsiyon, kompleksleşme, çökeltme ya da hücre içi biriktirme şeklinde metal iyonlarını detoksifiye etmektedir. Özellikle biyoyumumluluk ve kararlı ürün elde edilmesi biyolojik sentezin en önemli avantajlarıdır. AuNP sentezi için mikroorganizmaların kullanımı kısa ikilenme zamanları, gelişmiş biyoproses yöntemleri, ucuz substrat kullanımları sentez şartlarının optimizasyonu gibi avantajları nedeniyle biyolojik sentezde ön plana çıkmaktadır.

AuNP'lerin istenilen boyut ve şekillerde sentezlenebilmesi, yüzey modifikasyonlarının kolay olması, küçük parçacık boyutları nedeniyle sahip oldukları geniş yüzey-hacim oranları, sahip oldukları optik (SPR) ve diğer eşsiz (biyoyumlu, inert, kararlı, düşük toksisite) özellikleri göz önüne alındığında **ideal bir aşı adjuvan adayı** olabileceği ve aşı teknolojisine fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Aşı gelişimi tarihsel olarak Louis Pasteur'ün “izole et, etkisiz hale getir, enjekte et” paradigmasına dayanmaktadır. Aşı; konağa verildiğinde hümmoral ve/veya hüccresel yanıt oluşturarak, konağın belirli bir patojene karşı bağışıklık sağlayabilen basit, kararlı ve aktif immünojenik bir formülasyondur. Tıbbi müdahaleler arasında aşı uygulaması büyük bir

etkiye sahiptir (Zhao et al., 2014). Son yıllarda modern ve rasyonel tasarım yaklaşımıyla aşı geliştirme çalışmalarında nanopartiküllerden faydalanılmasıyla aday aşı sayısı giderek artmaktadır. Nanopartiküllerin, taşıma sistemleri ve/veya immün yanıt oluşturma potansiyeli nedeniyle adjuvan olarak kullanım potansiyellerinin araştırılması büyük ilgi görmektedir. Hastalıkların önlenmesi, teşhis ve tedavisinde onaylanmış nano boyutlu aşı ve ilaç taşıma sistemleri meydana gelen devrimi kanıtlar niteliktedir (Shen et al., 2018; Singh et al., 2019). Çeşitli antijenlere ve dozlara karşı bağışıklık tepkilerini artırabilen çok yönlü adjuvanların geliştirilmesi aşı endüstrisinde arzu edilen bir durumdur. Bağışıklık tepkisinin seviyesinden ve kalitesinden ödün vermeden aşı dozunu ve antijen miktarını azaltacak herhangi bir yaklaşım aşının maliyetini de önemli oranda azaltacaktır (Mutwiri et al., 2007). Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri ve pek çok ülkede insanlarda yaygın olarak kullanılabilen adjuvan alüminyum hidroksit jeli olan Alum'dur. Ancak ortaya çıkan yan etkiler ve yeterince bağışıklık sağlanamaması aşı adjuvanlarının standardizasyonuna ve yeni adjuvanların geliştirilmesine verilen önemi giderek arttırmaktadır.

Bu çalışmada;

- AuNP'lerin sentezlenmesinde fiziksel ve kimyasal yöntemlerin dezavantajları göz önüne alındığında oldukça güçlü bir alternatif olan biyolojik sentez yaklaşımı ile **Aktinomiset izolatları ile ekstrasellüler AuNP biyosentezi gerçekleştirildi.**
- ***Streptomyces* sp. M137-2'ye ait hücresiz fermentasyon sıvısı ile AuNP biyosentezi gerçekleştirildi.** İkinci dereceden model denklemi ve yanıt yüzeyi eğrileri kullanılarak mikrobiyal AuNP biyosentezi üzerinde etkisi olan değişkenlerin istatistiksel deney tasarımı yaklaşımı ile optimum değerleri **pH 8.0, altın tuzu derişimi (HAuCl_4) 10^{-3} M, inkübasyon süresi ise 72 saat olarak belirlendi.** Elde edilen veriler, bir mikroorganizma kullanılarak mikrobiyal AuNP (mAuNP) sentezinin boyuta bağlı istatistiksel optimizasyonunu gerçekleştiren ilk rapor niteliğindedir.
- **Ortalama 43 nm boyutlarında (30-50), monodispers dağılıma sahip, küresel ve oldukça stabil AuNP'lerin** sentezlendiği karakterizasyon çalışmaları ile gösterildi.

- Geniş tarama aralığında uygulanan mAuNP konsantrasyonlarında dahi **L929 hücre canlılığının %80'nin altına düşmemesi, makrofaja farklılaşan U937 monosit hücrelerinde ise en yüksek konsantrasyon (hücre canlılığı ~%60) dışında hücre canlılığının %70'in üzerinde olması mAuNP'lerin biyolojik olarak uyumlu olduğunu gösterdi.** Sentezlenen mAuNP'lerin özellikle biyouyumlu ve kararlı olmaları medikal alanda kullanımlarına yönelik en önemli avantajlarıdır.
- AuNP'lerin, adjuvan olarak kullanımının toksisiteyi azalttığı, immünojen etkiyi arttırdığı, aşının depolanma stabilitesini sağladığı ve nanopartiküle bağlı bir toksisitenin oluşmadığı da bildirilmektedir. **mAuNP'lerin ticari eşdeğerlerine ve aşılarında sıklıkla kullanılan alum adjuvanı ile karşılaştırıldığında aşı adjuvanı olarak önemli bir potansiyel taşıdığı gösterildi.**
- Geleneksel adjuvan olan alum ile kıyaslandığında TNF- α seviyelerinde 3×10^{10} NP/ml AuNP-BSA konjugatlarının 2.09 kat ve 6×10^{10} NP/ml AuNP – BSA konjugatlarının 3.19 kat; IL-6 seviyelerinde ise sırasıyla 1.63 ve 2.09 kat artış sağladığı görüldü.
- AuNP-BSA konjugatların konfokal mikroskopi (DIC) ile hücresel alımı incelendiğinde makrofajlar tarafından fagosit edildiği, hücre zarından verimli şekilde geçerek sitoplazmaya nüfuz ettiği ve nükleusların çevresinde lokalize olduğu elde edilen görüntülerde görüldü.
- Mevcut araştırma mikrobiyal yöntem ile sentezlenen AuNP'lerin, adjuvan etkisinin değerlendirildiği ve konvansiyonel adjuvan alumina göre daha etkin olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Farklı metal nanopartiküllerin kullanıldığı çeşitli stratejiler uygulanarak geliştirilen aşı platformlarında farklı şekiller (küresel, kafes, çubuk, disk), 2 nm'den 200'ye kadar değişen boyutlardaki nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ve çeşitli kaplama türlerinin doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkisi üzerindeki etkisinin daha detaylı analizine ihtiyaç vardır (Marques Neto et al., 2017). Son yıllarda aşı adjuvanlarının standardizasyonuna ve yeni adjuvanların geliştirilmesine verilen önem giderek artmaktadır.

Biyolojik güvenlikleri göz önüne alınarak antijenlerin taşınmasında ve immun sistemin uyarılmasında nano aşılar ümit vaat etmektedir. **İlerleyen süreçte seçilen bir aşı antijeni ile prekliniik deneylerin yapılması ve büyük ölçekte mAuNP üretim sürecinin geliştirilmesi önerilmektedir.**

Son olarak adjuvan özelliklerin incelendiğı çalışmaları metalik olmayan nanopartiküller olduğı, metal nanopartiküllerin daha yeni değeriendirilmeye başlanan bir alan olduğunu hala cevaplanması gereken birçok soru ve sorun bulunduğunu belirtmek önemlidir (Marques Neto et al., 2017). Nanoteknolojinin aşılamaa uygulanması, nanopartiküllerin hem antijen taşıyıcıları hem de antijenin APC'ler tarafından alımını teşvik edici kapasitesini kullanılır. Bu sistemler ile üretilen aşılar yavaş salınım, kontrollü salınım, tek doz şeklinde alternatifler sağlayabilecek potansiyelindedir. Genel olarak aşı taşıyıcıları veya immünoregülatör olarak polimerik nanomateryaller, iyi biyolojik güvenliği ve *in vivo* etkinliği nedeniyle kliniik uygulamaya en yakın olandır. Güvenli ve etkin/etkili aşı vektörleri veya immünoregülatörler geliştirilmesinde nanopartiküllerin tekrarlanabilir üretimi, işlevselleştirilmesi önemli konular haline gelmiştir. Mikro akışkan ve nanopartiküllerin kontrollü sentezi gibi yeni teknolojilerin yaygın araştırılması ile bu alandaki gelişmelerin artacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abadeer, N. S. and Murphy, C. J.,** 2016, Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(9):4691-4716 pp.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. A. H. and Pillai, S.,** 2012, Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Saunders, Philadelphia, 608 p.
- Abdelhalim, M. A. K.,** 2011, Exposure to gold nanoparticles produces cardiac tissue damage that depends on the size and duration of exposure, *Lipids in health and disease*, 10(1):1-9 pp.
- Abu-Tahon, M. A. and Isaac, G. S.,** 2019, Purification, characterization and anticancer efficiency of L-glutaminase from *Aspergillus flavus*, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 65(6):284-292 pp.
- Agnihotri, M., Joshi, S., Kumar, A. R., Zinjarde, S., Kulkarni, S.,** 2009, Biosynthesis of gold nanoparticles by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, *Materials Letters*, 63:1231-1234 pp.
- Aguilar, J. C. and Rodriguez, E. G.,** 2007, Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*, 25(19):3752-3762 pp.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Ramani, R., Srinivas, V., Sastry, M.,** 2003a, Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species, *Nanotechnology*, 14:824-828 pp.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M. I., Kumar, R., Sastry, M.,** 2003b, Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora* sp., *Langmuir*, 19:3550-3553 pp.
- Ahmad, S., Zamry, A. A., Tan, H. T., Wong, K. K., Lim, J., Mohamud, R.,** 2017, Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A review on the cellular uptake and subsequent immunological properties, *Molecular Immunology*, 91:123-133 pp.
- Ahmad, T., Wani, I. A., Manzoor, N., Ahmed, J., Asiri, A. M.,** 2013, Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 107:227-234 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Akintelu, S. A., Yao, B. and Folorunso, A. S.,** 2021, Bioremediation and pharmacological applications of gold nanoparticles synthesized from plant materials, *Heliyon*, 7(3):e06591.
- Alkilany, A. M., Pratik K. N., Cole R. H., Timothy J. S., Catherine J. M. and Michael D. W.,** 2009, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects, *Small*, 5(6):701-708 pp.
- Alkilany, A. M. and Murphy, C. J.,** 2010, Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?, *Journal of nanoparticle research*, 12(7):2313-2333 pp.
- Anik, M. I., Mahmud, N., Al Masud, A. and Hasan, M.,** 2022, Gold nanoparticles (GNPs) in biomedical and clinical applications: A review, *Nano Select*, 3(4):792-828 pp.
- Apte, M., Girme, G., Bankar, A., Ravi-Kumar, A., Zinjarde, S.,** 2013, 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures, *Journal of Nanobiotechnology*, 11(2):1-9 pp.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A.,** 2014, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, *Frontiers in immunology*, 5:491 p.
- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R. and Mukherjee, P.,** 2012, Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future, *Chemical Society Reviews*, 41(7):2943-2970 pp.
- Assis, N. R., Caires, A. J., Figueiredo, B. C., Morais, S. B., Mambelli, F. S., Marinho, F. V. and Oliveira, S. C.,** 2018, The use of gold nanorods as a new vaccine platform against schistosomiasis, *Journal of Controlled Release*, 275:40-52 pp.
- Atkins and De Paula,** 2010, Physical Chemistry, W. H. Freeman and Company, 8th Edition, New York, 1086 p.
- Atlas, R. M.,** 2004, Handbook of microbiological media, 3rd Ed., CRC press, Boca Raton, 2056 p.
- Awate, S., Babiuk L. A., Mutwiri, G.,** 2013, Mechanism of action of adjuvants, *Frontiers in Immunology*, 4:114-124 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baalousha, M., and Lead, JR.,** 2007, Characterization of natural aquatic colloids (<5nm) by flow-field flow fractionation and atomic force microscopy, *Environ Sci Technol.*, 41:1111–1117 pp.
- Bachmann, M., F. and Jennings, G.T.** 2010, Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns, *Nat. Rev. Immunol.*, 10:787-796 pp.
- Baek, Y. S., Haas, S., Hackstein, H., Bein, G., Hernandez-Santana, M., Lehrach, H., Sauer, S., Seitz, H.,** 2009, Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells, *BMC immunology*, 10(1):1-15 pp.
- Bailly, A. L., Correard, F., Popov, A., Tselikov, G., Chaspoul, F., Appay, R. and Esteve, M. A.,** 2019, *In vivo* evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles, *Scientific reports*, 9(1):1-12 pp.
- Balagurunathan R., Radhakrishnan M., Rajendran R. B., Velmurugan D.,** 2011, Biosynthesis of gold nanoparticles by actinomycete *Streptomyces viridogens* strain HM10, *J Biochem Biophys*, 48(5):331–335 pp.
- Balasubramanian, S. K., Yang, L., Yung, L. Y. L., Ong, C. N., Ong, W. Y. and Liya, E. Y.,** 2010, Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles, *Biomaterials*, 31(34):9023-9030 pp.
- Balkwill, F.,** 2000, Transgenic and knockout mice in cytokine research, *Cytokine Molecular Biology*, 186 p.
- Bancos, S., Stevens, D. L. and Tyner, K. M.,** 2015, Effect of silica and gold nanoparticles on macrophage proliferation, activation markers, cytokine production, and phagocytosis *in vitro*, *International journal of nanomedicine*, 10:183-206 pp.
- Banerjee, K. and Ravishankar Rai, V.,** 2018, A review on mycosynthesis, mechanism, and characterization of silver and gold nanoparticles, *BioNanoScience*, 8(1):17-31 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Mohammadi, M. A., Alizadeh, A. and Naghibi, F.,** 2014, Microbial mediated preparation, characterization and optimization of gold nanoparticles, *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4):1493-1501 pp.
- Barhate, G., Gautam, M., Gairola, S., Jadhav, S. and Pokharkar, V.,** 2014, Enhanced mucosal immune responses against tetanus toxoid using novel delivery system comprised of chitosan-functionalized gold nanoparticles and botanical adjuvant: Characterization, immunogenicity, and stability assessment, *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(11):3448-3456 pp.
- Baskaran, B., Muthukumarasamy, A., Chidambaram, S., Sugumaran, A., Ramachandran, K. and Manimuthu, T. R.,** 2017, Cytotoxic potentials of biologically fabricated platinum nanoparticles from *Streptomyces* sp. on MCF-7 breast cancer cells, *IET nanobiotechnology*, 11(3):241-246 pp.
- Bastus, N. G., Sanchez-Tillo, E., Pujals, S., Farrera, C., Lopez, C., Giralt, E. and Puentes, V.,** 2009, Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response, *ACS nano*, 3(6):1335-1344 pp.
- Bennur, T., Khan, Z., Kshirsagar, R., Javdekar, V. and Zinjarde, S.,** 2016, Biogenic gold nanoparticles from the Actinomycete *Gordonia amarae* applications in rapid sensing of coppers ions, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233:684-690 pp.
- Beveridge, T. J. and Murray, R. G. E.** 1980, Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 141(2):876-887 pp.
- Bhargava, A., Jain, N., Khan, M. A., Pareek, V., Dilip, R. V. and Panwar, J.,** 2016, Utilizing metal tolerance potential of soil fungus for efficient synthesis of gold nanoparticles with superior catalytic activity for degradation of rhodamine B, *Journal of environmental management*, 183:22-32 pp.
- Bhattacharya, S.,** 2021, Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy, DOI:10.55772, 95835.
- Biglari, S., Shahidi, G. H. and Sharifi, G. R.,** 2014, Production of gold nanoparticles by *Streptomyces djakartensis* isolate B-5., *Nanomedicine Journal*, 1(4):229-237 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Binupriya, A. R., Sathishkumar, M., Vijayaraghavan, K. and Yun, S. I.,** 2010, Bioreduction of trivalent aurum to nano-crystalline gold particles by active and inactive cells and cell-free extract of *Aspergillus oryzae* var. *Viridis*, *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3):539-545 pp.
- Birla S. S., Gaikwad, S. C., Gade, A. K., Rai, M. K.,** 2013, Rapid synthesis of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by optimizing physiocultural conditions, *The Scientific World Journal*, 1-12 pp.
- Boisselier, E. and Astruc, D.,** 2009, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chem. Soc. Rev.*, 38:1759-1782 pp.
- Boraschi, D. and Italiani, P.,** 2015, From antigen delivery system to adjuvanticy: the board application of nanoparticles in vaccinology, *Vaccines*, 3(4):930-939 pp.
- Borran, A. A., Aghanejad, A., Farajollahi, A., Barar, J. and Omid, Y.,** 2018, Gold nanoparticles for radiosensitizing and imaging of cancer cells, *Radiation Physics and Chemistry*, 152:137-144 pp.
- Box, G. E. and Draper, N. R.,** 1987, Empirical model-building and response surfaces, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.
- Box, G. E., Hunter, W. G. and Hunter, J. S.,** 1978, Statistics for experimenters, 639 p.
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J. and Whyman, R.,** 1994, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7:801-802 pp.
- Cain, D. W., Sanders, S. E., Cunningham, M. M. and Kelsoe, G.,** 2013, Disparate adjuvant properties among three formulations of “alum”, *Vaccine*, 31(4):653-660 pp.
- Camas, M., Sazak Camas, A. and Kyeremeh, K.,** 2018, Extracellular synthesis and characterization of gold nanoparticles using *Mycobacterium* sp. BRS2A-AR2 isolated from the aerial roots of the Ghanaian mangrove plant, *Rhizophora racemosa*, *Indian journal of microbiology*, 58(2):214-221 pp.
- Camesano, T. A. and D'Angelo, S. M.,** 2011, 85th ACS Colloid and Surface Science Symposium, Canada.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Canepa, E., Salassi, S., Simonelli, F., Ferrando, R., Rolandi, R., Lambruschini, C. and Rossi, G.,** 2021, Non-disruptive uptake of anionic and cationic gold nanoparticles in neutral zwitterionic membranes, *Scientific reports*, 11(1):1-11 pp.
- Cantor, C. R. and Schimmel, P. R.,** 1980, Techniques for the study of biological structure and function, San Francisco: W.H. Freeman, 584 p.
- Cao, F., Yan, M., Liu, Y., Liu, L. and Ma, G.,** 2018, Photothermally controlled MHC Class I Restricted CD8⁺ T-Cell response elicited by hyaluronic acid decorated gold nanoparticles as a vaccine for cancer immunotherapy, *Advanced Healthcare Materials*, 7:1701439-1701451 pp.
- Cao, Y., Ma, Y., Zhang, M., Wang, H., Tu, X., Shen, H. and Zhang, Z.,** 2014, Ultrasmall graphene oxide supported gold nanoparticles as adjuvants improve humoral and cellular immunity in mice, *Advanced Functional Materials*, 24(44):6963-6971 pp.
- Carabineiro, S. A. C.,** 2017, Applications of gold nanoparticles in nanomedicine: Recent advances in vaccines, *Molecules*, 22:857-873 pp.
- Carlet, K. M., Kamneva, N. Y. and Reminga, J.,** 2004, Technical report of response surfaces methodology, Carnegie Mellon University Pittsburgh Pa School of Computer Science, 136 p.
- Castillo, E. D.,** 2007, Process Optimization, a Statistical Approach, Springer Science + Business Media, LLC, New York.
- Chanana, M. and Liz-Marzan and L. M.,** 2012, Coating matters: the influence of coating materials on the optical properties of gold nanoparticles, *Nanophotonics*, 1(3-4):199-220 pp.
- Chauhan, N., Tiwari, S., Iype, T. and Jain, U.** 2017, An overview of adjuvants utilized in prophylactic vaccine formulation as immunomodulators. Expert review of vaccines, 16(5):491-502 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, H. W., Huang, C. Y., Lin, S. Y., Fang, Z. S., Hsu, C. H., Lin, J. C. and Hu, C. M. J.,** 2016, Synthetic virus-like particles prepared via protein corona formation enable effective vaccination in an avian model of coronavirus infection, *Biomaterials*, 106:111-118 pp.
- Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A. and Li, X.,** 2007, Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells, *Nano letters*, 7(5):1318-1322 pp.
- Chen, X. and Gao, C.,** 2017, Influences of size and surface coating of gold nanoparticles on inflammatory activation of macrophages, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160:372-380 pp.
- Chen, Y. S., Hung, Y. C., Lin, W. H. and Huang, G. S.,** 2010, Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide, *Nanotechnology*, 21(19):195101.
- Chevrier, D. M., Chatt, A., and Zhang, P.,** 2012, Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review, *Journal of Nanophotonics*, 6(1):064504.
- Chithrani, B. D. and Chan, W. C. W.,** 2007, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Letters*, 7(6):1542-1550 pp.
- Chithrani, B. D., Arezou A. G., and Chan, W. C. W.,** 2006, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters*, 6(4):662-668 pp.
- Cho, W. S., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H. Y., Han, B. S. and Jeong, J.,** 2009, Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles, *Toxicology and applied pharmacology*, 236(1):16-24 pp.
- Clogston, J. D. and Patri, A. K.,** 2011, Zeta potential measurement, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, 697:63-70 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Climent, N., García, I., Marradi, M., Chiodo, F., Miralles, L., Maleno, M. J. and Plana, M.,** 2018, Loading dendritic cells with gold nanoparticles (GNPs) bearing HIV-peptides and mannosides enhance HIV-specific T cell responses, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(2):339-351 pp.
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. and Wyatt, M. D.,** 2005, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity, *Small*, 1(3):325-327 pp.
- Cormode, D. P., Sanchez-Gaytan, B. L., Mieszawska, A. J., Fayad, Z. A. and Mulder W. J.,** 2013, Inorganic nanocrystals as contrast agents in MRI: synthesis, coating and introduction of multifunctionality, *NMR Biomed*, 26:766–780 pp.
- Correa-Llanten, D. N., Munoz-Ibacache, S. A., Castro, M. E., Munoz, P. A. and Blamey, J. M.,** 2013, Gold nanoparticles synthesized by *Geobacillus* sp. strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica, *Microbial Cell Factories*, 12(75):1-6 pp.
- Cruz, L. J., Tacken, P. J., Rueda, F., Domingo, J. C., Albericio, F., Figdor, C. G.,** 2012, Targeting nanoparticles to dendritic cells for immunotherapy, *Methods in Enzymology*, 509:143-163 pp.
- Cribbs, D. H., Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Tran, M., Petrushina, I., Sadzikava, N. and Agadjanyan, M. G.,** 2003, Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with β -amyloid, *International immunology*, 15(4):505-514 pp.
- D'Agata, R., Palladino, P. and Spoto, G.,** 2017, Streptavidin-coated gold nanoparticles: critical role of oligonucleotides on stability and fractal aggregation, *Beilstein journal of nanotechnology*, 8(1):1-11 pp.
- Dağlıoğlu, Y., Yılmaz, H. Ö.,** 2018, Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksikite deneylerindeki önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 1:174-196 s.
- Dai, X., Xiong, Y., Li, N. and Jian, C.** 2019, Vaccine types. In *Vaccines-the History and Future*. IntechOpen.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dakterzada, F., Mobarez, A. M., Roudkenar, M. H. and Mohsenifar, A.,** 2016, Induction of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* flagellin (1-161) using gold nanoparticles as an adjuvant, *Vaccine*, 34(12):1472-1479 pp.
- Daniel M. C. and Astruc, D.,** 2004, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum size related properties and applications toward biology, catalysis and nanotechnology, *Chemical Reviews*, 104:293-346 pp.
- Daraee, H., Eatemadi, A., Abbasi, E., Fekri Aval, S., Kouhi, M. and Akbarzadeh, A.,** 2016, Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1):410-422 pp.
- Das, B. S., Das, A., Mishra, A., and Arakha, M.,** 2021, Microbial cells as biological factory for nanoparticle synthesis, *Frontiers of Materials Science*, 1-15 pp.
- Das, S. K., Das, A. R., Guha, A. K.,** 2009, Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management, *Langumuir*, 25(14):8192-8199 pp.
- Das, S. K., Das, A. R., Guha, A.K.,** 2010, Microbial synthesis of multishaped gold nanostructures, *Small*, 6(9):1012-1021 pp.
- Davis, P.,** 1988, Gold therapy in the treatment of rheumatoid arthritis, *Canadian Family Physician*, 34:445-452 pp.
- Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J. and Krieg, A. M.,** 1998, CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen, *The Journal of Immunology*, 160(2):870-876 pp.
- Debele-Butuner, B., Alapınar, C., Varisli, L., Erbaykent-Tepedelen, B., Hamid, S. M., Gönen-Korkmaz, C., Korkmaz, K. S.,** 2012, Inflammation-mediated abrogation of androgen signaling: an *in vitro* model of prostate cell inflammation, *Molecular Carcinogenesis*, 53(2):85-97 pp.
- De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. and Geertsma, R. E.,** 2008, Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration, *Biomaterials*, 29(12):1912-1919 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Derakhshan, F. K, Dehnad, A. and Salouti, M.,** 2012, Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles by metal resistance bacteria: *Streptomyces griseus*, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 42(6):868-871 pp.
- Ding, L., Yao, C., Yin, X., Li, C., Huang, Y., Wu, M. and Wu, M.,** 2018, Size, shape, and protein corona determine cellular uptake and removal mechanisms of gold nanoparticles, *Small*, 14(42):1801451.
- Ding, P., Zhang, T., Li, Y., Teng, M., Sun, Y., Liu, X. and Zhang, G.,** 2017, Nanoparticle orientationally displayed antigen epitopes improve neutralizing antibody level in a model of porcine circovirus type 2, *International Journal of Nanomedicine*, 12:5239-5254 pp.
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J. and El-Sayed, M. A.,** 2012, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chemical Society Reviews*, 41(7):2740-2779 pp.
- Du, L., Jiang, H., Liu, X., Wang, E.,** 2007, Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by *Escherichia coli* DH5a and I its application on direct electrochemistry of hemoglobin, *Electrochemistry Communications*, 9:1165-1170 pp.
- Du, L., Xian, L. and Feng, J. X.,** 2011, Rapid extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by the fungus *Penicillium sp.*, *Journal of Nanoparticle Research*, 13(3):921-930 pp.
- Dykman, L. A. and Khlebtsov, N. G.,** 2014, Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells, *Chemical reviews*, 114(2):1258-1288 pp.
- Dykman, L. A. and Khlebtsov, N. G.,** 2011, Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects, *Acta Naturae*, 3(9):34-55 pp.
- Dykman, L. A. and Khlebtsov, N. G.,** 2012, Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chem. Soc. Rev.*, 41:2256-2282 pp.
- Dykman, L. A. and Khlebtsov, N. G.,** 2017, Biomedical applications of multifunctional gold-based nanocomposites, *Biochemistry*, 81:1771-1789 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dykman, L. A., Staroverov, S. A., Fomin, A. S., Khanadeev, V. A., Khlebtsov, B. N., and Bogatyrev, V. A.,** 2018, Gold nanoparticles as an adjuvant: Influence of size, shape, and technique of combination with CpG on antibody production, *International Immunopharmacology*, 54:163-168 pp.
- Eickhoff, T. C. and Myers, M.,** 2002, Workshop summary. Aluminum in vaccines, *Vaccine*, 20:1-4 pp.
- Elahi, N., Kamali, M. And Baghersad, M. H.,** 2018, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, *Talanta*, 184:537-556 pp.
- Elbagory, A. M., Hussein, A. A. and Meyer, M.,** 2019, The *in vitro* immunomodulatory effects of gold nanoparticles synthesized from hypoxis hemerocallidea aqueous extract and hypoxoside on macrophage and natural killer cells, *International Journal of Nanomedicine*, 14:9007.
- El-Batal, A. I. and Tamie, M. S. S.,** 2015, Biosynthesis of gold nanoparticles using Marine *Streptomyces cyaneus* and their antimicrobial, antioxidant and antitumor (*in vitro*) activities, *J. Chem. Pharm. Res.*, 7(7):1020-1036 pp.
- El-Sayed, I. H., Huang, X. and El-Sayed, M. A.,** 2005, Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer, *Nano letters*, 5(5):829-834 pp.
- Enea, M., Pereira, E., Costa, J., Soares, M. E., da Silva, D. D., de Lourdes Bastos, M. and Carmo, H. F.,** 2021, Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles on two distinct hepatic cell models, *Toxicology in Vitro*, 70:105046.
- Ensign, J. C.,** 1992, Introduction to the *Actinomycetes*, The Procaryotes, 2nd ed., Balows, A., Trilper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds.), Springer, Verlag-NewYork.
- Erkekoğlu, P. ve Baydar, T.,** 2021, Güncel *in vitro* sitotoksikite testleri, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41:45-63 pp.
- Faraday, M.,** 1857, X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147:145-181 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eskandari-Nojehdehi, M., Jafarizadeh-Malmiri, H. and Rahbar-Shahrrouzi, J.,** 2016, Optimization of processing parameters in green synthesis of gold nanoparticles using microwave and edible mushroom (*Agaricus bisporus*) extract and evaluation of their antibacterial activity, *Nanotechnology Reviews*, 5(6):537-548 pp.
- Falahati, M., Attar, F., Sharifi, M., Haertlé, T., Berret, J. F., Khan, R. H., Saboury, A. A.,** 2019, A health concern regarding the protein corona, aggregation and disaggregation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(5): 971-991 pp.
- Faulk, W. and Taylor, G.,** 1979, An immunocolloid method for the electron microscopy. *Immunochemistry*, 8:1081-1083 pp.
- Fayaz, A. M., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., Kalaichelvan, P. T.,** 2011, Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*, *Process Biochemistry*, 46:1958-1962 pp.
- Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F., Plebanski, M.,** 2004, Size-dependent immunogenicity: Therapeutic and protective properties of nanovaccines against tumors, *J. Immunol.*, 173:3148-3154 pp.
- Fraga, S., Brandao, A., Soares, M. E., Morais, T., Duarte, J. A., Pereira, L. and Carmo, H.,** 2014, Short-and long-term distribution and toxicity of gold nanoparticles in the rat after a single-dose intravenous administration, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(8):1757-1766 pp.
- Frens, G.,** 1973, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature physical science*, 241(105):20-22 pp.
- Fries, C. N., Curvino, E. J., Chen, J. L., Permar, S. R., Fouda, G. G. and Collier, J. H.,** 2021, Advances in nanomaterial vaccine strategies to address infectious diseases impacting global health, *Nature Nanotechnology*, 16(4):1-14 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fytianos, K., Rodriguez-Lorenzo, L., Clift, M. J., Blank, F., Vanhecke, D., Von Garnier, C. and Rothen-Rutishauser, B.,** 2015, Uptake efficiency of surface modified gold nanoparticles does not correlate with functional changes and cytokine secretion in human dendritic cells in vitro, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3):633-644 pp.
- Furth, V. R.,** 1994, *Immunol Ser.*, 60:5-7 pp.
- Gahlawat, G. and Choudhury, A. R.,** 2019, A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes, *RSC Adv*, 9:12944–12967 pp.
- Gannon, C. J., Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. and Curley, S. A.,** 2008, Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells, *Journal of nanobiotechnology*, 6(1):1-9 pp.
- Gericke, M. and Pinches, A.,** 2006, Biological synthesis of metal nanoparticles, *Hydrometallurgy*, 83:132-140 pp.
- Gerlier, D. and Thomasset, N.,** 1986, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods*, 94(1-2):57-63 pp.
- Ghimire, T. R.** 2015, The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm, *Springerplus*, 4(1):1-18 pp.
- Ghimire, T. R., Benson, R. A., Garside, P. and Brewer, J. M.,** 2012, Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro, *Immunology letters*, 147(1-2):55-62 pp.
- Ghorbani, H.,** 2016, Microbial synthesis of gold nanoparticles with *Salmonella typhirium*, *Minerva Biotechnologica*, 28(1):29-32 pp.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. and Rotello, V. M.,** 2008, Gold nanoparticles in delivery applications, *Advanced drug delivery reviews*, 60(11):1307-1315 pp.
- Ghosh, S., Ahmad, R., Zeyauallah, M. and Khare, S. K.,** 2021, Microbial nano-factories: synthesis and biomedical applications, *Frontiers in Chemistry*, 9:19-213 pp.
- Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H. and Wallace, W.,** 1926, The antigenic value of toxoid precipitated by potassium- alum, *J Path Bact*, 29:38-45 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Golinska, P., Wypij, M., Ingle, A. P., Gupta, I., Dahm, H. and Rai, M.,** 2014, Biogenic synthesis of metal nanoparticles from *Actinomycetes*: biomedical applications and cytotoxicity, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:8083-8097 pp.
- Gopal, J. V., Thenmozhi, M., Kannabiran, K., Rajakumar, G., Velayutham, K. and Rahuman, A. A.,** 2013, Actinobacteria mediated synthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. VITDDK3 and its antifungal activity, *Materials Letters*, 93:360-362 pp.
- Gregory, A. E., Williamson, E. D., Prior, J. L., Butcher, W. A., Thompson, I. J., Shaw, A. M. and Titball, R. W.,** 2012, Conjugation of *Y. pestis* F1-antigen to gold nanoparticles improves immunogenicity, *Vaccine*, 30(48):6777-6782 pp.
- Gregory, A. E., Williamson, E. D. and Titball, R.,** 2013, Vaccine delivery using nanoparticles *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3:13 p.
- Gu, Y, Wei S., Gufeng W. and Ning F.,** 2011, Single particle orientation and rotation tracking discloses distinctive rotational dynamics of drug delivery vectors on live cell membranes, *Journal of the American Chemical Society*, 133(15):5720-5723 pp
- Gulla, S. K., Rao, B. R., Moku, G., Jinka, S., Nimmu, N. V., Khalid, S. and Chaudhuri, A.,** 2019, *In vivo* targeting of DNA vaccines to dendritic cells using functionalized gold nanoparticles, *Biomaterials science*, 7(3):773-788 pp.
- Gunasekera, U. A., Pankhurst, Q. A. and Douek, M.,** 2009, Imaging applications of nanotechnology in cancer, *Targeted Oncology*, 4(3):169-181 pp.
- Gupta, S. and Bector, S.,** 2014, Biosynthesis of extracellular and intracellular gold nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 103:1113-1123 pp.
- Gurunathan, S., Han, J., Park, J. H. and Kim, J. H.,** 2014, A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles, *Nanoscale research letters*, 9(1):1-11 pp.
- Hamid, N. F. B. and Said, F. M.,** 2018, Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* FTC 5356 using response surface methodology, *IIUM Engineering Journal*, 19(1):34-47 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hanauer, M., Pierrat, S., Zins, I., Lotz, A. and Sönnichsen, C.,** 2007, Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape, *Nano Letters*, 7:2881-2885 pp.
- Hanley, C., Thurber, A., Hanna, C., Punnoose, A., Zhang, J. and Wingett, D. G.,** 2009, The influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction, *Nanoscale research letters*, 4(12):1409-1420 pp.
- Havel, J., Panyala, N. R. and Pena-Mendez, E. M.,** 2009, Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives, *Journal of applied biomedicine*, 7(2):75-91 pp.
- Hayat, G., S. M., and Darroudi, M.,** 2019, Nanovaccine: a novel approach in immunization, *Journal of cellular physiology*, 234(8):12530-12536 pp.
- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J. and Gu, N.,** 2007, Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*, *Materials Letters*, 61:3984–3987 pp.
- Heydenreich, B., Bellinghausen, I., König, B., Becker, W. M., Grabbe, S., Petersen, A. and Saloga, J.,** 2012, Gram-positive bacteria on grass pollen exhibit adjuvant activity inducing inflammatory T cell responses, *Clinical and Experimental Allergy*, 42(1):76-84 pp.
- Ho, Y. T., Poinard, B., Yeo, E. L. L. and Kah, J. C. Y.,** 2014, An instantaneous colorimetric protein assay based on spontaneous formation of protein corona on gold nanoparticles, *Analyst*, 140(4):1026-1036 pp.
- Hofmann-Antenbrink, M., Grainger, D. W. and Hofmann, H.,** 2015, Nanoparticles in medicine: Current challenges facing inorganic nanoparticle toxicity assessments and standardizations, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(7):1689-1694 pp.
- HogenEsch, H.,** 2002, Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants, *Vaccine*, 20:S34-S39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W. and El-Sayed, M. A.,** 2005, Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods, *Journal of the American Chemical Society*, 128(6):2115-2120 pp.
- Huang, X. and El-Sayed, M. A.,** 2010, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of Advanced Research*, 1:13-28 pp.
- Huang, X., Jain, K., El-Sayed, I. and El-sayed, M.,** 2007, Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy, *Nanomedicine*, 2(5):681-693 pp.
- Hubbell, J. A., Thomas, S. N. and Swartz, M. A.,** 2009, Materials engineering for immunomodulation, *Nature*, 462:449-460 pp.
- Hulkoti, N. I. and Taranath, T. C.,** 2014, Biosynthesis of nanoparticles using microbes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121:474-483 pp.
- Huo, D., He, J., Li, H., Yu, H., Shi, T., Feng, Y. and Hu, Y.,** 2014, Fabrication of Au@Ag core-shell NPs as enhanced CT contrast agents with broad antibacterial properties, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117:29-35 pp.
- Husseiny, M. I., Abd El-Aziz, M., Badr, Y. and Mahmoud, M. A.,** 2007, Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*, *Spectrochimica Acta Part A*, 67:1003-1006 pp.
- Ibrahim, K. E., Al-Mutary, M. G., Bakhiet, A. O. and Khan, H. A.,** 2018, Histopathology of the liver, kidney, and spleen of mice exposed to gold nanoparticles, *Molecules*, 23(8):1848 p.
- Jafari, M., Rokhbakhsh-Zamin, F., Shakibaie, M., Moshafi, M. H., Ameri, A., Rahimi, H. R. and Forootanfar, H.,** 2018, Cytotoxic and antibacterial activities of biologically synthesized gold nanoparticles assisted by *Micrococcus yunnanensis* strain J2, *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15:245-253 pp.
- Jain, P. K., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A.,** 2007, Au nanoparticles target cancer, *Nanotoday*, 2(1):18-29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiang, W., B. Y. S. Kim, J. T. Rutka, and W. C. W. Chan.,** 2008, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent, *Nature Nanotechnology*, 3(3):145-150 pp.
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W. and Sijiao, L.,** 2004, Nanotechnology and biosensors, *Biotechnology advances*, 22(7):505-518 pp.
- Johal, M. S.,** 2011, Understanding nanomaterials, Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- Kaba, S. A., McCoy, M. E., Doll, T. A., Brando, C., Guo, Q., Dasgupta, D. and Lanar, D. E.,** 2012, Protective antibody and CD8+ T-cell responses to the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein induced by a nanoparticle vaccine, *PLoS One*, 7(10):e48304.
- Kalabegishvil, T., Kirkesali, E., Ginturi, E., Rcheulishvili, A., Murusidze, I., Pataraya, D., Gurielidze, M., Bagdavadze, N., Kuchava, N., Gvarjaladze, D. and Lomidze, L.,** 2013, Synthesis of gold nanoparticles by new strains of thermophilic actinomysetes, *Nano Studies*, 7:255-260pp.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K. and Gurunathan, S.,** 2009, Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*, *Bioresource technology*, 100(21):5356-5358 pp.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B. and Gurunathan, S.,** 2010, Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 77(2):257-262 pp.
- Kalmodia, S., Vandhana, S., Rama, B. R. T., Jayashree, B., Seethalaksmi, T. S., Umashankar, V., Yang, W., Barrow, C. J., Krishnakumar, S. and Elchuri, S. V.,** 2016, Bio-conjugation of antioxidant peptide on surface-modified gold nanoparticles: a novel approach to enhance the radical scavenging property in cancer cell, *Cancer Nano*, 7(1):1-19 pp.
- Kanekiyo, M., Wei, C. J., Yassine, H. M., McTamney, P. M., Boyington, J. C., Whittle, J. R. and Nabel, G. J.,** 2013, Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies, *Nature*, 499(7456), 102-106 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kang, S., Ahn, S., Lee, J., Kim, J. Y., Choi, M., Gujrati, V. and Jon, S.,** 2017, Effects of gold nanoparticle-based vaccine size on lymph node delivery and cytotoxic T-lymphocyte responses, *Journal of controlled release*, 256:56-67 pp.
- Kannan, R., Nune, S., Chanda, N., Zambre, A., and Shukla, R.,** 2011, Novel nanochemistry toward generation and stabilization of gold nanoparticles in human serum albumin matrix, *Pure and Applied Chemistry*, 83(11):2055-2062 pp.
- Kansal, H., Singh, S. and Kumar, P.,** 2005, Parametric optimization of powder mixed electrical discharge machining by response surface methodology, *Journal of Materials Processing Technology*, 169(3):427-436 pp.
- Kapara, A., Brunton, V., Graham, D. and Faulds, K.,** 2020, Investigation of cellular uptake mechanism of functionalised gold nanoparticles into breast cancer using SERS, *Chemical science*, 11(22):5819-5829 pp.
- Karthik, L., Kumar, G., Keswani, T., Bhattacharyya, A., Reddy, B. P. and Rao, K. B.,** 2013, Marine actinobacterial mediated gold nanoparticles synthesis and their antimalarial activity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(7):951-960 pp.
- Kasturi, S. P., Skountzou, I., Albrecht, R. A., Koutsonanos, D., Hua, T., Nakaya, H. I., Ravindran, R., Stewart, S., Alam, M., Kwissa, M., Villinger, F. and Murthy, N.,** 2011, Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity, *Nature*, 470:543–547 pp.
- Kasthuri, J., Veerapandian, S. and Rajendiran, N.,** 2009, Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1):55-60 pp.
- Khadivi Derakhshan, F., Dehnad, A. and Salouti, M.,** 2012, Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles by metal resistance bacteria: *Streptomyces griseus*, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 42(6):868-871.
- Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y. and Maiti, S.,** 2007, Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells, *Chembiochem*, 8(11):1237-1240 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khuri, A. I., and Mukhopadhyay, S.,** 2010, “Response surface methodology”, *Computational Statistics*, 2(2):128-149 pp.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A.,** 2000, Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation Norwich. Printed by Crowes, Norwich 291:5-17 pp.
- Kikuchi, F., Kato, Y., Furihata, K., Kogure, T., Imura, Y., Yoshimura, E. and Suzuki, M.,** 2016, Formation of gold nanoparticles by glycolipids of *Lactobacillus casei*, *Scientific reports*, 6(1):1-8 pp.
- Kim, K. H. and Lee, E. K.,** 2007, Biothermodynamic analysis of BSA adsorption to alum gel using isothermal titration calorimetry, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(4):366-371 pp.
- Kim J. S, Kuk E., Yu K. N, Kim J. H, Park S. J, Lee H. J, Jeong D. H. and Cho M. H.,** 2007, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 3:95–101 pp.
- Kitching, M., Choudhary, P., Inguva, S., Guo, Y., Ramani, M., Das, S. K. and Marsili, E.,** 2016, Fungal surface protein mediated one-pot synthesis of stable and hemocompatible gold nanoparticles, *Enzyme and Microbial Technology*, 95:76-84 pp.
- Konishi, Y., Tsukiyama, T., Tachimi, T., Saitoh, N., Nomura, T. and Nagamine, S.,** 2007, Microbial deposition of gold nanoparticles by the metal-reducing bacterium *Shewanella algae*, *Electrochimica Acta*, 53(1):186-192 pp.
- Kool, M., Fierens, K. and Lambrecht, B. N.,** 2012, Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant, *Journal of medical microbiology*, 61(7):927-934 pp.
- Korbekandi, H., Iravani, S. and Abbasi, S.,** 2009, Production of nanoparticles using organism, *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(4):279-306 pp.
- Krieg, A. M.,** 2006, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nature reviews Drug discovery*, 5(6):471-484 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, D. S. R. S., Narendhran S., Kumar, P. S. and Kumar, B. L.,** 2016, A novel *Streptomyces* sp. mediated gold nanoparticle synthesis and its efficacy on antibiogram and cytotoxic activity on breast cancer (MCF-7) cell line, *Am-Euras. J. Sci. Res.*, 11(3):183-188 pp.
- Kumar, R., Ray, P. C., Datta, D., Bansal, G. P., Angov, E. and Kumar, N.,** 2015, Nanovaccines for malaria using *Plasmodium falciparum* antigen Pfs25 attached gold nanoparticles, *Vaccine*, 33(39):5064-5071 pp.
- Kumar, S., Harrison, N., Richards-Kortum, R. and Sokolov, K.,** 2007, Plasmonic nanosensors for imaging intracellular biomarkers in live cells, *Nano letters*, 7(5):1338-1343 pp.
- Lande, K.,** 1927, Die gunstige, Heinflussung schleichender Dauerinfektionen surch Solganal, *Munch Med Wchschr*, 74:1132-1139 pp.
- Lane, D. J.,** 1991, 16S/23S rRNA sequencing, In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow, New York: Wiley, 115-175 pp
- Larsson, M., Hill, A. and Duffy, J.,** 2012, Suspension stability; why particle size, zeta potential and rheology are important, *Annual transactions of the Nordic rheology society*, 20(6):209-214 pp.
- Lee, Y. J., Ahn, E. Y. and Park, Y.,** 2019, Shape-dependent cytotoxicity and cellular uptake of gold nanoparticles synthesized using green tea extract, *Nanoscale research letters*, 14(1):1-14 pp.
- Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R.,** 2008, Cytotoxicity of nanoparticles, *Small*, 4(1):26-49 pp.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. S. and Chen, G.,** 2011, Biosynthesis of nanoparticles by microorganism and their applications, *Journal of Nanomaterials*, 1-16 pp.
- Lin, Z., Wu, J., Xue, R. and Yang, Y.,** 2005, Spectroscopic characterization of Au³⁺ biosorption by waste biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(4):761-765 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lindblad, E. B.**, 2004, Aluminium compounds for use in vaccines, *Immunology and cell biology*, 82(5):497-505 pp.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R. and Pederson, J.**, 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 38:471 p.
- Liu, Y., Perumalsamy, H., Kang, C. H., Kim, S. H., Hwang, J. S., Koh, S. C. and Kim, Y. J.**, (2020), Intracellular synthesis of gold nanoparticles by *Gluconacetobacter liquefaciens* for delivery of peptide CopA3 and ginsenoside and anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated macrophages, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 48(1):777-788 pp.
- Llevot, A. and Astruc, D.**, 2012, Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer, *Chemical Society Reviews*, 41(1):242-257 pp.
- Lokina, S., Suresh, R., Giribabu, K., Stephen, A., Sundaram, R.L. and Narayanan, V.**, 2014, Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129:484-490 pp.
- Lu, W., Xiong, C., Zhang, G., Huang, Q., Zhang, R., Zhang, J. Z. and Li, C.**, 2009, Targeted photo thermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog-conjugated hollow gold nanospheres, *Clin Cancer Res*, 15:876–886 pp.
- Madera, R., Gong, W., Wang, L., Burakova, Y., Llellish, K., Galliher-Beckley, A. and Bai, J.**, 2016, Pigs immunized with a novel E2 subunit vaccine are protected from subgenotype heterologous classical swine fever virus challenge. *BMC veterinary research*, 12(1):197 p.
- Magdi, H. M. and Bhushan, B.**, 2015, Extracellular biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium chrysogenum*, *Microsyst Technol*, 21:2279-2285 pp.
- Manivasagan P. and Oh J.**, 2015, Production of a Novel Fucoidanase for the Green Synthesis of Gold Nanoparticles by *Streptomyces* sp. and Its Cytotoxic Effect on HeLa Cells, *Mar. Drugs*, 13:6818-6837 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mandenijs, C.F. and Brundin, A.,** 2008, Bioprocess optimization using design of experiments methodology, *Biotechnol Prog*, 24(6):1191-1203 pp.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kang, K., Sivakumar, K., Park, S. and Kim, S.,** 2015, Production of α -amylase for the biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces* sp. MBRC-82, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72:71-78 pp.
- Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P. and Bachmann, M. F.,** 2008, Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size, *Eur. J. Immunol*, 38:1404-1413 pp.
- Martins, E., Versiani, A. F., Andrade, L. M., Scalzo, S., Geraldo, J. M., Chaves, R. C., Ferreira, D. C., Ladeira, M., Guatimosim, S., Ladeira, L. O. and Fonseca, F. G.,** 2016, Gold nanoparticles and their applications in biomedicine, *Future Virology*, ISSN 1746-0794 pp.
- Marques Neto, L. M., Kipnis, A. and Junqueira-Kipnis, A. P.,** 2017, Role of metallic nanoparticles in vaccinology: implications for infectious disease vaccine development, *Frontiers in immunology*, 8:239 p.
- Marquis, B. J., Love, S. A., Braun, K. L. and Haynes, C. L.,** 2009, Analytical methods to assess nanoparticle toxicity, *Analyst*, 134(3):425-439 pp.
- Matczuk, M., Ruzik, L., Aleksenko, S. S., Keppler, B. K., Jarosz, M. and Timerbaev, A. R.,** 2019, Analytical methodology for studying cellular uptake, processing and localization of gold nanoparticles, *Analytica Chimica Acta*, 1052:1-9 pp.
- McCoy, M. E., Golden, H. E., Doll, T. A., Yang, Y., Kaba, S. A., Burkhard, P. and Lanar, D. E.,** 2013, Mechanisms of protective immune responses induced by the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-based, self-assembling protein nanoparticle vaccine, *Malaria journal*, 12(1):1-12 pp.
- Merritt, K. and Johnson, A. G.,** 1965, Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation: VI. Enhancement of antibody formation by nucleic acids, *The Journal of Immunology*, 94(3):416-422 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mie, G.**, 1976, Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions, *Contributions to the optics of turbid media*, 25(3):377-445 pp.
- Mieszawska, A. J., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A. and Cormode, D. P.**, 2013, Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease, *Molecular Pharmaceutics*, 10:831-847 pp.
- Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V. and Rafailovich, M. H.**, 2010, Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time, *Nanotoxicology*, 4(1):120-137 pp.
- Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K. C. and Nautiyal, C. S.**, 2014, Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp., *Bioresource technology*, 166:235-242 pp.
- Mishra, A., Tripathy, S. K., Wahab, R., Jeong, S. H., Hwang, I., Yang, Y. B., Kim, Y. S., Shin, H. S. and Yun, S. I.**, 2011, Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C₂C₁₂ cells, *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3):617-630 pp.
- Mocan, T., Matea, C., Tabaran, F., Iancu, C., Orasan, R. and Mocan, L.**, 2015, *In vitro* administration of gold nanoparticles functionalized with MUC-1 protein fragment generates anticancer vaccine response via macrophage activation and polarization mechanism, *Journal of Cancer*, 6(6):583 p.
- Mohanan, D., Slütter, B., Henriksen-Lacey, M., Jiskoot, W., Bouwstra, J. A., Perrie, Y. and Johansen, P.**, 2010, Administration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 147(3):342-349 pp.
- Mold, M., Shardlow, E. and Exley, C.**, 2016, Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations, *Scientific reports*, 6(1):1-13 pp.
- Montgomery, D. C.**, 2001, Design and Analysis of Experiments, 5th Edition, Wiley, New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moreira, A. F., Rodrigues, C. F., Reis, C. A., Costa, E. C. and Correia, I. J.,** 2018, Gold-core silica shell nanoparticles application in imaging and therapy: A review, *Microporous and Mesoporous Materials*, 270:168-179 pp.
- Morones, J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A. and Ramirez J. T.,** 2005, The bactericidal effect of silver nanoparticles, *Nanotechnology*, 16:2346–2353 pp.
- Mout, R., Moyano, D. F., Rana, S. and Rotello, V. M.,** 2012, Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine, *Chemical Society Reviews*, 41(7):2539-2544 pp.
- Moyano, D. F., Goldsmith, M., Solfiell, D. J., Landesman-Milo, D., Miranda, O. R., Peer, D. and Rotello, V. M.,** 2012, Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response, *Journal of the American Chemical Society*, 134(9):3965-3967 pp.
- Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Bone, N., Lee, Y. K., Patra, C. R., Wang, S. and Mukhopadhyay, D.,** 2007, Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis, *Journal of nanobiotechnology*, 5(1):1-13 pp.
- Mukherjee, P., Roy, M., Mandal, B. P., Dey, G. K., Mukherjee, P. K., Ghatak, J., Tyagi A. K. and Kale, S. P.,** 2008, Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*, *Nanotechnology*, 19(7):075103.
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R. and Sastry, M.,** 2002, Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*, *ChemBioChem*, 5:461-463 pp.
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C. and Baxter, S. C.,** 2008, Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging, *Accounts of chemical research*, 41(12):1721-1730 pp.
- Murray, R. Z. and Stow, J. L.,** 2014, Cytokine secretion in macrophages: SNAREs, Rabs, and membrane trafficking, *Frontiers in immunology*, 5:538 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mutwiri, G., Benjamin, P., Soita, H., Townsend, H., Yost, R., Roberts, B. and Babiuk, L. A.,** 2007, Poly [di (sodium carboxylatoethylphenoxy) phosphazene](PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens, *Vaccine*, 25(7):1204-1213 pp.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C.,** 1995, Response Surface Methodology, *Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. and Anderson – Cook, C. M.,** 2009, Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, John Wiley and Sons, 677p.
- Nadhe, S. B., Wadhwani, S. A., Singh, R. and Chopade, B. A.,** 2020, Green synthesis of AuNPs by *Acinetobacter* sp. GWRVA25: optimization, characterization, and its antioxidant activity, *Front Chem*, 8:474p.
- Nagata, Y. and Chu, K.H.,** 2003, Optimization of a fermentation medium using neural networks and genetic algorithms, *Biotechnol Lett*, 25(21):1837-1842 pp.
- Nair, B. and Pradeep, T.,** 2002, Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains, *American Chemical Society*, 2(4):293-298 pp.
- Nalbantsoy, A., Karış M., Karakaya, L. ve Akgül, Y.,** 2016, Antioxidant, cytotoxic and İNOS activity of Liquidambar orientalis Mill. resin extracts, *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3):198-205 pp.
- Nambara, K., Niikura, K., Mitomo, H., Ninomiya, T., Takeuchi, C., Wei, J. and Ijiro, K.,** 2016, Reverse size dependences of the cellular uptake of triangular and spherical gold nanoparticles, *Langmuir*, 32(47):12559-12567 pp.
- Nanda, A. and Saravanan, M.,** 2009, Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and it's antimicrobial activity against MRSA and MRSE, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4):452-456 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R. and Ragadhita, R.,** 2019, How to read and interpret FTIR spectroscopy of organic material, *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1):97-118 pp.
- Nangia, Y., Wangoo, N., Goyal, N., Shekhawat, G. and Suri, C. R.,** 2009, A novel bacterial isolate *Stenotrophomonas maltophilia* as living factory for synthesis of gold nanoparticles, *Microbial Cell Factories*, 8(39):1-7 pp.
- Naraginti, S. and Li, Y.,** 2017, Preliminary investigation of catalytic, antioxidant, anticancer and bactericidal activity of green synthesized silver and gold nanoparticles using *Actinidia deliciosa*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170:225-234 pp.
- Narayanan, K. B. and Sakthivel, N.,** 2010, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 156:1-13 pp.
- Nativo, P., Ian A. P., and Mathias B.,** 2008, Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles, *ACS Nano* 2(8):1639-1644 pp.
- Nehl, C. L., Liao, H. and Hafner, J. H.,** 2006, Optical properties of star-shaped gold nanoparticles, *Nano letters*, 6(4):683-688 pp.
- Newman, M. J., Powell, M. F., and Burdman, J. R.,** 1995, Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. New York, NY: Plenum Press.
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., Ijiro, K. and Sawa, H.,** 2013, Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses *in vitro* and *in vivo*, *ACS Nano*, 5:3926-3938 pp.
- Nikzamir, M., Akbarzadeh, A. and Panahi, Y.,** 2021, An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61:102316p.
- Njoki, P. N., Lim, I. I. S., Mott, D., Park, H. Y., Khan, B., Mishra, S. and Zhong, C. J.,** 2007, Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(40):14664-14669 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Noordin, M. Y., Venkatesh, V. C., Sharif, S., Elting, S. and Abdullah, A.,** 2004, Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel. J., *Material Processing Technol.*, 145:46-58 pp.
- O'Hagan D. T.,** 2000, Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Methods in Molecular Medicine, Vol. 42), Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 342p.
- Orlowski, P., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Gniadek, M., Labedz, O., Malewski, T., Nowakowska, J., Chodaczek, G., Celichowski, G., Grobelny, J. and Krzyzowska, M.,** 2018, Tannic acid-modified silver and gold nanoparticles as novel stimulators of dendritic cells activation, *Front.Immunol.*, 9:1115. doi: 10.3389/fimmu.2018.01115.
- Oskay, M., Tamer, A. U. and Azeri, C.,** 2004, Antibacterial activity of some *actinomycetes* isolated from farming soils of Turkey, *African Journal of Biotechnology*, 3(9):441-446 pp.
- Paino, I. M. M., Marangoni, V. S., de Oliveira, R. D. C. S., Antunes, L. M. G. and Zucolotto, V.,** 2012, Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells, *Toxicology letters*, 215(2):119-125 pp.
- Pajovic, J. D., Dojcilovic, R., Bozanic, D. K., Kascakova, S., Refregiers, M., Dimitrijevic-Brankovic, S. and Djokovic, V.,** 2015, Tryptophan-functionalized gold nanoparticles for deep UV imaging of microbial cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 135:742-750 pp.
- Pakravan, A., Salehi, R. and Mahkam, M.,** 2021, Comparison study on the effect of gold nanoparticles shape in the forms of star, hallow, cage, rods, and Si-Au and Fe-Au core-shell on photothermal cancer treatment, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33:102144.
- Pamies, R., Cifre, J. G. H., Espín, V. F., Collado-González, M., Baños, F. G. D. and de la Torre, J. G.,** 2014, Aggregation behaviour of gold nanoparticles in saline aqueous media, *Journal of nanoparticle research*, 16(4):1-11 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U. and Jahnke-Dechent, W.,** 2007, Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles, *Small*, 3(11):1941-1949 pp.
- Pantic, I.,** 2011, Nanoparticles and modulation of immune responses, *Science Progress*, 94(1):97–107 pp.
- Pareek, V., Bhargava, A. and Panwar, J.,** 2020, Biomimetic approach for multifarious synthesis of nanoparticles using metal tolerant fungi: a mechanistic perspective, *Materials Science and Engineering: B*, 262:114771.
- Park, S. J., Taton, T. A. and Mirkin, C. A.,** 2002, Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes, *Science*, 295(5559):1503-1506 pp.
- Parnsamt, C. and Brimson, S.,** 2015, Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on IL-2, IL-6 and TNF- α production via MAPK pathway in leukemic cell lines, *Genetics and Molecular Research*, 14(2):3650-3668 pp.
- Parween, S., Gupta, P. K. and Chauhan, V. S.,** 2011, Induction of humoral immune response against PfMSP-119 and PvMSP-119 using gold nanoparticles along with alum, *Vaccine*, 29(13):2451-2460 pp.
- Pasquale, A. D., Preiss, S., Silva, F. T. D. and Garçon, N.,** 2015, Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond, *Vaccines*, 3(2):320-343 pp.
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P. and Dasgupta, A. K.,** 2007, Cell selective response to gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2):111-119 pp.
- Patri A., Dobrovolskaia M., Stern S. and McNeil S.,** 2006, Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics, In MM Amiji, ed., *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor and Francis, 105–138 pp.
- Pederzoli F., Tosi, G., Vandelli, M. A., Belletti, F. F. and Ruozzi B.,** 2017, Protein corona and nanoparticles how can we investigate on?, *Wiley Periodicals*, 9:1-23 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pernodet, N., Fang, X., Sun, Y., Bakhtina, A., Ramakrishnan, A., Sokolov, J. and Rafailovich, M.**, 2006, Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts, *Small*, 2(6):766-773 pp.
- Pitirollo, O., Micoli, F., Necchi, F., Mancini, F., Carducci, M., Adamo, R. and Lay, L.**, 2020, Gold nanoparticles morphology does not affect the multivalent presentation and antibody recognition of Group A *Streptococcus* synthetic oligorhamnans, *Bioorganic chemistry*, 99:103815.
- Prakash, D., Mahale, V., Bankar, A., Nawani, N., Zinjarde, S. and Kapadnis, B.**, 2013, Biosynthesis of colloidal gold nanoparticles by *Streptomyces* sp. NK52 and its anti-lipid peroxidation activity, *Journal of Experimental Biology*, 51:969-972 pp.
- Prathna, T. C., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M. and Mukherjee, A.**, 2011, Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1):152-159 pp.
- Prema, P., Iniya, P. A. and Immanuel, G.**, 2016, Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* (MTCC- 4030), *The Royal Society of Chemistry*, 6:4601-4607 pp.
- Rajasree, S. R. R. and Suman T. Y.**, 2012, Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using a gram negative bacterium *Pseudomonas fluorescens*, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2:796-799 pp.
- Ramon, G.**, 1924, Sur la toxine et sur l'toxoide diphterique, *Ann. Inst. Pasteur*, 38:1p.
- Ranjitha, V. R. and Rai, V. R.**, 2017, Actinomycetes mediated synthesis of gold nanoparticles from the culture supernatant of *Streptomyces griseoruber* with special reference to catalytic activity, *3 Biotech*, 7(5):1-7 pp.
- Reed, S. G., Orr, M. T. and Fox, C. B.**, 2013, Key roles of adjuvants in modern vaccines, *Nature medicine*, 19(12):1597-1608 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reddy, S. T., van der Vlies, A. J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G. J., O'Neil, C. P., Lee, L. K., Swartz, M. A. and Hubbell, J. A.,** 2007, Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines, *Nat. Biotechnol.*, 25:1159–1164 pp.
- Rieznichenko, L. S., Shpileva, S. I., Gruzina, T. G., Dybkova, S. N., Ulberg, Z. R. and Chekhun, V. F.,** 2010, Cancer cells—gold nanoparticles contact interaction determined by their size and concentration, *Rep Natl Acad Sci Ukr*, 2:170-174 pp.
- Rodriguez-Del Rio, E., Marradi, M., Calderon-Gonzalez, R., Frande-Cabanes, E., Penadés, S., Petrovsky, N. and Alvarez-Dominguez, C.,** 2015, A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection, *Vaccine*, 33(12):1465-1473 pp.
- Ryan, Joseph A., K. Wesley Overton, Molly E. Speight, Christine N. Oldenburg, LiNa Loo, Wayne Robarge, Stefan Franzen, and Daniel L. Feldheim,** 2007, Cellular Uptake of Gold Nanoparticles Passivated with BSA-SV40 Large T Antigen Conjugates, *Analytical Chemistry*, 79(23):9150-9159 pp.
- Sabella, S., Brunetti, V., Vecchio, G., Galeone, A., Maiorano, G., Cingolani, R. and Pompa, P. P.,** 2011, Toxicity of citrate-capped AuNPs: an *in vitro* and *in vivo* assessment, *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12):6821-6835 pp.
- Sadhasivam, S., Shanmugam, P., Veerapandian, M., Subbiah, R. and Yun, K.,** 2012, Biogenic synthesis of multidimensional gold nanoparticles assisted by *Streptomyces hygroscopicus* and its electrochemical and antibacterial properties, *Biometals*, 25:351-360 pp.
- Saha, K., Kim, S. T., Yan, B., Miranda, O. R., Alfonso, F. S., Shlosman, D. and Rotello, V. M.,** 2013, Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells, *Small*, 9(2):300-305 pp.
- Salata, O. V.,** 2004, Applications of nanoparticles in biology and medicine, *Journal of nanobiotechnology*, 2(1):1-6 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Salihu, A., Alam, M. Z., Abdulkarim, M. I. and Salleh, H. M.,** 2011, Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental desing, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69:66-73 pp.
- Salvati, A., Pitek, A. S., Monopoli, M. P., Prapainop, K., Bombelli, F. B., Hristov, D. R. and Dawson, K. A.,** 2013, Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface, *Nature nanotechnology*, 8(2):137-143 pp.
- Sanchez-Villamil, J. I., Tapia, D. and Torres, A. G.,** 2019, Development of a gold nanoparticle vaccine against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7, *MBio*, 10(4), e01869-19.
- Sani, A., Cao, C. and Cui, D.,** 2021, Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review, *Biochemistry and biophysics reports*, 26:100991.
- Sapsford, K. E., Tyner, K., M., Dair, B. J., Deschamps, J. R. and Medintz, I. L.,** 2011, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal Chem.* 83:4453–4488 pp.
- Saravanakumar, K., MubarakAli, D., Kathiresan, K., Thajuddin, N., Alharbi, N. S. and Chen, J.,** 2016, Biogenic metallic nanoparticles as catalyst for bioelectricity production: A novel approach in microbial fuel cells, *Materials Science and Engineering B*, 203:27-34 pp.
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I. and Kumar, R.,** 2003, Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete, *Current science*, 85(2):162-170 pp.
- Sathiyarayanan, G., Vignesh, V., Saibaba, G., Vinothkanna, A., Dineshkumar, K., Viswanathana, M. B. and Selvin, J.,** 2014, Synthesis of carbohydrate polymer encrusted gold nanoparticles using bacterial exopolysaccharide: a novel and greener approach, *The Royal Society of Chemistry*, 4:22817-22827 pp.
- Schaeublin, N. M., Braydich-Stolle, L. K., Maurer, E. I., Park, K., MacCuspie, R. I., Afroz, A. N. And Hussain, S. M.,** 2012, Does shape matter? Bioeffects of gold nanomaterials in a human skin cell model, *Langmuir*, 28(6):3248-3258 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Satpathy, S., Patra, A., Ahirwar, B. and Hussain, M. D.,** 2020, Process optimization for green synthesis of gold nanoparticles mediated by extract of *Hygrophila spinosa* T. Anders and their biological applications, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 121:113830.
- Schanen, B. C., Das, S., Reilly, C. M., Warren, W. L., Self, W. T., Seal, S. and Drake D. R.,** 2013, Immunomodulation and T helper TH1/TH2 response polarization by CeO₂ and TiO₂ nanoparticles, *PloS one*, 8(5):e62816.
- Scott, G. B., Williams, H. S. and Marriott, P. M.,** 1967, The phagocytosis of colloidal particles of different sizes, *British journal of experimental pathology*, 48(4):411p.
- Scull, C. M., Hays, W. D. and Fischer, T. H.,** 2010, Macrophage pro-inflammatory cytokine secretion is enhanced following interaction with autologous platelets, *Journal of Inflammation*, 7(1):1-9 pp.
- Sekimukai, H., Iwata-Yoshikawa, N., Fukushi, S., Tani, H., Kataoka, M., Suzuki, T. And Nagata, N.,** 2020, Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs, *Microbiology and Immunology*, 64(1):33-51 pp.
- Shaalan, M., Saleh, M., El-Mahdy, M. and El-Matbouli, M.,** 2016, Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: a review, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(3):701-710 pp.
- Shah, M., Badwaik, V., Kherde, Y., Waghwani, H. K., Modi, T., Aguilar, Z. P. and Dakshinamurthy, R.,** 2014, Gold nanoparticles: various methods of synthesis and antibacterial applications, *Front Biosci*, 19(8):1320-1344 pp.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H. and Nohi, A.,** 2007, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach, *Process Biochemistry*, 42 (5):919-923 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shanmugasundaram, T., Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Kadirvelu, K. and Balagurunathan, R.,** 2017, Biocompatible silver, gold and silver/gold alloy nanoparticles for enhanced cancer therapy: in vitro and in vivo perspectives, *Nanoscale*, 9(43):16773-16790 pp.
- Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhwani, S., Gaidhani, S. and Chopade, B.A.,** 2014, Microbial synthesis of gold nanoparticles: current status and future prospects, *Advances in Colloid and Interface Science*, 209:40-48 pp.
- Shen, Y., Hao, T., Ou, S., Hu, C. and Chen, L.,** 2018, Applications and perspectives of nanomaterials in novel vaccine development, *Med. Chem. Commun.*, 9(2):226–238.
- Shepherd, M. D., Kharel, M. K., Bosserman, M. A. and Rohr, J.,** 2010, Laboratory maintenance of *Streptomyces* species, *Current protocols in microbiology*, 18(1): 10E-1.
- Shi, X., Li, D., Xie, J., Wang, S., Wu, Z. and Chen, H.,** 2012, Spectroscopic investigation of the interactions between gold nanoparticles and bovine serum albumin, *Chinese Science Bulletin*, 57(10):1109-1115 pp.
- Shukla, Ravi, Vipul Bansal, Minakshi Chaudhary, Atanu Basu, Ramesh R. Bhonde, and Murali Sastry,** 2005, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir* 21(23):10644-10654 pp.
- Singh, A. K., Tiwari, R., Singh, V. K., Singh, P., Khadim, S. R., Singh, U., Srivastava, V., Hasan, S. H. and Asthana, R. K.,** 2019, Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51:164-176 pp.
- Singh, A., Misra, R., Mohanty, C. and Sahoo, S. K.,** 2010, Applications of nanotechnology in vaccine delivery, *International Journal of Green Nanotechnology: Biomedicine*, 2(1):B25-B45.
- Singh, M., and O'Hagan, D. T.** 2002, Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research*, 19(6):715-728 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, P. K. and Kundu, S.,** 2014, Biosynthesis of gold nanoparticles using bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 84(2):331-336 pp.
- Singh, P., Kim, Y. J., Wang, C., Mathiyalagan, R. and Yang, D. C.,** 2016, Microbial synthesis of Flower-shaped gold nanoparticles, *Nanomedicine and Biotechnology*, 44:1469-1474 pp.
- Skladanowski, M., Wypij, M., Laskowski, D., Golinska, P., Dahm, H. and Rai, M.,** 2016, Silver and gold nanoparticles synthesis from *Streptomyces* sp. isolated from acid forest soil with special reference to its antibacterial activity against pathogens, *Journal of Cluster Science*, doi: 10.5402/2013/515091, 1-21 pp.
- Smith, J. D., Morton, L. D. and Ulery, B. D.,** 2015, Nanoparticles as synthetic vaccines, *Current opinion in biotechnology*, 34:217-224 pp.
- Soltani, N. M., Shahidi, B. G. and Khaleghi, N.,** 2015, Biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces fulvissimus* isolate, *Nanomedicine Journal*, 2(2):153-159 pp.
- Sonavane, G., Tomoda, K. and Makino, K.,** 2008, Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(2):274-280 pp.
- Sowani, H., Mohite, P., Munot, H., Shouche, Y., Bapat, T., Kumar, A. R., Kulkarni, M. and Zinjarde, S.,** 2016, Green synthesis of gold and silver nanoparticles by an actinomycete *Gordonia amicalis* HS-11: Mechanistic aspects and biological application, *Process Biochemistry*, 51:374-383 pp.
- Srijampa, S., Buddhisa, S., Ngernpimai, S., Leelayuwat, C., Proungvitaya, S., Chompoosor, A. and Tippayawat, P.,** 2020, Influence of gold nanoparticles with different surface charges on localization and monocyte behavior, *Bioconjugate Chemistry*, 31(4):1133-1143 pp.
- Srinath, B. S. and Ravishankar Rai, V.,** 2015, Biosynthesis of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of size 4–10 nm from spent cultures of *Klebsiella pneumoniae*, *3 Biotech*, 5(5):671-676 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Srinath, B. S., Namratha, K. and Byrappa, K.,** 2018, Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles by *Bacillus subtilis* and their environmental applications *Adv. Sci. Lett.* 24:5942–5946 pp.
- Srivastava, S. K., Yamada, R., Ogino, C. and Kondo, A.,** 2013, Biogenic synthesis and characterization of gold nanoparticles by *Escherichia coli* K12 and its heterogeneous catalysis in degradation of 4-nitrophenol, *Nanoscale research letters*, 8(1):1-9 pp.
- Staroverov, S. A. and Dykman, L. A.,** 2013, Use of gold nanoparticles for the preparation of antibodies to tuberculin, the immunoassay of mycobacteria, and animal vaccination, *Nanotechnologies in Russia*, 8(11):816-822 pp.
- Staroverov, S. A., Vidyasheva, I. V., Gabalov, K. P., Vasilenko, O. A., Laskavyi, V. N. and Dykman, L. A.,** 2011, Immunostimulatory effect of gold nanoparticles conjugated with transmissible gastroenteritis virus, *Bulletin of experimental biology and medicine*, 151(4):436-439 pp.
- Staroverov, S. A., Volkov, A. A., Mezheny, P. V., Domnitsky, I. Y., Fomin, A. S., Kozlov, S. V. and Guliy, O. I.,** 2019, Prospects for the use of spherical gold nanoparticles in immunization, *Applied microbiology and biotechnology*, 103(1):437-447 pp.
- Steckiewicz, K. P., Barcinska, E., Malankowska, A., Zauszkiewicz-Pawlak, A., Nowaczyk, G., Zaleska-Medynska, A. and Inkielewicz-Stepniak, I.,** 2019, Impact of gold nanoparticles shape on their cytotoxicity against human osteoblast and osteosarcoma in in vitro model evaluation of the safety of use and anti-cancer potential, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(2):1-15 pp.
- Stone, J. W., Thornburg, N. J., Blum, D. L., Kuhn, S. J., Wright, D. W. and Crowe, J. E.,** 2013, Gold nanorod vaccine for respiratory syncytial virus, *Nanotechnology*, 24(29):295102.
- Sujitha, M. V. and Kannan, S.,** 2013, Green synthesis of gold nanoparticles using Citrus fruits (*Citrus limon*, *Citrus reticulata* and *Citrus sinensis*) aqueous extract and its characterization, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 102:15-23 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sun, P. P., Lai, C. S., Hung, C. J., Dhaiveegan, P., Tsai, M. L., Chiu, C. L. and Fang, J. M.,** 2021, Subchronic oral toxicity evaluation of gold nanoparticles in male and female mice, *Heliyon*, 7(3):e06577.
- Sun, W., Gufeng, W., Ning F. and Edward S. Y.,** 2009, Wavelength dependent differential interference contrast microscopy: selectively imaging nanoparticle probes in live cells, *Analytical Chemistry*, 81(22):9203-9208 pp.
- Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Broich, M. L., Moon, J. W., Gu, B. and Doktycz, M. J.,** 2011, Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*, *Acta Biomaterialia*, 7(5):2148-2152 pp.
- Suzuki E.,** 2002, High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium, *J. Microsc.* 208:153–157 pp.
- Tai, Y., Lai, C. H., Wang, T. Z., Tran, N. T. T. and Yung, Y. M.,** 2011, Direct synthesis of Rev peptide conjugated gold nanoparticles and their application in cancer therapeutics, *Bioconjugate Chem*, 22:1394-1401 pp.
- Tao, W., Ziemer, K. S. and Gill, H. S.,** 2014, Gold nanoparticle–M2e conjugate coformulated with CpG induces protective immunity against influenza A virus, *Nanomedicine*, 9(2):237-251 pp.
- Tao, W., Hurst, B. L., Shakya, A. K., Uddin, M. J., Ingrole, R. S., Hernandez-Sanabria, M. and Gill, H. S.,** 2017, Consensus M2e peptide conjugated to gold nanoparticles confers protection against H1N1, H3N2 and H5N1 influenza A viruses, *Antiviral research*, 141:62-72 pp.
- Tapia, D., Sanchez-Villamil, J. I., Stevenson, H. L. and Torres, A. G.,** 2021, Multicomponent gold-linked glycoconjugate vaccine elicits antigen-specific humoral and mixed TH1-TH17 immunity, correlated with increased protection against *Burkholderia pseudomallei*, *Mbio*, 12(3):01227-21.
- Tarangini, K. and Mishra, S.,** 2013, Production, characterization and analysis of melanin from isolated marine *Pseudomonas* sp. using vegetable waste, *Res J Eng Sci*, 2278: 9472 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tarantola, M., Pietuch, A., Schneider, D., Rother, J., Sunnick, E., Rosman, C. and Janshoff, A.,** 2011, Toxicity of gold-nanoparticles: synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells, *Nanotoxicology*, 5(2):254-268 pp.
- Tazaki, T., Tabata, K., Aina, A., Ohara, Y., Kobayashi, S., Ninomiya, T. and Niikura, K.,** 2018, Shape-dependent adjuvanticity of nanoparticle-conjugated RNA adjuvants for intranasal inactivated influenza vaccines, *RSC advances*, 8(30):16527-16536 pp.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. and Parikh R. Y.,** 2010, Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6:257-262 pp.
- Thakker, J. N., Dalwadi, P. and Dhandhukia, P. C.,** 2013, Biosynthesis of gold nanoparticles using *Fusarium oxysporum* sp. cubense JT1, a plant pathogenic fungus, *ISRN Biotechnology*, doi: 10.5402/2013/515091, 1-5 pp.
- Thompson, D.,** 1982, Response Surface Experimentation, *J Food Process Preservation*, 6:155-188 pp.
- Tokur, A. ve Aksoy, A.,** 2017, *In vitro* sitotoksikite testleri, *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1): 112-118 s.
- Torres-Chavolla, E., Ranasinghe, R. J. and Alocilja, E. C.,** 2010, Characterization and functionalization of biogenic gold nanoparticles for biosensing enhancement, *IEEE transactions on nanotechnology*, 9(5):533-538 pp.
- Triulzi, R. C., Micic, M., Orbulescu, J., Giordani, S., Mueller, B. and Leblanc, R. M.,** 2008, Antibody–gold quantum dot–PAMAM dendrimer complex as an immunoglobulin immunoassay, *Analyst*, 133(5):667-672 pp.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. and Hillier, J.,** 1951, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11:55-75 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsai, D. H., DelRio, F. W., Keene, A. M., Tyner, K. M., MacCuspie, R. I., Cho, T. J., Zachariah, M. R. and Hackley, V. A.,** 2011, Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods, *Langmuir*, 27(6):2464-2477 pp.
- Ulman, A.,** 2013, An introduction to ultrathin organic films, *Langmuir*, Academic pres.
- Usman, A. I. and Aziz A. A.,** 2019, Optimization of biosynthesis gold nanoparticles via central composite design toward monodisperse, *Mater. Res. Express.*, 6:015051p.
- Uto, T., Wang, X., Katsuaki, S., Haraguchi, M., Akagi, T., Akashi, M. and Baba, M.,** 2007, Targeting of antigen to dendritic cells with poly glutamic acid nanoparticles induces antigen specific humoral and cellular immunity, *The Journal of Immunology*, 178:2979-2986 pp.
- Vala, A. K.,** 2015, Exploration on green synthesis of gold nanoparticles by a marine derived fungus *Aspergillus sydowii*, *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 34(1):194-197 pp.
- Varia, J. C., Zegeye, A., Velasquez-Orta, S. and Bull, S.,** 2016, Process analysis of AuCl_4^- sorption leading to gold nanoparticle synthesis by *Shewanella putrefaciens*, *Chemical Engineering Journal*, 288:482-488 pp.
- Verhoeckx, K. C., Bijlsma, S., de Groene, E. M., Witkamp, R. F., van der Greef, J. and Rodenburg, R. J.,** 2004, A combination of proteomics, principal component analysis and transcriptomics is a powerful tool for the identification of biomarkers for macrophage maturation in the U937 cell line, *Proteomics*, 4(4):1014-1028 pp.
- Vetro, M., Safari, D., Fallarini, S., Salsabila, K., Lahmann, M., Penades, S. and Compostella, F.,** 2017, Preparation and immunogenicity of gold glyco-nanoparticles as antipneumococcal vaccine model, *Nanomedicine*, 12(1):13-23 pp.
- Vijayakumar, S. and Ganesan, S.,** 2012, In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents, *Journal of nanomaterials*, doi:10.1155/2012/734398.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wadhvani, S. A., Shedbalkar, U. U., Singh, R., Karve, M. S. and Chopade, B. A.,** 2014, Novel polyhedral gold nanoparticles: green synthesis, optimization and characterization by environmental isolate of *Acinetobacter* sp. SW30, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(10):2723-2731 pp.
- Waghmare, S., S., Deshmukh, A.M. and Sadowski, Z.,** 2014, Biosynthesis, optimization, purification and characterization of gold nanoparticles, *African Journal of Microbiology Research*, 8(2):138-146 pp.
- Wang, C., Zhu, W., Luo, Y. and Wang, B. Z.,** 2018, Gold nanoparticles conjugating recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin enhanced mucosal cellular immunity, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(4):1349-1360 pp.
- Wang, C., Zhu, W. and Wang, B. Z.,** 2017, Dual-linker gold nanoparticles as adjuvanting carriers for multivalent display of recombinant influenza hemagglutinin trimers and flagellin improve the immunological responses in vivo and in vitro. *International journal of nanomedicine*, 12:4747 p.
- Wang, J. and Wan, W.,** 2009, Experimental desing methods form fermentative hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(1):235-244 pp.
- Wang, S. H., Lee, C. W., Chiou, A. and Wei, P. K.,** 2010, Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images, *Journal of nanobiotechnology*, 8(1):1-13 pp.
- Wang, X., Uto, T., Akagi, T., Akashi, M. and Baba, M.,** 2008, Poly glutamic acid nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an AIDS vaccine, *Journal of Medical Virology*, 80:11-19 pp.
- Wang, Y. Q., Wu, J., Fan, Q. Z., Zhou, M., Yue, Z. G., Ma, G. H. and Su, Z. G.,** 2014, Novel vaccine delivery system induces robust humoral and cellular immune responses based on multiple mechanisms, *Advanced healthcare materials*, 3(5):670-681 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, Y. T., Lu, X. M., Zhu, F., Huang, P., Yu, Y., Zeng, L. and Wu, Y. M.,** 2011, The use of a gold nanoparticle-based adjuvant to improve the therapeutic efficacy of hNgR-Fc protein immunization in spinal cord-injured rats, *Biomaterials*, 32(31):7988-7998 pp.
- Wei, M., Chen, N., Li, J., Yin, M., Liang, L., He, Y., Song, H. Y., Fan and Huang, Q.,** 2012, Polyvalent immunostimulatory nanoagents with self-assembled CpG oligonucleotide-conjugated gold nanoparticles, *Angewandte Chemie*, 124(5):1228-1232 pp.
- Wijaya, A., Schaffer, S. B., Pallares, I. G. and Hamad-Schifferli, K.,** 2009, Selective release of multiple DNA oligonucleotides from gold nanorods, *ACS Nano*, 3(1):80-86 pp.
- Wiwanitkit, V., Sereemasapun, A. and Rojanathanes, R.,** 2009, Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report, *Fertility and Sterility*, 91(1):e7-e8.
- Xie, H., Tkachenko, A. G., Glomm, W. R., Ryan, J. A., Brennaman, M. K., Papanikolas, J. M., Franzen, S. and Feldheim, D. L.,** 2003, Critical flocculation concentrations, binding isotherms, and ligand exchange properties of peptide-modified gold nanoparticles studied by UV– visible, fluorescence, and time-correlated single photon counting spectroscopies, *Analytical chemistry*, 75(21):5797-5805 pp.
- Xie, X., Liao, J., Shao, X., Li, Q. and Lin, Y.,** 2017, The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles, *Scientific reports*, 7(1):1-9 pp.
- Xu, L., Liu, Y., Chen, Z., Li, W., Liu, Y., Wang, L., Liu, Y., Wu, X., Ji, Y., Zhao, Y., Ma, L., Shao, Y. and Chen, C.,** 2012, Surface-engineered gold nanorods: promising DNA vaccine adjuvant for hiv-1 treatment, *Nano Lett*, 12:2003-2012 pp.
- Yan, X., Zhao, X., Jing, S., Zhu, S., Lei, C., Li, R., Gong, P., Ling, B., Wang, R. and Wang, H.,** 2018, Probing glutathione reductase activity with graphene quantum dots and gold nanoparticles system, *Sensors and Actuators B*, 263:27-35 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Y., Zhang, Y., Thakur, A., Li, R., Xu, H., Wang, Z., Ghavami, M., Tu, Z. and Liu, H.**, 2019, One-pot synthesis and characterization of ovalbumin-conjugated gold nanoparticles: A comparative study of adjuvanticity against the physical mixture of ovalbumin and gold nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 571:118704.
- Yeh, Y. C., Creran, B. and Rotello, V. M.**, 2012, Gold nanoparticles: preparation, properties and applications in bionanotechnology, *Nanoscale*, 4:1871-1880 pp.
- Yip, H. C., Karulin, A. Y., Tary-Lehmann, M., Hesse, M. D., Radeke, H., Heeger, P. S. and Lehmann, P. V.**, 1999, Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response *The Journal of Immunology*, 162(7):3942-3949 pp.
- Yurdakök, K. ve İnce, T.**, 2008, Aşı adjuvanları. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51(4):225 s.
- Zhang J., Atay T. and Nurmikko A.V.**, 2009, Optical detection of brain cell activity using plasmonic GNPs, *Nano Lett*, 9:519–524 pp.
- Zhang, P., Andorko, J. I. and Jewell, C. M.**, 2017, Impact of dose, route, and composition on the immunogenicity of immune polyelectrolyte multilayers delivered on gold templates, *Biotechnology and bioengineering*, 114(2):423-431 pp.
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C., Mitter, N., Yu, C. and Middelberg, A.P.J.**, 2014, Nanoparticle vaccines, *Vaccine*, 32:327–337 pp.
- Zharov, V. P., Mercer, K. E., Galitovskaya, E. N. and Smeltzer, M. S.**, 2006, Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles, *Biophysical journal*, 90(2):619-627 pp.
- Zaman, M., Good, M. F. and Toth, I.**, 2013, Nanovaccines and their mode of action, *Methods*, 60:226-231 pp.
- Zanchet, D., Hall, B. D. and Ugarte, D.**, 2011, Characterization of nanophase materials. Wiley-VCH Verlag: GmbH., 13–36 pp.
- Zheng, J., Zhou, C., Yu, M. and Liu, J.**, 2012, Different sized luminescent gold nanoparticles, *Nanoscale*, 4(14):4073-4083 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zonooz, N. F., Salouti, M., Shapouri, R. and Nasseryan, J., 2012, Biosynthesis of gold nanoparticles by *Streptomyces* sp. ERI-3 supernatant and process optimization for enhanced production, *J. Clust Sci*, 23:375-382 pp.



TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince her aşamasında bilgi, tecrübe ve yardımını esirgemeyen, desteğini daima hissettiğim değerli danışmanım Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA'ya, tez çalışması süresince tez izleme kurulu toplantılarında yönlendirmeleri ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Sait SARGIN'a ve Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması süresince *in vitro* hücre kültürü denemelerinde malzeme desteği sağlayan, laboratuvar imkanlarını sunan ve elde edilen sonuçların yorumlanmasında emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Kemal Sami Korkmaz'a, deney tasarımı hakkında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Prof. Dr. Murat ELİBOL'a ve cihaz kullanım desteği sağlayan Prof. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a katkılarından ve laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Aliye ÜSTER Vakfı tarafından desteklenmiştir. Projeyi destekleyen Aliye ÜSTER Vakfı'na teşekkürü borç bilirim.

Adjuvan potansiyeli araştırılan bu tezde, çalışmalarda oldukça gerekli malzeme olan alumun temin edilmesinde destek sağlayan Atafen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık Pazarlama Sanayi ve Ticaret A.Ş.'ne ve Yaprak GEDİK'e teşekkür ederim.

Tez çalışması süresince *in vitro* hücre kültürü denemelerini birlikte gerçekleştirdiğimiz, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen doktorant Aytül GÜL'e sonsuz teşekkür ederim.

E.Ü. Biyomühendislik Bölümü lisansüstü öğrencileri, Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışanları ve mezun olan bana emeği geçen arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bugüne kadar her kararında tüm koşullarda hep desteğim olan, bana inanan, başarılarımın mimarı ve sahibi sevgili ailem annem Sevgi ÜNLÜER'e ve babam Bekir ÜNLÜER'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Nefise ÜNLÜER

Biyolog

EGİTİM

2007-2011	Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Lisans
2012-2014	Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD., Tezli Yüksek Lisans
2015-2019	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İş Güvenliği ABD., Tezli Yüksek Lisans
2014-2022	Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoteknoloji ABD., Doktora

BİLİMSEL VERİLER

Tezler

- Hastane Ortamında Aerob Bakterilerin ve Küflerin İzolasyonu ve Tanılanması, 2014, Adana.
- İzmir İli Çevresinde Bulunan Yem Fabrikalarında Biyolojik Risk Faktörlerinden Mikrobiyal Alerjenlerin Belirlenmesi ve Risk Analizi, 2019, İzmir.
- Mikrobiyal Altın Nanopartikül (AuNP) Sentezinin Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Adjuvan Olarak Kullanım Potansiyelinin Değerlendirilmesi, 2022, İzmir.

Araştırma Projeleri

- 2013, BAP, FEF2013YL4, Hastane Enfeksiyonlarına Neden Olan Aerob

Bakterilerin ve *Aspergillus* Suşlarının İzolasyonu, Tanılanması ve Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi, *Proje Personeli*

- 2015, BAP, 15MÜH037, Topraktan Metagenomik DNA İzolasyonu İçin Farklı Protokollerin Karşılaştırılması, *Proje Personeli*
- 2018, Aliye ÜSTER Vakfı Projesi, Mikrobiyal Altın Nanopartikül (AuNP) Üretiminin Optimizasyonu, Karakterizasyonu ve Adjuvan Olarak Kullanım Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Katıldığı Kongre, Kurs ve Eğitimler

- 21. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 03-07 Eylül 2012, İZMİR.
- 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, ESKİŞEHİR.
- LOOPEGE EÜ Lisansüstü Öğrenci Oryantasyon Programı, 24-26 Eylül 2014, İZMİR.
- MeristemEGE Girişimcilik Sertifika Programı (TUBİTAK 1601 Programı kapsamında yürütülen), 26.04.2015-16.06.2015, İZMİR.
- Hücre Kültürü Eğitimi, 19-20 Mart 2016, İZMİR.
- 5. Biyomalzeme Günleri, 22-23 Ekim 2018, İSTANBUL.
- BD Akan Hücre Ölçer Çalıştayı, 13 Kasım 2018, İZMİR.

Ulusal Toplantılarda Sunulan Bildiriler

- Sağlam, A., Korkmaz, H., Tanrıseven, D., Kuzu, B., Arıkan, B., Dinçer, S., Yasemin, S., Ünlüer, N., Kazaz, A., Adana'da Satışa Sunulan Dondurmalarda Stafilocokal Enterotoksinlerin Varlığının Saptanması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 03-07 Eylül 2012, İZMİR.
- Ünlüer, N., Korkmaz, H., Kibar, F., Hastane Ortamında Aerob Bakterilerin ve Küflerin İzolasyonu ve Tanılanması. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, ESKİŞEHİR.
- Ünlüer, N., HAMEŞ, E. E., Mikrobiyal Altın Nanopartikül Üretiminin İstatistiksel Optimizasyonu. 5. Biyomalzeme Günleri, 22-23 Ekim 2018, İSTANBUL.

UZMANLIK ALANLARI

Mikrobiyoloji

Moleküler Biyoloji

Mikrobiyal Biyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji

İş Güvenliği

TEKNİK BECERİ ve YETERLİLİKLER

Proje ve tez yazım

Laboratuvar uygulamaları

Ders anlatım

YABANCI DİL YETERLİLİKLERİ

İngilizce