
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

ALTIN NANOKAFESLERİN MAKROFAJ HÜCRELERİ İLE ETKİLEŞİMİNİN RAW 264.7 HÜCRE HATTI-HBSAG MODELLERİNDE İN VİTRO ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI

Emine YAVUZ

DOKTORA TEZİ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MART 2017

EMİNE YAVUZ tarafından hazırlanan "Altın nanokafeslerin makrofaj hücreleri ile etkileşiminin RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modellerinde in vitro şartlarda araştırılması'' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Başkan: Prof. Dr. Ayşegül Atak YÜCEL
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Üye: Prof. Dr. Vedat BULUT
İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Üye: Prof. Dr. Ayşe LaLe DOĞAN
Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum .....

Tez Savunma Tarihi: 27/03/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Emine YAVUZ

27/03/2017

ALTIN NANOKAFESLERİN MAKROFAJ HÜCRELERİ İLE ETKİLEŞİMİNİN RAW 264.7 HÜCRE HATTI-HBSAG MODELLERİNDE İN VİTRO ŞARTLARDA ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Emine YAVUZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2017

ÖZET

Bu tez çalışmasında, porlu ve boşluklu özel yapısıyla multifonksiyonel bir nanomalzeme olarak son yıllarda çeşitli teranostik uygulamalarda sıklıkla kullanılan biyouyumlu altın nanokafes (AuNK) parçacıklarının immün sistem üzerine etkileri; AuNK'ların makrofajlarla etkileşiminin RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı-HBsAg (Hepatit B yüzey antijeni) modellerinde *in vitro* şartlarda araştırılması sonucu tespit edildi. Au nanokafeslerin protein adsorpsiyon kapasitesi ve *in vitro* antijen salım profili belirlendi. Au nanokafeslere bağlanan HBsAg proteininin yapısal ve fonksiyonel özelliklerindeki muhtemel değişikliklikler araştırıldı. AuNK'ların makrofaj hücre canlılığı ve metabolik aktivitesi üzerine etkileri incelendi ve sitotoksik olmayan dozlar saptandı. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücre hattında lipopolisakkarit (LPS) kaynaklı NO üretiminine etkisi araştırıldı. HBsAg ile konjuge Au nanokafeslerin (HBsAg-AuNK) *in vitro* immün cevapları makrofajlarda sistematik olarak analiz edildi. Altın nanokafeslerin ve hazırlanan HBsAg-AuNK formülasyonlarının makrofajların antijen alımını, işlemesini, sunumunu ve aktivasyonunu nasıl etkilediği sorusunun cevabı; akım sitometri ile hücre yüzey belirteçleri, konfokal mikroskopi ile hücre içi antijen lokalizasyonu ve ELİSA testleri ile sitokin cevapları analiz edilerek aydınlatıldı. Sonuçlar hâlihazırda birçok aşıda adjuvan olarak kullanılan alum ile karşılaştırıldı. Deney sonuçlarına göre AuNK'ların biyouyumluluğunun yüksek olduğu, Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO üretimini baskıladığı, Au nanokafeslerin aluma oranla makrofajların antijen alım kapasitesini arttırdığı, adsorpsiyon sonucu HBsAg'nin antijenik özelliklerini değiştirmediği, kolayca hücre içine alınıp sitoplazma ve lizozomda biriktiği, makrofajların antijen sunum ve stimülasyon özelliklerini arttırdığı ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde daha çok anti-inflamatuar cevabı destekler yönde sitokin profili oluşturduğu tespit edildi.

Bilim Kodu : 1039.2

Anahtar Kelimeler : Altın nanokafes, Hepatit B yüzey antijeni, makrofaj

Sayfa Adedi : 134

Danışman : Prof.Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

EVALUATION OF THE INTERACTION OF GOLD NANOCAGES WITH MACROPHAGES IN RAW 264.7 CELL LINE-HBSAG MODELS IN VITRO

(Ph. D. Thesis)

Emine YAVUZ

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

March 2017

ABSTRACT

In this thesis study, the effects of multifunctional and biocompatible gold nanocages (AuNCs), a special structure with ultra thin porous walls and hollow interiors which have been widely used in various theranostics applications, on immune system were investigated via the evaluation of the interaction of gold nanocages with macrophages in RAW 264.7 murine macrophage cell line-HBsAg (Hepatitis B surface antigen) models *in vitro*. The protein adsorption capacity and *in vitro* antigen release profile of AuNCs were determined. The probable changes in structural and functional properties of AuNC associated HBsAg protein were investigated. The effects of AuNCs on macrophage cell viability and metabolical activity were analysed and non-cytotoxic doses were determined. The effect of Au nanocages on LPS induced NO production of RAW 264.7 cell line was investigated. The immune responses of HBsAg conjugated Au nanocages (HBsAg-AuNC) in macrophages were systematically analysed *in vitro*. The answer to the question of how AuNCs and newly designed HBsAg-AuNC formulations affect macrophage antigen uptake, antigen processing, antigen presentation and activation were clarified by analyzing cell surface markers with flow cytometry; intracellular antigen localization with confocal microscopy; and cytokine responses with ELISA. The results were also compared with alum which is the adjuvant of many human vaccines. According to the results of experiments AuNCs were found highly biocompatible compared to alum; decreased LPS induced NO production; increased the antigen uptake capacity of macrophages compared to alum; did not change the antigenicity of HBsAg; were uptaken efficiently into macrophages and accumulated in the cytoplasm and lysosome; increased antigen presentation and stimulation; and created cytokine profile supporting mainly anti-inflammatory response in RAW 264.7 cells.

Science Code : 1039.2

Key Words : Gold nanocage, Hepatitis B surface antigen, macrophage

Page Number : 134

Advisor : Prof.Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında benden desteğini, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, bilimsel ve deneysel tecrübelerinden faydalandığım saygı değer tez danışmanı hocam Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a,

Engin bilgi ve tecrübeleriyle immünoloji alanında yetişmemi sağlayan Gazi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı kıymetli öğretim üyeleri Prof. Dr. Vedat BULUT, Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL, Prof. Dr. Cemalettin AYBAY, Doç. Dr. Resul KARAKUŞ ve Doç. Dr. Arzu ARAL'a,

Tez izleme komitelerimde bana her zaman yol gösteren ve destek olan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı kıymetli öğretim üyesi Prof. Dr. Dicle GÜÇ'e,

Destek ve yardımlarıyla her zaman teşviklerini gördüğüm Selçuk Üniversitesi İLTEK Müdürü Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ'e ve Biyoteknoloji bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Pembegül UYAR ARPACI'ya,

Doktora eğitimim boyunca bana hiçbir karşılık beklemeksizin destek olan Gazi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndaki canım arkadaşlarım Dr. Melek YAMAN, Nihan ÖRÜKLÜ, Sanem GÖKÇEN ve Dr. Süheyla HASGÜR'e,

Maddi ve manevi tüm güçlüklere karşı her zaman yanımda olan, beni özveri ile yetiştiren, haklarını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim annem Safiye GÜLER ve babam Recai GÜLER'e ve destekleriyle ve sevgileriyle zorluklar karşısında beni daha güçlü kılan kız kardeşlerim Melike HEBİLOĞLU ve Gözde Nur DURSUN'a,

Bu meşakkatli ama bir o kadar da mükâfatlarla dolu süreçte bana daima destek olan sevgili eşim Doç. Dr. Selman YAVUZ ve canımdan çok sevdiğim oğlum Orhan Ahmet YAVUZ'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 214S652 nolu proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Altın Nanoparçacıkların Özellikleri 5

2.2. Altın Nanoparçacıkların Biyolojik Sistemlerle Etkileşimi 9

2.2.1. Altın nanoparçacıkların biyodağılımı 9

2.2.2. Altın nanoparçacıkların hücre içine alımı 11

2.2.3. Altın nanoparçacıkların sitotoksik etkileri 16

2.2.4. Altın nanoparçacıkların antijen sunucu hücreler ile etkileşimi 17

2.3. Au Nanoparçacıkların Terapötik Uygulamalarda Kullanımı 20

2.3.1. Fototermal terapi ve radyoterapi 20

2.3.2. İmmünterapi 22

2.4. Altın Nanokafeslerin Özellikleri ve Nanotıptaki Yeri 32

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM 39

3.1. Araç-Gereçler 39

3.1.1. Kitler 39

3.1.2. Antikorlar 40

3.1.3. Kimyasallar 40

3.1.4. Cihazlar 42

3.2. Yöntemler 43

3.2.1. Altın nanokafes sentezi ve karakterizasyonu 43

3.2.2. Hücre hattı ve kültür ortamı 44

3.2.3. Sitotoksisite analizleri 46

3.2.4. NO (nitrik oksit) üretiminin kantifikasyonu 48

3.2.5. Antijen adsorpsiyon karakterizasyonu 49

3.2.6. Monolisa HBs Ag ULTRA ELİSA 50

3.2.7. Hücre içi antijen alımı 51

3.2.8. Konfokal mikroskopi 52

3.2.9. Akım sitometri ile fenotip analizi 54

3.2.10. ELİSA *(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)* ile sitokin konsantrasyon ölçümü 55

4. BULGULAR 57

4.1. Altın Nanokafes Sentezi ve Karakterizasyonu 57

4.2. Hücre Kültürü 59

4.3. Altın Nanokafeslerin Sitotoksik Etkileri 60

4.3.1. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkisinin ölçülmesi ve alum ile karşılaştırılması 60

Sayfa

4.3.2. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücre canlılığınına etkisinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile araştırılması ve IC_{50} değerlerinin alum ile karşılaştırılması 69

4.4. Au Nanokafeslerin RAW 264.7 Makrofaj Hücrelerinin NO Üretimine Etkisi..... 73

4.5. Au Nanokafeslerin Antijen Adsorpsiyon Yüzdesi ve İn Vitro Antijen Salım Testi 79

4.6. rHBsAg'nin İn Vitro Antijenitesinin İncelenmesi 82

4.7. Makrofajların HBsAg Alımının Akım Sitometri ile Analizi..... 83

4.8. HBsAg Antijeninin İntrasellüler Lokalizasyonunun Konfokal Mikroskopi Yöntemiyle Araştırılması 86

4.9. Au Nanokafeslerin MHC Sınıf I, MHC Sınıf II ve CD86 Moleküllerine Etkisinin Akım Sitometri ile Analizi 91

4.10. RAW 264.7 Hücrelerinin Sitokin Salgılama Profil Analizi 95

4.10.1. İL-12 salınımı 95

4.10.2. TNF-α salınımı 95

4.10.3. İL-10 salınımı 96

4.10.4. İL-1β salınımı 98

4.10.5. İL-6 salınımı 98

4.10.6. İL-4 salınımı 100

5. TARTIŞMA 103

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 109

KAYNAKLAR 113

ÖZGEÇMİŞ 133

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Kitler 39

Çizelge 3.2. Antikorlar 40

Çizelge 3.3. Kimyasallar 40

Çizelge 3.4. Cihazlar 42

Çizelge 4.1. Altın nanokafeslerin fizikokimyasal karakterizasyonu 59

Çizelge 4.2. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinde zamana bağlı IC_{50} değerleri ... 71

Çizelge 4.3. Altın nanokafeslerin HBsAg adsorpsiyon kapasitesi 80

Çizelge 4.4. Alum adjuvanının HBsAg adsorpsiyon kapasitesi 80

Çizelge 4.5. % Kümülatif HBsAg salımı 81

Çizelge 4.6. AuNK:HBsAg formülasyonlarından ekstrakte edilen HBsAg örneklerinin Monolisa HBs Ag ULTRA kitiyle tespit edilen OD_{450} değerleri 83

Çizelge 4.7. Farklı formülasyonlarla uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri 92

Çizelge 4.8. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri 93

Çizelge 4.9. AuNK ve LPS ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri 94

Çizelge 4.10. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF-α yanıtı 96

Çizelge 4.11. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-10 yanıtı 97

Çizelge 4.12. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-1β yanıtı 98

Çizelge 4.13. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-16 yanıtı 99

Çizlege 4.14. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-4 yanıtı 100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Altın nanoparçacıkların temel özellikleri 7

Şekil 2.2. Altın nanoparçacıkların biyomedikal uygulamaları 8

Şekil 2.3. Nanoparçacıkların hücrelerle etkileşimi ve biyodağılımı..... 11

Şekil 2.4. Altın nanoparçacıkların hücre içine alımı 12

Şekil 2.5. Altın nanoparçacık hücre etkileşimini etkileyen faktörler..... 12

Şekil 2.6. Nanoparçacıkların internalizasyon mekanizmaları 15

Şekil 2.7. Nanoparçacıkların immünmodülasyon etkileri 19

Şekil 2.8. Terapötik AuNP'lerin makrofaj hücreleri içinde tümöre taşınması..... 21

Şekil 2.9. Kanser radyoterapi uygulamalarında ideal AuNP özellikleri 22

Şekil 2.10. Nanoparçacık temelli tümör güdümlü ilaç taşıma sistemi 25

Şekil 2.11.Yüzey adsorpsiyon yöntemiyle Au nanoparçacıkların proteinlerle etkileşimi 27

Şekil 2.12. Nanoparçacıkların immünstimülan aktiviteleri 28

Şelik 2.13. Altın nanoparçacıkların aşılarda kullanımı 30

Şekil 2.14. Nanoparçacık-HBsAg temelli aşı formülasyonunun HBV (Hepatit B virüsü) spesifik hücresel ve hümoral immün cevabı güçlendirmesi..... 32

Şekil 2.15. Altın nanokafeslerin galvanik yer değiştime metodu ile sentezi..... 33

Şekil 2.16. Au nanokafeslerden kontrollü ilaç salımının şematik gösterimi 35

Şekil 2.17. Altın nanokafeslerin iki-foton mikroskopi ile görüntülenmesi..... 36

Şekil 2.18. Au nanokafeslerin kanser terapisinde kullanımı 37

Şekil 4.1. Sentezlenen Au nanokafeslerin TEM görüntüleri ve UV-Vis-NIR spektrumu.. 58

Şekil 4.2. Altın nanokafeslerin farklı konsantrasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri üzerine 24 saat sonraki etkisi 62

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.3. Alumun farklı konsantrasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri üzerine 24 saat sonraki etkisi..... 63

Şekil 4.4. Hücresel empedansın oluşum şeması..... 69

Şekil 4.5. Gerçek zamanlı hücre empedans değişim grafiği 70

Şekil 4.6. Farklı AuNK konsantrasyonlarının (95 µg/ml (kırmızı eğri), 47,5 µg/ml (fosforlu yeşil eğri), 23,75 µg/ml (pembe eğri), 11,88 µg/ml (mavi eğri), 5,94 µg/ml (kahverengi eğri) ve 0 µg/ml (yeşil eğri) RAW 264.7 makrofaj hücre proliferasyonuna etkisinin gerçek zamanlı ve dinamik izlenmesi..... 72

Şekil 4.7. Farklı alum konsantrasyonlarının (333 µg/ml (kırmızı eğri), 166 µg/ml (fosforlu yeşil eğri), 83 µg/ml (pembe eğri), 41 µg/ml (mavi eğri), 20 µg/ml (kahverengi eğri) ve 0 µg/ml (yeşil eğri) RAW 264.7 makrofaj hücre proliferasyonuna etkisinin gerçek zamanlı ve dinamik izlenmesi..... 73

Şekil 4.8. LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde Au nanokafeslerin NO üretimi inhibisyonu 77

Şekil 4.9. Au nanokafeslere adsorbe rHBsAg* (yeşil) antijeninin 24 saat sonra hücre içine alımı..... 85

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. Altın nanokafes sentezinin deneysel kurulumu 57

Resim 4.2. Ag nanoküplerin (solda) ve Au nanokafeslerin (sağda) parçacık boyutlarının TEM ile ölçülmesi (maksimum çözünürlük 0,20 nm) 58

Resim 4.3. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü 60

Resim 4.4. AuNK (25 µg/ml) ile 48 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler (10X objektif)..... 64

Resim 4.5. AuNK (25 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler ve nanoparçacıkların hücre içine alımı (40X objektif) 65

Resim 4.6. Alum (83 µg/ml, 41 µg/ml ve 20 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler..... 66

Resim 4.7. Alum (20 µg/ml, 5 µg/ml ve 2,5 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler..... 67

Resim 4.8. Alum (20 µg/ml, 5 µg/ml ve 2,5 µg/ml) ile 48 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler..... 68

Resim 4.9. AuNK ve LPS ile farklı kombinasyonlarda 24 saat uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde (40 x 10^3 hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik modifikasyonlar. 78

Resim 4.10. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve çekirdekleri DAPI ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri..... 88

Resim 4.11. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve hücre membranları Phalloidin ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri..... 89

Resim 4.12. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve lizozomları LysoTracker Red ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri..... 90

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
α	Alfa
Au	Altın
β	Beta
γ	Gama
CO_2	Karbon dioksit
C	Santrigrat (*Celcius*)
Dk	Dakika
G	Rölatif yer çekimi kuvveti (*Gravity*)
kDa	Kilo dalton
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/mililitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
pg	Pikogram
V	Volt

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
Alum	Alüminyum hidroksit jeli ($Al(OH)_3$)
ASH	Antijen sunucu hücre
AuNK	Altın nanokafes
AuNP	Altın nanoparçacık
CTL	Sitotoksik T lenfosit *(Cytotoxic T Lypmhocyte)*
DC	Dendritik hücre (*Dendritic Cell*)
Kısaltmalar	**Açıklamalar**
DMSO	Dimetilsülfoksit

EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*Epidermal growth factor receptor*)
ELİSA	Enzim-bağlı immunosorbant asey *(Enzyme linked immonusorbent assay)*
FBS	Fetal sığır serumu *(Fetal Bovine Serum)*
FcγR	Fc gama reseptörü
İg	İmmünoglobulin
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni *(Hepatitis B surface antigen)*
İFN	İnterferon
İL	İnterlökin
MHC	Majör/Ana doku uygunluk kompleksi *(Major histocompatibility complex)*
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
OD	Optik dansite (*Optical Density*)
PAMPs	Patojenle ilişkili moleküler yapılar (*Pathogen associated molecular patterns*)
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu (*Phosphate-buffered saline*)
PRR	Patern Tanıyıcı Reseptör (*Pattern Recognition Receptor*)
RPM	Dakikadaki dönüş sayısı (*Revolutions per minute*)
SDS	Sodyum dodesil sülfat (*Sodium dodecyl sulfate*)
TCR	T hücre reseptörü (*T Cell Receptor*)
Th	T yardımcı (*T helper*) hücre
TLR	Toll-benzeri reseptör (*Toll-like receptor*)
TNF	Tümör nekroze edici faktör

1. GİRİŞ

İmmün sistem hücreleri nanoparçacıkların dokulara ulaşmasını engelleyen ilk bariyerdir. Bu nedenle, Au nanoparçacıkların fagositlerle etkileşiminin, hücre içi alım mekanizmalarının ve ortaya çıkan immün cevapların araştırılması nanomedikal tedavilerin verimliliği ve geleceği açısından büyük önem taşımaktadır. Doğal immün sistem hücrelerinden makrofajlar; vücut savunmasında ve doku homeostazında rol oynayan, bulundukları lokasyona spesifik farklı fenotip ve gen ekspresyon profilleri sergileyen fagositik hücrelerdir [1] . Antijen sunucu hücre (ASH) olarak görev yapan bu hücreler T hücrelerle etkileşerek edinsel immün sistem aktivasyonunda ön plana çıkar. Hem yüzeylerinde eksprese ettikleri yardımcı stimülatör moleküller (CD40, CD80, CD86) ve peptit sunan MHC sınıf I ve MHC sınıf II molekülleri hem de ürettikleri İL-6, İL-1β ve TNF-α gibi sitokinlerle primer ve sekonder immün cevap oluşumunda anahtar görev alırlar [2, 3].

Antijen taşıma ve/veya immünmodülasyon özelliklerine sahip altın nanoparçacıkların immünterapilerde kullanılması günümüzde bilim insanlarının üzerinde çalıştığı önemli konulardan biridir. Nanoparçacıklar ilaç ya da biyolojik maddelerin hapsolabileceği ya da yükleneceği, adsorbe olacağı ya da bağlanacağı moleküler maddelerdir. Bir antijen nanoparçacıkla birleştiği zaman çözünebilir bir antijene oranla daha güçlü bir immün cevap oluşturabilir [4]. Antijenik yapıların bir yüzeye adsorplanması antijen sunumunu arttırarak immün cevap oluşumunu indükler. Yüzey adsorpsiyon yöntemi ile yüksek miktarda antijen nanoparçacıklara bağlanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar nanoyüzeylerin antijen adsorpsiyon kapasitesi ile antijen sunucu hücrelerin sitokin sekresyonu arasında doğru orantı olduğunu göstermektedir [5]. Nanoparçacıkların büyüklüğü, şekli ve yüzey özellikleri protein adsorpsiyon verimliliğini etkiler. Ayrıca nanoparçacıklar adsorbe proteinin yapısını modifiye ederek fonksiyonel değişikliklere de neden olabilir [6]. Bazı tedavilerde farklı epitopları açığa çıkardığı için bu tür değişiklikler faydalı olabilir. Genellikle, antijen taşıyıcı nanoyapıların ilgili antijeni degradasyondan ve yapısal değişikliklerden korumaları, antijen sunucu hücreler tarafından antijen alımını kolaylaştırmaları ve antijen salımını kontrol etmeleri istenilen özelliklerdir.

Son yıllarda farklı şekil, büyüklük ve özelliklerde kolaylıkla sentezlenebilen biyouyumlu ve biyoinert altın nanoparçacıklar *in vitro* ve *in vivo* biyomedikal uygulamalarda araştırmacıların özellikle ilgisini çekmektedir [7]. Buna rağmen bilimsel literatürde altın nanoparçacıkların makrofaj hücreleri ile olan etkileşimini araştıran sınırlı sayıda uygulama mevcuttur. Bu çalışmalarda altın nanoparçacıkların farklı hastalık antijenleri (influenza ve şap hastalığı gibi) için başarılı bir antijen taşıyıcı olarak kullanıldığı formülasyonlar tasarlanmıştır [8]. Özellikle altın nanoparçacıkların lizozomal kaçışlarını gösteren çalışmalar önem arz etmektedir. Endositik yolak ile hücre içine alınan farklı şekil ve boyuttaki altın nanoparçacılardan bazıları lizozom içinde bazıları da lizozomdan kaçarak sitoplazmada görüntülenmiştir [9]. Özellikle ekzojen antijenin çapraz sunumunu mümkün kılan bu tür sistemler intrasellüler viral enfeksiyonlara karşı savaşta öncül $CD8^+$ T hücre aracılı hücresel immün cevabı güçlendirmektedir [5]. Ayrıca çalışmalarda farklı şekildeki altın nanoparçacıkların (küresel, çubuk, küp gibi) farklı sitokin profili ile karakterize olabileceği de gösterilmiştir [9, 10].

Altın nanoparçacıklar arasında, 2002 yılında Prof. Dr. Younan Xia'nin grubu tarafından ilk defa sentezlenen, ultra ince porlu duvarları ve boşluklu içyapılarıyla altın nanokafes (AuNK) parçacıkları biyoaktif maddeleri taşıyabilmeleri, yakın kızıl ötesi (NIR: *Near infrared*) ışığı absorbe edip ısıya dönüştürebilmeleri (fototermal etki) ve parlak lüminesans özellikleri sayesinde ilaç salımı ve kanser terapisi gibi teranostik uygulamalarda (görüntüleme, teşhis, tedavi) umut vaat edici olmuştur [11-17].

Altın nanokafeslerin *in vivo* ortamda biyouyumlu olduğu yapılan toksisite çalışmalarıyla gösterilmiştir [12]. Altın nanokafeslerle işaretlenen insan mezenkimal kök hücrelerin invazif olarak *in vitro* ve *in vivo* şartlarda iki-foton ya da fotoakustik mikroskopi yöntemleriyle görüntülenmesini amaçlayan bir çalışma altın nanokafeslerin insan mezenkimal kök hücreleri (iMKH) için toksik etki oluşturmadığını ve altın nanokafesleri içine alan hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulmadığını göstermiştir. Ayrıca altın nanokafesler iMKH'lerin farklı hücre serilerine farklılaşmasını etkilememiştir [18].

Özellikle fototermal kanser terapisi araştırmalarında sıklıkla kullanılan Au nanokafesler başarılı sonuçlar ortaya koymaktadır. 2008 yılında yapılan bir çalışmada meme kanser

hücre hattını hedefleyen anti-HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) monoklonal antikoru ile konjuge edilmiş altın nanokafeslerin fototermal etkileri kantitatif olarak gösterilmiştir [14]. Yavuz ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada kanser ilaçlarının kontrollü salımı için köşeleri delik ve içi boş küp şeklinde altın nanokafesler ısıya duyarlı akıllı polimerler ile kaplanıp içine ilaç hapsedilerek istenilen zamanda ve mekânda kontrollü ilaç salımı sağlanmıştır [19].

Makrofajların doğal ve edinsel immün cevap oluşumunda, çeşitli hastalıkların patogenezinde ve uygulanan tedavilerin başarısında önemli rolleri vardır. Monosit kökenli makrofajlar; klasik aktive makrofajlar (M1; *classically activated*) ve alternatif aktive makrofajlar (M2; *alternatively activated*) olarak perifer dokularda iki farklı gruba polarize olur. M1 makrofajlar tarafından üretilen proinflamatuar sitokinler (TNF-α, İL-1β, İL-6, İL-12 gibi) ve oksijen ve nitrojen radikalleri kronik enfeksiyonlarda intrasellüler patojenlere karşı savunmada ve kanser immünterapide ön plana çıkmaktadır. Alternatif aktive makrofajlar ise salgıladıkları immünsüpresif sitokinlerle (İL-10) daha çok dokuların yeniden biçimlendirilmesinde (*tissue remodelling*), anjiyogenezde ve debris temizliğinde görev alır [20-22]. Makrofajlar tarafından fagosite edilen antijenler işlenir ve yüzeylerinde bulunan Sınıf II MHC molekülleri aracılığıyla $CD4^+$ T lenfositlere sunulur. Ayrıca aktive olmuş profesyonel ASH'ler işlemiş oldukları antijenleri yüzeylerinde Sınıf I MHC aracılığıyla $CD8^+$ T hücrelere çapraz sunarak, $CD8^+$ T hücrelerin sitotoksik T lenfositlere (CTL: *Cytotoxic T Lymphocytes*) dönüşümünü indükler [23, 24]. Aktive olmuş makrofajlar yardımcı T (Th) hücre farklılaşmasında etkilidir. Th1 hücreler; İL-2, İFN-γ ve TNF-α salgılayarak intrasellüler patojenlere karşı savunmada, anti-tümör cevabında ve otoimmünitede rol oynar. Th2 hücreler ise; İL-4, İL-5 ve İL-13 üreterek ekstrasellüler savunma için hümoral immün cevabı güçlendirir [25].

Literatürde biyomedikal uygulamalarda etkili bir ajan olan altın nanokafeslerin makrofaj hücreleri ile etkileşimini *in vitro* şartlarda araştıran bir model çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda AuNK'ların RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin mitokondriyel aktivitelerine ve hücre canlılığına olan etkileri farklı tekniklerle (kolorimetrik XTT metodu ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi) araştırılmıştır. Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan RAW 264.7 makrofajlarında Au nanokafeslerin anti-inflamatuar ve immünregülatör etkisi Griess

metoduyla (NO kantifikasyonu) aydınlatılmıştır. RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modellerini oluşturan özgün altın nanokafes temelli formülasyonların makrofajların antijen alımını, işlemesini, sunumunu ve aktivasyonunu nasıl etkilediği sorusunun cevabı akım sitometri ve konfokal mikroskopi ile analiz edilmiştir. Nanoparçacıklarla uyarım sonrası makrofajların sekrete ettiği Th1-tip (İL-1β, İL-6, TNF-α) ve Th2-tip (İL-4 and İL-10) sitokin miktarları karşılaştırılarak ne tür bir immün cevap (hücresel ya da hümoral) oluşumunun AuNK'lar tarafından indüklendiği değerlendirilmiştir.

Deney sonuçlarına göre AuNK'ların biyouyumluluğunun yüksek olduğu, Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO üretimini baskıladığı, aluma oranla makrofajların antijen alım kapasitesini arttırdığı, adsorpsiyon sonucu HBsAg'nin antijenik özelliklerini değiştirmediği, kolayca hücre içine alınıp sitoplazma ve lizozomda akümüle olduğu, makrofajların antijen sunum ve stimülasyon özelliklerini arttırdığı ve RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde daha çok anti-inflamatuar cevabı destekler yönde sitokin profili oluşturduğu tespit edildi.

Bu tez çalışması sonucunda elde ettiğimiz veriler AuNK'ların doğal immün sistem hücresi olan makrofajlar ile etkileşimini inceleyerek bu konuda eksik olan bilimsel literatüre büyük katkı sağlayacak ve yeni nesil teranostik uygulamalarda yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Altın Nanoparçacıkların Özellikleri

Nobel Ödüllü fizikçi Richard Feynman nanoteknoloji kavramından ilk kez 1959 yılında öğrencilerine yaptığı bir konuşmasında bahsetmiştir [26]. Nanoteknoloji moleküler ölçekteki fonksiyonel sistemlerin tasarım ve yapımını içeren multidisipliner bir alandır. Amerikan Ulusal Nanoteknoloji İnsiyatifi nanoskala ölçekteki bu teknolojiyi sadece büyüklüğe göre 1-100 nm olarak tanımlarken, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi bu tanımı büyüklük ve fonksiyona göre 1-1000 nm olarak belirlemiştir. Avrupa İlaç Ajansı ise büyüklüğe göre 0,2-100 nm olarak yaptığı nanomalzeme tanımını en son 1000 nm'den küçük parçacıklar olarak güncellemiştir [27].

Nanoparçacıklar boyutları biyomoleküllere benzediği için (örneğin proteinler (1-20 nm), DNA (~2 nm), virüs (~20 nm), hücre reseptörleri (~10 nm), hemoglobin (~5 nm), hücre membranı (~6-10 nm) gibi) medikal alanda büyük ilgi görmektedir. Büyüklükleri ≤ 50 nm olan nanoparçacıklar hücre ve organellere kolayca girerek DNA, protein, enzim ve hücre reseptörleri ile etkileşebilmekte, daha küçük nanoparçacıklar ise (≤20 nm) kan damarlarından çıkarak vücutta serbest dolaşabilmektedir. Nanoparçacıkların büyüklük ve şekilleri biyolojik sistemlerin immünolojik cevaplarını etkilemektedir [28]. Biyolojik olaylar hücrede nanoskala boyutta gerçekleştiği için nanoteknolojik gelişmeler tıp dünyasına daha hızlı ve yüksek verimli çözümler sunma potansiyeline sahiptir [29]. Özellikle nanoparçacıklar terapötik etkiyi arttıran bunun yanısıra sistemik toksisiteyi azaltan ajanlar olarak immünterapilerde kullanılmakta ve tasarımlarında yapılan çeşitli değişikliklerle immün hücreleri stimüle etmeleri sağlanarak yeni nesil aşı, kanser ve otoimmünite tedavilerinde umut vadetmektedir [30].

Son yıllarda soy metal nanoyapılar (altın ve gümüş gibi) üstün fototermal, kimyasal ve optik özellikleri ve geniş yüzey alanı/hacim oranları ile biyomedikal uygulamalarda ön plana çıkmıştır [31]. İlk defa 1857 yılında Michael Faraday suda çözünmüş altın kolloid parçacık ("nanoaltın") sentezini gerçekleştirmiştir [32]. Ancak 90'lı yılların ortalarına kadar nanometre boyuttaki metal parçacıkların biyolojik ve medikal uygulamaları konusunda

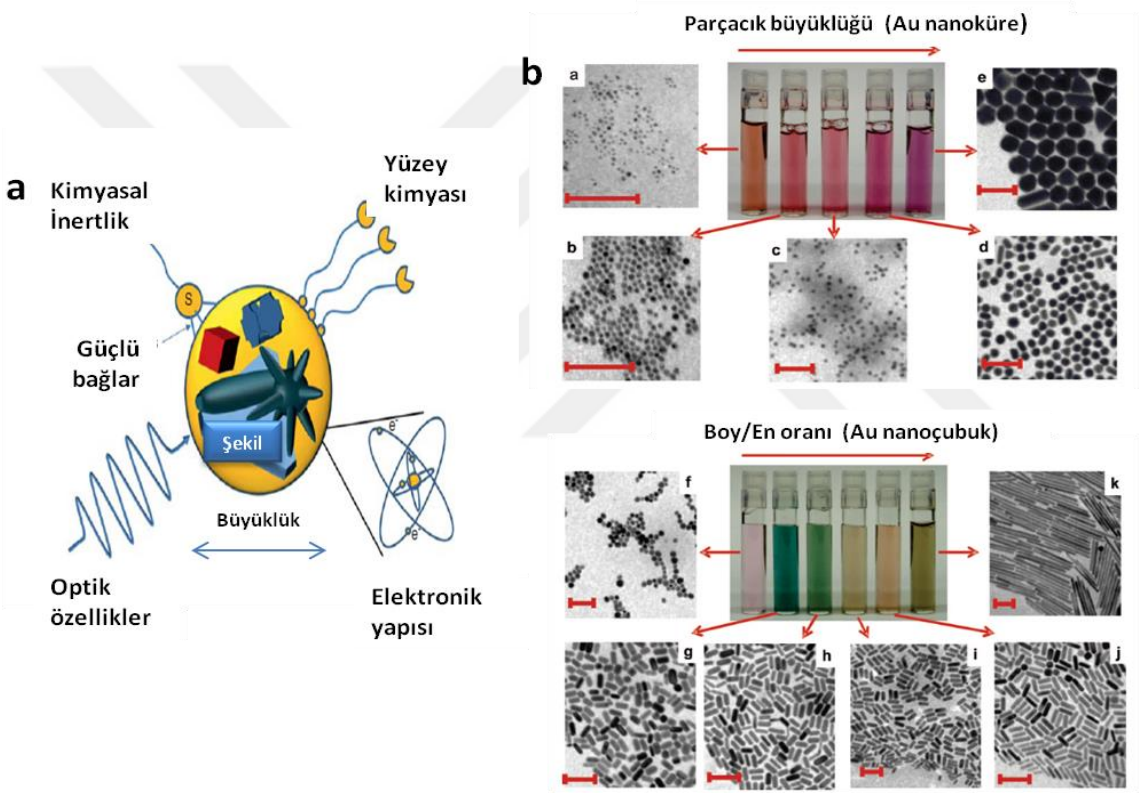
çok fazla ilerleme kaydedilmemiştir. Günümüzde altın nanoparçacıklar çapları yaklaşık bir ila birkaç yüz nanometre arasında değişen altın çekirdek yapı üzerine yüzey kaplaması yapılmış kolloidal ya da kümelenmiş parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Altın kor yapı temel karakteristik özellikleri tanımlarken kor yapıyı çevreleyen koruyucu tabaka parçacık stabilitesini, solubilitesini ve biyolojik çevre ile olan etkileşimi düzenler [33].

Altın nanoparçacıkların nanobiyoteknoloji alanında kullanılmasının pek çok avantajı vardır [29, 34]: (i) Altın bileşikleri tarih boyunca tıp alanında kullanılmış ve yan etkisi görülmemiştir; (ii) Au nanoparçacıkların basit, ucuz, güvenli ve güvenilir çeşitli metotlarla kolayca sentezlenmesi mümkündür; (iii) AuNP'ler reaksiyon parametreleri değiştirilerek farklı boyutlarda sentezlenebilir; (iv) AuNP'ler küre, çubuk, küp, altıgen, üçgen, yıldız, piramit, kafes gibi farklı şekil ve morfolojilerde kolayca sentezlenebilir; (v) Negatif yüzey yükleri sebebiyle yüksek reaktivite gösteren ve tiyol/amin içeren moleküllerle (organik moleküller, DNA, protein, enzim gibi) güçlü etkileşim gösteren AuNP'lerin yüzeyleri modifiye edilebilir; (vi) Au nanoparçacıklar karakteristik yüzey plazmon rezonans (SPR: *Surface plasmon resonance*) bandları ile kolayca karakterize edilebilir; eşsiz optik ve elektronik özelliklerinden dolayı biyosensörlerde ve görüntüleme sistemlerinde kullanılabilir; (vii) Son olarak altın nanoparçacıklar biyouyumludur ve intrinsik olarak toksik değildir [35].

Altın ve gümüş nanoparçacıklar güçlü SRP absorpsiyon özelliğinden dolayı parlak renklidir (Şekil 2.1). SRP bandlarının yoğunluğu ve pozisyonu nanoparçacıkların şekli değiştikçe değişerek görünür ya da yakın kızılötesi (NIR: *Near infrared*) bölgeye kayabilir [36]. Normalde AuNP'lerin SRP dalgaboyu yaklaşık 520 nm olup bu dalga boyu doku ve kan tarafından absorbe edildiği için *in vivo* uygulamalarda kullanımı sınırlıdır. Fakat *in vivo* aplikasyonlarda anizotrop ve içi boş nanoparçacıkların (nanokafesler gibi) NIR bölgesindeki SRP bandları, NIR ışığı dokuya daha derin nüfuz edebildiği ve uygulandığı alanda ciddi bir hasar (yanma gibi) oluşturmadığı için medikal uygulamalarda kullanımı büyük ilgi uyandırmaktadır [37-39]. Fototermal terapi deneysel olarak elektromanyetik radyasyonun (çoğunlukla kızılötesi formunda; 650-900 nm) emiliminin ve saçılımının kanser dahil çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bir tedavi metodudur. AuNP'ler fototermal terapilerin immünolojik uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [40].

Nanoparçacıkların şeklini ve büyüklüğünü kontrol edebilen farklı ve tekrarlanabilir sentez metodları son yirmi yılda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır [41].

Altın nanoparçacıklar plazmonlarla ışığı absorbe etmenin yanısıra parçacık büyüklüğü ile orantılı ışığı saçar. Bu özelliği AuNP'lerin kontrast maddesi olarak lazer taramalı konfokal mikroskopi, multifoton plazmon rezonans mikroskopi, optik koherens mikroskopi ve üçüncü harmonik mikroskopi gibi biyomedikal görüntüleme tekniklerinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır [42, 43].

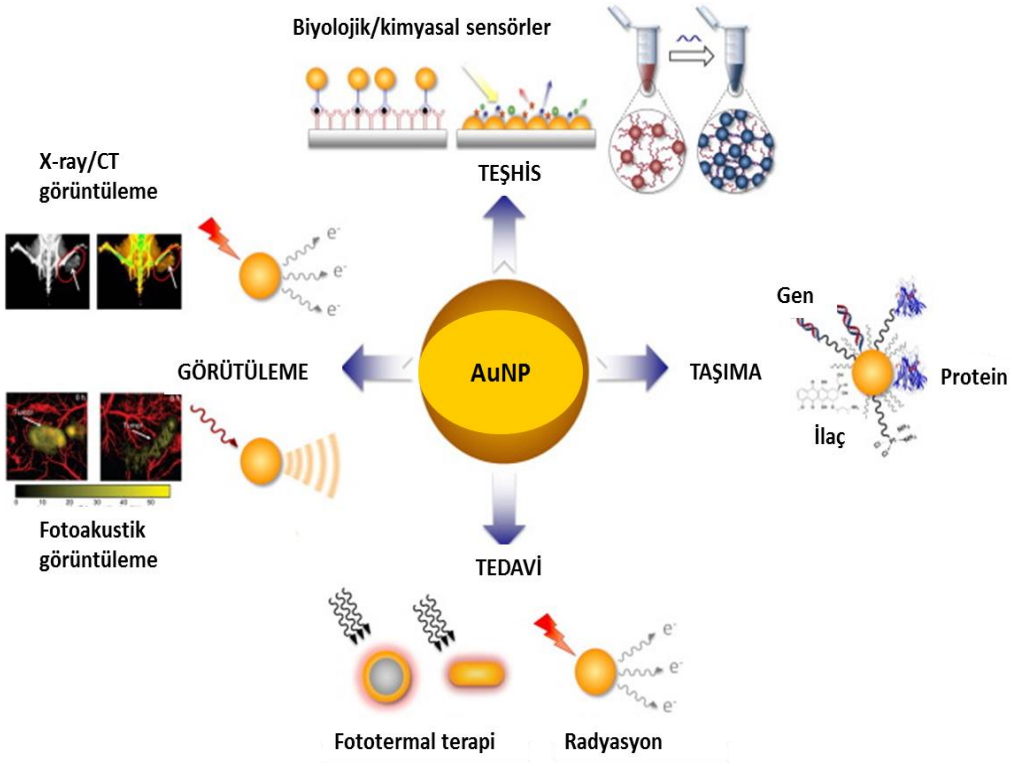


Şekil 2.1. Altın nanoparçacıkların temel özellikleri. (a) Altın nanoparçacıklar farklı büyüklük, şekil, yüzey kaplaması ve optik özelliklerde sentezlenebilir [34]. (b) Au nanokürelerin (4-40 nm; a-e) ve Au nanoçubukların (1,3-20 nm; f-k) geçirimli elektron mikroskop (TEM) görüntüleri. Plasmon bandları ile ilişkili olarak parçacık solüsyonlarının renkleri değişiklik göstermektedir. Ölçekler = 100 nm [36].

Au yüzeylerin tiyol ve amin gruplarına bağlanabilme özelliği sayesinde çeşitli fonksiyonel gruplar ile konjuge edilen Au nanoparçacıklar görüntüleme (bilgisayarlı tomografi, fotoakustik görüntüleme ve yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi), güdümlü taşıma (ilaç, protein, gen ve siRNA), teşhis (biyolojik ve kimyasal sensörler) ve tedavi

(fototermal terapi ve radyoterapi) gibi biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.2) [33, 44]. Son yıllarda hassas ve seçici biyolojik deteksiyon teknolojilerinde özellikle nükleik asitlerin hedeflendiği nanosistemlerde önemli gelişmeler yaşanmıştır [41]. Altın nanoparçacıklar hücre membranlarından penetre ederek hücre içindeki önemli biyomoleküllerle etkileşime girip immün cevapları modifiye edebilmekte ve immün sistemde akümüle olmaktadır. Çoklu işlevselliğe sahip AuNP'ler farklı immünolojik yolakları hedef alan kombine tedavilerde kullanılan nanomalzemeler arasında başarıyla yerini almıştır [45].

2015 yılı itibariyle iki farklı Au nanoparçacık formülasyonu kanser tedavisi için klinik faz çalışmalarında incelenmiştir: (1) Paciotti ve arkadaşları tarafından 2004 yılında rekombinan insan tümör nekroz faktör alfa (rhTNF-α) taşıması için sentezlenip PEG ile kaplanmış kolloidal AuNP'ler (Aurimune; CYT-6091; Cytimmune Sciences, Inc.) [46] ve (2) Metastatik akciğer kanserinde fototermal ablasyon için kullanılan sistemik toksisite göstermeyen AuroLase terapisi (AuroShell; Nanospectra Biosciences, Inc.) [33, 39]. Nanoteknolojik ilerlemeler ışığında bu sayının hızla artacağı öngörülmektedir.



Şekil 2.2. Altın nanoparçacıkların biyomedikal uygulamaları [33]

2.2. Altın Nanoparçacıkların Biyolojik Sistemlerle Etkileşimi

2.2.1. Altın nanoparçacıkların biyodağılımı

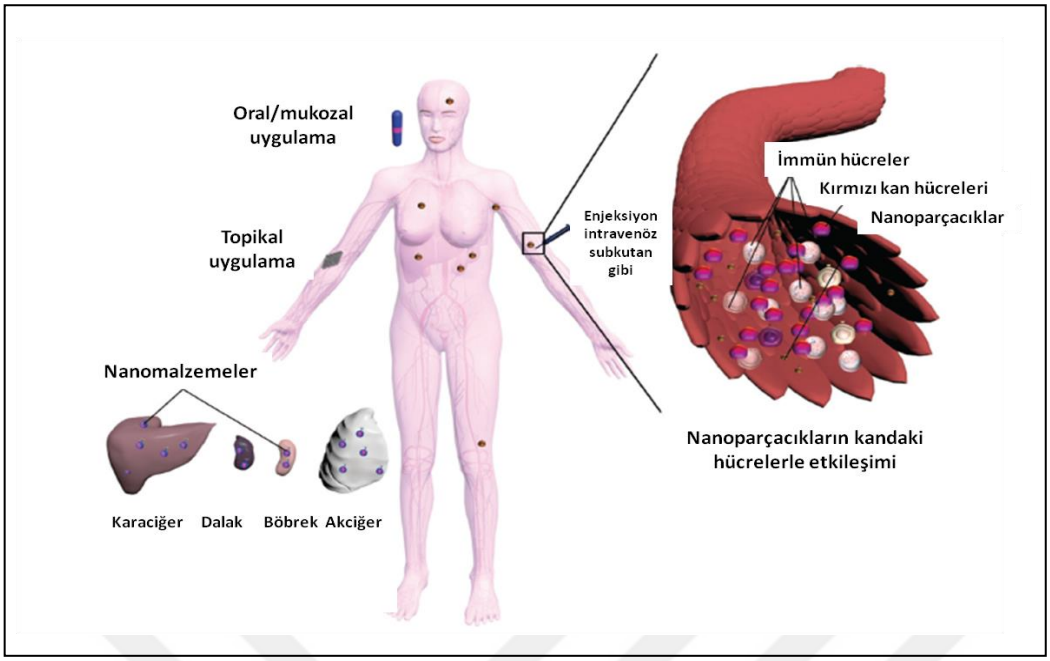
Nanoparçacıklarla biyolojik sistemlerin etkileşiminin araştırılması (nanobiyo etkileşim) nanomateryallerin güvenli ve etkili kullanımı için büyük önem arz etmektedir. Hücreler tarafından alındıktan sonra altın nanoparçacıkların vücuttaki biyodağılımı nanoteknolojik uygulamaların uzun süreli toksik etkilerinin aydınlatılması açısından titizlikle değerlendirilmelidir (Şekil 2.3) [47]. Parçacıkların protein adsorpsiyonu (protein korona yapısı) ve makrofajlar tarafından alımı vücuttan atılım hızını ve organlarda depolanma süresini etkiler. Au nanoparçacıkların kandaki klirensi ve organlardaki birikimi *in vivo* şartlarda parçacık büyüklüğü, şekli, yükü ve yüzey kaplaması gibi çeşitli faktörlerle ilişkilidir [48]. Küçük parçacıklar dolaşımda daha uzun süre kalmakta ve daha fazla alana yayılmakta, polietilen glikol (PEG: *Polyethylene glycol*) ile yüzeyi kaplanan parçacıkların (fagositoz rezistan parçacıklar) ise opsonizasyonu azalmakta ve retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından alımı düşmektedir [49].

Karaciğer, altın ve gümüş nanoparçacıkların biriktiği birincil organdır (%90 oranında) [50, 51]. Farklı büyüklükteki nanoparçacıkları farelere intravenöz yoldan vererek AuNP'lerin biyodağılım paternini araştıran bir çalışmada küçük parçacıkların (15 nm ve 50 nm) kan-beyin bariyerini geçebildiği; farklı büyüklükteki nanoparçacıkların (15 nm, 50 nm, 100 nm ve 200 nm) ağırlıklı olarak karaciğer, akciğer ve dalakta akümüle olduğu; büyük parçacıkların (200 nm) ise kan, akciğer, mide ve pankreasta çok az miktarda bulunduğu tespit edilmiştir [52]. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada, AuNP'lerin (1 nm, 4 nm, 5 nm, 18 nm, 80 nm ve 200 nm) negatif ya da pozitif yüklü olmasından bağımsız çabucak dolaşımdan temizlenerek en çok karaciğerde biriktiği gösterilmiştir [48]. Balasubramanian ve arkadaşlarının yaptığı in *vivo* çalışma da bu sonuçları desteklemiş; AuNP'lerin hızlı ve sürekli olarak en çok karaciğer ve sonra dalakta akümüle olduğu ve intravenöz enjeksiyondan 2 ay sonra bu organlarda yüksek miktarlarda tespit edildiği bildirilmiştir [53]. Farklı bir çalışma da Au nanoparçacıkların (40 nm) intravenöz enjeksiyondan altı ay sonra bile karaciğerde Kupffer hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir [54].

Genel kural olarak 6 nm'den küçük nanoparçacıklar hızlıca süzülerek böbreklerden atılırlar. 8 nm'den büyük parçacıklar ise glomerüler filtrasyonla atılamayıp ya lezyonlarda akümüle olur ya da mononükleer fagosit sistem (MPS: *mononuclear phagocyte system*) ile temizlenir. Nanoparçacıklar üzerindeki pozitif yük hemoliz ve platelet agregasyonu kaynaklı sistemik toksisiteye neden olur ve kandaki MPS tarafından çabucak alınır. Negatif yüklü nanoparçacıklar daha uzun sirkülasyon süresine sahipken nötral parçacıkların sirkülasyon süresi en uzundur [55, 56]. Altın nanoparçacıkların dokulardaki dağılımı büyüklük bağımlı olup 10 nm'den büyük parçacıkların dağılımı bazı organlarla sınırlı bulunmuştur (kan, karaciğer ve dalak gibi) [57]. Elsabahy ve Wooley yüzey kimyasının nanoparçacıkların toksisite, immünojenite ve biyodağılım gibi özelliklerini etkilediğini; aşırı pozitif yükün hızlı opsonizasyon ile nanoparçacıkların atılımını hızlandırdığını belirtmiştir [58]. Genel olarak küçük parçacıkların büyük parçacılara oranla daha hızlı bir şekilde renal ve hepatobiliyer yollardan vücuttan atılacağı düşünülmektedir [49].

Dolaşımdaki NP'ler daha çok karaciğer ve dalaktaki mononükleer fagositler tarafından temizlenir. Diğer organ ve dokuların (tümör dokuları gibi) hedeflendiği çalışmalarda fagositler tarafından alımı azaltmak için çeşitli polimerik yapılarla kaplanan nanoparçacıklar RES'ten kaçabilir. Karaciğer ya da dalaktaki makrofajların hedeflendiği uygulamalarda (intrasellüler patojenlere karşı) ise nanoparçacıkların RES tarafından alımı avantaj oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada intraperitonel yoldan fareye verilen serbest gentamisin (bakteriyel enfeksiyonlara karşı kullanılan bir antibiyotik) böbrekte birikerek nefrotoksisiteye neden olmakta fakat nanoparçacık içinde enkapsüle şekilde fareye verildiğinde karaciğer ve dalakta akümüle olarak böbreklerde görünür bir toksisiteye neden olmamaktadır [59].

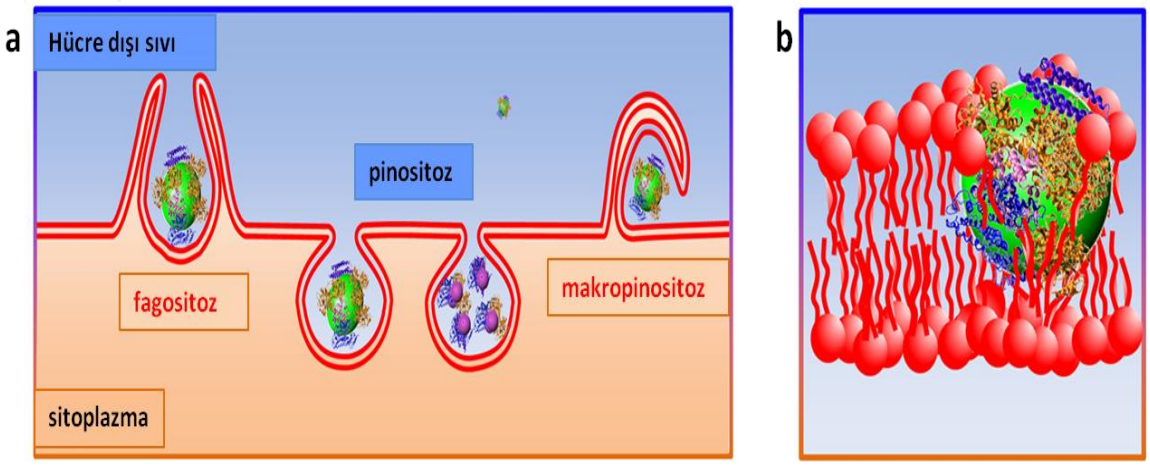
Ortamdaki sitokin ve makrofaj profili nanoparçacıkların klirens hız ve miktarlarını etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada yardımcı T hücre-1 (Th1) eğilimli farelerde nanoparçacık klirensinin yardımcı T hücre-2 (Th2) eğilimli farelere oranla daha yavaş olduğu ve böylece immün sistem özelliklerinin nanoparçacık alımını ve klirensini etkileyebileceği gösterilmiştir [60].



Şekil 2.3. Nanoparçacıkların hücrelerle etkileşimi ve biyodağılımı [58]

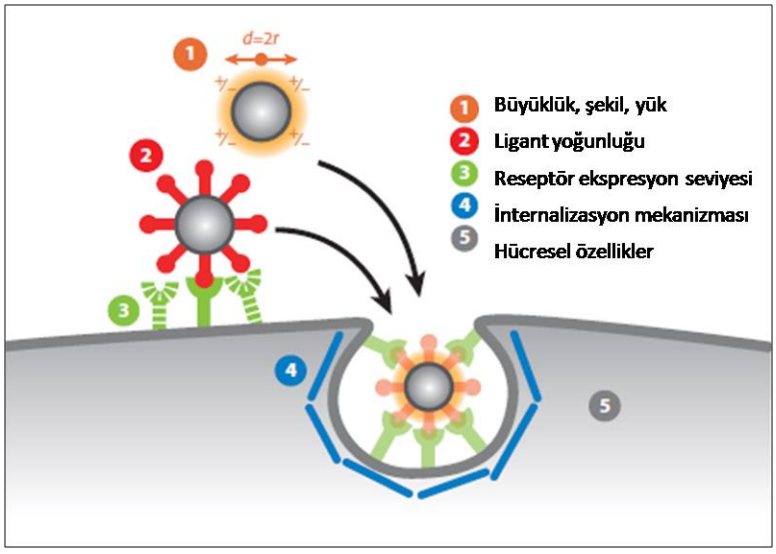
2.2.2. Altın nanoparçacıkların hücre içine alımı

Altın nanoparçacıkların çeşitli hücreler tarafından alımının araştırılması ve alım mekanizmalarının aydınlatılması nanobiyo etkileşim alanında detaylıca çalışılması gereken bir konudur. Nanoparçacıklar (NP'ler) büyüklüğüne göre aktif taşıma (endositoz) ya da hücre membranından penetre ederek pasif taşıma ile hücre içine alınabilir (Şekil 2.4). Endositoz (biyo)moleküllerin ve nanoparçacıkların internalizasyonu için kullanılan temel biyolojik mekanizmadır. Memeli hücreleri makromolekülleri ve/veya nanoparçacıkları beş şekilde internalize ederler: (i) fagositoz (mannoz reseptör-, kompleman reseptör-, Fcγ (Fc gama) reseptör- ve çöpçü reseptör (SR: *scavenger receptor*)- aracılı yolaklar); (ii) makropinositoz (aktin bağımlı); (iii) klatrin-aracılı endositoz; (iv) kaveolin-aracılı endositoz; (v) klatrin/kaveolin-bağımsız endositoz [61]. Parçacık penetrasyon yolağından bağımsız olarak hücre-nanoparçacık etkileşimi NP'lerin fizikokimyasal özelliklerine (büyüklük, şekil, yüzey yükü ve yüzey kimyası ve kaplaması) göre şekillenmektedir. Diğer yandan hücre spesifik parametreler (hücre çeşidi ya da hücre döngüsü fazı gibi) de bu etkileşimde önemlidir [62].



Şekil 2.4. Altın nanoparçacıkların hücre içine alımı. Hücre dışı sıvı içinde bulunan nanoparçacıklar çeşitli biyomoleküllerle kaplandıktan sonra (protein korona) (a) aktif (reseptör aracılı) transport (endositoz) ya da (b) pasif transport ile hücre içine alınabilir [62].

Endositoz ve hücresel alım oranı (*cellular uptake rate*) nanoparçacık büyüklüğü de dâhil bir çok faktöre bağlıdır (Şekil 2.5). Nanoparçacık büyüklüğü parçacıkların hücre içi alım verimliliğini ve kinetiğini, internalizasyon mekanizmasını ve hücre içi lokalizasyonunu etkileyebilmektedir. Farklı hücre hatları kullanılarak yapılan Au nanoparçacık çalışmaları sonucunda genel olarak 30-50 nm parçacık kor büyüklüğünün maksimum alım için en uygun büyüklük olduğu belirlenmiştir [62, 63].



Şekil 2.5. Altın nanoparçacık hücre etkileşimini etkileyen faktörler [55]

Opsonizasyon (kan komponentlerinin parçacıklara bağlanması) genel olarak endositozu kolaylaştır ve hızlandırır. Opsoninler (antikorlar, kompleman proteinleri gibi) nanomateryal hücre reseptör etkileşimini yönlendirerek endositozu arttırır. Parçacık büyüklüğü ve parçacıkların yüzey kimyası Au nanoparçacıklara serum proteinlerinin adsorpsiyonunu etkileyerek makrofajlar tarafından alımı (endositoz) tetikleyebilir ya da engelleyebilir [64]. Yüklü ya da hidrofobik parçacıklar serum proteinlerini kolayca adsorplayabilirken PEG gibi parçacık agregasyonunu önleyen polimerler ile yüzeyi kaplanmış nanoparçacıkların opsonizasyonu azalıp dolaşımdaki süreleri arttırılabilir [65, 66].

Nanoparçacıkların yüzey yükü zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarına göre belirlenir. Zeta potansiyel değeri nanomateryalin yüzeyindeki doğal yükü (pozitif ya da negatif) gösterir. Zeta potansiyelinin yüksek olması genelde nanoparçacıkların yüksek stabiliteye sahip olduğunu gösterir. Eğer süspansiyondaki tüm parçacıklar büyük bir negatif ya da pozitif değere sahipse birbirlerini itme eğiliminde olacakları için agrege olma ihtimalleri yoktur. Eğer düşük zeta potansiyel değerine sahiplerse agregasyonu önleyecek itici kuvvet zayıf olacaktır. Ayrıca nanoparçacıkların yüzey yüklerine bağlı olarak endositotik yolaklarla hücre içine alımları farklılık gösterebilir [67].

Profesyonel fagositler (monositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler gibi) NP'leri endositoz yoluyla alıp endolizozomal kompartmanlarda degrade edebilir. Bozunmayan yapılar ise zamanla dışkı ya da balgamla vücuttan dışarı atılır. Degradasyon ya da boşaltım mekanizmalarında oluşabilecek sorunlar kronik inflamasyona neden olarak zamanla ciddi doku hasarları ile sonuçlanabilir. Nanomalzemelerin endositozu parçacıkların hücre içi hedeflere bağlanmasını sağlar ve bunun sonucunda hücre sinyalizasyon yolaklarının, motilitenin ve metabolizmanın bozulabilir [68]. Bu nedenle AuNP'lerin hücre içi alımının immünolojik sonuçlarının araştırılması çok önemlidir.

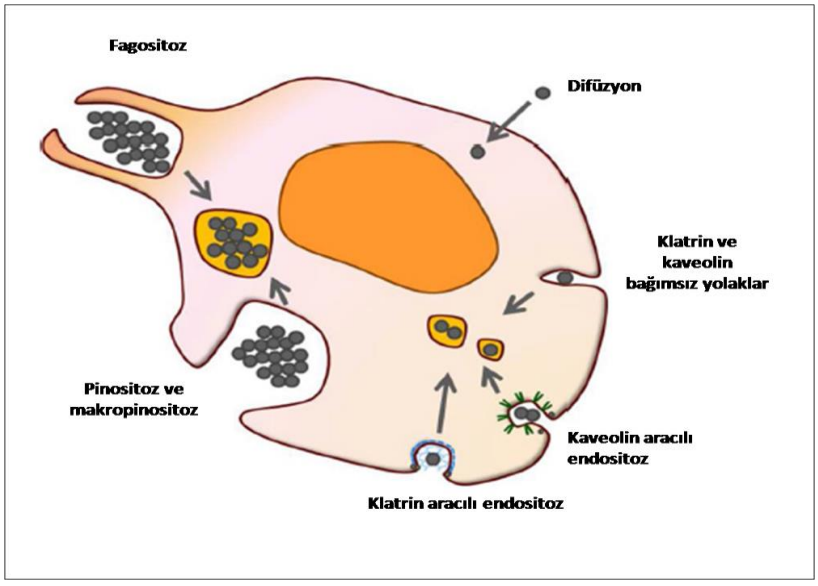
Dolaşımda nanoparçacıkların ilk karşılaştığı biyolojik yapılar plazma proteinleri (opsoninler) ve immün hücrelerdir. Nanoparçacıklar dolaşımdan genellikle karaciğer ve dalakta bulunan fagositik hücreler tarafından uzaklaştırılır. Nanoteknolojinin en büyük avantajlarından biri nanoparçacıkların fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek biyolojik

olaylara (immün hücreler tarafından parçacık alımı gibi) istenilen şekilde müdahale etmeye imkân sağlamasıdır. Örneğin PEG polimeri ile kaplamak hücre içine alımı azaltırken, farklı ligantlarla fagositleri hedeflemek de alımı hızlandırarak antijen sunumunu arttırabilmektedir. Yeni çalışmalar ışığında önceden düşünüldüğü gibi nanoparçacık alımı için genel geçer kurallar (100 nm'den küçük parçacıklar pinositozla, 100 nm'den büyük parçacıklar fagozitozla hücre içine alınır gibi) ortaya koymak çok mümkün değildir [69].

Yeni çalışmalar opsonizasyonun basit bir protein adsorpsiyon olayından çok daha karışık olduğunu göstermiştir. Nanoparçacıklar antikorlar ile immün sistem tarafından hedeflenebilir. PEG ile kaplanmış nanoparçacıklar ile tedavi edilen hastaların %25'inde anti-PEG antikorlarının oluştuğu görülmüştür [70]**.** Qui ve arkadaşları Au nanoçubukların yüzey kaplamasının parçacıkların hücre içi alımına ve sitotoksisitesine olan etkisini araştırdıkları bir çalışmada, geçirimli elektron mikroskobu (TEM: *Transmisson electron microscope*) görüntülerine göre katyonik yüzey sürfaktanı CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) kaplı Au nanoçubuklar hücre içinde lizozomda lokalize olmuş ve bir kısmı mitokondride görüntülenmiştir. Serum proteinleri ile kaplanan altın nanoçubuklar vezikül içinde lizozoma taşındıktan sonra protein yapı parçalanmış ve CTAB molekülleri salıverilmiştir. Toksik CTAB molekülleri hücrelerin şişmesine ve mitokondri aktivasyonuna sebep olarak hücresel inflamasyonu ve apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuçlar ışığında nanoparçacığın şeklinden ve yükünden bağımsız sadece yüzey kaplamasının da opsonizasyon mekanizmasını düzenleyerek parçacıkların hücre içine alımını ve sitotoksisitesini etkilediği fikri önesürülmüştür [71].

Rafailovich ve arkadaşları primer insan dermal fibroblast hücreleri ile yaptığı çalışmada AuNP'lerin (45 nm) hücre içine klatrin-aracılı endositoz ile girdiğini, daha küçük nanoparçacıkların (13 nm) ise çoğunlukla fagozitoz (reseptör aracılı olmayan endositoz) mekanizmasını kullandığını belirtmiştir. TEM sonuçları altı günlük inkübasyon sonunda altın nanoparçacıkların sitoplazmaya büyük vakuoller içinde taşındığını, hücre çekirdeğine ya da mitokondriye lokalize olmadığını göstermiştir. Vakuol sayısındaki artış ve hücre membran stabilitesi ile AuNP sitotoksisitenin ilişkili olduğu ve ayrıca içine nanoparçacık almış hücrelerin hasarlanmış aktin filament yapısının belli bir zaman sonra kendini

yenileyerek hücre isleketinin stabil yapısının restore edildiği sonucu da bu çalışmada paylaşılmıştır [72]. Franca ve arkadaşlarının AuNP'ler (30 nm ve 150 nm) ve RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı ile yaptığı *in vitro* çalışma ise hidrodinamik büyüklükleri 100 nm'nin altında olan Au nanoparçacıkların fagositoz yoluyla alınabileceğini göstermiştir. Altın kolloidlerin büyüklükten bağımsız olarak makrofaj hücreleri tarafından pinositoz ve fagositoz dâhil olmak üzere çeşitli yollarla (klatrin-aracılı pinositoz, kaveolin-aracılı fagositoz, çöpçü (SR: *scavenger receptor*) reseptör aracılı fagositoz gibi) alınabileceği ve bu yolaklar engellense bile bilinmeyen farklı mekanizmalar üzerinden AuNP'lerin alımının gerçekleştiği ayrıntısı paylaşılmıştır. Küçük nanoparçacıklar (30 nm) hücre içine girmek için daha çeşitli internalizasyon yollarını kullanırken (SR-, klatrin- ve kaveolin- aracılı yolaklar) daha büyük parçacıklar (150 nm) ağırlıklı olarak SR yolunu ve daha düşük oranda kaveolin yolunu kullanmıştır. Çöpçü reseptörlerin temel görevinin (ortama periferal kan mononükleer hücreleri tarafından inflamatuar sitokinlerin salgılanmamasından dolayı) altın kolloid yapıların hücre içine alınması olduğu düşünülmüştür [73]. Bartneck ve arkadaşlarının altın nanoçubuklar (15 x 50 nm) ve primer insan fagositik hücreleri (monositler ve makrofajlar) ile yaptıkları çalışma ise nanoparçacıkların internalizasyonun makropinositoz yoluyla yapıldığını göstermiştir [74]. Sonuç olarak farklı özellikteki AuNP'ler farklı endositoz yolakları ile hücre içine alınmakta ve bu durum parçacık sitotoksisitesini etkilemektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Nanoparçacıkların internalizasyon mekanizmaları [75]

2.2.3. Altın nanoparçacıkların sitotoksik etkileri

Genel olarak literatürde küçük nanoparçacıkların büyüklere oranla daha toksik olduğu bildirilmektedir. Küçük nanoparçacıkların toplam kütlelerine oranla yüzey alanları çok daha büyüktür ve bu durum çevrelerindeki biyomoleküllerle olan etkileşimi arttırıp yan etki yaratabilir. Küçük NP'lerin geniş ve katalitik aktivite gösteren yüzeyleri reaktif oksijen ürünleri (ROS: *Reaktif Oxygen Species*) ve nitrik oksit (NO) üretimi gibi toksik mekanizmaları tetikleyebilmektedir. Deney hayvanlarında ise *in vivo* NP toksisitesi parçacık büyüklüğüne göre değişen biyodağılım ve alıkoyma süresi ile doğrudan ilişkilidir. Pan ve arkadaşları küçük Au nanoparçacıkların (1,4 nm) aşırı toksik olduğunu ve 12 saat içerisinde nekroz kaynaklı hızlı hücre ölümüne neden olduğunu, büyük AuNP'lerin (15 nm) ise hücre çeşidinden ve yüzeydeki ligantlardan bağımsız daha düşük toksisite gösterdiğini bildirmiştir [68]. Khan ve arkadaşlarının yaptığı ve Au nanoparçacıkların HeLa (insan epitelyal hücre hattı) hücreleri tarfından alımının moleküler etkilerinin incelendiği bir çalışma karbon nanotüplerin tersine AuNP'ların (18 nm) hücre gen ekspresyonlarında (immün cevap, transport, hücre siklüsü regülasyonu ve apoptoz gibi yolaklarda etkin genler) anlamlı bir değişikliğe ve sitotoksisiteye neden olmadığını belirtmiştir. Au nanoparçacıkların hücre içine alımı serum proteinleriyle olan nonspesifik interaksiyonuna bağlı bulunurken elektron mikroskop görüntüleri parçacıkların çekirdek dışında membranöz yapılarda biriktiğini göstermiştir [76]. Başka bir çalışmada da hücrelerde protein ekspresyonunu kontrol etmek için hücre içi gen regülasyon ajanı olarak kullanılması amaçlanan oligonükleotid konjuge altın nanoparçacıklar yüksek oranda hücre içine alınmış ve akut sitotoksisite göstermemiştir [77]. Aueviriyavit ve arkadaşlarının altın ve gümüş nanoparçacıkların (<100 nm) gastrointestinal sistem üzerine etkilerini incelemek için oluşturduğu *in vitro* modelde Au nanoparçacıkların 24 saatlik uyarım sonunda Caco-2 (insan kolerektal adenokarsinoma hücre hattı) hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik etki yapmadığı fakat Ag nanoparçacıkların akut sitotoksisiteye ve oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur [78].

Ancak büyüklük toksisiteyi belirleyen tek faktör değildir. Örneğin, katyonik NP'ler nötral ya da anyonik olanlara göre daha toksiktir [62]. Nanoparçacık-hücre etkileşiminde parçacık yükü ve büyüklüğünün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Au nanoparçacıkların

fagositik (RAW 264.7; fare makrofaj hücre hattı) ve fagositik olmayan (HepG2; insan karaciğer kanser hücre hattı) hücreler tarafından alımı karakterize edilmiştir. Çalışma sonucunda pozitif yüklü AuNP'lerin negatif yüklü parçacıklara oranla HepG2 hücreleri tarafından daha fazla hücre içine alındığı fakat parçacık yükünün RAW 264.7 hücreleri üzerinde benzer bir etki göstermediği tespit edilmiş ve nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri kadar hücre tipinin de interaksiyonda etkili olduğu tartışılmıştır. Aynı büyüklük ve yükteki (40 nm; pozitif ya da negatif) Au nanoparçacıkların intrasellüler lokalizasyonları incelendiğinde ise fagositik ve fagositik olmayan hücrelerin farklı mekanizmalar üzerinden nanoparçacık alımını gerçekleştirdiği bulunmuştur. HepG2 hücreleri nanoparçacıkları klatrin-aracılı endositoz ile hücre içene alırken RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri fagositoz mekanizmasını kullanmıştır [79]. Hühn ve arkadaşlarının parçacık yükünün AuNP alıma olan etkisini araştırdığı bir çalışma ise amfifilik polimerlerle modifiye edilmiş kolloid yapıdaki AuNP'lerin 3T3 fare fibroblast hücreleri tarafından alım oranının pozitif yüklü parçacıklar için negatif yüklü parçacıklara oranla daha yüksek olduğunu ve artmış alımdan dolayı pozitif yüklü AuNP'lerin sitotoksisitesinin daha fazla olduğunu raporlamıştır [80]. Goodman ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışma da bu sonucu desteklemiş ve 2 nm kor büyüklüğüne sahip Au parçacıkların katyonik halinin anyonik haline göre toksik olduğunu bildirmiştir [81].

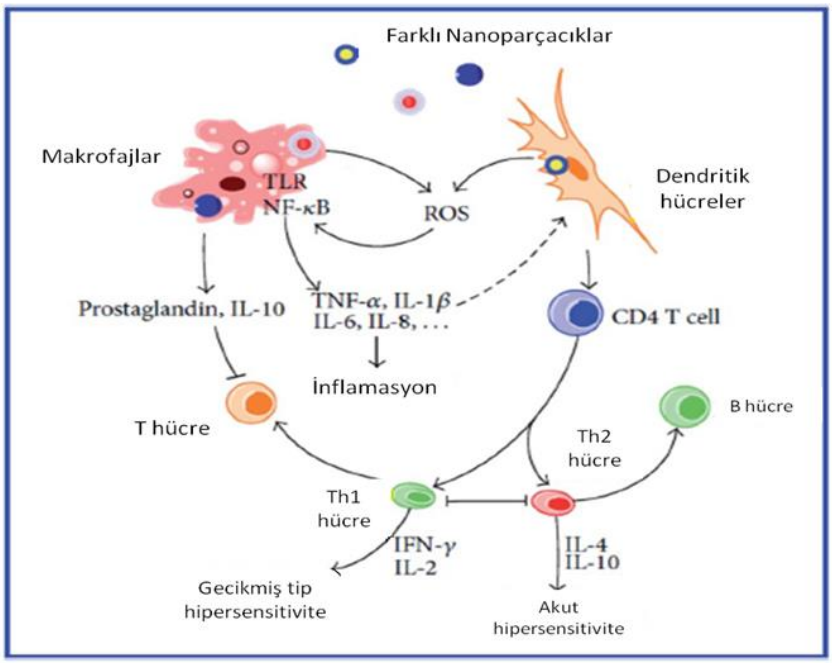
Son yıllarda yapılan nanotoksisite çalışmaları altın nanomateryallerin toksisitesinin nanoparçacıkların şekil, büyüklük, yüzey kimyası ve saflık gibi özelliklerine göre değiştiğini göstermiştir. Nanoparçacık toksisitesi değerlendirilirken her bir parametrenin etkisi sistematik olarak detaylıca incelenmelidir [82].

2.2.4. Altın nanoparçacıkların antijen sunucu hücreler ile etkileşimi

İmmün sistem hücreleri Au nanoparçacıkların dokulara ulaşmasını engelleyen ilk bariyerdir. Nanoparçacıklarla immün sistemin etkileşimi immünsüpresyon ya da immünstimülasyona neden olabilir (Şekil 2.7) [83]. Bu nedenle AuNP'lerin fagositlerle (makrofajlar, DC'ler, nötrofiller ve mast hücreleri gibi) etkileşimi, hücre içi alım mekanizmaları ve ortaya çıkan immün cevaplar çok büyük ilgi uyandırmaktadır. Shukla ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada makrofajlar (RAW 264.7) tarafından pinositoz yoluyla

alınıp çekirdek çevresindeki lizozomlarda lokalize olan altın nanoparçacıkların sitotoksik ve immünojenik etkilerinin bulunmadığı ve antioksidan özellik gösteren biyouyumlu ajanlar olarak nanobiyoteknolojik uygulamalarda güvenle kullanılabileceği belirtilmiştir [84]. Bir diğer yandan fare makrofaj hücre hattı (J774 A1) kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise farklı büyüklükteki (2 nm, 5 nm ve 40 nm) AuNP'lerin sitotoksik ve immünolojik cevapları araştırılmış ve parçacık büyüklüğü azaldıkça pro-inflamatuar sitokin genlerinin (TNF-α, İL-6 ve İL-1) ekspresyonunda artış tespit edilmiştir [85]. Fakat diğer yandan Sumbayev ve arkadaşları Au nanoparçacıkların büyüklük bağımlı bir şekilde İL-1β inflamatuar cevabını *in vivo* (fare) ve *in vitro* (THP-1: insan monosit hücre hattı) şartlarda azalttığını göstermiştir [86].

Au nanoparçacıkların profesyonel antijen sunucu hücre olan dendritik hücreler (DC) ile olan etkileşimi immünterapilerde ön plana çıkmaktadır. Cheung ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Au nanoparçacıkları (15-24 nm) Epstein–Barr virüsü aktivasyonu ilişkili bir peptidi dendritik hücrelere sunma amaçlı kullanmıştır. Peptid ile fonksiyonelleştirilmiş AuNP'lerin DC'ler tarafından alımı İnterferon-γ (İFN-γ) ve major doku uygunluk kompleksi I (MHC-I) ekspresyonunu arttırırken sitotoksik T hücre cevabını da aktive etmiştir [87]. Prostat kanseri peptid antijenleri ile konjuge edilmiş AuNP'lerin kullanıldığı başka bir çalışma da nanoparçacıkların dendritik hücreler tarafından alınıp sitoplazmada lokalize olduğunu ve immün cevapta artış görüldüğünü bildirmiştir. Sonuçlar anti-tümör tedavileri açısından umut vadedici bulunmuştur [88]. Villers ve arkadaşlarının Au nanoparçacıkların (10 nm) dendritik hücrelerin immün fonksiyonları üzerine etkilerini araştırdığı çalışma sonucunda fare kemik iliği progenitör hücrelerinden üretilen DC'ler ile AuNP'lerin inkübasyonu sonrası sitotoksik bir etki görülmediği ve hücrelerin fenotiplerinde ve proinflamatuar İL-6 sitokin sekresyonunda değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Fakat T lenfosit aktivasyonunda ve dolayısıyla antijen spesifik immün cevap regülasyonunda önemli bir rol oynayan İL-12p70 sitokin salımında azalma görülmüştür [89]. Farelere oral yoldan kolloid Au nanoparçacık verilen bir çalışmada ise fagositlerin aktivitesinde artış olmuş ve doz bağımlı olarak B hücre ve $CD4^+/CD8^+$ T hücre yüzdesinde artış görülmüştür [90].



Şekil 2.7. Nanoparçacıkların immünmodülasyon etkileri [83]

NO inflamasyonun anahtar medyatörüdür. Akut ve kronik inflamasyon sırasında aşırı miktarda üretilir. NO L-Arjinin amino asitinden NOS (nitrik oksit sentaz) izoenzimleri tarafından sentezlenir. Bu enzimlerden biri olan iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) ağırlıklı olarak aktive makrofajlar tarafından eksprese edilir [91]. İndüklenebilir bir izoform olan iNOS'un Lipopolisakkarit (LPS) ve/veya sitokinler tarafından sentezi indüklenir. iNOS indüklendiği zaman uzun bir süre mikromolar düzeyde NO üretir. Bu şekilde üretilen NO sitotoksik etki gösterir ve doku hasarı yapar. Bu nedenle iNOS tarafından üretilen NO inhibisyonu potansiyel immünterapötik değere sahip olabilir [92]. LPS gram negatif bakterilerin hücre duvar komponentlerindendir. Makrofajların en güçlü aktivatörlerinden biridir ve NO üretiminde etkilidir. Bu sebeple, LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO üretiminin inhibisyonu anti-inflamatuar ajanların tespiti için muhtemel göstergelerden biridir [93]. Ma ve arkadaşları Au nanoparçacıkların (10-15 nm) RAW 264.7 hücrelerinde LPS ile indüklenmiş (*LPS-induced*) NO üretimini ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu nükleer faktor-κB (NF-κB) ve IFN-β/STAT1 yolakları üzerinden inhibe ettiğini bildirmiştir [94]. Bu durumun tersine Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise PEG polymeri ile kaplanmış AuNP'ların LPS ile aktive edilmiş RAW 264.7 hücreleri tarafından hızlıca internalize edildiği ve nanoparçacıkların LPS ile indüklenmiş NO ve İL-6

üretimini NF-κB ve p38 mitojen-aktive protein kinazlar (p38 MAPK) yolağı üzerinden arttırdığı gösterilmiştir [95]. Standart referans materyali olarak kullanılan AuNP'lerin (60 nm) RAW 264.7 hücrelerinde sitotoksik ve inflamatuar yanıtlarının ve hücre içi lokalizasyonlarının incelendiği bir diğer çalışma ise nanoparçacıkların hücre canlılığını ya da hücre membran bütünlüğünü olumsuz etkilemediğini, TNF-α ve İL-6 sitokin salınımında ve NO (nitrik oksit) akümülasyonunda anlamlı bir artışa neden olmadığını göstermiştir [96]. Au nanoparçacıkların diğer parçacıklara oranla (karbon nanotüpler, gümüş nanoparçacıklar, kuantum dotlar gibi) daha zayıf inflamatuar cevap oluşturduğu bulunmuştur [97]. Gosens ve arkadaşlarının yaptığı *in vivo* çalışma sonuçlarına göre küresel 50 nm boyutundaki altın nanoparçacıklar çok düşük pulmonar inflamasyon cevabı oluşturmuş büyük bir akut hasarı tetiklememiştir [98].

Altın nanoparçacıklara karşı oluşan immün cevabın araştırıldığı çalışma sonuçlarının farklılık göstermesinin sebebi olarak kullanılan nanoparçacığın boyutunun, şeklinin ve etkileşime girdiği doku ve hücrelerin çeşitliliği gösterilmektedir [49].

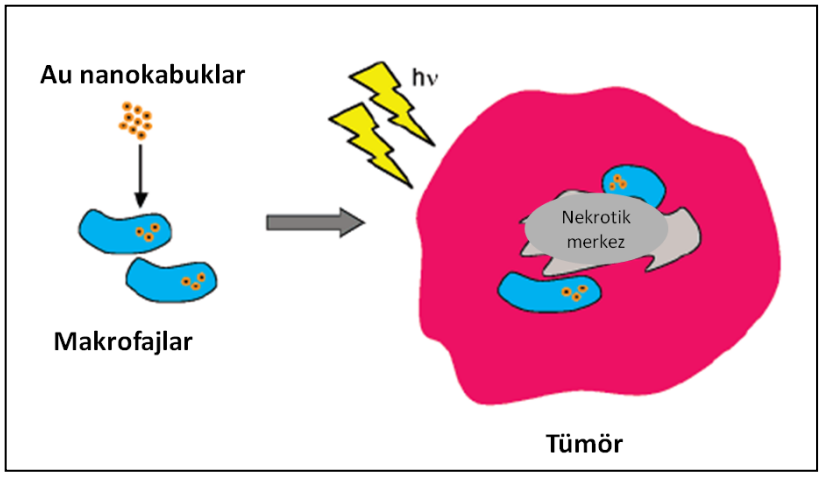
2.3. Au Nanoparçacıkların Terapötik Uygulamalarda Kullanımı

2.3.1. Fototermal terapi ve radyoterapi

Au nanoparçacıklar eşsiz optik özelliklere sahiptir. Işık nanoparçacıkların yüzeyindeki serbest elektronları uyarır ve ışık ile rezonans duruma geçen iletken metal elektronlarının toplu salınımı ile yüzey plazmon rezonans oluşumunu indükler. Özellikle fototermal terapi (FTT) uygulamalarında metal nanokabukların (çekirdek yapısı silika kabuk yapısı altın) büyüklük ve kabuk kalınlığı ayarlanarak yakın kızıl ötesi bölgesindeki (NIR: *Near Infrared Region*) ışığın parçacıklar tarafından absorbe edilmesi sağlanır. Dokuların ışık geçirgenlik dalga boyu 650-900 nm arasında olup NIR bölgesindeki bu ışık dokuya rahatlıkla nüfuz ederek nanoparçacıklar tarafından absorbe edilir. Sonrasında ısınan AuNP'ler fototermal hücre hasarına neden olarak kanser hücrelerini öldürür ve tümörün regresyonunu sağlar. İlk defa 2003 yılında Hirsch ve arkadaşları tarafından Au nanoparçacıklar SKBr3 (insan meme epitelyal karsinoma hücreleri) hücrelerinde fototermal ablasyon terapisinde kullanılmıştır [26, 99]. Qu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antikor konjuge Au

nanoparçacıklar spesifik olarak kanser hücrelerine bağlandıktan sonra fototermal terapi ile başarılı bir şekilde öldürülmüş ve hedeflenmemiş hücreler çok az zarar görmüştür [100].

Fototermal terapi sonrası ortaya çıkan immün cevapların araştırılması metastatik kanser vakalarının tedavi edilmesi açışından büyük önem taşımaktadır. Çeşitli kombinasyon tedavilerinde fototermal özelliğinin yanı sıra farklı immünmodulatuar ajanları taşıma görevini üstlenen Au nanoparçacıklar tedavinin uzun soluklu etkisini arttırmaktadır. 60 nm kor yarıçapına sahip Au nanokabuk (*Au nanoshell*) yüklü monositlerin (Truva atı modeli) tümör bölgesine taşınmasını hedefleyen bir çalışma femtosaniye lazerlerin de kullanımıyla bu tür bir uygulamanın altın nanoparçacık temelli fototermal ablasyon terapisinde inovatif bir tedavi metodu olacağını savunmuştur (Şekil 2.8) [101]. Örneğin FTT ve immünterapinin birlikte uygulandığı bir çalışma da bu metodu kullanarak bir çeşit antibiyotik olan makrolit ile fonksiyonelleştirilmiş Au nanoçubukların tümör ilişkili makrofajlarda (TAM: *Tumor associated macrophages*) birikerek meme ve beyin tümörlerine karşı güdümlü ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceği sonucunu paylaşmıştır [102].

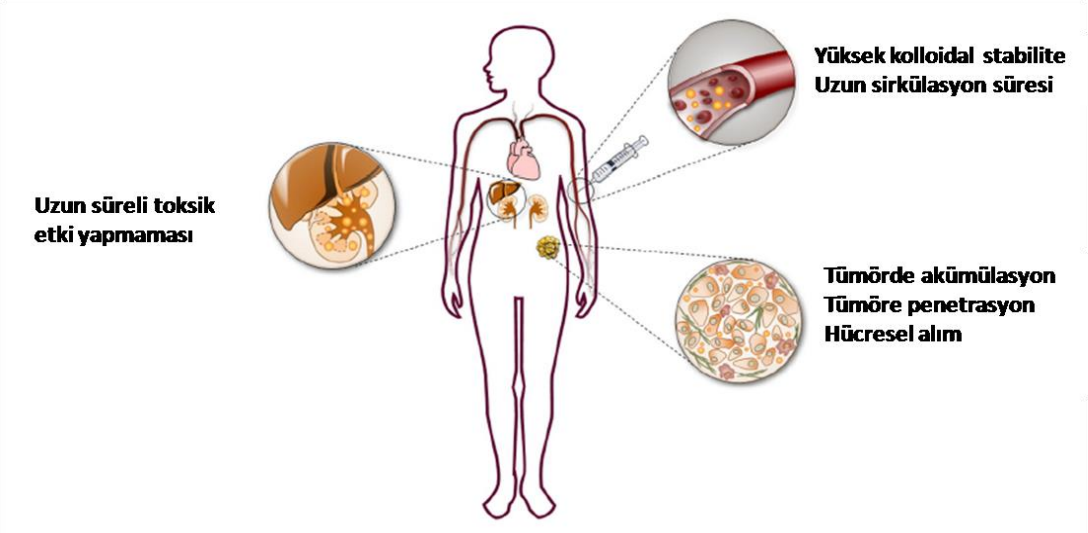


Şekil 2.8. Terapötik AuNP'lerin makrofaj hücreleri içinde tümöre taşınması (Truva atı modeli) [101]

Ultra hızlı lazerlerin de kullanımıyla Au nanoparçacıklarının FTT başarısının artacağı düşünülmektedir [103]. El-Sayed ve arkadaşları antikor konjuge Au nanoparçacıkları fototermal ajan olarak kullanarak kanser hücrelerinin düşük doz lazer enerjisi ile spesifik olarak öldürülebileceğini göstermiştir [104, 105]. Anti-EGFR antikoru bağlanmış Au

nanoçubuklar malign hücrelerin sitoplazmik membranlarında yüksek miktarda eksprese olan EGFR'ye yüksek afinite ile bağlanarak hem görüntüleme hem de terapi amaçlı kullanılmıştır [104]. Yavuz ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada termal değişikliklere karşı hassas akıllı polimer ile kaplanmış kanser ilacı yüklü altın nanokafesler NIR bölgesindeki ışığı absorplayarak taşıdığı ilacı kontrollü serbest bırakmıştır [19].

Altın nanoparçacıkların kanser radyoterapi alanında henüz klinik faz çalışmaları bulunmamakla birlikte yapılan son çalışmalarda tedavinin başarısı için dolaşımda uzun süre bulunan, tümör dokusunda akümüle olabilen, uzun süreli sistemik toksik etki yaratmayan, verilen radyasyon dozunu ve gücünü azaltarak yan etkileri ortadan kaldıran nanoparçacıklar özellikle tercih edilmektedir (Şekil 2.9) [33].



Şekil 2.9. Kanser radyoterapi uygulamalarında ideal AuNP özellikleri [33]

2.3.2. İmmünterapi

Altın nanoparçacıklar inert, kimyasal reaksiyonlara karşı dirençli ve antijenik molekülleri degradasyondan korudukları için etkili nanotaşıyıcılar olarak tanımlanmaktadır [106] . Nanoparçacıklar bir hücre ile karşılaştıklarında endositoz yoluyla çabucak hücre içine alınırlar. Sonrasında çeşitli organellere (endozomlar, lizozomlar, Golgi, mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) ve çekirdek) transfer olurlar. İntrasellüler transport sırasında taşınan kargonun salımı beklenen etkinin oluşması açısından önemlidir. İlacın hücre içi

hedeflere ulaştırılması için taşıyı nanoparçacıkların ilk önce hücre membranını endositoz (enerji bağımlı) ile geçerek hücre içine alınması gereklidir. Endositoz, ligand bağlı nanoparçacıklar ve hücre membranında bulunan spesifik reseptörleri arasında selektif olabileceği gibi hidrofobik ya da elektrostatik etkileşimlerden kaynaklı nonselektif de olabilir. Pinositoz tüm hücre çeşitlerinde olabilirken, fagositoz sadece özelleşmiş memeli hücreleri (makrofajlar, monositler ve nötrofiller gibi) tarafından yapılabilir [21]. Farklı yapılarla fonksiyonelleştirilen AuNP'ler dendritik hücre (DC) cevaplarını modüle etmek, T hücreleri aktive etmek ya da hümoral immün cevabı indüklemek gibi vasıflara sahiptir. Özellikle Au nanoparçacıklara konjuge antijen ve adjuvant moleküllerini lenf nodlarında bulunan DC'lere taşıyan sistemler klinik immünterapi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [88].

Au nanoparçacık temelli immünterapilerde çeşitli hücresel yolaklar uyarılır. Normalde patojenlerin ürettiği tehlike sinyalleri ile aktive olan immün sistem aşılarda doğal ya da sentetik adjuvanlar tarafından uyarılmaktadır. AuNP'ler nanoadjuvant taşıyıcı olarak immün sistemi aktive edebilmektedir. Örneğin, primer kemik iliği kökenli makrofajların iki farklı peptid konjuge edilmiş Au nanoparçacıklar (10 nm) ile muamele edildiği bir çalışmada; konjugatların Toll-benzeri reseptör-4 (TLR-4) tarafından bağlanması ile hücre aktivasyonu gerçekleşmiş, nanoparçacıklar internalize edilmiş ve TNF-α, İL-1β ve İL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinler ve nitrik oksit sentaz 2 (NOS2) enzimi üretilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın paylaştığı bir diğer önemli sonuç da AuNP konjugasyonunun peptidlerin immün sistem hücreleri tarafından tanınır hale gelmesini sağlamış olmasıdır [107].

Günümüz koruyucu aşı çalışmaları subünite aşıları ön plana çıkarmaktadır. Subünite aşılar saflaştırılmış patojenik komponentlerden (antijen) oluşmakta ve spesifik immün cevabı arttırmaktadır. Ancak subünite antijenleri zayıf immüjenite göstermekte ve immün cevapların tetiklenmesi için formülasyonlarda adjuvanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni nesil subünite aşılarında antijen ve immünuyarıcı molekülleri yapısında birleştirerek patojen yapıları (virüsler; nanoskala boyut, bakteriler; mikroskala boyut) taklit eden sentetik nanoparçacıklar yoğun ilgi görmektedir. Antijen sunucu hücreler parçacık aşıların (*particle vaccines*) hücresel ve hümoral immün cevapları başlattığı primer hedefleridir. Özellikle dendritik hücreler naif T hücrelerin en güçlü aktivatörleridir. Ancak yapılan son

çalışmalar makrofajların da parçacık aşı kaynaklı T hücre farklılaşmasında önemli rol oynadığını göstermiştir [108].

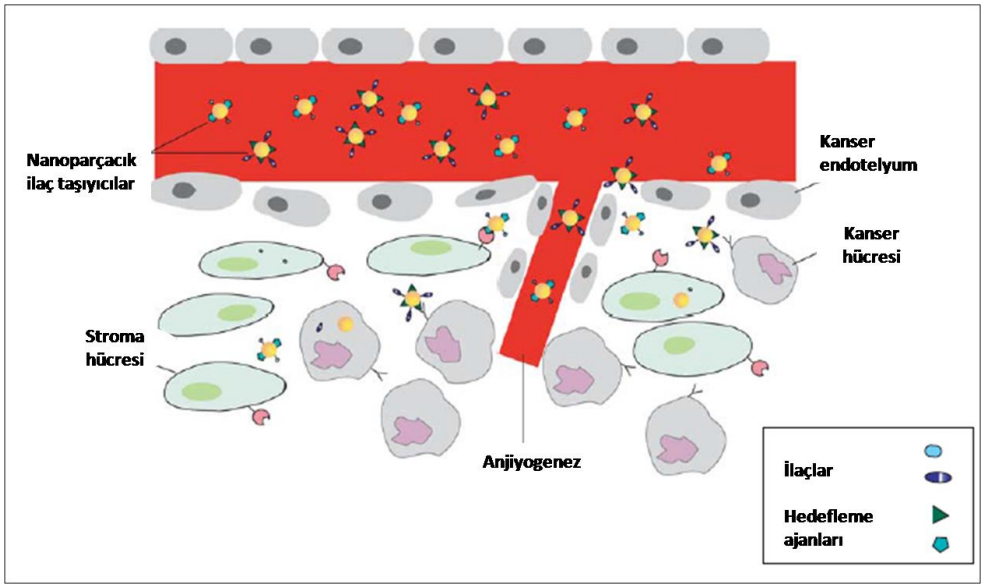
Altın nanoparçacıkların makrofaj aktivasyonu yeni nesil adjuvantlarda aranan bir parametredir. Yeni nesil DNA aşılarında DNA'nın fagositik antijen sunucu hücrelere (ASH) ulaştırılması immün aktivasyonun yeterliliği açısından büyük önem arz etmektedir. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Au nanoparçacıklara kovalent bağlanan düşük moleküler ağırlığa sahip kitosan molekülleri *in vitro* ve *in vivo* ortamda viral olmayan DNA taşıma vektörü olarak kullanılmış ve RAW 264.7 makrofajlarının kullanıldığı gen transfeksiyon ve sitotoksisite deneyleri sonucunda Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg: *Hepatitis B surface antigen*) DNA transfeksiyon verimliliği yüksek ve toksisitesi düşük bulunmuştur. BALB/c farelerde serum antikor titresini arttıran (sadece DNA verilen gruba oranla) ve düşük dozda dahi güçlü sitotoksik T lenfosit yanıtını tetikleyen bu yapı DNA aşı taşıma sistemi olarak başarılı görülmüştür [109].

Altın nanoparçacıklar büyüklük ve geometri açısından viral parçacıklara benzemekte, lenf nodlarında akümüle olmaları ve antijen sunucu hücrelerle etkileşime girmeleri sebebiyle inovatif aşı sistemlerinde ilgi çekmektedir. Enfeksiyöz ajanlara karşı (Hepatit B, malaria ve inflüenza gibi) hazırlanan altın parçacık temelli DNA aşıları (*gene gun*) antijen kodlayan DNA plasmidleriyle kaplanmış Au parçacıklarının kullanıldığı sistemler olup insan klinik faz çalışmalarında antikor titresinde ve/veya $CD8^+$ T hücre cevabında artışa sebep olduğu tespit edilmiştir [110, 111]. Ayrıca bakteri DNA'sına benzeyen ve Toll-benzeri reseptör-9 (TLR-9) ile etkileşime girerek immün hücreleri stimüle eden sitozin-fosfat-guanozin (CpG) oligonükleotid moleküllerinin AuNP'ler ile birlikte kullanıldığı immünterapi çalışmaları da son yıllarda ümit vadedicidir. Au nanoparçacıkların fagositik immün hücreler tarafından hızlıca alınıp endolizozomal kompartmanlarda bulunan TLR-9 reseptörlerinin konjuge CpG motifleri (CpG-AuNP) ile bağlanması immün aktivasyonu güçlendirmektedir. Wei ve arkadaşları da bu sonucu destekliyerek CpG-AuNP parçacıklarının (15 nm ve 30 nm) TNF-α ve İL-6 üretimini indükleyerek immünstimülatuar etki gösterdiğini saptamıştır [112].

Kanser immünterapi

Kanser immünterapinin temel amacı immünsüpresif hücre popülasyonunu ve immünefektör hücreleri uyararak tümöre karşı oluşan immün cevabı arttırmak ve güçlendirmektir. Altın nanoparçacıklar yoğunlukla dokularda ve immün hücrelerde akümüle olduğu için antijen ve adjuvan gibi immünterapötik ajanların taşınması için uygun bir platform sağlamaktadır. Au nanoparçacıklar sahip oldukları optik özellikleri sayesinde immün terapilerde (özellikle fototermal ablasyon ve ışık uyarımlı ilaç taşıma gibi) başarıyla kullanılmaktadır. AuNP'ların optik özelliklerinden faydalanılan kombine terapiler güdümlü tümör spesifik immün cevapların oluşmasında etkili olmaktadır [113].

Kanser nanoterapi çalışmalarının amaçlarından biri ileri teknoloji ilaç taşıma sistemleri geliştirmektir. Nanoparçacıklara konjuge olmuş terapötik ilaçlar yüksek özgüllükle tümöre kolayca penetre olmakta ve böylece düşük doz ilaçla düşük toksisiteli aynı zamanda biyoyararlanımı yüksek bir tedavi hedeflenmektedir (Şekil 2.10). Tümör antijenlerini taşıyıp dendritik hücrelere ulaştıran farklı nanotaşıyıcılar içerisinde 100 nm'nin altındaki nanoparçacıklar lenf nodlarına direne olabilmekte ve profesyonel antijen sunucu hücreler tarafından rahatlıkla alınabilmektedir.



Şekil 2.10. Nanoparçacık temelli tümör güdümlü ilaç taşıma sistemi [113]

AuNP'lerin hücreler tarafından alım kapasitelerinin yüksek olması antijenin taşınma oranını arttırarak aşıların verimliliğini yükseltmektedir. Au nanoparçacıkların retikülo-endotelyal sistem hücreleri tarafından alınıp dalakta akümüle olması immün sistemi aktive ederek aşıların etkinliğinin arttırılması açısından ayrı bir önem arz etmektedir. Au nanoparçacıklar nanotaşıyıcı olarak çeşitli kanser tedavi applikasyonlarında (ilaç ve gen taşınması ve fototermal terapi gibi) test edilmektedir. AuNP'lerin *in vivo* biyodağılımı detaylıca karakterize edilmiş fakat immün sistem üzerine etkileri üzerindeki araştırmalar son zamanlarda yoğunlaşmıştır. Kanser immünterapi alanındaki uygulamalar büyük bir potansiyele sahiptir [114].

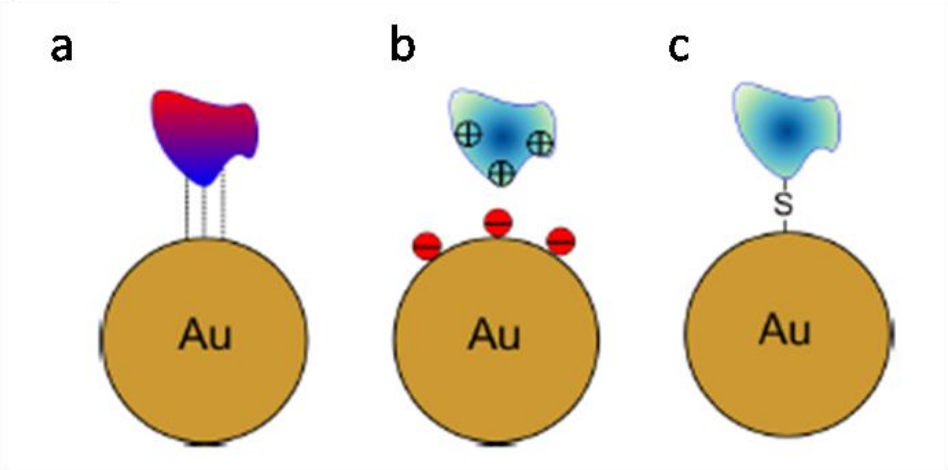
Lin ve arkadaşlarının altın nanoaşı (AuNV: *Gold nanovaccine*) olarak adlandırdıkları tümör ilişkili peptidlerin bağlandığı PEG ile modifiye edilmiş AuNP'lerin kanser aşı platformu olarak kullanıldığı çalışmada free peptidlere oranla AuNV parçacıklarının T hücreleri çok daha iyi stimüle ederek anti-tümör cevabı arttırdığı gösterilmiştir. Antijen spesifik immün cevap oluşturabilen biyouyumlu nanoaşılar kanser immünterapisinde umut vadetmektedir [115]. Patra ve arkadaşlarının dizayn ettiği nanoparçacık temelli güdümlü ilaç taşıma sisteminde cetuximab (C225; anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü antikoru) hedefleme ajanı, gemcitabin antikanser ilacı ve altın nanoparçacıklar taşıma sistemi olarak kullanılmıştır. *İn vitro* pankreatik tümör hücre proliferasyonunu ve *in vivo* pankreatik tümör büyümesini inhibe eden bu sistemin farklı kanser türlerinde de kullanım uygunluğu tavsiye edilmiştir [116]. Tümör spesifik antijenlerin nanoparçacık temelli taşıyıcılar (*particulate carriers*) tarafından dendritik hücrelere ulaştırılması immünterapilerde başarıyla uygulanan bir yöntemdir [117].

Kanser terapilerinde nanoparçacık ilaç taşıma sistemlerinin birçok avantajı olsa da kan dolaşımı sırasında stabilitelerinde oluşabilecek değişiklikler, düşük renal atılım, kanser dokularında sınırlı akümülasyon ve kanser hücreleri tarafından yetersiz alım gibi konular üzerinde daha çok araştırma yapılmalıdır. Özellikle nanoparçacıkların hücre, doku, organ ve vücut seviyesinde biyolojik sistemlerle etkileşimi dikkatlice incelenmelidir [118].

Aşı terapisi

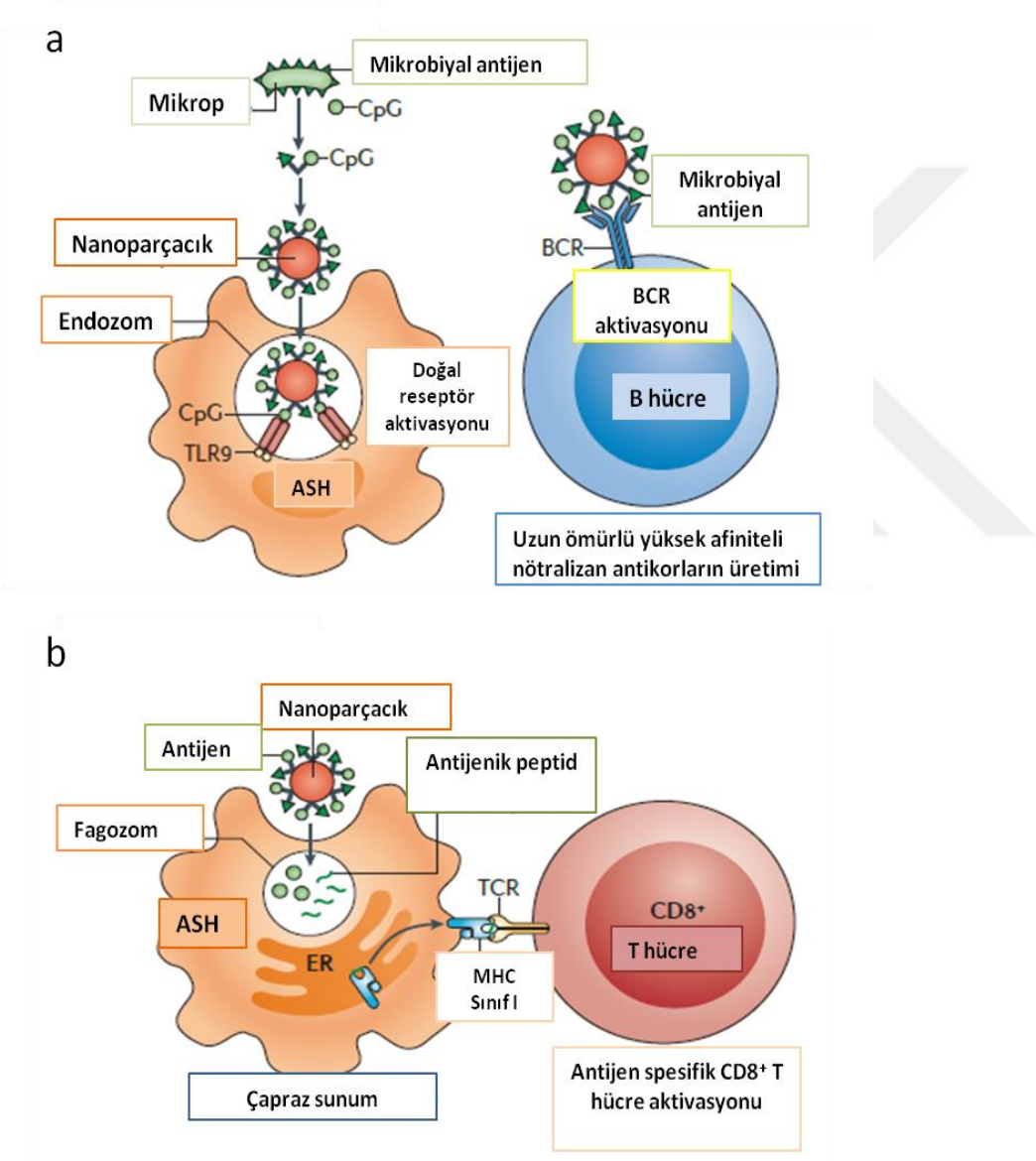
Doğal patojenler antijenik epitoplar ve tehlike sinyallerinden oluşan parçacıklı yapısıyla antijen sunucu hücreleri uyararak uygun immün cevapların oluşmasını ve tehlikenin (bakteri, virüs, mantar gibi) bertaraf edilmesini sağlar. Doğal enfeksiyon sırasında aktivasyon sinyalleri patojenlerin korunmuş moleküler motifleri (LPS; gram negatif bakteri, metillenmemiş C-G oligonükleotid sekansı; bakteriyel DNA, tek sarmallı RNA molekülleri; viral genom gibi) ile sağlanır. ASH'ler hücre yüzey ve hücre içi reseptörleri ile tehlike sinyallerini alır. Toll-benzeri reseptör ailesini (patern tanıma reseptörleri) hedef alan adjuvanlar aşı dizaynlarında önemlidir. Mikroplar ASH'ler tarafından alındığında hem antijenik yapı hem de aktivasyon sinyalleri birlikte hücreye ulaşır. Antijen ve aktive edici ligantların fiziksel birlikteliği maksimum immün cevap için önemlidir. Bu nedenle hem antijen hem de tehlike sinyallerini yapısında birleştiren parçacık aşıları günümüzde özellikle araştırılmaktadır [118].

Yüzey adsorpsiyon yöntemi ile protein yapılar nanoparçacıklara bağlanabilir. Bu yöntemle dizayn edilen nanoparçacık-antijen formülasyonlarındaki proteinler kimyasal değişimlere maruz kalmadan nonkovalen şekilde bağlandıkları Au nanoparçacıklardan rahatlıkla salınırlar (Şekil 2.11) [63].



Şekil 2.11. Yüzey adsorpsiyon yöntemiyle Au nanoparçacıkların proteinlerle etkileşimi. (a) Hidrofobik etkileşim (kırmızı, hidrofilik bölge; mavi, hidrofobik bölge). (b) Elektrostatik etkileşim. (c) Sülfür bağı [63]

Peptid temelli subünite nanoaşılarda kullanılan nanoparçacık taşıma sistemleri antijeni kontrollü şekilde salarak güçlü ve spesifik immün cevap yarattığı, ASH tarafından antijen alımını arttırdığı, peptidleri degradasyon ve eliminasyondan koruduğu, antijenin sitotoksik T lenfositlere (CTL: *Cytotoxic T lymphocytes*) çapraz sunulmasını sağladığı ve çoklu peptid epitoplarını barındıran sentetik yapıların dizayn edilmesine olanak sağlayıp B hücreleri aktive ettiği için modern aşı sistemlerinde ön plana çıkmaktadır (Şekil 2.12) [119].

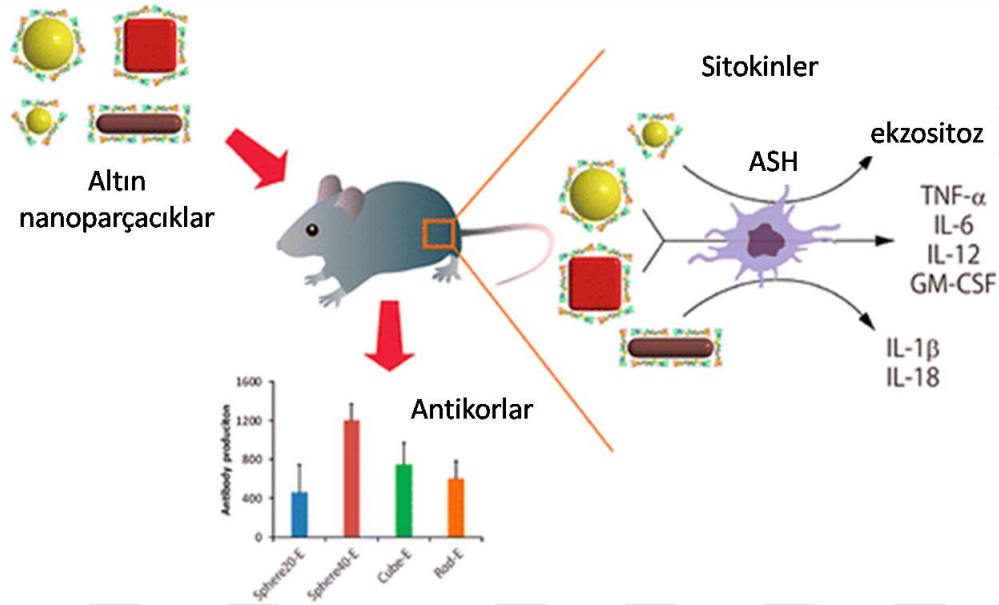


Şekil 2.12. Nanoparçacıkların immünstimülan aktiviteleri. (a) Nanoparçacık yüzeyinde tekrarlı antijen sunumu. (b) Ekzojen antijenlerin MHC Sınıf I ile çapraz sunumu. BCR (*B cell receptor*); TCR (*T cell receptor*); ER (endoplazmik retikulum); ASH (antijen sunucu hücre) [27].

Parçacık temelli aşılar genellikle ASH'ler tarafından kolaylıkla tanınıp hücre içine alınırlar. Bu aşıların DC'leri hedef alma verimliliği büyüklük, yüzey yükü, hidrofobisite, hidrofilisite gibi özelliklerine ve serum proteinleri ve hücre yüzey reseptörleri ile etkileşimine bağlıdır. Parçacık aşıları (*particulate vaccines*) büyüklükleri 500 nm'nin üstünde olduğu zaman DC'ler tarafından alım verimi düşmektedir. Büyük parçacıklar esasen makrofajlar tarafından alınmaktadır. Büyüklük hücreler arası sıvıda bulunan parçacıkların lenfatik kılcallara girmesini ve lenf nodlarında alıkonmasını belirleyen kritik bir parametredir. 200 nm'den küçük parçacıklar hızlıca kılcallara girerek lenf nodlarında bulunan DC hücreleri tarafından yakalanırlar. Büyük parçacıklar ise enjeksiyon yapılan bölgede birikerek lokal ASH'ler tarafından alınıp direne oldukları lenf nodlarında T hücrelere sunulur. Lenf nodlarında bulunan DC'ler deride bulunan DC'lere oranla daha immatür bir fenotipe sahip olsa da inflamatuar sitokin cevapları ve T hücre uyarma kapasiteleri çok yüksektir. Sonuç olarak, küçük nanoparçacıklar daha çok hücreye ulaşır [88].

Fifis ve arkadaşlarının farelerde yaptığı preklinik çalışma sonucunda profilaktik ve terapötik parçacık-temelli aşılar için optimum büyüklük 40-50 nm olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada büyüklüğü 300 nm'ye kadar olan parçacıkların CD4 T ve CD8 T hücre cevabını güçlü bir şekilde indükleyerek fareleri ölümcül influenza enfeksiyonundan koruduğu görülmüştür [120]**.** *İn vitro* çalışmalar genellikle pozitif yüklü parçacıkların nötral ya da negatif yüklü parçacıklara oranla DC'ler tarafından daha fazla hücre içine alındığını göstermiştir. Fakat *in vivo* çalışmalar pozitif parçacık yükünün aşının efektifliğinin belirlenmesinde etkili olmadığını ve hatta pozitif yüzey yüklü aşı taşıma sistemlerinin ektrasellüler matriksde bulunan negatif yüklü komponentlerle elektrostatik interaksiyonu sonucu immobilize olup dokulara daha az penetre olduğunu göstermiştir [88].

Aşı platformu olarak kullanılmak istenen altın nanoparçacıkların şeklinin ve büyüklüğünün *in vitro* ve *in vivo* şartlarda immünolojik cevaplara olan etkisini araştıran bir başka çalışma ise antijen ile kaplanmış 40 nm büyüklükteki küresel ve kübik AuNP'lerin kemik iliği kökenli dendritik hücrelerde (BMDC: *Bone marrow derived dendritic cells*) TNF-α, İL-12 ve İL-6 gibi sitokinlerin sekresyonunda ve farelerde antijen spesifik antikor titresinde artışa neden olduğunu saptamış ve aşı adjuvanı olarak kullanım potansiyelini ortaya koymuştur (Şekil 2.13) [9].



Şekil 2.13. Altın nanoparçacıkların aşılarda kullanımı [9]

Bir aşıya karşı immün cevap oluşabilmesi için aşı antijenin antijen sunucu hücreler tarafından alınıp, major lenfoid organlarda sunulması gerekir. Değişik büyüklükteki aynı cins nanoparçacıklar farklı adjuvan etki gösterip farklı düzeylerde antikor cevabı oluşturabilirler. Bunun sebebi olarak antijen sunucu hücrelerin farklı büyüklükteki nanoparçacıklara farklı cevap geliştirmesi düşünülmektedir. Aşı antijenine karşı oluşan immünitenin çeşidi antijen dozuna, aşının hangi yolla verildiğine, adjuvana ve antijene göre değişir [121].

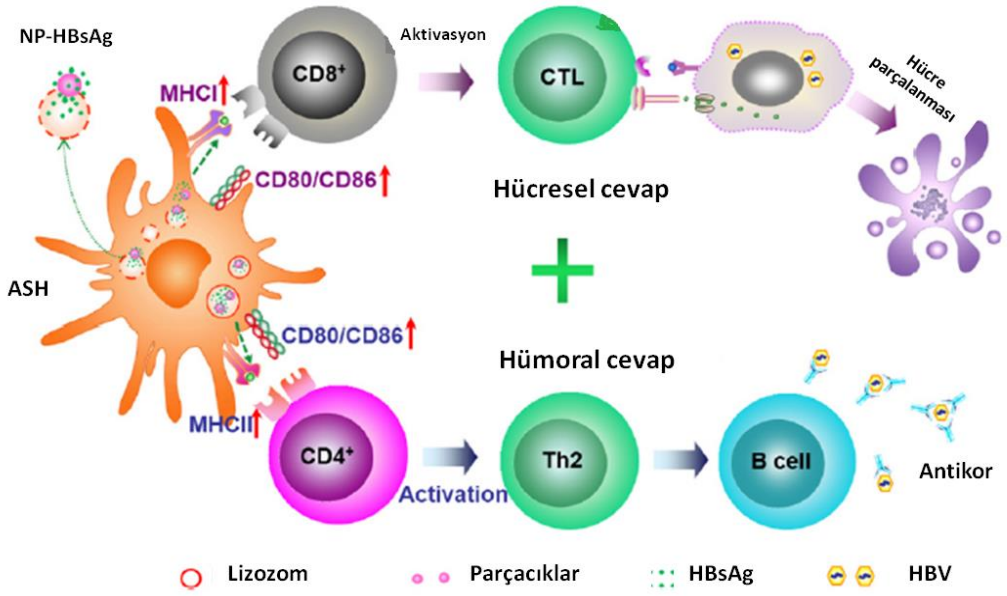
Adjuvanlar üç temel mekanizma üzerinden fonksiyon gösterirler: Antijen stabilizasyonu, antijen taşınması ve doğal immün sistem aktivasyonu [2]. Ayrıca adjuvanlar antijen sunucu hücreler üzerinde immünstimülator etkiye sahip olanlar veya antijen alımını başlatan taşıyıcı sistemler olmak üzere iki katagoride sınıflandırılabilir [4]. İdeal bir protein ya da peptid-temelli aşı, antijen sunucu hücreleri hedef almalı, antijenik protein yapıları hedef hücrelere ulaşana kadar degrade olmaktan korumalı ve son olarak da doğal immün sistem elementleriyle etkileşerek ASH matürasyonunu indükleyip T hücre aracılı immün cevabı başlatmalıdır. Sentetik ya da doğal biyomalzemeler ilaç-dağıtım taşıyıcısı (drug-delivery carriers) ve aşı adjuvanı olarak kullanılmaktadır. Nanoparçacıkların antijen taşıma özellikleri ve biyolojik potansiyelleri birçok bilim insanı tarafından büyük bir merakla araştırılmaktadır. Örneğin, biyobozunabilir kalsiyum fosfat nanoparçacıklarının (CaP NP)

Toll-benzeri reseptör-9 ligandı CpG ve hemaglütinin (HA) peptidi ile enkapsüle olduğu bir çalışmada, dentritik hücrelerin (DC) aktivasyon ve matürasyonunun indüklendiği ve güçlü bir antijen-spesifik $CD4^+$ T hücre cevabının oluştuğu rapor edilmiştir [122].

Hem hücresel hem de hümoral immün cevapları başlatan ve sürdüren ASH'ler parçacık aşıların primer hedefleridir. Antijen taşıyan nanoaşı parçacıkları ASH tarafından internalize edildikten sonra fagozomal/endolizozomal yolakta degrade olur ve peptidler MHC moleküllerine yüklenir. MHC sınıf II ve MHC sınıf I (çapraz sunum için) moleküllerine antijenik epitopların yüklenmesi ile hücresel immün cevabı ve parçacıkların yüzeyinde bulunan multivalan antijenlerin B hücre reseptörlerini çapraz bağlanması ile hümoral immün cevabı indükleyen bu nanoaşı modelleri viral ve kanser aşılarında umut vaat etmektedir. Parçacık aşıları genellikle subkutan ya da intradermal olarak enjekte edilmekte olup ASH ile direk enjeksiyon bölgesinde ya da lenf nodlarında etkileşime geçmektedir. Efektif bir immün cevabın başlayabilmesi için parçacıklar antijenik kargosunu salmalı ve ASH'ler bu antijeni sunmalı ve T hücreleri aktive olmaları için uyarmalıdır [123, 124].

Yue ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* (J774A.1; fare makrofaj hücre hattı) ve *in vivo* deneyler sonucunda; nanoparçacıkların adjuvan olarak kullanıldığı terapötik HBV aşı formülasyonu hem HBsAg'ye spesifik sitotoksik T lenfosit cevabını güçlendirmiş hem de antikor titresini arttırmıştır (Şekil 2.14) [23]. Hepatit B enfeksiyonu hepatit B virüsünün (HBV) neden olduğu ölümcül potansiyele sahip bir hastalıktır. Aşı antijeni HBsAg *in vivo* şartlarda mayada eksprese olan ~24 kDa büyüklükte S proteini içeren bir lipoprotein kompleksidir. 22 nm boyuttaki HBsAg parçacıkları kromotografik yöntemlerle pürifiye edilip alüminyum adjuvanına adsorbe edilerek aşıda kullanılır. Alüminyum adjuvanları profilaktik aşılarda kullanılan ve yüksek antikor titresiyle antijene spesifik immün cevap oluşturan ajanlardır [125]. Fakat, alüminyum ciddi lokal ve sistemik yan etki oluşturma riski taşımaktadır. Steril apse, eozinofili ve miyofasit oluşabilecek yan etkiler arasında sayılmaktadır. Bu yan etkiler nadir olarak görülse de alüminyumun Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklardaki muhtemel rolü de ayrıca kaygı vericidir. Bu nedenlerden dolayı, alüminyuma alternatif daha güvenli ve daha efektif adjuvanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Alüminyum bazlı aşılar gibi adsorbe olmuş antijen taşıyan farklı

nanoyapılar da aşı olarak kullanılabilir. Yapılan birçok çalışma bu tür taşıyıcıların taşıdıkları antijen kadar immünojenik olabileceğini göstermiştir [5, 126].



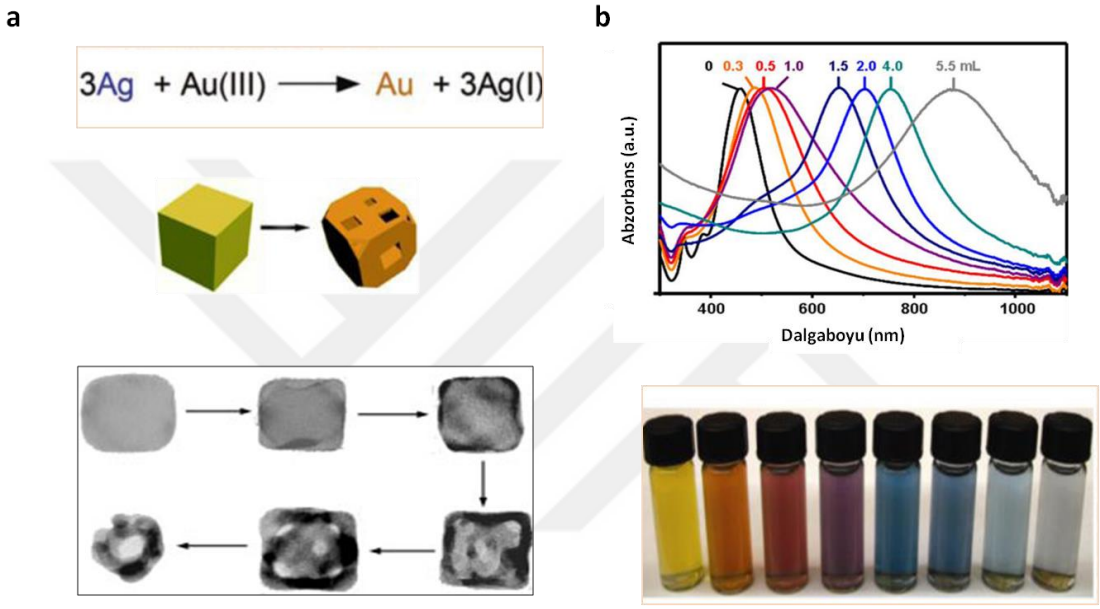
Şekil 2.14. Nanoparçacık-HBsAg temelli aşı formülasyonunun HBV (Hepatit B virüsü) spesifik hücresel ve hümoral immün cevabı güçlendirmesi [23].

Biyouyumlu özelliğiyle bilinen altın nanoparçacıklar rekombinan antijen taşıma sistemlerinde kullanıma uygundur. Altın nanoparçacıkların antijen taşıyıcı olarak kullanılması farklı hastalıklarda denenmiştir (influenza, şap hastalığı (*foot and mouth disease*) gibi). Bu çalışmalarda nanoparçacıklar alum ya da tam Freund adjuvanı ile birlikte verilmiştir. Son zamanlarda nanoparçacıkların da antikor ve sitokin sekresyonu gibi immünolojik cevapları tek başlarına indükliyebilecekleri literatürde raporlanmıştır [9].

2.4. Altın Nanokafeslerin Özellikleri ve Nanotıptaki Yeri

Yakın kızılötesi (NIR: *Near infrared*) bölgede ayarlanabilir lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR: *Localized surface plasmon resonance*) pik özelliği nedeniyle dikkat çeken içi boş, yüzeyi porlu ve biyouyumlu Au nanokafesler multifonksiyonel bir nanomateryal olarak son yıllarda biyomedikal ve katalitik uygulamalarda ön plana çıkmaktadır [127]. 2002 yılında Prof. Dr. Younan Xia'nin grubu tarafından ilk defa sentezlenen altın nanokafeslerin üretiminde şablon olarak gümüş nanoyapılar kullanılır [128, 129]. Sentez sırasında altın,

gümüş nanoparçacıklarının üstünde birikerek Ag nanoparçacıkların şeklini alır. Sonrasında içteki Ag'nin oksitlenip uzaklaştırılmasıyla içi boş ve kenarları porlu altın nanokafesler oluşur. Sonuç olarak Ag nanoküplerin (30-200 nm) kloroaurik asit ($HAuCl_4$) ile galvanik yer değiştime reaksiyonu (metaller arasındaki elektrokimyasal potansiyel farkına dayalı) sonucu duvar kalınlığı, gözenekli yapısı ve boşluk büyüklüğü kontrol edilebilen içi boş altın nanokafesler sentezlenir (Şekil 2.15) [130].



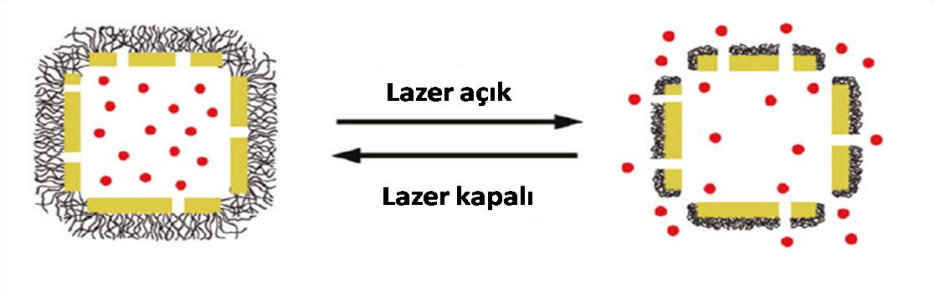
Şekil 2.15. Altın nanokafeslerin galvanik yer değiştime metodu ile sentezi. (a) Ag nanoküplerden Au nanokafes sentezi ve morfolojik değişikleri gösteren TEM görüntüleri. (b) Ag nanoküplerin ve Au nanokafeslerin UV-Vis spektrumları; eklenen $HAuCl_4$ miktarı arttıkça pik sağa kaymakta ve solüsyonda renk değişimi olmaktadır [130, 131].

Ag ve $HAuCl_4$ arasındaki molar birleşme oranı kontrol edilerek AuNK'ların yüzey plazmon rezonans (SRP: *Surface plasmon resonance*) pikleri 500 nm -1200 nm arasındaki spektral bölgeden seçilebilir. Absorpsiyon çapraz kesitleri aşırı büyük olan Au nanokafesler fototermal terapötik ajan olarak kullanıma çok uygundur. Ayrıca biyolojik moleküllerle fonksiyonelleştirilebilen bu nanokafesler erken kanser tanısı için spesifik kanser hücresi hedeflenmesinde moleküler işaretleyici (*biomarker*) olarak kullanılmaktadır. Optik koherens tomografi (OCT: *Optical coherence tomography*) ve fototermal erime deneyleri sonucu AuNK'ların güçlü bir şekilde NIR bölgesindeki (~ 800 nm) ışığı emme (*absorption*) ve saçma (*scattering*) özelliği olduğu ve absorpsiyon çapraz kesitlerinin klinikte kullanılan

konvansiyonel organik boyalardan (ICG: *İndocyanine green* gibi) en az 5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Au nanokafeslerin dikkat çeken özellikleri şu şekilde sıralanabilir: i) Ag ve $HAuCl_4$ arasındaki sitokiyometrik oran kontrol edilerek Au nanokafeslerin SRP piki 500 nm-1200 nm arasındaki herhangi bir dalgaboyuna kolayca ayarlanabilir; ii) AuNK'ların absorpsiyon ve saçılma çapraz kesitleri AuNK'ların iç boşluk yapısı ve duvarlarındaki por yoğunluğu değiştirilerek kontrol edilebilir; iii) Au nanokafesler alkantiyol kimyası ile iki basamaklı sadece karıştırma ve santrifüj etmeye dayalı bir yöntemle kolayca çeşitli biyolojik ajanlarla (antikorlar gibi) fonksiyonalize edilebilir [131, 132]. Bu özelliklerinden dolayı AuNK'lar kontrast madde olarak kanserin optik diagnozunda (OCT, fotoakustik görüntüleme ve iki-foton lüminesans endomikroskopik görüntüleme gibi) ve termal terapötik ajan olarak kanser tedavisinde kullanılmaya aday yeni nesil nanoparçacıklar (Au nanokabuklar gibi) arasında başarıyla yerini almıştır [133-135]. Farklı Au nanoyapıları (nanohexapod, nanoçubuk, nanokafes) karşılaştıran bir çalışma nanoyapıların şekil ya da morfolojilerinin kandaki dolaşımlarını ve biyodağılımlarını etkilediğini ve Au nanokafeslerin *in vivo* ortamda biyouyumlu olduğunu göstermiştir [136].

Chen ve arkadaşlarının yaptığı; meme kanser hücrelerinin (SK-BR-3) yüzeyinde aşırı eksprese olan epidermal büyüme faktör reseptörlerini (EGFR: *Epidermal growth factor receptor*) hedef alan monoklonal antikorlar (anti-HER2) ile konjuge edilmiş Au nanokafeslerin (~ 45 nm; SRP piki ~810 nm) kullanıldığı bir çalışma, AuNK'ların diğer Au nanoyapılara (Au nanokabuklar ve Au nanoçubuklar gibi) oranla çok daha düşük lazer gücüyle kanser hücrelerinin fototermal yıkımında etkili olduğunu göstermiştir [137]. Kim ve arkadaşlarının melanomlarda yaptığı *in vitro* (B16 melanom hücre hattı) ve *in vivo* (fare) çalışmalar ise Au nanokafeslerin (46 nm), NIR bölgesinde ayarlanabilir güçlü ışık abzorpsiyonu ve 700 nm-900 nm aralığında ışığın yumuşak dokuya derinlemesine nüfuz edebilmesi; tümör spesifik ligantlarla kolayca bağlanabilmesi; biyoinert olması gibi özelliklerinden dolayı fotoakustik tomografi (PA: *Photoacoustic*) için ideal bir kontrast ajanı olduğunu göstermiştir [138]. Wang ve arkadaşları ise Au nanokafeslerin yüzeyini radyoaktif ^{64}Cu ile işaretleyerek kantitatif pozitron emisyon tomografisi (PET: Positron emission tomography) ile *in vivo* kanser hücre hedeflemesinde kullanılabileceğini ve AuNK'ların (55 nm ve 30 nm) tümörün içinde hızlıca akümüle olup uzun süre kalabildiğini (24 saat) göstermiştir [139].

Boşluklu içyapısı ve fototermal etkisinden dolayı Au nanokafesler özgün ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır. Multifoton lüminesans özelliği sayesinde optik görüntüleme teknikleri ile hedeflenen bölgede kontrollü ilaç salımının kolaylıkla takip edilebildiği içinde enkapsüle ilaç taşıyan AuNK sistemleri nanomedikal uygulamalarda ön plana çıkmaktadır [140, 141]. Altın nanokafeslerin pasif hedefleme (*passive targeting*) ile tümöre yönlendirildiği fare modellerinde; enjeksiyon sonrası normal dokularda (kas ve yağ gibi) çok az miktarda AuNK bulunduğu fakat tümörde biriken AuNK miktarının 24 saat içinde hızla arttığı gösterilmiştir [142]. Akıllı polimerlerle kaplı kanser ilacı (doxorubicin) yüklü altın nanokafeslerin kullanıldığı kontrollü ilaç salım sisteminde ise Au nanokafesler LSPR pikleriyle örtüşen NIR lazer ışığına maruz kaldıklarında ışığı absorbe ederek ısıya dönüştürmüştür (fototermal etki). Polymer zinciri sıcaklığın artmasıyla büzüşerek porların açılmasına neden olmuş ve içeride hapsolan ilaç salınmıştır. Lazer kapatıldığında sıcaklık düşerek polymer zincirleri tekrar eski halini almış ve ilaç salınımı durdurulmuştur. Deneyler sonucunda hem fototermal etki hem de kanser ilacının etkisiyle meme kanser hücreleri öldürülmüştür. NIR lazer kaynağının yanısıra yumuşak dokuya derinlemesine penetre edebilen yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU: *High intensity focused ultrasound*) tekniği de bu sistemde kullanılabilmektedir (Şekil 2.16) [19, 142].

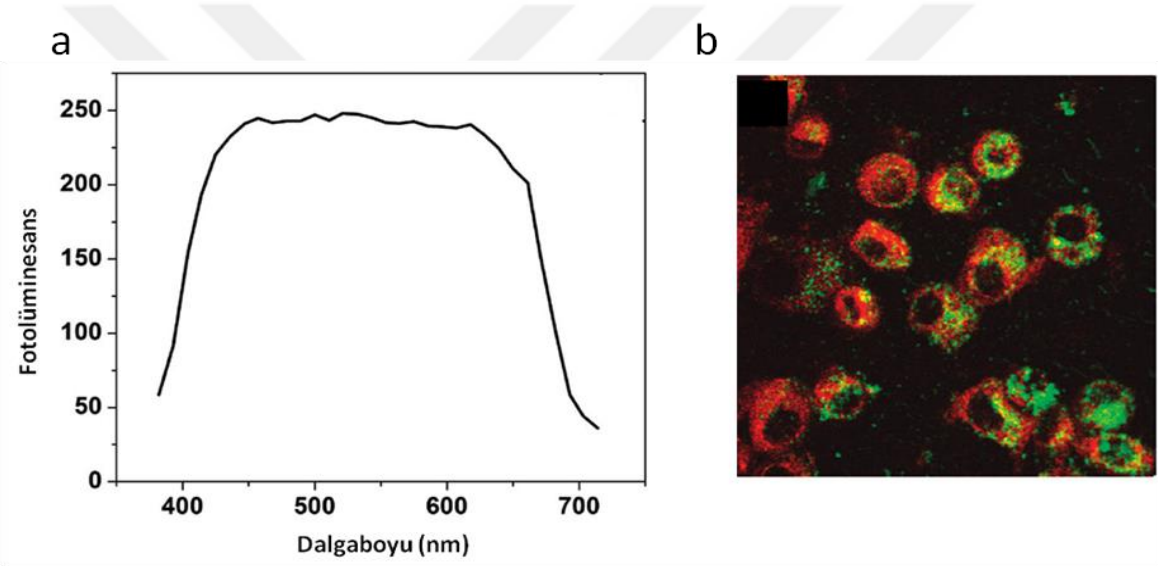


Şekil 2.16. Au nanokafeslerden kontrollü ilaç salımının şematik gösterimi [19]

Au ve arkadaşları iki-foton lüminesans ve ICP-MS tekniklerini kullanarak PEG ve anti-EGFR antikorları ile fonksiyonelleştirilmiş Au nanokafeslerin U87MGwtEGFR hücreleri (EGFR'yi aşırı eksprese eden insan glioblastoma hücre hattı) tarafından alımını araştırmıştır (Şekil 2.17). Antikor ile konjuge edilmiş AuNK'ların sadece PEG'lenmiş (*PEGylated*) altın nanoparçacıklara oranla yaklaşık 4-7 kat daha fazla hücre içine alındığı ve bu alımın reseptör aracılı endositozla yapıldığı gösterilmiştir. Ayrıca endositozun inkübasyon

süresine ve sıcaklığına, nanokafeslerin büyüklüğüne (35 > 50 > 90 nm) ve AuNK (50 nm) başına düşen immobilize antikor sayısına göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Biyodağılım çalışması sonucunda enjeksiyondan 24 saat sonra farelerde Au nanokafeslerin büyük oranda karaciğerde akümüle olduğu bulunmuştur [143]. PEG'lenmiş AuNK'ların intravenöz yoldan farelere enjekte edildiği bir başka çalışma da 7 gün sonra altın nanokafes akümülasyonun en çok karaciğer ve dalakta olduğunu göstermiştir [136].

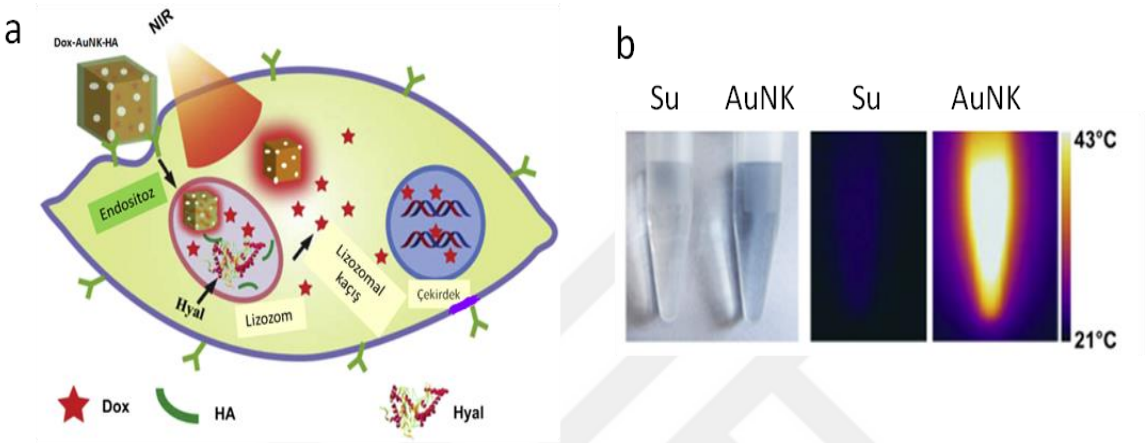
Altın nanokafeslerin parlak fotoluminesans özellikleri iki-foton mikroskopi tekniğinde yeni bir optik görüntüleme ajanı olarak kullanılmalarına imkan sağlamaktadır [144].



Şekil 2.17. Altın nanokafeslerin iki-foton mikroskopi ile görüntülenmesi. (a) Lazer ile 800 nm dalga boyunda uyarılan AuNK'ların fotolüminesans emisyon spektrumu. (b) Anti-EGFR konjuge Au nanokafesler (yeşil) ile inkübe edilen U87MGwtEGFR hücrelerinin iki-foton konfokal mikroskop görüntüsü [143].

Wang ve arkadaşları kemoterapötik ilaç yüklü Au nanokafes-hyalüronik asit (Dox-AuNK-HA) hücre içi ilaç salım platformu tasarlamış ve çoklu uyarana cevap veren (*multi-stimuli responsive*) ve nokta atışı yapabilen bir sistem geliştirmiştir. Bu nanohibrit yapı HA-CD44 (özellikle kanser hücrelerinde fazla eksprese olan hücre yüzey reseptörü) bağlanması sayesinde özgül olarak kanser hücreleri tarafından reseptör aracılı endositozla hücre içine alınmış ve HA moleküllerinin lizozomda hyalürodinaz (Hyal) enzimiyle degrade edilmesi sonucu enkapsüle edilmiş ilaç salınmıştır. Ayrıca bu çalışmada AuNK'ların fototermal özelliği sayesinde kemoterapi ve fototermal terapinin sinerjistik tümör öldürme etkisi *in*

vivo deneylerle gösterilmiştir. HA ve CD44 arasındaki spesifik bağlanmadan dolayı tümörü hedefleyen, ilacı HA ve Hyal molekülleri arasındaki enzimatik reaksiyondan dolayı hücre içine girdikten sonra salan, fototermal özelliği ile hem *in vivo* hem de *in vitro* şartlarda kanser hücrelerini öldüren bu Au nanokafes temelli ilaç taşıma sisteminin halihazırdaki kanser tedavilerinin yan etkilerini ortadan kaldıracağı düşünülmüştür (Şekil 2.18) [145].



Şekil 2.18. Au nanokafeslerin kanser terapisinde kullanımı. (a) Kanser ilacı (Doxorubicin) yüklü AuNK-HA nanoparçacıkların hücre içi ilaç salımı ve fototermal etkisi. (b) Au nanokafeslerin fototermal ısınması: AuNK'lar 10 dakika 808 nm lazer ışınına maruz bırakılmış ortam sıcaklığı 22 °C artmıştır. HA: Hyalüronik asit, Hyal: Hyalürodinaz [145].

Wang ve arkadaşları dış uyarıcılardan bağımsız (örneğin NIR ışınları) ortamdaki biyolojik moleküllerle (ATP gibi) etkileşim sonucu kontrollü salım yapan Au nanokafes temelli taşıma sistemlerinin biyosensor olarak biyolojik sistemlerde kullanılmasının uygun olduğunu göstermiştir [7]. Cai ve arkadaşları *in vivo* sıçan modelinde altın nanokafeslerin lenf sisteminde dolaşımını ve lenf nodları tarafından alımını kantitatif olarak noninvazif fotoakustik tomografi yöntemiyle incelemiştir ve AuNK'ların özellikle metastatik kanser vakalarında fotoakustik tomografi (PA: *Photoacoustic tomography*) ile sentinel lenf nodu görüntülemesinde optik izleyici olarak kullanılmasını uygun bulmuştur [146].

İnsan mezenkimal kök hücrelerini (iMKH) altın nanokafeslerle işaretleyip iki-foton ya da fotoakustik mikroskopi yöntemleriyle izlenmesini amaçlayan bir çalışma altın

nanokafeslerin iMKH'ler için toksik bir etki oluşturmadığını ve AuNK'ları alan hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulmadığını göstermiştir. Ayrıca iMKH'lerin farklı hücrelere farklılaşmasında da herhangi bir problem gözlenmemiştir. TEM sonuçlarına göre, altın nanokafeslerin çoğu endozom benzeri yapılar içinde hücre içine alınmış, çekirdekte altın nanokafes görüntülenmemiştir. Hücreler tarafından alındıktan sonra altın nanokafeslerin morfolojisi değişmemiş, AuNK'ların iMKH tarafından alımı inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak artmıştır [18].

Altın nanokafesler antikanser ilacı içermeden de fototermal özellikleri ile kanser terapisinde kullanılırken sahip oldukları optik özellikler (floresan ışıma, multifoton lüminesans ışıma ve güçlü optik absorpsiyon gibi) sayesinde diagnoz alanında da yol gösterici olmaktadır [147]. Sonuç olarak, Au nanokafeslerin özellikleri (büyüklük, yüzey yükü, bağlanan ligantlar gibi) amaçlanan hedefler doğrultusunda manipüle edilerek çeşitli nanotıp uygulamalarında kullanılabilir [74, 148].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç-Gereçler

3.1.1. Kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan kitler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kitler

Kit Adı	Katalog Numarası	Markası
Mouse İL-10 Platinum ELİSA	BMS614/2	eBioscience
Mouse TNF alfa Platinum ELİSA	BMS607/3	eBioscience
Mouse İL-4 Platinum ELİSA	BMS613	eBioscience
Mouse İL-6 Platinum ELİSA	BMS603/2	eBioscience
Mouse İL-1 beta Platinum ELİSA	BMS6002	eBioscience
Mouse İL-12p70 Platium ELİSA	BMS6004	eBioscience
Alexa Fluor 488 Mikroskala Protein İşaretleme Kiti	A30006	İnvitrogen
Monolisa HBsAg ULTRA ELİSA	72346	Biorad
Mikro BCA Protein Miktar Tayin Kiti	23235-500	Thermo Scientific
XTT Hücre Proliferasyon Kiti	20-300-1000	Biological Industries
Griess Reagent Kiti	G-7921	Molecular Probes

3.1.2. Antikorlar

Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Antikorlar

Antikor Adı	Klon Numarası	Markası
Anti-mouse CD86 (B7-2)-FITC	GL1	eBioscience
Anti-mouse MHC Class I (H-2Kd/H-2Dd)-PE	34-1-2S	eBioscience
Anti-mouse MHC Class II (I-A/I-E)-APC	M5/114.15.2	eBioscience
Anti-mouse CD16/32 Purified	93	eBioscience

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kimyasallar

Kimyasal Adı	Katalog No	Markası
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	FG0445	Millipore
Phosphate Buffered Saline (PBS)	14190	GIBCO
Fetal Bovine Serum (FBS)	S0115	Biochrom
Penisilin (100 U/ml)-Streptomisin (100 µg/ml)	A2213	Biochrom

Kimyasal Adı	**Katalog No**	**Markası**
Kloroaurik asit ($HAuCl_4$)	27988-77-8	Alfa Aesar
Polivinilpirolidin (PVP)	9003-39-8	Sigma Aldrich
Alhydrogel 2% (*Aluminum hydroxide wet gel suspension*; $Al(OH)_3$)	vac-alu-250	Invivogen
Rekombinan Hepatit B Yüzey Antijeni adw subtipi (rHBsAg)	CSI15712C	Cell Sciences
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	A3672,0100	AppliChem
Lysotracker Red DND-99	L-7528	Invitrogen
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate)	D3571-10	Invitrogen
Lipopolysaccharides *Escherishia coli* orijinli 055:B5	L6529	Sigma
Alexa Fluor 680 Phalloidin	A12379	Invitrogen
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Scientific
Coomassie Blue G-250	A3480,0025	AppliChem

3.1.4. Cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Cihazlar

Cihazın Adı, Markası ve Modeli
Zetasizer, Nano-ZS, Malvern, Birleşik Krallık
UV-Visible Spektrofotometre, Libra S22, Biochrom, Birleşik Krallık
Akım Sitometri (Flow Cytometry), FACS Aria III, Becton Dickinson Inc. , ABD
CO_2 Gaz İnkübatörü, CB 53-UL, Binder, Almanya
Mikroplaka Spekrofotometre, Epoch, BioTek, ABD
Faz Kontrastlı İnvert Mikroskop, Leica DM IL LED, Leica, Almanya
Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop, A1/A1R, Nikon, Japonya
Ultra Saf Su Üretim Sistemi, Elix & Milli-Q, Merck Millipore, Almanya
Işık Mikroskobu, CX21FS1, Olympus, Japonya
Biyogüvenlik Kabini Sınıf II, NU-425-400S, Nuaire, ABD
Acea xCELLigence RTCA DP Analizatör (*xCELLigence Real Time Cell Analysis Dual Purpose*), 3X16, Acea Biosciences Inc., ABD
Santrifüj, Universal 320R, Hettich, Almanya
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), JEM-2100, Jeol, ABD

3.2. Yöntemler

3.2.1. Altın nanokafes sentezi ve karakterizasyonu

Altın nanokafesler (AuNK), gümüş nanoküplerin altın atomları ile yer değiştirmesi metodu (*galvanic replacement reaction*) kullanılarak iki aşamada sentezlendi [130, 149]. Sentez sırasında mümkün olduğunca kullanılan malzemelerin en saf olanları seçildi ve arınık çalışmaya dikkat edildi.

Gümüş nanoküplerin sentezi

60 ml etilen glikol 250 ml altı yuvarlak balon içine eklendi ve yağın içinde 150 °C'de 1 saat ısıtıldı. Sonrasında etilen glikolde çözünmüş 0,7 ml 3 mM sodyum hidrosülfid (NaHS) solüsyonu ve 15 ml 0.18 M polivinilpirolidin (PVP) solüsyonu reaksiyon balonuna eklendi. 8 dakika sonra etilen glikolde çözünmüş 5 ml 0.28 M gümüş nitrat (AgNO3) solüsyonu eklendi. Reaksiyon solüsyonu kirli yeşil renge ulaşıncaya (yaklaşık 20 dakika) kadar yağın için beklendi. Kirli yeşil renk oluşur oluşmaz balon yağ banyosundan çıkarıldı ve su-buz banyosunda dikkatlice soğutularak reaksiyon durduruldu. Reaksiyon solüsyonu aseton ve saf su ile yıkandıktan sonra santrifüj edilerek gümüş nanokristalleri elde edildi. Elde edilen gümüş nanoküpler, altın nanokafeslerin sentezinde kullanılmak için morfolojisi ve büyüklükleri değişmeden ultra saf su içerisinde +4 °C sıcaklıkta 3-4 ay saklandı.

Gümüş nanoküplerden altın nanokafeslerin sentezi

Belirli sayıdaki gümüş nanoküpler (~$2{,}1 \times 10^{12}$ gümüş nanoküp /ml), 40 mg PVP içeren 20 ml suyun içinde 10 dakika 102 °C sıcaklıkta manyetik balıkla karıştırıldı. Bu solüsyona, 5 ml 0,1 mM altın tuzu ($HAuCl_4$) çözeltisi şırınga pompası ile yaklaşık 5 dakikada (40 ml/saat) eklendi. Ekleme tamamlandıktan sonra solüsyon 10 dakika daha kaynamada tutuldu. Sonra reaksiyon balonu su-buz banyosuna batırılarak soğutuldu. Soğuyan reaksiyon solüsyonu 13 500 rpm (17 400 x g) hızda oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilerek altın nanokafesler çöktürüldü. Yeni sentezlenen altın nanokafesler önce 2 defa doymuş tuz (NaCl) çözeltisi ve 5 defa ultra saf su ile yıkanarak 1ml ultra saf su içerisinde +4 °C sıcaklıkta saklandı.

Gümüş nanoküplerin ve altın nanokafeslerin karakterizasyonları UV-Visible (Libra S22, Biochrom, Birleşik Krallık) veya UV-Vis-NIR spektrofotometre (U-4100, Hitachi, Japonya) cihazları ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM: *Transmission Electron Microscope*, JEM-2100, Jeol, ABD) ile yapıldı. TEM mikrografları *Gatan digital micrograph* programı ile hazırlandı. Karakterizasyonlar sırasında farklı çözücülerin (ultra saf su, PBS, FBS içeren DMEM ve FBS içermeyen DMEM gibi) parçacık stabilitesi üzerine etkileri araştırıldı. Parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyeli dinamik ışık saçılma (DLS: *Dynamic Light Scattering*) sistemi olan Zetasizer Nano cihazı (Nano-ZS, Malvern, UK) ile ölçüldü. İndüktif eşleşmiş plazma ve kütle spektrometresi cihazı (ICP-MS: *Inductively coupled plasma-mass spectrometer,* Elan DRC-e, PerkinElmer, ABD) kullanılarak Au atomlarının konsantrasyon tayini yapıldı. ICP-MS numunesi hazırlanırken yeni sentezlenmiş altın nanokafes numunesinden 100 µl alındı. 900 µl hidroklorik asit (HCl) ve nitrik asitin (HNO_3) 3:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan kral suyu çözeltisinde altın nanoparçacıklar çözdürüldü. Daha sonra hacim 10 ml'ye ultra saf su ile tamamlanarak analiz yapıldı (dilüsyon faktörü 100). ICP-MS sonuçlarına göre Au atomları konsantrasyonu µg/ml cinsinden hesaplandı. ICP-MS ve TEM ölçüm sonuçları kullanılarak parçacık konsantrasyonu hesaplandı.

+4 °C'de ultra saf su içerisinde saklanan Au nanokafeslerin her deney öncesi mutlaka karakteristik lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR: *Localized surface plasmon resonance*) piki ölçülerek stabilitesi kontrol edildi. Rengi ve LSPR pikinin yeri değişmiş nanoparçacıklar kullanılmadı ve yeni sentezler yapıldı.

3.2.2. Hücre hattı ve kültür ortamı

Bu tezde *in vitro* makrofaj çalışmalarının model hücre hattı RAW 264.7 kullanıldı [150, 151]. BALB/c fare kaynaklı RAW 264.7 hücre hattı (ATCC TIB71) Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu'ndan (ATCC, Manassas, VA, ABD) ticari olarak temin edildi. RAW 264.7 hücreleri, *Abelson murine leukemia* virüsü ile indüklenmiş farenin tümör dokusundan elde edilmiş tek katmanlı büyüyen yapışkan bir hücre hattıdır. ATCC firmasının talimatları doğrultusunda RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri DMEM besiyeri içine sıcaklıkla inaktive edilmemiş % 10'luk fetal sığır serumu (FBS: *Fetal bovine serum*) ve 100 U/ml penisilin-100

µg/ml streptomisin eklenerek T75 (75 cm^2 kültür kabı) hücre kültür kaplarında hücre yoğunluğu mililitrede $1x10^6$ olana kadar 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde üretildi. Yapışkan hücreler, hücre kültür kabının %75-80'ini kapladığında steril hücre kazıyıcı aparatları (*cell scraper*) kullanılarak yeni kültür ortamına altkültüre edildi (*subculture*).

Hücre pasajlama

DMEM besiyeri 37 °C su banyosunda 15-20 dakika ısıtıldı. Yeni flaskın içine yeterli miktarda ısıtılmış besiyeri eklendi. Hücrelerin ekildiği T75 flaskı içindeki eski besiyeri aspire edildi. Hücreler 1X steril PBS ile yıkandı ve üstüne 10 ml taze besiyeri eklendi. Hücre kazıyıcı (cell scraper) ile hücreler dikkatlice kazınarak flaskın tabanından kaldırıldı. 10 ml serolojik pipet ile hücre süspansiyonu köpürtülmeden pipetaj yapıldı. 100 µl homojenize hücre süspansiyonu %0,04 Trifan mavisi ile 1:1 oranında dilüe edildi. Hemositometre ile sayım yapılıp 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı. Yeni flaskın içine istenilen sayıda hücre eklendi (bir adet T75 flak için yaklaşık 3×10^6 hücre). Hücreler %80 konfluense ulaşınca (2-3 gün sonra) tekrar pasajlandı.

Hücre dondurma

RAW 264.7 hücreleri flask tabanından kaldırılarak (pasajlama prosedüründe anlatıldığı gibi) homojen görünümlü hücre süspansiyonu elde edildi. Hemositometre ile hücreler sayıldı. Oda sıcaklığında 1200 rpm'de 5 dakika hücreler santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant aspire edildi. Dondurma solüsyonu olarak %10 DMSO (dimetil sülfoksit) içeren FBS solüsyonu (*freezing medium*) hazırlandı. 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre pelleti dondurma solüsyonu ile hafifçe pipetaj yapılarak karıştırıldı. Hızlıca her bir kriyovial içine 1 ml hücre süspansiyonu eklendi. Kriyovialler önce -20 °C'de hücreler donana kadar (yaklaşık 4 saat) bekletildi. Daha sonra en az 24 saat -80 °C'de dondurulduktan sonra sıvı azot içeren devar kabında (< -150 ˚C sıvı azot buharında) saklandı. Çalışmalarda pasaj sayısı 10'dan küçük hücreler kullanıldı. Pasaj sayısı yüksek hücreler çalışma sonrası tekrar dondurulmayıp atıldı.

Hücre çözdürme

DMEM besiyeri 37 °C su banyosunda 15-20 dakika ısıtıldı. Kriyovial içinde saklanan donmuş hücreler 37 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. Kriyovial %70 etanol ile silindi. Dikkatlice vialin kapağı açıldı ve pastör pipet yardımıyla 1 ml hücre süspansiyonu 15 ml falkon tüp içine transfer edildi. Hücrelerin üzerine yavaşça 9 ml DMEM ilave edildi ve hafifçe pipetaj yapıldı. Hücreler oda sıcaklığında 1200 rpm'de (400 x g) 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti üzerine 1 ml DMEM ilave edildi. Hücreler homojenize edildikten sonra içinde 15 ml önceden ısıtılmış DMEM bulunan 75 cm^2 hücre kültür flaskına eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücreler 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Hücreler flaskın tabanına tutununca eski besiyeri aspire edilip 15 ml taze besiyeri eklenerek hücreler çoğaltıldı.

3.2.3. Sitotoksisite analizleri

Altın nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinin canlılık ve proliferasyonuna olan etkileri iki farklı teknik ile araştırıldı. Ön hazırlık çalışmalarında hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçümüne dayalı kolorimetrik bir metot olan XTT hücre proliferasyon kiti (Biological Industries, İsrail) kullanıldı. AuNK'ların IC_{50} (hücre sayısında %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon) değerleri ise gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA DP, Acea Biosciences Inc., ABD) ile tespit edildi.

XTT hücre proliferasyon ve canlılık tayin testi

XTT yönteminde steril düz tabanlı 96 kuyulu plaklar kullanıldı. Her kuyuya $15x10^3$ RAW 264.7 hücresi 100 µl besiyeri içinde ekildi ve 37 °C'de %5 CO_2'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, yaklaşık %75 konfluense ulaşan hücrelerin besiyeri madde eklemeden hemen önce uzaklaştırıldı. Belirlenen kuyulara FBS içermeyen DMEM içerisinde seri dilüsyon yapılarak hazırlanmış farklı dozlarda AuNK (25 µg/ml-0,05 µg/ml) veya alum (333 µg/ml-0,625 µg/ml) içeren süspansiyonlar 100 µl hacimde eklendi. AuNK hücrelere verilmeden önce parçacık agregasyonunu önlemek için süspansiyon 30 saniye ultrasonik su banyosunda sonikasyona tabi tutuldu. Hiç madde eklenmeyen sadece hücre içeren kuyular (hücre kontrol), sadece besiyeri içeren hücre ve

madde içermeyen kuyular (blank: medyum kontrol) ve sadece parçacık süspansiyonu içeren hücre içermeyen kuyular (madde kontrol) kontrol grupları olarak belirlendi. 24 ve 48 saat 37 °C'de %5 CO_2'li ve % 95 nemlendirilmiş etüvde hücreler inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre içine alınmamış parçacıkları uzaklaştırmak için hücreler 2-3 kez önceden 37 °C'de ısıtılmış steril PBS tamponu ile yıkandı. XTT solüsyonu kit protokolüne göre bir adet 96 kuyulu plak için 5 ml solüsyon A (XTT solüsyonu) ile 100 µl solüsyon B (aktivatör solüsyonu) karıştırılarak steril ortamda hazırlandı. Her bir kuyuya XTT solüsyonu (50 µl/kuyu) eklendi. Plaklar 37 °C'de en az 4-5 saat bekletildi. İnkübasyon sonrasında, kromojenik ürünün 460 nm (referans dalga boyu 650 nm) dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) ile optik yoğunluğu (OD: *Optical density*) ölçüldü. Her bir doz en az dört tekrarlı çalışıldı. Birbirinden bağımsız en az üç deney yapıldı.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (xCELLigence RTCA)

Gerçek zamanlı sitotoksisite analiz metodu için önceden pasajlanmış ve %75-80 konfluense ulaşmış eksponansiyel büyüme fazındaki RAW 264.7 hücreleri kullanıldı. Hücre ekimi öncesi her bir E-plak (E-plate: *Electronic plate*) kuyusuna önceden ısıtılmış 50 µl DMEM besiyeri eklendi ve plaklar güvenlik kabini içinde 30 dakika bekletildi. Kuyular içinde baloncuk olmamasına özellikle dikkat edildi. 30 dakika sonunda E-plaklar gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA: *Real time cell analysis*) istasyonuna yerleştirilerek arkaplan (*background*) okuması (*Step 1*) yapıldı. Hücre pasajlaması ve sayımı yapılarak 400 000 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Medyum kontrol ve madde kontrol kuyuları hariç diğer kuyulara 100 µl hücre süspansiyonu (40 000 hücre/kuyu) eklendi. Hücrelerin kuyu tabanına sağlıklı bir şekilde yapışabilmeleri için E-plaklar kabin içinde 30-60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra plaklar RTCA istasyonuna yerleştirilerek saatte bir empedans ölçümü alındı (*Step 2*). Yaklaşık 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO_2'li ve %95 nemlendirilmiş inkübatörün içinde hücreler plak tabanlarına yapıştı ve prolifere oldu. Kuyularda ölçülen hücre indeks (CI: *Cell index*) değerleri yaklaşık 1 değerine ulaşınca hücrelere verilecek AuNK süspansiyonları hazırlandı. FBS içermeyen DMEM içinde maksimum 95 µg/ml Au atomları (parçacık konsantrasyonu: 1,06 nM) içeren Au nanokafes süspansiyonu seri dilüsyonla 5 farklı konsantrasyonda hazırlandı. Madde eklemeden önce *Step 2* durduruldu ve plaklar RTCA istasyonundan çıkarıldı. Hücreler Au

nanokafeslerle muamele edilmeden önce kuyulardaki besiyeri aspire edildi. Kuyulardaki final hacim 150 µl olarak seçildi. Medyum ve hücre kontrol kuyularına 150 µl FBS içermeyen DMEM eklendi. Madde kontrol kuyularına 150 µl maksimum doz AuNK süspansiyonu, diğer kuyulara ise belirlenen konsantrasyonlarda 150 µl hacimde AuNK süspansiyonları eklendi. Her bir doz en az iki tekrarlı çalışıldı. Deney en az iki kez tekrarlandı. Madde ekleme işlemi tamamlandıktan sonra E-plaklar tekrar istasyona geri kondu ve yaklaşık 280 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alındı (*Step 3*). Sonuçlar RTCA 2.0 programı ile analiz edilip farklı zaman dilimleri için IC_{50} değerleri hesaplandı.

xCELLigence sistemi alumun RAW 264.7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisini araştırmak için de kullanıldı. Alum için maksimum doz 333 µg/ml seçildi. Seri dilüsyon ile hazırlanan 5 farklı dozdaki alum süspansiyonu hücrelere verildi. Sadece alum ya da sadece besiyeri ya da sadece hücre içeren kuyular kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar RTCA 2.0 programı ile analiz edilip IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.2.4. NO (nitrik oksit) üretiminin kantifikasyonu

96 kuyulu plaklara 40 000 hücre/kuyu olacak şekilde RAW 264.7 hücreleri ekildi. 37 °C'de %5 CO_2'li ve %95 nemlendirilmiş inkübatörün içinde 24 saat gerçekleşen inkübasyon sonrasında hücre besiyeri aspire edildi. Katkısız DMEM içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Au nanokafes ve alum süspansiyonları (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml gibi) 100 µl hacimlerde kontrol kuyuları hariç diğer kuyulara eklendi. Hücreler belirlenen sürelerde (24 saat veya 48 saat) LPS'li (1 µg/ml) ya da LPS'siz ortamda nanoparçacıklar ile inkübe edildi. LPS'li örneklerin bazı gruplarında LPS ile Au nanokafesler hücrelere birlikte verilirken diğer gruplarda hücreler belirlenen sürelerde (4 saat gibi) önce nanokafeslerle inkübe edilip sonrasında ortama LPS (1 µg/ml) eklendi. Sadece LPS (1 µg/ml) ile uyarılan hücreler pozitif kontrol, madde eklenmeyen sadece hücre içeren kuyular ise negatif kontrol seçildi. İnkübasyon sonrası hücre süpernatantları toplandı. Hemen kullanılmayan süpernatantlar -80 ˚C'de saklandı.

Ortamda biriken nitrit makrofajların NO üretimini gösteren bir parametre olarak kullanıldı ve Griess kiti ile kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Ölçüm öncesi seri dilüsyon yöntemiyle 1

µM-100 µM arasındaki standartlar (100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM ve 1,5625 µM ve 0,78125 µM) saf su ile hazırlandı. Griess reaktifini hazırlamak için kitte bulunan Komponent A ve Komponent B eşit hacimlerde karıştırılarak ışıktan korunmuş şekilde muhafaza edildi. 96 kuyulu mikroplaklarda yapılan ölçümler için her bir kuyuya 20 µl Griess reaktifi, 150 µl hücre kültür süpernatantı ya da standart nitrit solüsyonu ve 130 µl ultra saf su eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Referans (kör) için 20 µl Griess reaktifi 280 µl saf su ile karıştırılarak kullanıldı. Örneklerin ve standartların absorbansları mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) ile 548 nm'de okutuldu. Süpernatantlarda bulunan nitrit konsantrasyonu sodyum nitrit standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. NO inhibisyon deneyleri için hücre canlılığı ≥ %95 olan konsantrasyonlar kullanıldı.

3.2.5. Antijen adsorpsiyon karakterizasyonu

AuNK:HBsAg ve Alum:HBsAg formülasyonlarının hazırlanması

Dört farklı oranda AuNK:HBsAg (2,5µg:20µg, 5µg:20µg, 7,5µg:20µg ve 10µg:20µg) ve aynı oranlarda Alum:HBsAg formülasyonları steril şartlar altında hazırlandı. HBsAg antijeni (196 µg/ml), AuNK (80,78 µg/ml) veya alum (100 µg/ml) ile belirlenen hacimlerde mikrosantrifüj tüpleri içerisinde karıştırıldı ve final hacim PBS (pH 7,4) ile 1 ml'ye tamamlandı. Karışımlar 4 °C'de 70 rpm hızla çalkalanarak yaklaşık 15 saat inkübe edildi [5]. Adsorpsiyon sonrası bağlanmayan antijeni uzaklaştırmak için karışımlar 14 000 rpm (18 407 x g) hızda 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Toplanan süpernatantlar ve PBS içinde tekrar çözdürülen pelletler planlanan deneylerde kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı [152].

Antijen bağlama kapasitesi ölçümü

Hazırlanan farklı altın nanokafes-antijen formülasyonlarının antijen bağlama kapasitesini ölçmek için mikro BCA metodu uygulandı [153]. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (200 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 0,5 µg/ml) sığır serum albümin (*bovine serum albümin*) solüsyonları hazırlandı. Kör (*blank*) olarak standartların dilüsyonunda kullanılan PBS seçildi. Mor renkli kolorimetrik ürünün 562 nm'deki absorbans değerleri mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) ile ölçüldü.

Süpernatantlarda bulunan HBsAg miktarı baz alınarak antijen adsorpsiyon kapasitesi hesaplandı [154]. Ayrıca sıcaklığın Au nanokafeslerin adsorpsiyon kapasitesine etkisini anlamak için AuNK:HBsAg (5µg:20µg) ve Alum:HBsAg (5µg:20µg) formülasyonları son hacim 500 µl olacak şekilde PBS içinde hazırlanarak 37 °C ve 4 °C'de 15 saat boyunca 70 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası formülasyonlar 14 000 rpm'de (18 407 x g) 15 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Deney 3 defa tekrarlandı. Süpernatantlardaki protein miktarı mikro BCA testi ile kantifiye edildi. Yapılan tüm mikro BCA testlerinde Au nanokafeslerin ve alum parçacıklarının 562 nm'deki intrinsik absorpsiyonları ölçülerek sonuçlar normalize edildi.

In vitro antijen salım testi

Altın nanokafeslerin yüzeyine adsorbe olan HBsAg antijeninin zamana karşı *in vitro* şartlarda salımını ölçmek için seçilen AuNK:HBsAg (10µg:20µg ve 10µg:40µg) ve Alum:HBsAg (10µg:20µg) formülasyonları 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerinde son hacim 1 ml olacak şekilde PBS içinde hazırlandı. Karışımlar 37 °C sıcaklıkta hafifçe çalkalanarak (70 rpm) sürekli karıştırıldı. Belirlenen zaman dilimleri sonunda örnekler 14 000 rpm (18 407 x g) hızda 4 °C'de santrifüj edilerek süpernatantlar toplandı. Santrifüj sonrası çökeltiye tekrar 1 ml PBS eklenerek karıştırmaya devam edildi. Salınmayan protein miktarının tespiti için deney sonunda toplanan pelletler 1 ml denatüre edici %5 SDS (0,1 M NaOH ile hazırlanmış) ile tekrar çözdürüldü. Deney 2 defa tekrarlandı. Salınan ve salınmayan protein konsantrasyonu mikro BCA metodu ile tespit edildi. Adsorbe olmuş antijen salım profili alum için de aynı metotla bulundu. Au nanokafeslerin ve alum parçacıklarının 562 nm'deki intrinsik absorpsiyonları ölçülerek sonuçlar normalize edildi [155, 156].

3.2.6. Monolisa HBs Ag ULTRA ELİSA

Yukarıda detaylıca anlatılan adsorpsiyon deneyleri sonucunda farklı adsorpsiyon formülasyonlarından elde edilen süpernatantlardaki altın nanokafeslerle inkübe edilmiş HBsAg'nin yapısal bütünlüğünü *ve in vitro* antijenitesini araştırmak için Monolisa HBs Ag ULTRA testi kullanıldı. Kuyucuklara önce 100 µl örnek ya da kontrol çözeltileri eklendi. Örneklerin üstüne 50 µl konjugat solüsyonu eklenerek 1 saat 30 dakika üzeri adeziv film ile kapatılarak 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar boşaltıldıktan sonra

en az 5 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı. Yıkamanın hemen sonrasında kuyucukların kurumasına fırsat vermeden her bir kuyucuğa 100 µl taze hazırlanmış kromojen (TMB: *tetramethyl benzidine*) solüsyonu eklendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 ± 5 dakika örnekler oda sıcaklığında karanlıkta üstü açık şekilde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu (1 N sülfürük asit solüsyonu: *stopping solution*) ekledi. Yarım saat içinde örneklerin ve kontrollerin 450 nm'de (referans dalga boyu 650 nm) absorbans değerleri ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol sonuçlarıyla karşılaştırarak örneklerde antijenik özelliğini kaybetmemiş HBsAg tespiti yapıldı.

3.2.7. Hücre içi antijen alımı

HBsAg'nin işaretlenmesi ve Au nanokafeslere bağlanması

RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modelinde makrofaj hücreleri tarafından farklı formülasyonlarda kullanılan HBsAg'nin *in vitro* ortamda hücre içine alımının araştırılması için Alexa Fluor 488 mikroskala protein işaretleme kiti kullanıldı. Kitte yazan direktifler doğrultusunda saf HBsAg proteini (196 µg/ml) Alexa Fluor 488 boyası ile işaretlendi. İşaretlenmiş protein 4 °C sıcaklıkta ışıktan korunarak muhafaza edildi. Alexa Fluor 488 ile işaretlenen HBsAg (HBsAg*), AuNK:HBsAg* (5µg:10µg) ve Alum:HBsAg* (5µg:10µg) formülasyonlarında kullanıldı. Kısaca, istenilen formülasyonları hazırlamak için nanoparçacık ve işaretlenmiş protein içeren karışımlar PBS ile 1 mililitreye tamamlanarak 4 °C sıcaklıkta hafifçe çalkalanarak (70 rpm) 15 saat inkübe edildi. Bu metot ile işaretli antijenin (HBsAg*) nanoparçacıklara ve aluma adsorpsiyonu amaçlandı. İnkübasyon sonrası süspansiyonlardan belirlenen miktarlarda (50 µl) alınarak hücrelere vermek için FBS'siz DMEM ile final hacim 500 µl olacak şekilde karıştırıldı. Bu örneklerde HBsAg* yaklaşık 1 µg/ml hesaplandı. Daha sonra kalan örnekler 14 000 rpm'de (18 407 x g) 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar mikro BCA testi için toplandı. Pelletler ise hücrelere verilmeden önce FBS'siz DMEM ile hacim 500 µl olacak şekilde karıştırıldı ve parçacık aglomerasyonunu önlemek için sonike edildi. Ayrıca Au nanokafeslere adsorbe antijenin adsorbe olmamış antijene oranla hücre içine alım verimliliğini karşılaştırabilmek amacıyla işaretlenmiş ana HBsAg* stoğundan (200 µg/ml) hesaplanan hacimlerde alınıp final hacim

FBS'siz DMEM ile 500 µl'ye tamamlanarak 1 µg/ml HBsAg* hücrelere verilmek için hazırlandı.

Akım sitometri

Floresan pozitif hücre sayıları akan hücre ölçer akım sitometri yöntemi ile tespit edildi. RAW 264.7 hücreleri 24 kuyulu plakaya $4x10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücreler plakaya yapıştıktan sonra besiyeri çekildi ve hücreler PBS ile yıkandı. HBsAg*, AuNK:HBsAg* veya Alum:HBsAg* formülasyonları ile hücreler 24 saat muamele edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırılarak toplandı. Hücre süspansiyonları 2500 rpm'de (590 x g) 5 dakika santrifüj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı. Hücre içine alınmayan işaretli antijenleri uzaklaştırmak için üç defa PBS ile yıkama işlemi yapıldı. En son yıkamadan sonra hücre pelletleri 500 µl %2 paraformaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Akım sitometri cihazında (FACS Aria III, Becton Dickinson Inc., ABD) okutulan örnekler FACSDiva (Sürüm 6.1.3) programıyla analiz edildi. Hiçbir işlem görmemiş hücreler boyanmamış (*unstain*) kontrol grubu olarak kullanıldı. Deney 2 defa tekrarlandı. Akım sitometri yöntemi ile floresan pozitif hücre sayısı tespit edilerek altın nanokafeslerin sadece antijen ve aluma oranla antijen internalizasyonunu nasıl etkilediği tespit edildi [23].

3.2.8. Konfokal mikroskopi

Farklı antijen formülasyonlarının hücre içine alımı ve kolokalizasyonu konfokal mikroskopi yöntemi ile araştırıldı. Tek başına, AuNK'ya veya aluma adsorbe Alexa Fluor 488 işaretli HBsAg'nin hücre içine alımı ve lokalize olduğu yer (lizozoma, sitoplazmaya ya da çekirdeğe) görüntülendi. Genel olarak muamele sonrası hücreler asidik organelleri işaretleyen LysoTracker Red DND-99 boyası, hücre membranını işaretleyen Alexa Fluor 680 Phalloidin boyası ya da hücre çekirdeklerini boyamak için kullanılan DAPI boyası ile tekli ya da çoklu kombinasyonlar halinde boyandı.

RAW 264.7 hücreleri konfokal mikroskopi için özel tasarlanmış tabanı cam olan 24 kuyulu plakaya (Sensoplate, Greiner Bione) $4x10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekildi. Hücreler plakaya yapıştıktan sonra besiyeri çekildi ve PBS ile yıkandı. Sadece HBsAg* (1 µg/ml) ve

AuNK:HBsAg* (5 µg/ml:10 µg/ml) formülasyonları hazırlandı ve hücrelere verildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler PBS ile iki defa yıkandı. LysoTracker Red DND-99 ile boyanacak hücreler hariç diğer hücre grupları boyamalar öncesinde %4 paraformaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi. Sonrasında hücreler iki defa PBS ile yıkandı.

Sadece DAPI ile boyanacak hücreler ana stoktan (5 mg/ml) PBS ile dilüe edilerek hazırlanan 1 µg/ml DAPI boyası ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve fazla boyayı uzaklaştırmak için iki defa PBS ile yıkandı.

DAPI ve Alexa Fluor 680 Phalloidin boyası ile boyanacak hücreler ise fiksasyon ve yıkama sonrası %0,5 Triton-X 100 ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve 2 defa PBS ile yıkandı. 1,5 ml metanol ile çözdürülerek hazırlanan Alexa Fluor 680 Phalloidin boya stoğu (200 ünite/ml) steril PBS ile dilüe edilerek final konsantrasyonu 5 ünite/ml olacak şekilde hücrelere uygulandı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında hücreler iki defa PBS ile yıkandı. Devamında DAPI ile boyama yapıldı.

Sadece LysoTracker Red DND-99 boyası ile boyanacak hücrelere fiksasyon işlemi yapılmadı. Konsantrasyonu 100 nM olacak şekilde boya hücrelere verildi. Oda sıcaklığında 30 dakika hücreler inkübe edildi. Yeni besiyeri ile hücre ortamı değiştirildi.

LysoTracker Red DND-99 ve Alexa Fluor 680 Phalloidin boyaları ile boyanacak hücreler ilk önce LysoTracker boyasıyla boyandı. Devamında üç defa PBS ile yıkanan hücreler yukarıda yazılan protokole uygun olarak Alexa Fluor 680 Phalloidin ile boyandı.

Alexa Fluor 488 (yeşil kanal; 494 nm/519 nm*),* LysoTracker Red DND-99 (turuncu kanal; 577 nm/590 nm), Alexa Fluor 680 Phalloidin (kırmızı kanal; 679 nm/702 nm) ve DAPI (mavi kanal; 358 nm/461 nm) ile boyanan hücreler parantez içinde verilen uyarılma/emisyon dalga boylarına uygun olan lazerler seçilerek lazer taramalı konfokal mikroskop (A1/A1R, Nikon, Japonya) ile NIS-Elements Viewer yazılımı (Sürüm 4.20, Nikon, Japonya) kullanılarak görüntülendi. Boyalı resimler standart detektör (SD), boyasız resimler ise *transmitted* detektör (TD) ile çekildi. Boyamalar sonucunda 10X objektif

(Nikon Plan Fluor, PA: 0,30) ile konfokal mikroskobun *NYQUEST* (objektif ve dalga boyuna bağlı en optimal yakınlaştırma büyütmesini yapan aplikasyon) özelliği ile görüntüler alındı.

3.2.9. Akım sitometri ile fenotip analizi

HBsAg, AuNK, alum, AuNK:HBsAg ya da Alum:HBsAg alımının makrofajların MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 moleküllerinin ekspresyonu üzerine etkisi akım sitometri tekniğiyle araştırıldı. RAW 264.7 hücreleri 24 kuyulu plaklara $4x10^5$ hücre/ml olacak şekilde ekildi ve 37 °C'de %5 CO_2'li, %95 nemlendirilmiş etüv içerisinde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Hücreler plakaya yapıştıktan sonra besiyeri çekildi ve PBS ile yıkandı. Hücreler HBsAg antijeni (40 µg/ml), AuNK süspansiyonu (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml), alum süspansiyonu (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml), çeşitli oranlarda hazırlanmış AuNK:HBsAg formülasyonları (5 µg/ml:40 µg/ml, 10 µg/ml:40 µg/ml, 15 µg/ml:40 µg/ml ve 20 µg/ml:40 µg/ml) ve Alum:HBsAg formülasyonları (5 µg/ml:40 µg/ml, 10 µg/ml:40 µg/ml, 15 µg/ml:40 µg/ml ve 20 µg/ml:40 µg/ml) ile 24 saat muamele edildi. Muamele görmemiş hücreler negatif kontrol, sadece LPS (1 µg/ml) ile 24 saat uyarılan hücreler de pozitif kontrol olarak seçildi. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile iki defa yıkandı. Hücreler hücre kazıyıcı ile kaldırılarak toplandı. Hücre süspansiyonları 2500 rpm'de (590 x g) 5 dakika santrifüj edilerek üç defa %0,05 FBS (v/v) içeren PBS ile yıkandı. Hücreler $1x10^6$ hücre/100 µL olacak şekilde flow tüplerine aktarıldı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için hücrelerin yüzeyinde bulunan Fc reseptörleri bloke edildi. Bunun için 1 µL anti mouse CD16/CD32 antikoru tüm tüplere eklenerek örnekler buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında tüplere 1'er µl APC fare anti-MHC sınıf II antikorları, PE fare anti-MHC sınıf I antikorları ve FITC fare anti-CD86 antikorları tekli ya da üçlü kombinasyonlar halinde ilave edildi. Örnekler 30 dk 4 °C'de karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 2500 rpm (590 x g) hızda 5 dakika santrifüj edilerek PBS ile üç defa yıkandı. Yıkamalar sonrasında hücre pelleti bütünlüğü bozulmadan dikkatlice süpernatant uzaklaştırıldı. Son olarak fazla boyadan arındırılan hücreler %2 paraformaldehit ile fikse edildi. Örnekler FACS Aria III akım sitometri cihazında (FACS Aria III, Becton Dickinson, ABD) okutulup FACSDiva (sürüm 6.1.3) programıyla analiz edildi. Uyarılmamış hücreler boyanmamış (*unstain*) kontrol grubu olarak kompenzasyon ayarları için kullanıldı. En az iki

bağımsız deneyin sonuçlarının ortalama ± standart sapma (SD) olarak hesaplanmasıyla veriler elde edildi.

3.2.10. ELİSA *(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)* ile sitokin konsantrasyon ölçümü

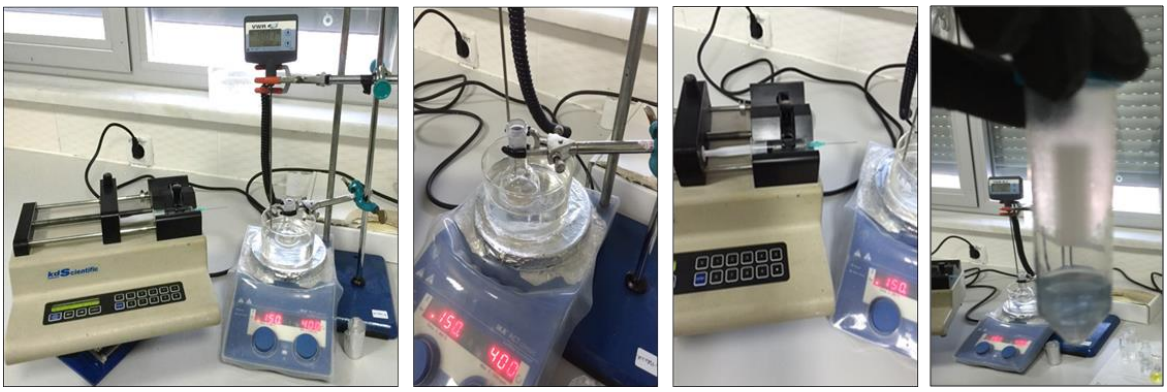
RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modelinde Au nanokafeslerin makrofaj hücrelerinin sitokin üretimine etkisi kolorimetrik ELİSA yöntemi ile araştırıldı. RAW 264.7 makrofaj hücreleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan HBsAg, AuNK, alum, AuNK:HBsAg ve Alum:HBsAg gibi maddelerle 24 saat inkübe edildikten sonra toplanan süpernatantlar ELİSA testleri yapılana kadar –80 °C'de saklandı. Ölçümlerde pozitif kontrol olarak 1 µg/ml bakteriyel lipopolisakkarit (LPS: *Escherishia coli* serotip 055:B5, Sigma) ile uyarılmış, negatif kontrol olarak ise uyarılmamış hücrelerin süpernatantları kullanıldı. Dondurulmuş süpernatantlar deney öncesi oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra dilüe edilmeden kullanıldı. Hücre kültür süpernatantlarında bulunan fare İL-4, İL-10, İL-6, İL-12p70, İL-1β ve tümör nekroz faktörü (TNF)-α sitokin düzeyleri sandviç ELİSA temeline dayanan kullanıma hazır ticari kolorimetrik ELİSA kitleri (eBioscience, ABD) ile üretici firma talimatları doğrultusunda çalışılarak tespit edildi. Öncelikle, kullanılacak mikrokuyulu şerit (*strip*) (tabanı ilgili sitokine özellikli monoklonal antikor ile kaplı) sayısı her bir örnek, standart ve blank en az iki tekrarlı çalışılacak şekilde belirlendi. Kullanılmayan fazla şeritler +4 °C'de saklandı. Deney başlangıcında kuyular 400 µl/kuyu olacak şekilde 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Fare TNF alfa Platinum ELİSA kiti hariç diğer sitokin ELİSA kitlerinde standart dilüsyonları direk mikrokuyulu plaklarda hazırlandı. Kör (*blank*) kuyularına 100'er µl örnek dilüenti (*sample diluent*) eklendi. Örnek kuyularına önce 50'şer µl örnek dilüenti ve üzerine 50'şer µl örnek eklendi. Sonrasında her bir kuyucuğa 50'şer µl biotin-konjugat solüsyonu eklendi. Plağın üstü adeziv film ile kapatılarak iki saat oda sıcaklığında sallanarak (400 rpm) inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kitlerde belirtilen sayıda yıkama solüsyonu ile yıkamalar yapıldı. Her bir kuyucuğa 100 µl streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*) solüsyonu eklendi. Plağın üstü adeziv film ile kapatılarak bir saat oda sıcaklığında sallanarak (400 rpm) inkübe edildi. Toplamda 3 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonunda tekrar prosedüre uygun şekilde yıkamalar yapıldı. Sonrasında bütün kuyulara 100'er µl TMB (*tetramethyl benzidine*) substrat solüsyonu eklendi. Mikroplaklar karanlıkta oda sıcaklığında belirtilen sürelerde (10 dakika ya da 30 dakika) en yoğun

standart koyu mavi renk alana kadar inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 100'er µl durdurma (*stop*) solüsyonu eklenerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Hiç beklenilmeden mikroplaka okuyucusunda (Epoch, Biotek, ABD) 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 650 nm) okutuldu. Sadece İL-10 kitinde diğerlerinden farklı olarak biotin-konjugat eklemeden önce 2 saat, biotin-konjugat ekledikten sonra 1 saat ve streptavidin-HRP ekledikten sonra 1 saat olmak üzere toplam 4 saat inkübasyon yapıldı. Standart eğri grafiği çizildi ve örneklerin optik dansiteleri standart eğri denklemine göre hesaplanarak sitokin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar Gen5 (Versiyon 2.00) yazılım programıyla analiz edildi. Sensitiviteler: İL-10=5,0 pg/ml, İL-4=2,0 pg/ml, İL-12p70=< 10 pg/ml, İL-6=6,5 pg/ml, TNFα=3,7 pg/ml, İL-1β=1,2 pg/ml.

4. BULGULAR

4.1. Altın Nanokafes Sentezi ve Karakterizasyonu

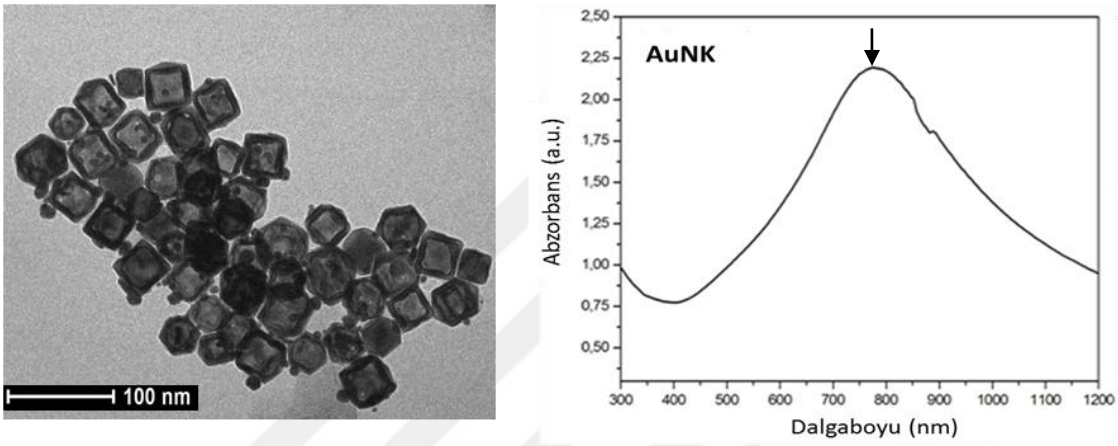
Au nanokafesler, Ag nanoküplerle kloroaurik asit (altın tuzu; $HAuCl_4$) arasında gerçekleşen galvanik yer değiştirme reaksiyonu ile sentezlendi (Resim 4.1). Gümüş (Ag) altından (Au) daha reaktif olduğu için (Ag/Ag^+ (0,80 V) ve $Au/AuCl_4^-$ (1,00 V) arasındaki elektrokimyasal potansiyel fark sonucu) altın tuzu Ag nanoyapılar tarafından indirgendi ($3Ag_{(s)} + AuCl_4^-{}_{(aq)} \rightarrow Au_{(s)} + 3Ag^+_{(aq)} + 4Cl^-_{(aq)}$) [17, 131]. Au nanokafes sentezi için gümüş nanoküpler biyouyumlu bir polimer olan polivinilpirolidin (PVP; MA= 55 000 g/mol) solüsyonu içinde 10 dakika kaynama sıcaklığında karıştırıldı. Bu solüsyona $HAuCl_4$ çözeltisi şırınga pompası ile kontrollü olarak eklendi (Resim 4.1). Her 1 mL ekleme sonrası karışımın UV-Vis spektrumları alınarak istenilen karakteristik lokalize yüzey plazmon rezonans piki (LSPR) elde edilmeye çalışıldı. İstenilen LSPR piki elde edildiğinde altın tuzu eklenmesi durduruldu. Soğutulan reaksiyon solüsyonu santrifüj edilerek nanokafesler çöktürüldü. Yıkamalarla AgCl, NaCl ve PVP uzaklaştırılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan Au nanokafeslerin absorbansları UV-Vis-NIR spektrofotometre (U-4100, Hitachi, Japonya) kullanılarak ölçüldü.



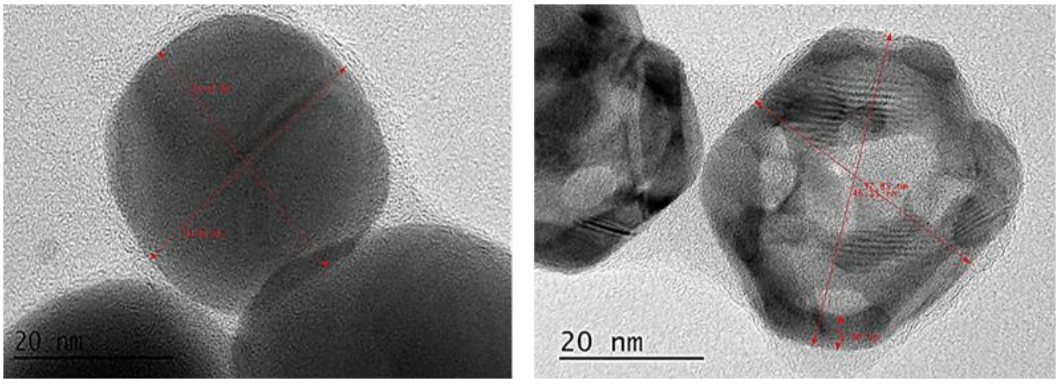
Resim 4.1. Altın nanokafes sentezinin deneysel kurulumu

Au nanokafeslerin büyüklükleri, duvar kalınlığı ya da her ikisi de değiştirilerek LSPR pikleri NIR bölgesindeki herhangi bir dalgaboyuna ayarlanabilir [157]. AuNK'ların UV-Vis-NIR absorpsiyon spektrumu yüzey plazmon rezonans pikini göstermektedir. Şekil 4.1'de AuNK'ların özgül karakteristik LSPR pikinin 777 nm civarında olduğu görülmekte ve bu

sonuç AuNK'ların boşluklu yapısını desteklemektedir. Yüksek magnifikasyonda yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskop (TEM) ile alınan görüntülerine göre Ag nanoparçacıkların köşegen uzunlukları 32,01 ± 2,2 nm ve 31,41 ± 3,5 nm olarak ölçülmüştür (Resim 4.3; solda). Au nanokafeslerin dış kenar uzunluğu 51,67 ± 7,32 nm, iç kenar uzunluğu 42,37 ± 6,26 nm ve duvar kalınlığı 5,87 ± 0,74 nm olup köşeler beyaz yani boşluklu yapıdadır (Resim 4.2; sağda).



Şekil 4.1. Sentezlenen Au nanokafeslerin TEM görüntüleri (solda) ve UV-Vis-NIR spektrumu (LSPR pik ~780 nm) (sağda). Ölçek çubuğu 100 nm'dir.



Resim 4.2. Ag nanoküplerin (solda) ve Au nanokafeslerin (sağda) parçacık boyutlarının TEM ile ölçülmesi (maksimum çözünürlük 0,20 nm). Ölçek çubuğu 20 nm'dir.

Altın nanokafeslerin fizikokimyasal karakterizasyonu için parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PdI) DLS (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Malvern, UK) cihazıyla ölçüldü ve değerler Çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1. Altın nanokafeslerin fizikokimyasal karakterizasyonu

Zeta Potansiyeli (mV)	Ortalama Hidrodinamik Çap (nm)	Polidispersite İndeksi
-7,46 ± 5,70	103,2 ± 47,27	0,22 ± 0,034

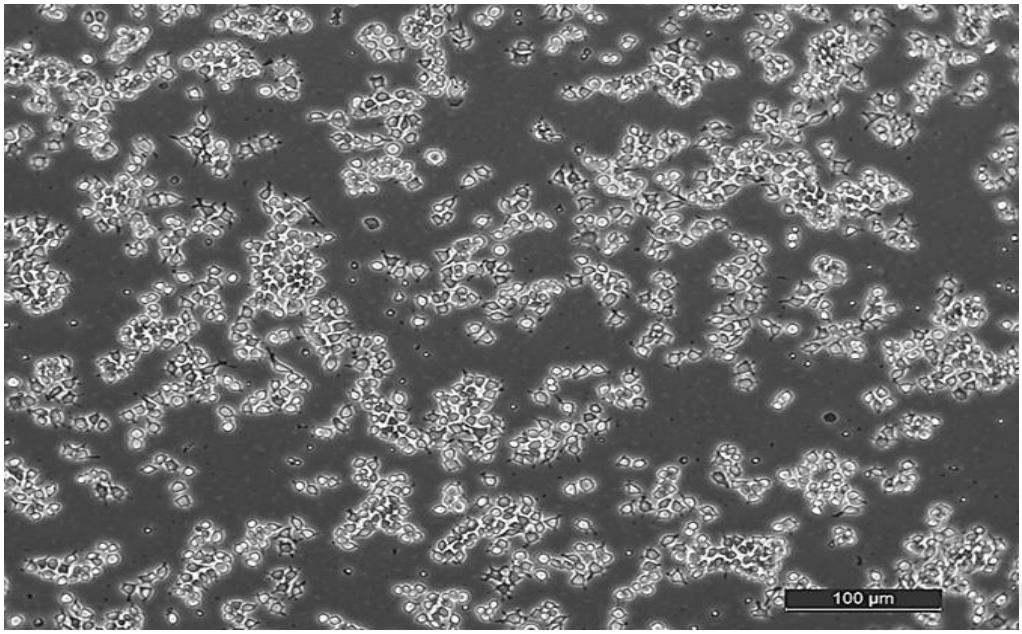
DLS sonuçları Au nanokafeslerin parçacık büyüklüklerinin homojen dağıldığını gösterdi. TEM ölçümlerine göre Au nanokafeslerin ortalama çapı 51,67 ± 7,32 nm bulundu. DLS sonuçları nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik (HD) çapını 103,2 ± 47,27 nm verdi. HD çapının TEM ölçümlerinden daha büyük olmasının nedeni büyük koruyucu PVP grubudur [67, 158]. Genellikle yüzey modifikasyonlarından dolayı nanoparçacıkların HD ölçümleri TEM ölçümlerinden daha büyük çıkmaktadır. AuNK gibi kolloidal sistemlerin stabilitesi ve yüzey yükleri hakkında bilgi sahibi olmak için zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Sentezlenen AuNK'lar literatürle uyumlu olarak negatif yüklü (-7,46 ± 5,70) bulundu [67, 145, 159].

Deneyler sırasında AuNK süspansiyonlarını hazırlarken kullanılan diğer çözücülerde (PBS (pH 7,4), FBS'li DMEM ve FBS'siz DMEM) kafeslerin yakın-kızılötesi LSPR piklerindeki kaymalara bakıldı. Altın nanokafeslerin PBS'de LSPR piki 780 nm, FBS'li DMEM'de 780 nm ve FBS'siz DMEM'de 787 nm olarak ölçüldü. Piklerdeki küçük varyasyonlar nanokafesleri saran ortamın refraktif indeksindeki değişimden kaynaklı olup kullanılan çözücülerde Au nanokafeslerin stabilitesinin değişmediği sonucuna varıldı.

4.2. Hücre Kültürü

Üretici ATCC (*American Type Culture Collection*) firmasının öneri ve uyarıları doğrultusunda RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı çoğaltılıp deneylerde kullanıldı. RAW 264.7 hücre kültürü için DMEM içerisine supplement olarak sıcaklıkla inaktive edilmemiş FBS eklendi. Sıcaklık inaktivasyonu FBS içinde bulunan ve RAW 264.7 hücrelerinin çoğalması için gerekli olan büyüme ve adezyon faktörlerini tahrip ettiği için bu hususa dikkat edildi. Ayrıca makrofaj hücrelerine zarar verdiği ve bazı makrofaj reseptörlerinin ligand bağlama özelliklerini kaybetmesine neden olduğu için tripsin enzimi yerine hücre

kazıyıcı aparatlar kullanılarak hücreler kaldırıldı. Artan pasaj sayısı ile birlikte makrofaj hücrelerinin aktivasyon seviyeleri ve buna bağlı bazı yapısal ve biyokimyasal özellikleri değişebileceği için deneylerde kullanılan makrofajların pasaj sayısı yirmiden az tutuldu [160]. Resim 4.3'de dondurulduktan sonra tekrar çözdürülen makrofaj hücrelerinin çevrik (invert: *inverted*) ışık mikroskobu görüntüsü bulunmaktadır.



Resim 4.3. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü (Leica, 10X objektif). Ölçek çubuğu 100 µm'dir.

4.3. Altın Nanokafeslerin Sitotoksik Etkileri

4.3.1. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinin metabolik aktivitesine etkisinin ölçülmesi ve alum ile karşılaştırılması

XTT sodyum tuzu (*sodium 3'-[1-[(phenylamino)-carbony]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate*) hücrelere aktif olarak absorbe olan bir tetrazolyum tuzudur. XTT metabolik aktivite gösteren hücrelerde mitokondriyal dihidrogenaz enzimleri tarafından biyoindirgenme reaksiyonları sonucunda turuncu renkli suda çözünen formazan bileşiklerine indirgenir. Sadece canlı hücrelerde mitokondri XTT tuzunu indirgeyerek oranj renkli suda çözünebilen bir boyaya dönüştürebilir. Oluşan boyanın yoğunluğu belirlenen dalga boyunda (450 nm-500 nm) spektrofotometre cihazı ile ölçülür. XTT metodu ile elde edilen boya yoğunluğu mitokondriyal enzimlerin aktivitesi ve buna

bağlı olan aktif hücre sayısının fazlalığı ile ilgileşim gösterir. Hücrelerin XTT indirgeme özelliği hücre canlılığının bir ölçütü olarak kabul edilir.

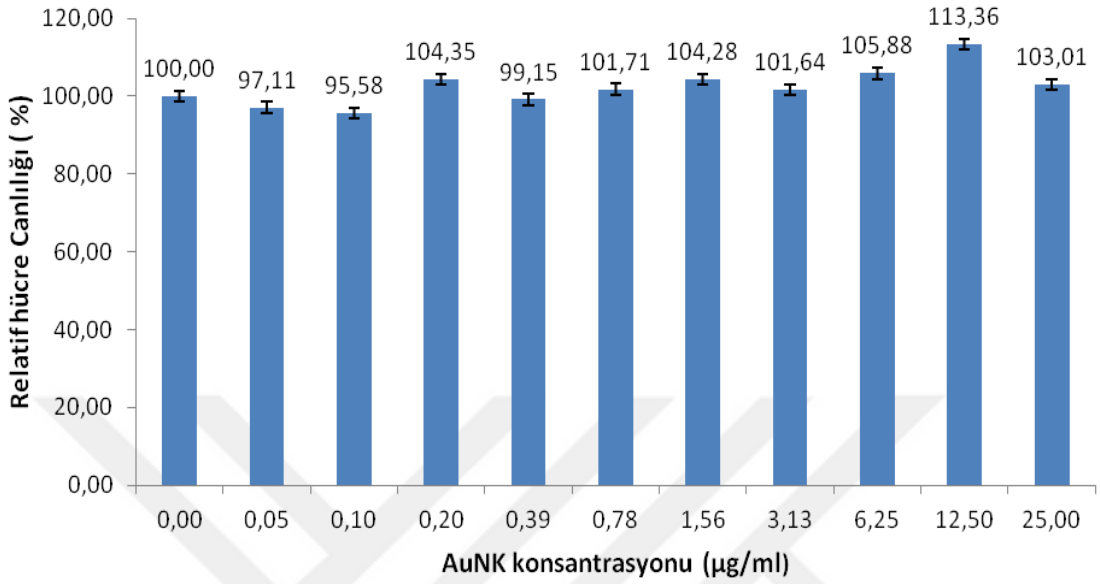
RAW 264.7 hücrelerinin mitokondriyal respiratuar aktiviteleri XTT molekülünün mitokondriyal redüksiyonu ile tespit edildi [161]. Yapılan ön çalışmalarda sadece altın nanokafes süspansiyonu içeren kuyuların (madde kontrol) absorbans ölçümleri incelendiğinde AuNK'ların XTT maddesi ile 460 nm'de girişim yapmadığı görüldü. Bu sebeple XTT kiti AuNK'ların sitotoksik etkilerini araştırmak için uygun bulundu.

AuNK'lar ile farklı sürelerde ve farklı dozlarda muamele edilen makrofajların proliferasyon paternini belirlemek için canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçen XTT kiti (Biological Industries, İsrail) kullanıldı. Sentezlenen Au nanokafeslerin ve aşılarda kullanılan alum (alüminyum hidroksit jel süspansiyonu) adjuvanının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde sitotoksik aktiviteleri XTT testleriyle araştırıldı. Hücreler FBS'siz DMEM içerisinde seri dilüsyon yapılarak hazırlanmış farklı dozlarda AuNK (25 µg/ml-0,05 µg/ml) veya alum (333 µg/ml-0,625 µg/ml) içeren süspansiyonlar ile 24 saat inkübe edildi. Sadece mitokondriyal ve hücre membranları bozulmamış hücrelerde süksinat dehidrogenaz enzimi (*Electron Transport Chain Complex II*) bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi çözünür oranj renkli formazan boyasına indirgeyebildi. 460 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu (Epoch, BioTek, ABD) ile OD'si ölçülen boyanın absorpsiyonu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısıyla doğru orantılı olarak arttı. Hiç madde eklenmeyen sadece hücre içeren kuyuların (hücre kontrol) absorbansı %100 canlılığın ölçütü kabul edildi. Sadece besiyeri içeren hücre ve madde içermeyen kuyuların (*blank*) absorbans değeri tüm OD'lerden çıkarılarak hesaplamalar bu değerlere göre yapıldı. AuNK'ların sitotoksik etkisi muamele görmemiş kontrol hücrelerine oranla relatif yüzde canlılık şeklinde aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi.

Relatif hücre canlılığı (%) = [Muamele görmüş hücrelerin absorbansı / Muamele görmemiş hücrelerin absorbansı] x 100

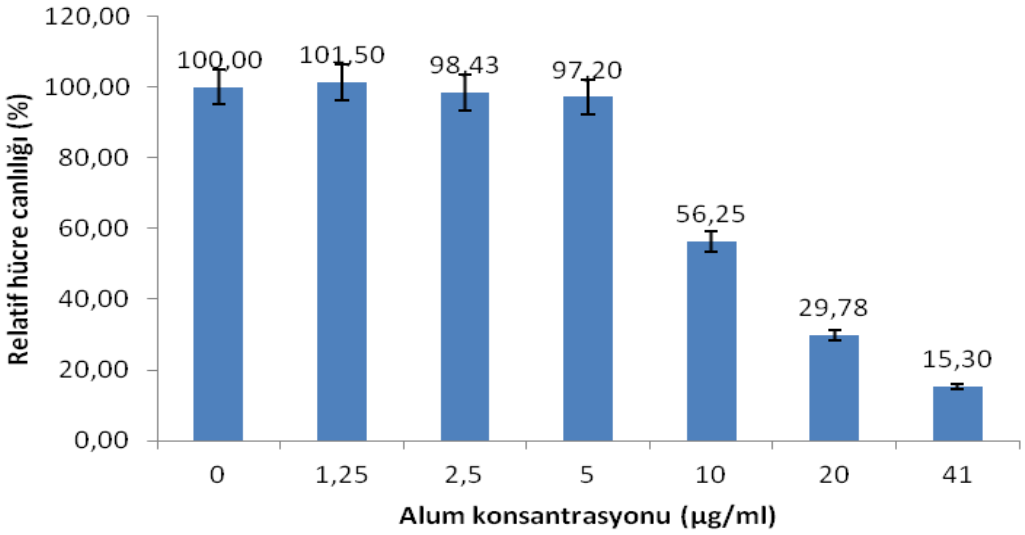
Altın nanokafeslere maruz bırakılan makrofaj hücrelerinin relatif canlılık yüzdesi inkübasyon sürelerine ve doza bağlı olarak AuNK'lardan etkilenmedi. Altın nanokafesler

uygulanan dozlarda ve sürelerde makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermedi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Altın nanokafeslerin farklı konsantrasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri üzerine 24 saat sonraki etkisi. Kolonlar dört tekrarlı ölçümün ortalamasını (n=4), hata çubukları ise standart sapmayı göstermektedir. Sonuçlar en az üç bağımsız deneyin temsilidir.

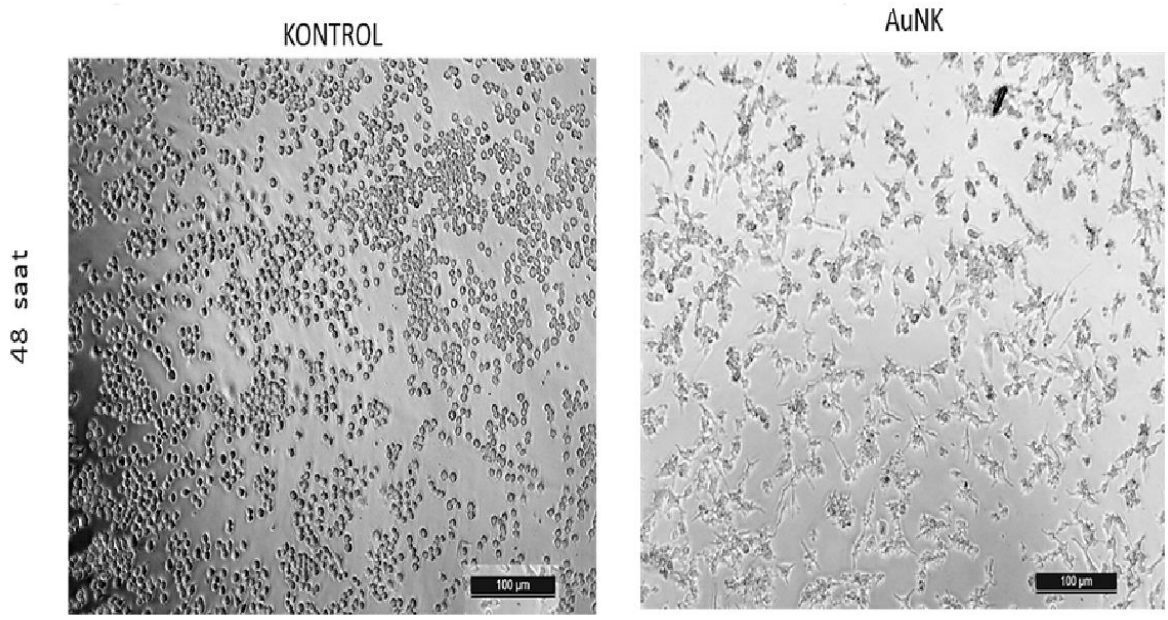
Alum adjuvanı 24 saatlik inkübasyon sonrası makrofajlar üzerinde doz bağımlı sitotoksik etki gösterdi (Şekil 4.3). Düşük konsantrasyonlarda (≤ 5 µg/ml) hücre canlılığında değişiklik gözlenmezken yüksek konsantrasyonlarda (≥ 10 µg/ml) hücre canlılığı doz arttıkça azaldı. 10 µg/ml alum dozunda canlılık yaklaşık %40 oranında azaldı. XTT sonuçlarına göre, alumun AuNK'lara oranla RAW 264.7 hücrelerinde daha düşük konsantrasyonlarda başlayan doz bağımlı sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.3. Alumun farklı konsantrasyonlarının RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri üzerine 24 saat sonraki etkisi. Kolonlar dört tekrarlı ölçümün ortalamasını (n=4), hata çubukları ise standart sapmayı göstermektedir. Sonuçlar en az iki bağımsız deneyin temsilidir.

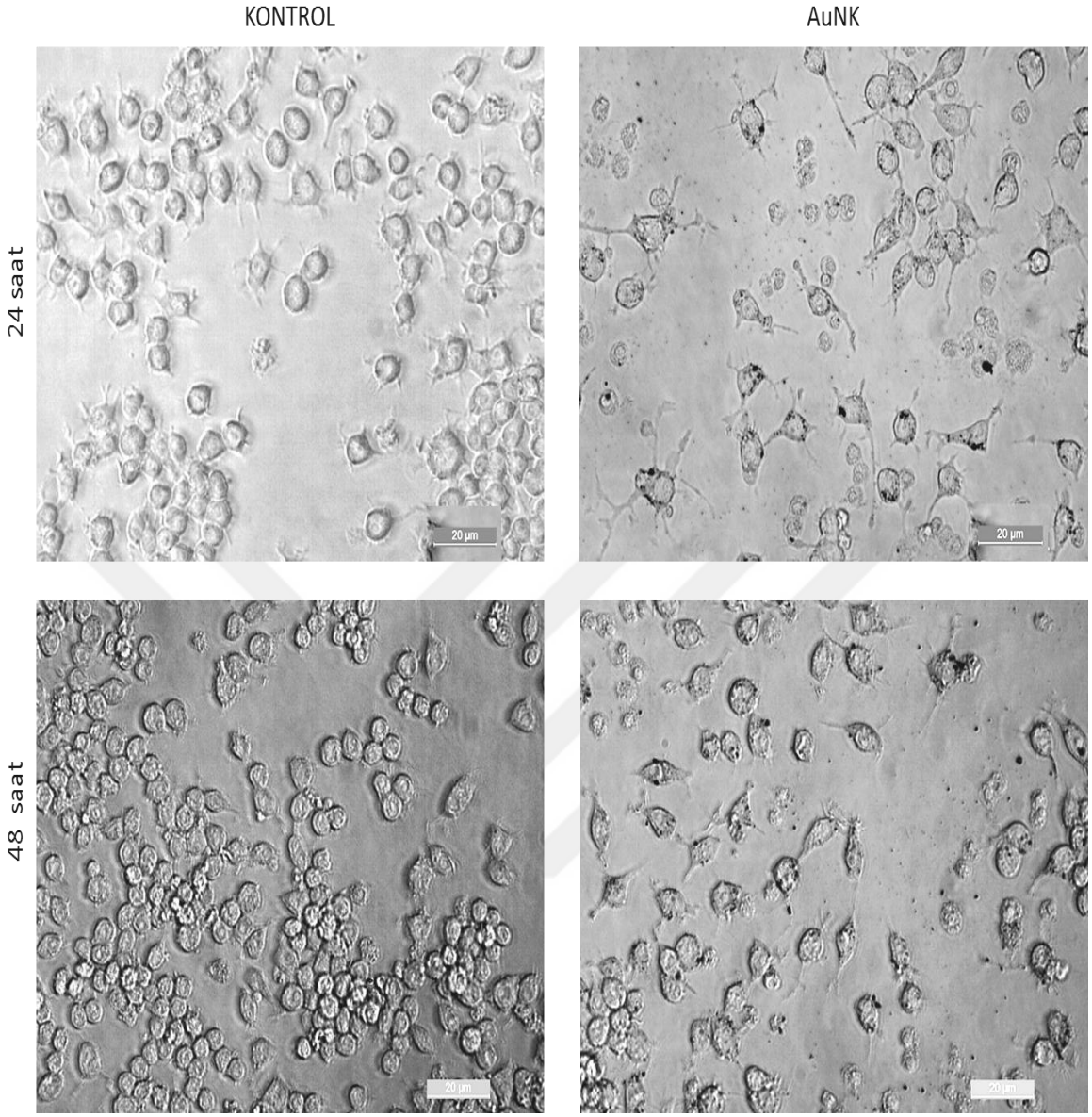
Hücre canlılığı mikroskop analizi

RAW 264.7 hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri incelendiğinde, uygulanan AuNK dozlarında kontrol hücre grubuna göre hücre sayılarında belirgin bir fark tespit edilmedi (Resim 4.4). 96 kuyulu plaklarda yapılan 48 saatlik muamele sonrası XTT eklemeden önce hücreler optik mikroskop (Leica, Almanya) ile 10X ve 40X büyütmede incelendi. Normal hücre morfolojisi genellikle yuvarlak, pürüzsüz ve yeknesak (*uniform*) gözlendi. Fakat Au nanokafeslerle ile muamele edilen hücreler daha düzensiz, pürüzlü ve psödopod uzantılı bir morfoloji sergiledi. Resim 4.4'de Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücre morfolojisi üzerinde yaptığı değişiklikler kontrol hücreleri ile karşılaştırmalı verildi. AuNK'larla inkübe edilen hücrelerin doz bağımlı olarak sitoplazmadaki granülaritesi arttı.



Resim 4.4. AuNK (25 µg/ml) ile 48 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler (Leica, 10X objektif). Ölçek çubuğu 100 µm'dir.

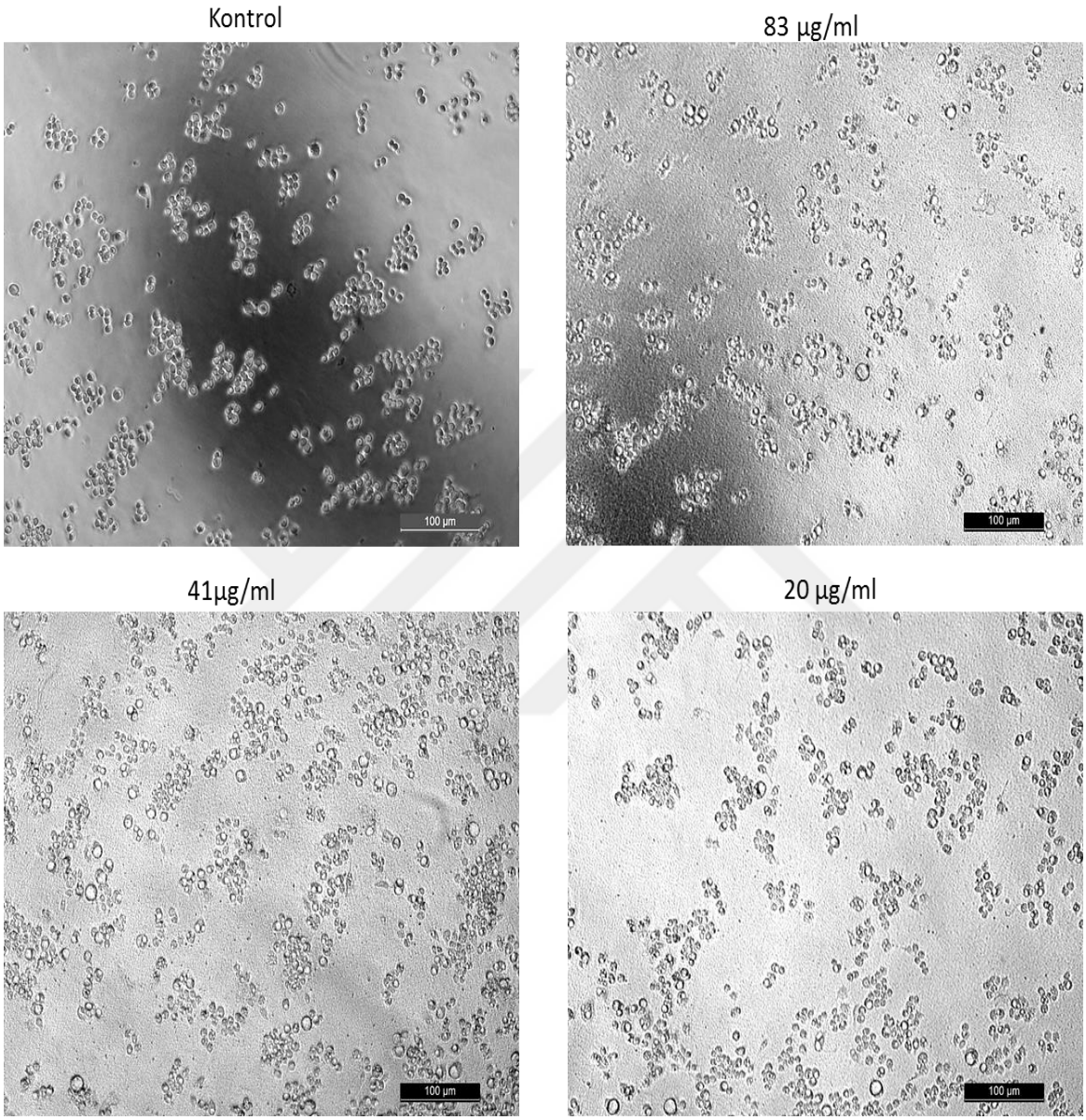
Nanoparçacıkların sitotoksisitesi hücre içine alınmalarına bağlıdır [162]. Düşük toksisitenin hücre içine yetersiz nanoparçacık alımından kaynaklı olmadığını göstermek için AuNK inkübasyonu sonrası makrofajların mikroskobik incelemesi yapıldı. Au nanokafeslerle 24 ve 48 saat inkübe edilen makrofaj hücrelerinin nanoparçacıkları endositoz yoluyla içlerine aldıkları ve uyarım sonucu morfolojilerinin değiştiği Resim 4.5'te gösterildi. Kontrol hücrelerine oranla AuNK'lar ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş hücrelerde psödopod uzantıları arttı. Bu değişiklikler makrofaj aktivasyonunun göstergeleri olarak değerlendirildi. Negatif yüklü Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücreleri tarafından hücre içine alınmalarında bir problem gözlenmedi ve hücre içine alınan AuNK'lar uygulanan doz ve sürelerde sitotoksik etki göstermedi.



Resim 4.5. AuNK (25 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler ve nanoparçacıkların hücre içine alımı (Leica, 40X objektif). Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

FBS'siz DMEM içinde seri dilüsyon yapılarak hazırlanan farklı dozlardaki alum ile (333 µg/ml-0,625 µg/ml) 24 saat inkübe edilen makrofaj hücrelerinin morfolojisi kontrol hücrelerine kıyasla değişiklik gösterdi. Özellikle yüksek dozlarda hücre içine alınan alum miktarı ile doğru orantılı olarak hücre büyüklükleri arttı (Resim 4.6). Altın nanokafes muamelesi sonrası hücrelerde artan sitoplazma uzantısı psödopodlar alum inkübasyonu sonrasında tespit edilmedi. Bu durum hücre içine AuNK ve alum alımının farklı yollardan yapılmış olduğunu düşündürdü. Bu farklılığın alumun büyüklüğünden (2677 ± 120nm) ve

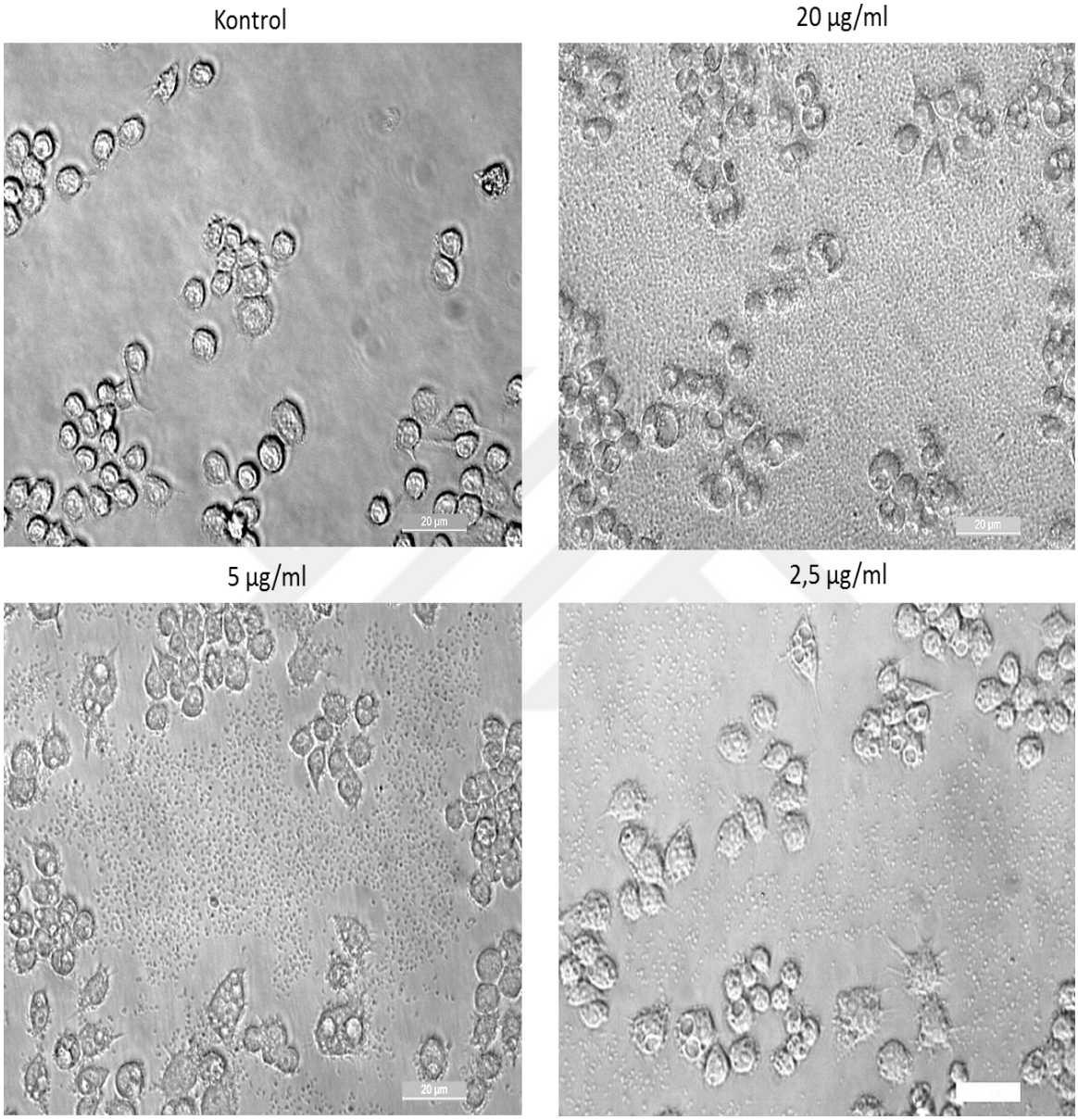
yüzey yükünün pozitif olmasından (10.96 ± 0.50mV) kaynaklanabileceği kanısına varıldı [163].



Resim 4.6. Alum (83 µg/ml, 41 µg/ml ve 20 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler (Leica, 10X objektif). Ölçek çubuğu 100 µm'dir.

Resim 4.7'de XTT eklemeden önce çekilen alum ile 24 saat inkübe edilmiş RAW 264.7 hücre görüntüleri daha ayrıntılı 40X büyütmede verildi. Doza bağlı olarak hücre içinde bulunan endozomların hacminin arttığı ve hücrelerin daha büyük ve yuvarlak olduğu

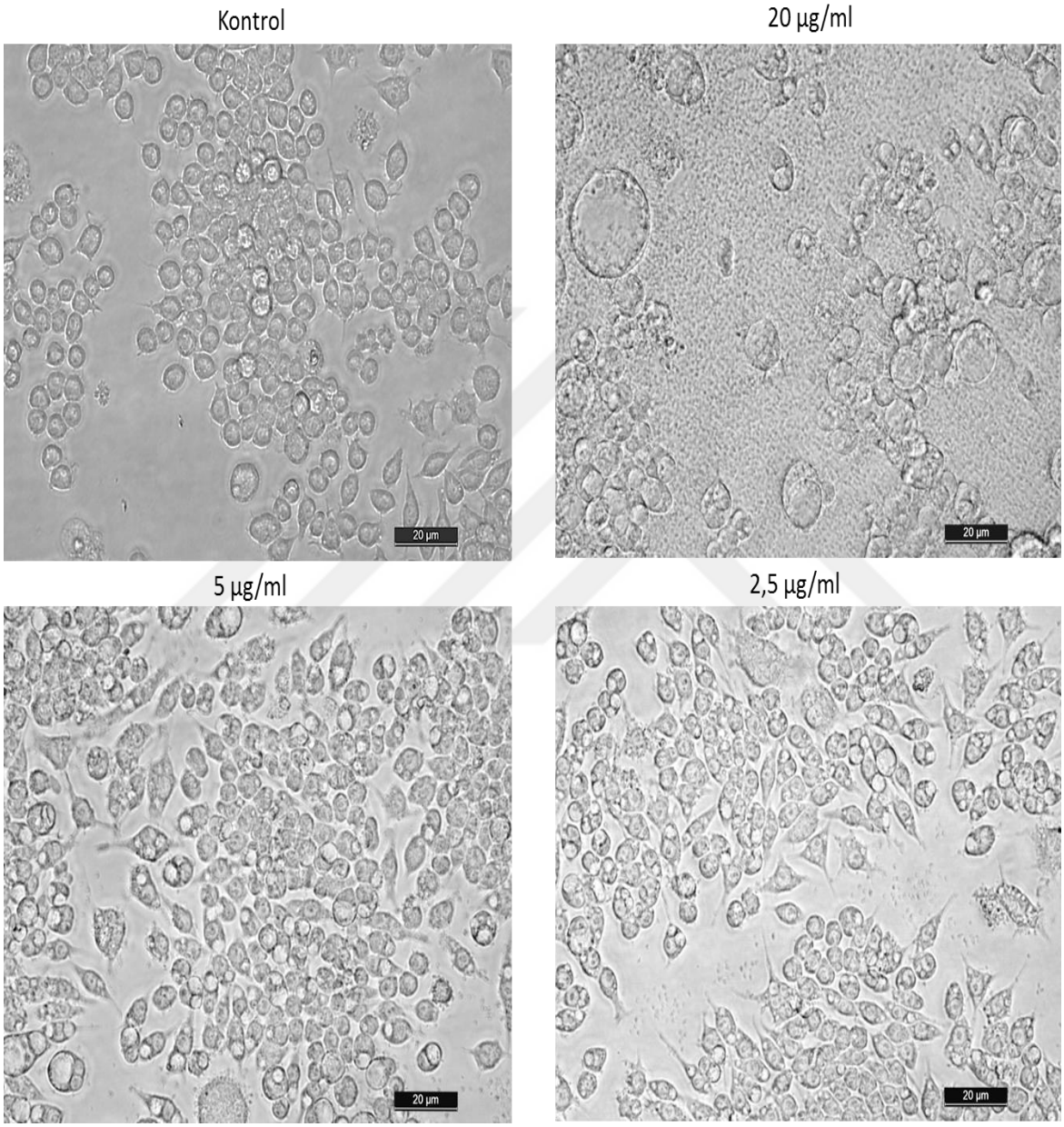
izlendi. Au nanokafes alımı sonrası görülen çoklu psödopod uzantılı makrofaj morfolojisi alumla muamele edilen hücrelerde görülmedi.



Resim 4.7. Alum (20 µg/ml, 5 µg/ml ve 2,5 µg/ml) ile 24 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler (Leica, 40X objektif). Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

Resim 4.8'de ise alum ile 48 saat inkübe edilmiş RAW 264.7 hücre görüntüleri 40X büyütmede verildi. Doz arttıkça hücrelerin psödopod uzantılarının azaldığı daha yuvarlak ve hacimli bir morfolojiye sahip oldukları görüldü. Ayrıca 24 saatlik inkübasyon süresine oranla 48 saatlik inkübasyonun alum alımını arttırdığı ve özellikle yüksek dozlarda toksik

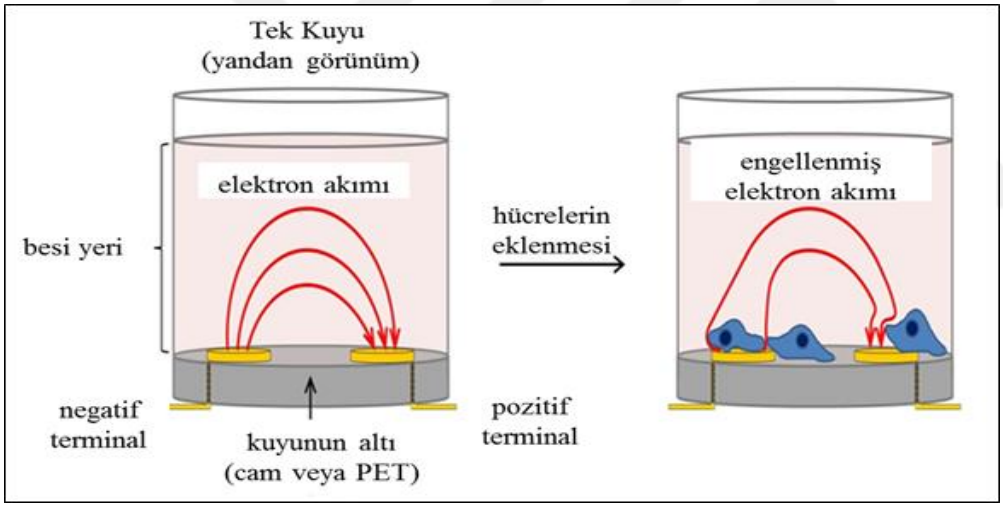
etki yaparak hücre sayısını azalttığı gözlendi. Alum ile inkübe edilen makrofajların zamana ve doza bağlı olarak büyüklük ve granülaritesi arttı. Muamele sonrası hücrelerin içinde intrasitozolik vakuoller gözlendi (Resim 4.8).



Resim 4.8. Alum (20 µg/ml, 5 µg/ml ve 2,5 µg/ml) ile 48 saat muamele edilmiş RAW 264.7 hücrelerinde ($15x10^3$ hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik değişiklikler (Leica, 40X objektif). Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

4.3.2. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücre canlılığına etkisinin gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile araştırılması ve IC_{50} değerlerinin alum ile karşılaştırılması

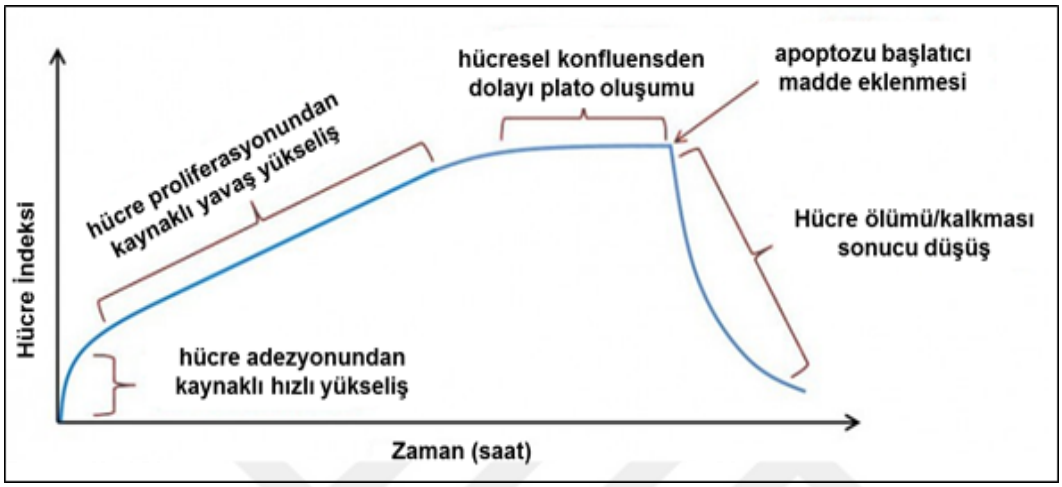
xCELLigence RTCA DP sistemi (Acea Biosciences, ABD) gerçek zamanlı elektriksel empedans ölçümü yapan noninvazif bir sistemdir. Sistemin çalışma prensibi ana hatlarıyla şu şekildedir: Hücre medyumu gibi iletken bir solüsyon içerisinde kuyu tabanını kaplayan altın elektrotlar arasında negatif terminalden pozitif terminale doğru elektron akımı olur. Elektrotlara hücrelerin yapışması ile elektron akımı kesintiye uğrar ve empedans oluşur (Şekil 4.4). Empedanstaki değişiklikler birimsiz bir parametre olan hücre indeksi (CI: *Cell index*) şeklinde ifade edilir. Altın mikroelektrot yüzeyleri ya da uygulanan elektrik potansiyeli (22 mV) hücreler üzerinde invazif bir etki oluşturmadığı için ölçümler güvenilirdir.



Şekil 4.4. Hücresel empedansın oluşum şeması [164]

Sistem 4 ana üniteden oluşur: RTCA DP (*Real Time Cell Analysis Dual Purpose*) analizörü, 3'lü plak istasyonu, özel tasarım plaklar ve RTCA yazılımı. RTCA DP analizöründe 3 birleşik istasyon (*craddle*) bulunur. 16 kuyulu E-plak 16 (*electronic plate 16*) ya da CIM-plak 16 (*cell invasion and migration plate 16*) ile deneyler yapılır. xCELLigence RTCA DP sisteminde hücre proliferasyon çalışmaları yapmak için hücreler tabanı %70-80 oranında altın mikroelektrot biyosensörler ile kaplı özel üretim üstü kapaklı E-plak kuyularına ekilir. Bu elektrotlar sayesinde elektriksel empedans ölçümü yapılır. Kuyularda elektrotlara yapışan hücre yoksa CI değeri sıfırdır. Hücreler tabana yapışmaya başladıkça CI değeri artar.

Şekil 4.5'deki gerçek zamanlı hücre empedans değişim grafiğinde görüldüğü gibi, zamana bağlı CI değerlerindeki değişimler hücre proliferasyonunu, apoptoz ya da nekroz kaynaklı hücre ölümünü ve hücre farklılaşması sonucu hücre morfolojisinde ortaya çıkan değişiklikleri yansıtmaktadır (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Gerçek zamanlı hücre empedans değişim grafiği [164]

Sentezlenen Au nanokafeslerin RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi empedans temelli hücre canlılık ve motilite ölçüm sistemi olan xCELLigence RTCA DP (Acea Biosciences, ABD) sistemi kullanılarak gerçek zamanlı araştırıldı [152, 165]. Yapılan ön çalışmalarla kuyulara ekilmesi gereken optimum hücre sayısı belirlendi. 16 kuyulu E-plaklar içerisine 400 000 hücre/ml ekilen makrofaj hücrelerinin tabana yapışıp yayılması sonucu CI değerleri yükselip 1 değerine ulaşınca çeşitli konsantrasyonlarda FBS'siz DMEM ile hazırlanan Au nanokafes süspansiyonları (95 µg/ml, 47,5 µg/ml, 23,75 µg/ml, 11,88 µg/ml ve 5,94 µg/ml) eski besiyeri aspire edildikten sonra eksponansiyel büyüme fazındaki hücrelere verildi. Hücre kontrol ve medyum kontrol kuyularına sadece FBS'siz DMEM, madde kontrol kuyularına ise maksimum doz (95 µg/ml) AuNK süspansiyonu eklendi. Yaklaşık 280 saat boyunca 15 dakikada bir ölçüm alınarak gerçek zamanlı hücre empedans değişim grafiği elde edildi (Şekil 4.6).

Deney süresince madde kontrol kuyularındaki AuNK parçacıkları ve kuyuların tabanını kaplayan altın mikroelektrotlar arasında CI değerini etkileyecek herhangi bir elektriksel etkileşim olmadı. Hücre kaplı kuyulardaki sensörlerden gelen relatif empedans

değerlerinin sadece medyum içeren kuyuların empedans değerlerine göre normalize edilmesi sonucu zamana bağlı değişen CI grafiği RTCA 2.0 programı ile elde edildi. Farklı kuyulardan elde edilen sonuçları doğru bir şekilde karşılaştırabilmek için grafiklerde normalize edilmiş CI değerleri (normalize değer = belirli bir zaman noktasında ölçülen empedans/normalizasyon zamanındaki empedans) kullanıldı. Böylece tüm kuyularda normalizasyon zamanındaki normalize CI değeri 1'e eşitlendi. RTCA 2.0 programı ile farklı zaman dilimleri için IC_{50} (hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon) hesaplandı (Çizelge 4.2). Belirlenen zaman dilimi için IC_{50} hesaplanırken konsantrasyona karşı CI değerleri grafiği kullanıldı (eğri çeşidi: *sigmoidal dose-response*).

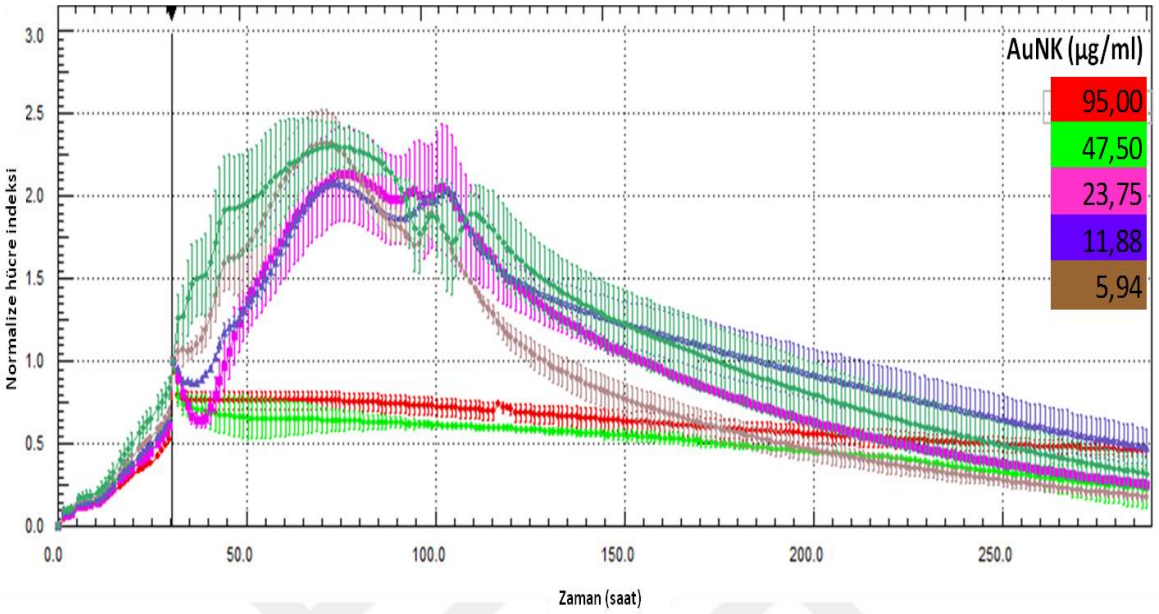
Çizelge 4.2. Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinde zamana bağlı IC_{50} değerleri

IC_{50} (24 saat)	**IC_{50} (48 saat)**	**IC_{50} (72 saat)**
25,5 ± 1,84 µg/ml	52,7 ± 6,08 µg/ml	86,75 ± 6,72 µg/ml

Şekil 4.7'de normalize hücre indeks-zaman grafiği 95 µg/ml ve 47,5 µg/ml AuNK ekledikten hemen sonra hücrelerin ölüp kuyuların tabanından kalktığını ya da hücre membran bütünlüğü bozulduğu için elektriksel empedans değerlerinin hızlıca düştüğünü göstermektedir.

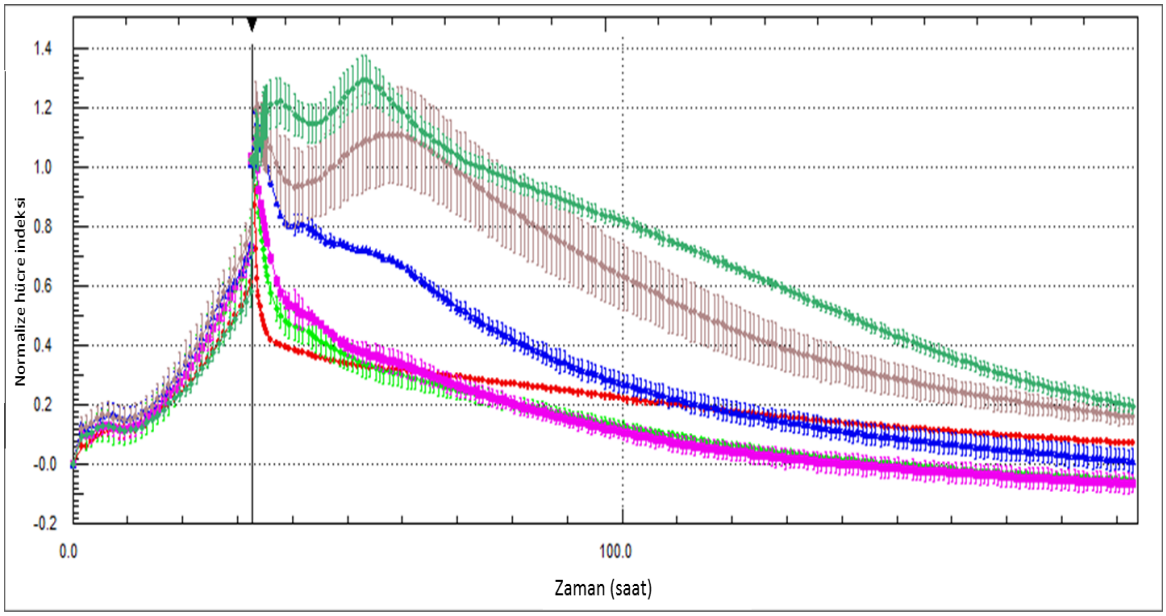
Yüksek miktarlarda intrasellüler AuNK akümülasyonu makrofaj hücrelerinin fonksiyonlarını bozarak hücre canlılığını azalttı. 23,75 µg/ml ve 11,88 µg/ml konsantrasyonlarında ise doz bağımlı olarak başlangıçta düşen CI değerleri hücrelerin adaptasyonu ile kısa süre sonra tekrar yükselmeye başladı. En düşük konsantrasyonda (5,94 µg/ml) ise AuNK ile etkileşime girmemiş kontrol hücrelerinin CI değerlerine benzer değerler ölçüldü. Yaklaşık 70 saat sonra en yüksek ilk iki konsantrasyon hariç (95 µg/ml ve 47,5 µg/ml) diğer kuyulardaki hücreler prolifere olarak konfluense ulaştı. Sonrasında ortamda yeterli besin ve tutunacak alan kalmadığı için CI değerleri zamana bağlı olarak düşüş gösterdi.

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile ayrıca RAW 264.7 hücrelerinin hücre katlama süresi (*cell doubling time*) hesaplandı ve 11,76 ± 1,46 saat bulundu.



Şekil 4.6. Farklı AuNK konsantrasyonlarının (95 µg/ml (kırmızı eğri), 47,5 µg/ml (fosforlu yeşil eğri), 23,75 µg/ml (pembe eğri), 11,88 µg/ml (mavi eğri), 5,94 µg/ml (kahverengi eğri) ve 0 µg/ml (yeşil eğri) RAW 264.7 makrofaj hücre proliferasyonuna etkisinin gerçek zamanlı ve dinamik izlenmesi. CI değerleri madde eklemeden önceki son zaman noktasına (siyah dikey çizgi) göre normalize edildi. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi (n=2). Deney 3 defa tekrarlandı.

Altın nanokafeslerle karşılaştırmak için alumun da RAW 264.7 fare makrofaj hücre canlılığı üzerine olan etkisi xCELLigence RTCA DP (Acea Biosciences, ABD) sistemi ile araştırıldı. FBS'siz DMEM ile hazırlanan farklı alum süspansiyonları (333 µg/ml, 166 µg/ml, 83 µg/ml, 41 µg/ml ve 20 µg/ml) yaklaşık 200 saat boyunca hücrelerle inkübe edildi (Şekil 4.7). Madde kontrol kuyularına eklenen alumun (1 mg/ml) kuyuların tabanında bulunan altın mikroelektrotların empedans ölçümüne hiçbir etkisi olmadı. 20 µg/ml hariç diğer tüm dozlarda hücreler hemen ölüp adezyon özelliğini kaybettiği için CI değerleri hızlı bir düşüş eğilimi gösterdi.



Şekil 4.7. Farklı alum konsantrasyonlarının (333 µg/ml (kırmızı eğri), 166 µg/ml (fosforlu yeşil eğri), 83 µg/ml (pembe eğri), 41 µg/ml (mavi eğri), 20 µg/ml (kahverengi eğri) ve 0 µg/ml (yeşil eğri) RAW 264.7 makrofaj hücre proliferasyonuna etkisinin gerçek zamanlı ve dinamik izlenmesi. CI değerleri madde eklemeden önceki son zaman noktasına (siyah dikey çizgi) göre normalize edilmiştir. Veriler ortalama ± standard sapma (SD) olarak verildi (n=2).

Alumun RAW 264.7 hücrelerinde zamana bağlı IC_{50} değerleri 24. saat için 8,8 µg/ml, 48. saat için 14,3 µg/ml, 72. saat için ise 11,7 µg/ml olarak RTCA 2.0 programı ile hesaplandı. IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında alumun Au nanokafeslere oranla çok daha düşük dozlarda makrofaj hücrelerine sitotoksik etki yaptığı bulundu. xCELLigence RTCA DP sisteminin verdiği sonuçlar ile XTT testi sonuçları literatürde de belirtildiği üzere korrele bulundu [166].

4.4. Au Nanokafeslerin RAW 264.7 Makrofaj Hücrelerinin NO Üretimine Etkisi

NO (nitrik oksit) inflamasyon, nörotoksisite, vazodilatasyon gibi birçok fizyolojik olayın moleküler medyatörüdür. Biyolojik örneklerdeki NO miktarını ölçmek için kullanılan metotlardan biri Griess diazotizasyon (*diazotization*) reaksiyonudur. Bu metot ile fizyolojik şartlar altında NO oksidasyonu sonucu oluşan stabil nitrit (NO_2^-: nitrit) spektrofotometrik olarak tespit edilir [167].

Au nanokafeslerle indüklenen makrofaj hücrelerindeki NO miktarı, NO deteksiyonu için yaygın bir şekilde kullanılan nitrit/nitrat tayinine dayalı Griess kiti ile yapıldı [94, 167, 168]. Ticari olarak temin edilen Griess kitinde (Griess Reagent Kit (G-7921), Molecular Probes Inc., ABD) Komponent A, Komponent B ve Komponent C olmak üzere 3 farklı solüsyon bulunmaktadır. Sülfanilik asit (Komponent A) örneklerdeki nitrit ile reaksiyona girerek diazonyum tuzuna dönüşür. Diazonyum tuzunun *N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride* (Komponent B) ile birleşmesi sonucu oluşan azo boyası spektrofotometrik olarak 548 nm'deki absorbans ölçülerek kantifiye edilir (deteksiyon limiti 1 µM). Nitrit standart solüsyonu (Komponent C) 1 mM deiyonize su içinde hazırlanmış sodyum nitrittir.

Hücre süpernatantlarında bulunan NO tayini için RAW 264.7 hücreleri 40 000 hücre/kuyu şeklinde 96 kuyulu plaklara ekildi ve hücreler tabana yapışana kadar 18-24 saat inkübe edildi. Sonrasında besiyeri aspire edildi ve FBS'siz DMEM içinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda AuNK içeren (15 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml ve 1,25 µg/ml) süspansiyonlar 100 µl hacimde hücrelere verildi. Negatif hücre kontrol kuyularına sadece FBS'siz DMEM, pozitif hücre kontrol kuyularına ise 1 µg/ml LPS içeren FBS'siz DMEM eklendi. Belirlenen sürelerdeki muamele sonrası (24 ve 48 saat) hücre kültür medyumu toplanarak santrifüj edildi. NO üretimi kültür medyumundaki uçucu olmayan stabil yıkım ürünü nitrit konsantrasyonu olarak ölçüldü. Bu amaç için NO deteksiyon kiti (Griess Reagent Kit, Molecular Probes Inc., ABD) kullanıldı. Yöntem kısmında ayrıntılı şekilde anlatılan kit protokolü uygulandı. Süpernatantlarda bulunan nitrit miktarı sodyum nitrit ($NaNO_2$) standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Her bir doz en az 2 tekrarlı çalışılarak deney en az dört defa tekrarlandı.

Sadece AuNK ile uyarılan makrofaj hücreleri uyarılmamış kontrol hücreleri gibi mikromolar düzeyde saptanabilir NO üretmedi (≤ 0 µM). Au nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinde tek başına inflamasyonu tetikleyici etkisi bulunmadı.

LPS ile uyarılmış RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde Au nanokafeslerin NO üretimine etkileri

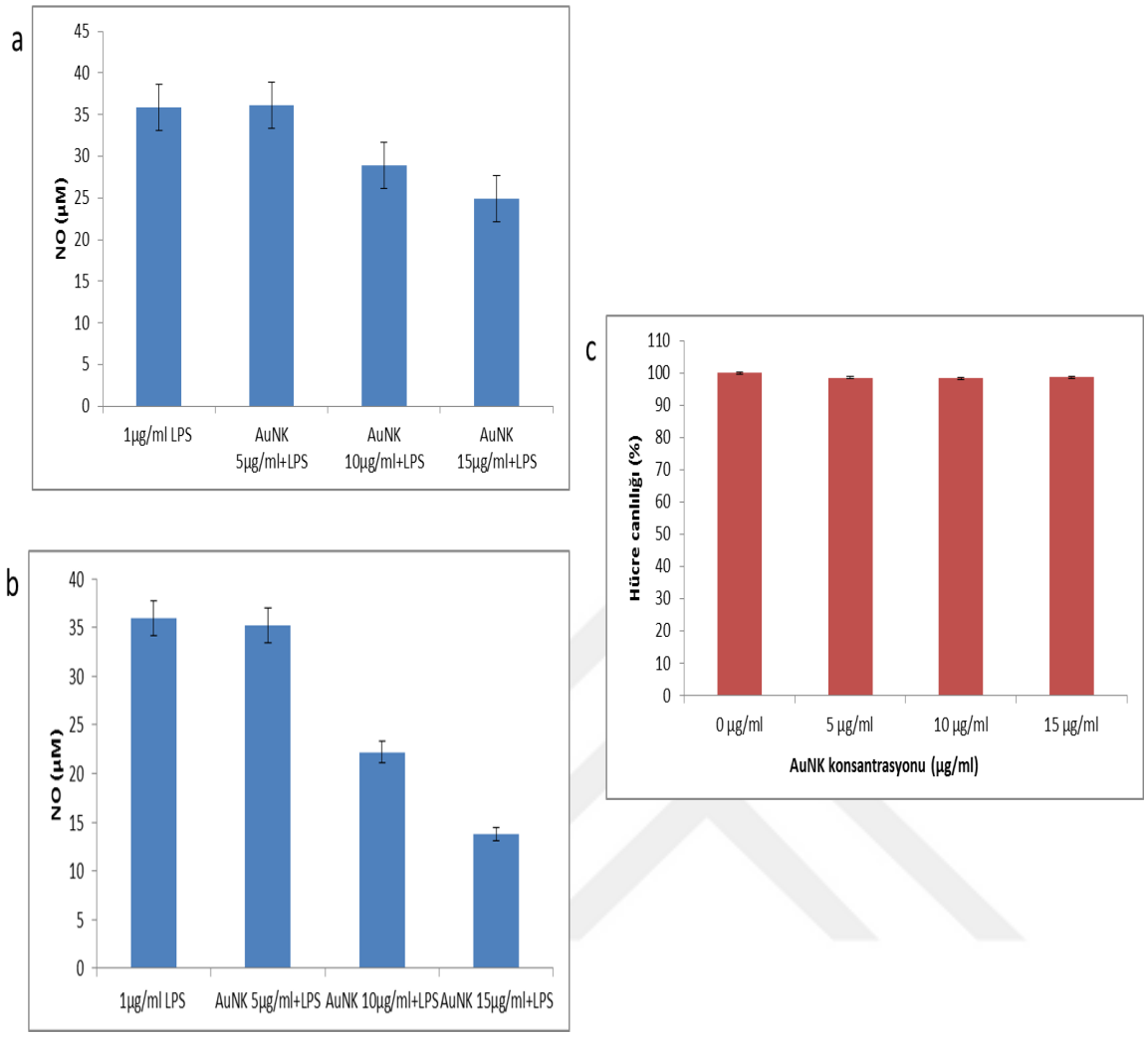
Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO üretimini nasıl etkilediğini bulmak için ilk önce hücreler 1 µg/ml LPS ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml ve 0,3125 µg/ml) Au nanokafeslerle 24 saat ve 48 saat uyarıldı. 24 saat yapılan inkübasyon sonunda sadece LPS ile uyarılan ve NO üretimi %100 kabul edilen pozitif hücre kontrol grubunda 24,77 ± 0,37 µM nitrit ölçülürken, uyarılmamış kontrol hücrelerinde nitrit akümülasyonu tespit edilmedi. Sadece Au nanokafeslerle 24 saat inkübe edilen hücrelerin süpernatantlarında nitrit miktarı kitin en düşük standart konsantrasyonundan (0,78 µM) daha düşük olduğu için ölçülemedi. LPS ve Au nanokafes ile 24 saat uyarılan hücreler ise 10 µg/ml hariç diğer tüm dozlarda sadece LPS ile uyarılan hücrelerdeki ile aynı miktarda NO üretti. Fakat 10 µg/ml AuNK ve 1 µg/ml LPS ile 24 saat uyarılan hücrelerde NO miktarı yaklaşık %34 oranında azalarak 16,44 ± 0,64 µM seviyesine düştü. Altın nanokafes yerine aynı dozlarda alum kullanılan çalışmalarda ise alumun 10 µg/ml dâhil hiçbir dozda sadece LPS ile uyarılan pozitif kontrol hücre grubuna oranla NO miktarında değişikliğe (artma ya da azalma) sebep olmadığı tespit edildi.

Farklı konsantrasyonlardaki (10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml ve 0,3125 µg/ml) Au nanokafeslerle 48 saat uyarılan hücrelerde NO üretimi tespit edilmedi. İnkübasyon süresi 48 saat olan deneylerde ise sadece LPS ile uyarılan hücreler 35,29 ± 0,86 µM NO üretirken, uyarılmamış hücre süpernatantlarında NO tespit edilmedi. İnkübasyon süresi 24 saat olan deneylerde olduğu gibi 48 saat sonunda da LPS ve Au nanokafeslerle eş zamanlı uyarılan hücrelerde sadece 10 µg/ml AuNK dozu için NO miktarında azalma tespit edildi (yaklaşık %23). XTT hücre canlılık testine göre 24 saat ve 48 saatlik muamele sonunda NO üretiminin indüklenmesi ya da inhibisyonu Au nanokafeslerin sitotoksik etkilerinden kaynaklı olmadığı çıkarımına varıldı (canlılık > %95).

Yapılan bu ilk deneylerin sonucunda 10 µg/ml konsantrasyonun altındaki dozların RAW 264.7 hücrelerinin LPS uyarımı sonucu ürettikleri NO miktarı üzerinde doz ya da zaman bağımlı etki göstermediği bulundu. 10 µg/ml'den daha yüksek AuNK dozlarının NO üretimi inhibisyonunu araştırmak için yeni deneyler yapıldı. RAW 264.7 hücreleri 1 µg/ml LPS ve

farklı konsantrasyonlardaki (15 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml) Au nanokafeslerle 24 saat uyarıldı. Sadece LPS ile uyarılan pozitif kontrol grubunda 35,90 ± 1,31 µM ölçüldü. Uyarılmamış kontrol hücrelerinde ve sadece Au nanokafeslerle 24 saat inkübe edilen hücrelerin süpernatantlarında nitrit akümülasyonu tespit edilmedi. Şekil 4.8a'da görüldüğü üzere 24 saatlik uyarım sonunda AuNK doz bağımlı şekilde LPS ile uyarılmış hücrelerdeki nitrit birikimini inhibe etti. Sitotoksisitenin AuNK'ların doz bağımlı anti-inflamatuar etkisine katkıda bulunabileceği tezini çürütmek için AuNK'ların RAW 264.7 hücre canlılığı üzerine etkisi XTT metodu ile araştırıldı. 24 saat boyunca uygulanan dozlarda (15 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml) AuNK'lar sitotoksik etki göstermedi (Şekil 4.8c). XTT hücre canlılık testine göre Au nanokafeslerin inhibitör etkisi hücre hasarından kaynaklı bulunmadı (canlılık > %95).

Au nanokafeslerin LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda NO üretimi üzerindeki etki mekanizmalarını araştırmak için RAW 264.7 hücreleri önce 4 saat farklı konsantrasyonlardaki Au nanokafeslerle ön muamele edildi, sonrasında 20 saat 1 µg/ml LPS ile uyarıldı [169]. Sadece LPS ile uyarılan hücreler hiçbir madde ile uyarılmayan kontrol hücrelerine oranla NO üretimini arttırırken, 4 saat sadece AuNK ve sonrasında aynı ortama eklenen LPS ile uyarılan RAW 264.7 hücrelerinde doz bağımlı olarak NO üretim düzeyi azaldı (Şekil 4.8b). Eş zamanlı uyarım bulgularından farklı olarak NO üretimindeki düşüş daha fazla oldu.

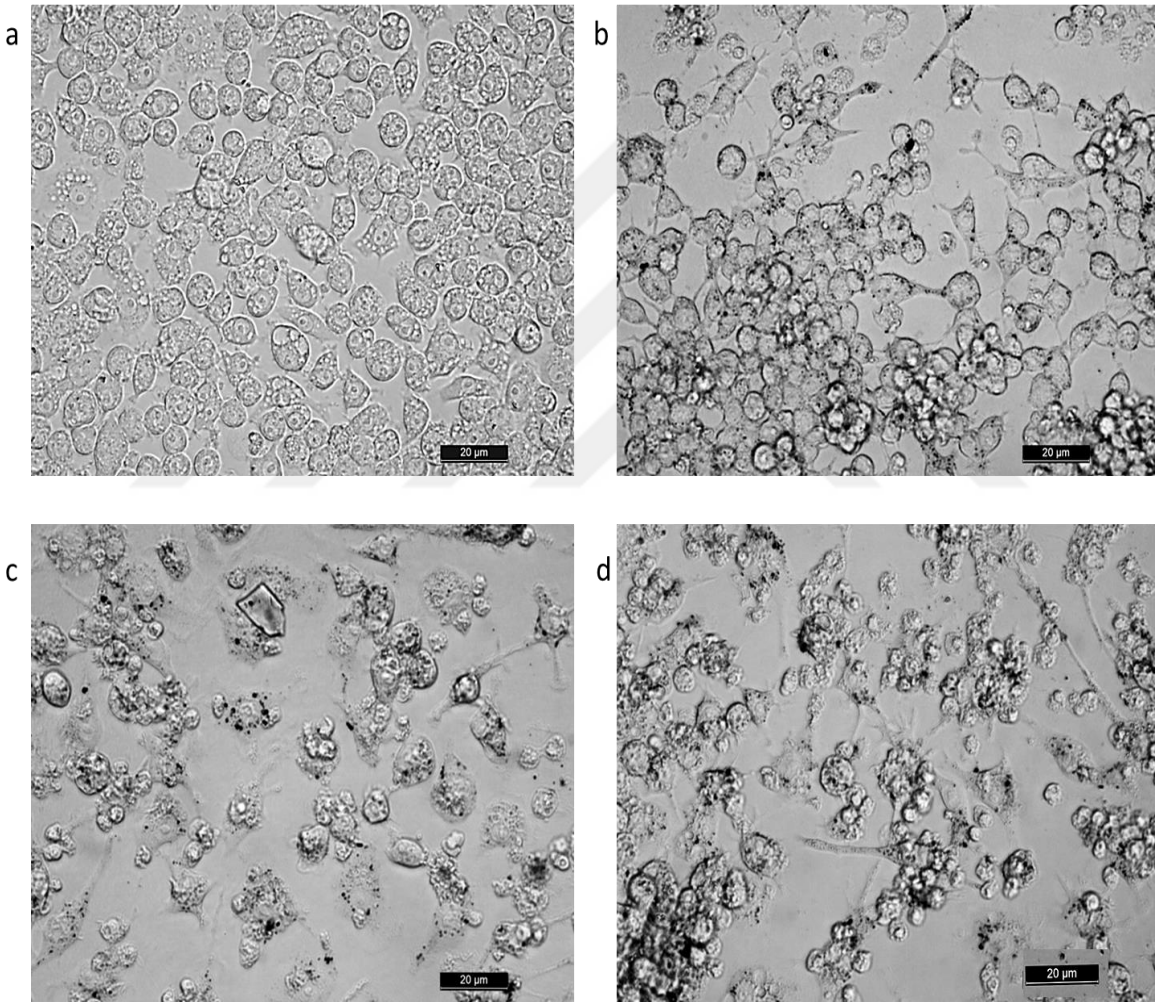


Şekil 4.8. LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde Au nanokafeslerin NO üretimi inhibisyonu. (a) RAW 264.7 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki (15 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml) AuNK ve LPS (1µg/ml) ile 24 saat muamele edildi. Hücre kültür süpernatantlarında NO konsantrasyon tayini Griess metoduyla yapıldı. (b) Farklı konsantrasyonlardaki AuNK ile 4 saat ön muamele edilen RAW 264.7 hücreleri devamında LPS ile 20 saat uyarıldı. NO miktarı Griess metoduyla ölçüldü. (c) RAW 264.7 hücreleri farklı dozlardaki AuNK (15 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml) ile 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı XTT testi ile ölçüldü.

Griess testlerinde kullanılan hücrelerin morfolojik analizi

RAW 264.7 hücreleri LPS (1 µg/ml) ve AuNK (15 µg/ml) ile farklı kombinasyonlarda 24 saat uyarıldı (Resim 4.9). Kontrol hücrelerine nispeten sadece LPS ile uyarılan fare makrofaj

hücrelerinde sayıca azalma olmazken hücreler intrasitozolik vakuol sayısındaki artışla daha granüler bir morfoloji sergiledi (Resim 4.9a). Sadece AuNK (15 µg/ml) (Resim 4.9b), AuNK (15 µg/ml) ve LPS (1 µg/ml) ile eş zamanlı (Resim 4.9c) ve 4 saat AuNK (15 µg/ml) uyarımı sonrasında LPS (1 µg/ml) (Resim 4.9d) ile uyarılan hücrelerde sadece LPS ile uyarılan hücrelere (Resim 4.9a) oranla psödopod uzantılarının miktarında ve uzunluklarında artış görüldü. LPS ile uyarımın Au nanokafeslerin hücre içine alımını etkilemediği kanısına varıldı (Resim 4.9c, Resim 4.9d).



Resim 4.9. AuNK ve LPS ile farklı kombinasyonlarda 24 saat uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde (40 x 10^3 hücre/kuyu) optik mikroskop ile gözlenen morfolojik modifikasyonlar. RAW 264.7 hücreleri sadece LPS (1 µg/ml) (a), sadece AuNK (15 µg/ml) (b), LPS (1 µg/ml) ve AuNK (15 µg/ml) ile eş zamanlı (c) ve önce 4 saat AuNK (15 µg/ml) sonrasında 20 saat LPS ile birlikte (d) 24 saat muamele edildi (Leica, 40X objektif). Ölçek çubuğu 20 µm'dir.

4.5. Au Nanokafeslerin Antijen Adsorpsiyon Yüzdesi ve In Vitro Antijen Salım Testi

Yüzeyi porlu ve içi boşluklu özel bir yapıya sahip altın nanokafeslerin antijen bağlama kapasitesini ve antijen salım özelliklerini araştırmak için hepatit B aşılarında antijen olarak kullanılan rHBsAg (recombinant *Hepatitis B surface antigen*) proteini model antijen olarak kullanıldı. Cell Sciences firmasından ticari olarak solüsyon şeklinde temin edilen (20 mM PB ve 154 mM NaCl içeren solüsyon içinde) *Pichia pastoris* orijinli 24 kDa ağırlığında arınık (steril) rHBsAg proteini saflığı ve düşük endotoksin özelliği (<0,1 ng/µg) ile çalışmalarımızda kullanılmak için uygun bulundu. RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modelinde adsorbe rHBsAg taşıyan altın nanokafeslerin RAW 264.7 hücrelerinin antijen alımı, işlenmesi, sunumu ve aktivasyonu üzerine etkilerini incelemek için öncelikle farklı AuNK:HBsAg formülasyonları hazırlandı. Ayrıca hâlihazırda kullanılan Hepatit B aşılarında rHBsAg'nin adsorbe olduğu alum parçacıkları içeren formülasyonlar da karşılaştırma amaçlı kullanıldı. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak verildi. Süpernatantlardaki rHBsAg protein miktarı bakır temelli (*biuret reaction;* $Cu^{+2} \rightarrow Cu^{+1}$) protein deteksiyon ve kantifikasyon metotlarından biri olan ve düşük konsantrasyondaki proteinleri (0,5-20 µg/ml) kantifiye edebilen yüksek hassasiyetli mikro BCA (*bicinchoninic acid*) testi ile tespit edildi.

Au nanokafeslere nonkovalent bağlanan rHBsAg antijeninin zamana karşı *in vitro* şartlarda salımı ve nanokafeslerin rHBsAg bağlama kapasiteleri (adsorpsiyon) mikro BCA testi ile ölçüldü. AuNK parçacıklarının adsorpsiyon kapasitesi santrifüj sonrası süpernatanta salınan bağlanmamış rHBsAg miktarı ölçülerek aşağıdaki formülle hesaplandı [5]:

AK (%) = [mt – ms] / mt × 100, (AK: Adsorpsiyon kapasitesi, mt: Kullanılan toplam antijen miktarı, ms: Süpernatantda bulunan antijen miktarı)

4 °C'de 70 rpm hızla çalkalanarak 15 saat boyunca karıştırılan formülasyonların adsorpsiyon kapasiteleri Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'te verildi. Au nanokafeslerin aluma oranla adsorpsiyon kapasitesinin yüksek olduğu ve bu durumun nanokafes miktarının az olduğu formülasyonlar da bile değişmediği saptandı. Pelletlerde yapılan protein ölçüm sonuçları da antijenin AuNK ve alum parçacıklarında adsorbe kaldığı sonucunu doğruladı.

Au nanokafeslerin porlu yapısının antijen adsorpsiyon kapasitesini arttıran önemli bir parametre olduğu düşünüldü [170]. Antijen miktarı sabit tutulup nanokafes ve alum miktarlarının değiştirildiği formülasyonlarda pozitif yüklü alumun adsorpsiyon kapasitesinin alum miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı tespit edildi. Artan AuNK miktarı ile HBsAg antijeninin adsorbsiyon kapasitesinde artış olmadı. Bunun nedeni olarak negatif yüklü Au nanoparçacıkların (-7,46 ± 5,70) nötral pH (pH=7) ortamında negatif yüklü HBsAg parçacıkları [171, 172] ile elektrostatik itmeden kaynaklı %100 bağlanma yapamamış olması düşünüldü.

Çizelge 4.3. Au nanokafeslerin HBsAg adsorpsiyon kapasitesi

AuNK:HBsAg Formülasyonları (µg:µg)	**%Adsorpsiyon Kapasitesi**
2,5:20	70,25 ± 0,16
5,0:20	68,4 ± 0,09
7,5:20	69,95 ± 0,07
10:20	69,9 ± 0,05

Çizelge 4.4. Alum adjuvanının HBsAg adsorpsiyon kapasitesi

Alum:HBsAg Formülasyonları (µg:µg)	**% Adsorpsiyon Kapasitesi**
2,5:20	37,9 ± 0,35
5,0:20	42,8 ± 0,16
7,5:20	48,65 ± 0,05
10:20	53,45 ± 0,02

Sıcaklığın Au nanokafeslerin adsorpsiyon kapasitesine olan etkisini araştırmak için farklı sıcaklıklar denendi. Adsorpsiyon kapasitesi AuNK:HBsAg (5µg:20µg) için 37 °C sıcaklıkta %66,18 ± 0,52; 4 °C'de ise %65,43 ± 0,24 bulundu. AuNK'ların rHBsAg bağlama kapasitesinin sıcaklığa bağlı bir değişim göstermediği tespit edildi.

Zamana bağlı antijen salım yüzdesi hesaplanırken belirli süreler sonunda toplanan süpernatantlardaki protein miktarları mikro BCA kiti ile ölçüldü [126]. AuNK:HBsAg (10µg:20µg ve 10µg:40µg) ve Alum:HBsAg (10µg:20µg) formülasyonlarında 1. saat sonunda yüksek miktarda antijen salımı (*initial burst effect*) tespit edildi. Yüzde kümülatif HBsAg salımı aşağıdaki formüle göre hesaplandı [126]:

% kümülatif salım = $([HBsAg]_t)/([HBsAg]_0)$ x 100. $[HBsAg]_t$: t zamanında süpernatantda bulunan HBsAg konsantrasyonu, $[HBsAg]_0$: t_0 zamanında adsorbe HBsAg konsantrasyonu

% kümülatif HBsAg salımı 37 °C sıcaklıkta 1. saatin sonunda Au nanokafes formülasyonları için %47,05 ± 0,42 (10µg:20µg) ve %51,85 ± 0,60 (10µg:40µg); alum için %56,1 ± 0,27 (10µg:20µg) bulundu. Porlu yapısından dolayı (kafes özelliği) aluma oranla AuNK'lardan salım daha az oldu. rHBsAg antijeninin Au nanokafeslere bağlanmasının elektrostatik interaksiyon ile gerçekleştiği ve yüksek adsorpsiyon kapasitesine rağmen Au nanokafeslerden hızlı antijen salımının antijen substrat bağlanmasındaki elektrostatik (iyonik) interaksiyondan kaynaklı olduğu düşünüldü.

Çizelge 4.5. % Kümülatif HBsAg salımı

Formülasyonlar (µg:µg)	**% Kümülatif HBsAg Salımı**
AuNK:HBsAg (10µg:20µg)	47,05 ± 0,42
AuNK:HBsAg (10µg:40µg)	51,85 ± 0,60
Alum:HBsAg (10µg:20µg)	56,1 ± 0,27

4.6. rHBsAg'nin In Vitro Antijenitesinin İncelenmesi

Antijenin denatürasyonu ya da deaktivasyonu yetersiz immün cevap oluşumuna neden olabilir. HBsAg parçacıklarının yapısal bütünlüğü ve immünolojik özellikleri arasında yakın bir ilişki vardır [173]. *İn vitro* antijeniteyi tespit etmek için serum ya da plazmasında Hepatit B virüsünün yüzey antijenini tespit için kullanılan sandviç tipinde tek basamaklı bir enzim-bağlı immunosorbant asey tekniği olan Monolisa HBs Ag ULTRA testi kullanıldı. Tabanı yakalayıcı antikor olarak monoklonal anti-HBsAg antikorları (fare) ile kaplı 8 kuyulu stripler içeren bu kit niteleyici deteksiyon için uygundur. Kit içeriğinde pozitif kontrol (ad ve ay tiplerinden pürifiye edilmiş HBsAg eklenmiş BSA içeren Tris HCl çözeltisi) ve negatif kontrol (BSA içeren Tris HCl çözeltisi) bulunmaktadır. AuNK:HBsAg formülasyonlarından ekstrakte edilen rHBsAg *in vitro* antijenite deteksiyonu için Monolisa HBs Ag ULTRA kitinde kullanıldı. Kit içeriğinde bulunan internal negatif ve pozitif kontroller dâhil tüm örneklerin absorbansı 450 nm'de (referans dalga boyu 650 nm) mikroplaka okuyucuda (Epoch, BioTek, ABD) ölçüldü. rHBsAg antijenine spesifik bağlanma özelliğine sahip monoklonal ve poliklonal anti-HBsAg antikorları ile tabanı kaplı kuyulara eklenen örneklerde HBsAg tespit edildi. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerin OD_{450} değerleri ile karşılaştırılarak nispi olarak analiz edildi. HBsAg pozitif kontrolün OD_{450} değeri 2,28, negatif kontrolün OD_{450} değeri ise 0,06 ölçüldü. Kitte verilen formüle göre (negatif kontrolün OD_{450} değeri + 0,05) cut-off değeri 0,11 hesaplandı. Örneklerin oran hesabı (OD örnek/Cut-off değeri) yapıldı. Oranı ≥ 1 olan örnekler pozitif kabul edildi. Monolisa HBs Ag ULTRA kiti 4 ˚C'de AuNK ile inkübe edilen rHBsAg proteininin yapısal bütünlüğünün korunduğunu; geri dönüşümsüz agregasyonların, parçalanmaların ya da konfirmasyon değişikliklerinin olmadığını gösterdi [174, 175]. AuNK'ya adsorbe olmuş rHBsAg antijeninin degradasyonu tespit edilmedi. Formülasyonlarda kimyasal etkileşim (moleküler hidroliz gibi) ya da kovalent agregasyon görülmedi.

Ayrıca, 37 °C sıcaklıkta yapılan adsorpsiyon deneylerinden ekstrakte edilen süpernatantlardaki HBsAg antijeninin de Monolisa HBs Ag ULTRA kitiyle yapılan analizlere göre yapısal değişiklik göstermediği bulundu. 37 °C sıcaklıkta karıştırılan rHBsAg parçacıklarının yapısında agregasyon, kimyasal değişim (örneğin oksidasyon) gibi proteinin sekonder yapısını bozup (α-sarmal ve β-yaprak oranı gibi) antijenik epitoplardaki değişim

nedeniyle antijenite kaybı ile sonuçlanabilecek ciddi alterasyonların olmadığı bulundu [173].

Çizelge 4.6. AuNK:HBsAg formülasyonlarından ekstrakte edilen HBsAg örneklerinin Monolisa HBs Ag ULTRA kitiyle tespit edilen OD_{450} değerleri

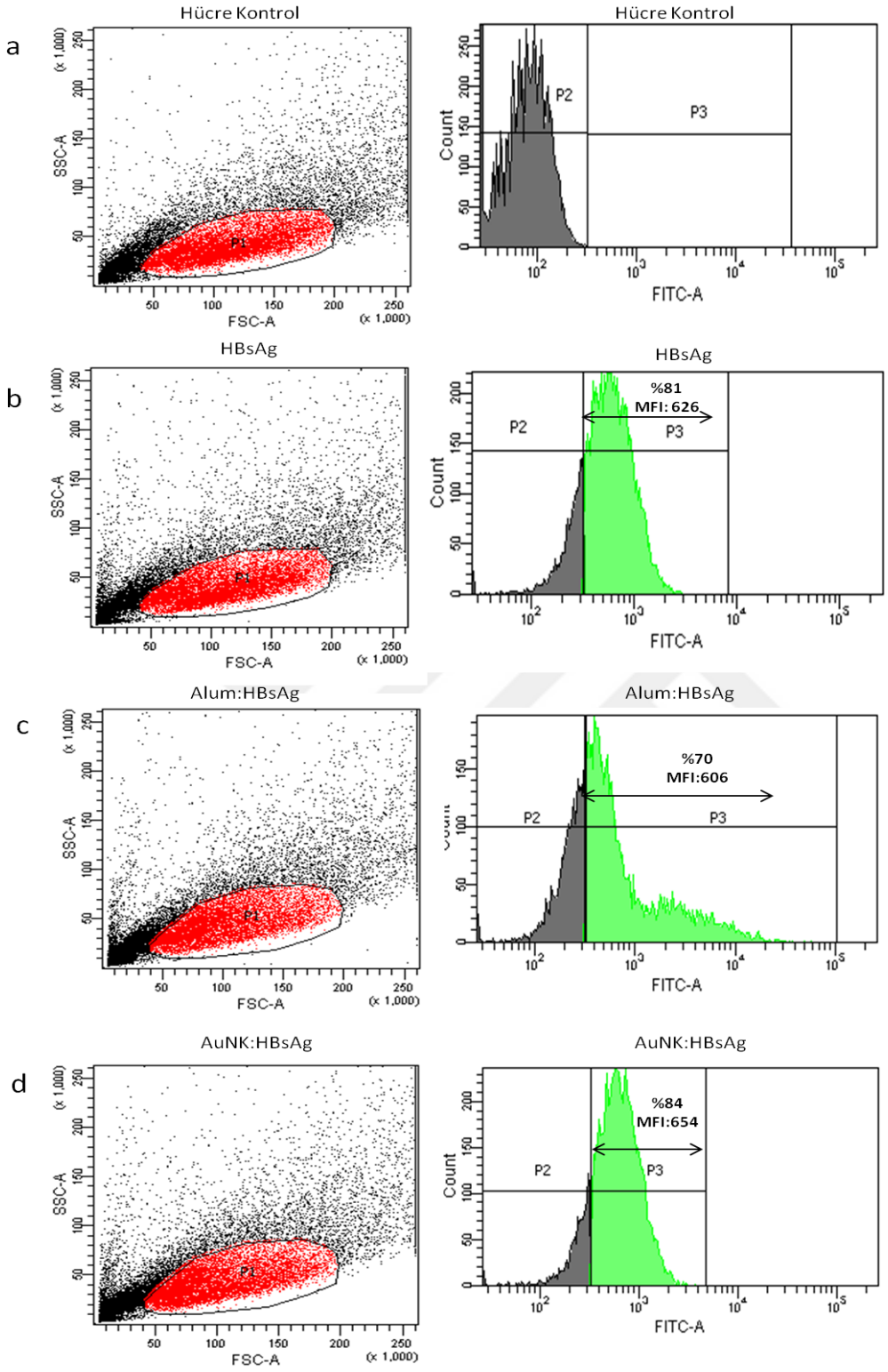
AuNK:HBsAg Formülasyonları (µg:µg)	OD_{450}
2,5:20	3,75 ± 0,018
5,0:20	3,75 ± 0,047
7,5:20	3,82 ± 0,002
10:20	3,79 ± 0,119
5:20 (4 ˚C)	3,80 ± 0,031
5:20 (37 ˚C)	3,81± 0,015
Negatif Kontrol	0,006± 0,002

4.7. Makrofajların HBsAg Alımının Akım Sitometri ile Analizi

rHBsAg proteinin moleküler ağırlığının küçük (24 kDa) olmasından dolayı proteini işaretlemek için Alexa Fluor 488 mikroskala protein işaretleme kiti kullanıldı. Özellikle moleküler ağırlığı küçük proteinleri (12-150 kDa) işaretlemekte özelleşmiş bu kitte kullanılan Alexa Fluor 488 boyası tetra florofenil (TFP: *tetra fluorophenyl*) ester fonksiyonel grubu içerir. TFP protein yapılarında bulunan primer amin gruplarıyla kararlı, parlak ve fotostabil boya-protein floresin konjugatları oluşturur.

Yarı nicel olan akım sitometri hücre içi parçacık alım çalışmalarında kullanımı tavsiye edilen bir yöntemdir [23, 176]. Au nanokafeslerin hücre içine antijen alımına etkilerini

araştırmak için makrofaj hücreleri işaretlenmiş rHBsAg* içeren farklı antijen formülasyonları ile (saf rHBsAg*, AuNK:HBsAg* veya Alum:HBsAg*) hücrelere verilen işaretli antijen konsantrasyonu yaklaşık 1 µg/ml olacak şekilde inkübe edildi. Akım sitometri cihazında (FACS Aria III, Becton Dickinson Inc., ABD) okutulan örnekler FACS Diva (Sürüm 6.1.3) programıyla FL1 kanalında analiz edilerek her bir gruptaki Alexa Fluor 488 pozitif hücre yüzdesi saptandı. Her bir örnek için toplam $2x10^4$ events yani $2x10^4$ hücre analiz edildi. P1 (Parent 1) kapısı alınarak hücre debrisi gibi gürültüler analiz dışı bırakıldı. P1 altında analiz edilen P2 (Parent 2) floresan negatif hücre yüzdesini P3 (Parent 3) ise floresan pozitif hücre yüzdesini göstermektedir. Sadece rHBsAg* antijeni ile inkübe edilen hücrelerde floresan pozitif hücre yüzde oranı %81 (MFI: 626) (Şekil 4.9b); aluma bağlanan rHBsAg* antijeni ile inkübe edilen hücrelerde oran %70 (MFI: 606) (Şekil 4.9c) ve altın nanokafeslere bağlanan rHBsAg* ile inkübe edilen hücrelerde ise oran %84 (MFI: 654) (Şekil 4.9d) bulundu. Au nanokafeslere bağlı antijenin rHBsAg* ve aluma adsorbe antijene oranla RAW 264.7 makrofajları tarafından hücre içine alımının arttığı görüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Au nanokafeslere adsorbe rHBsAg* (yeşil) antijeninin 24 saat sonra hücre içine alımı. (a) Hücre kontrol. (b) HBsAg* (1 µg/ml) ile muamele edilmiş RAW 264.7 hücreleri. (c) Alum:HBsAg* ile muamele edilmiş RAW 264.7 hücreleri. (d) AuNK:HBsAg* ile muamele edilmiş RAW 264.7 hücreleri.

4.8. HBsAg Antijeninin İntrasellüler Lokalizasyonunun Konfokal Mikroskopi Yöntemiyle Araştırılması

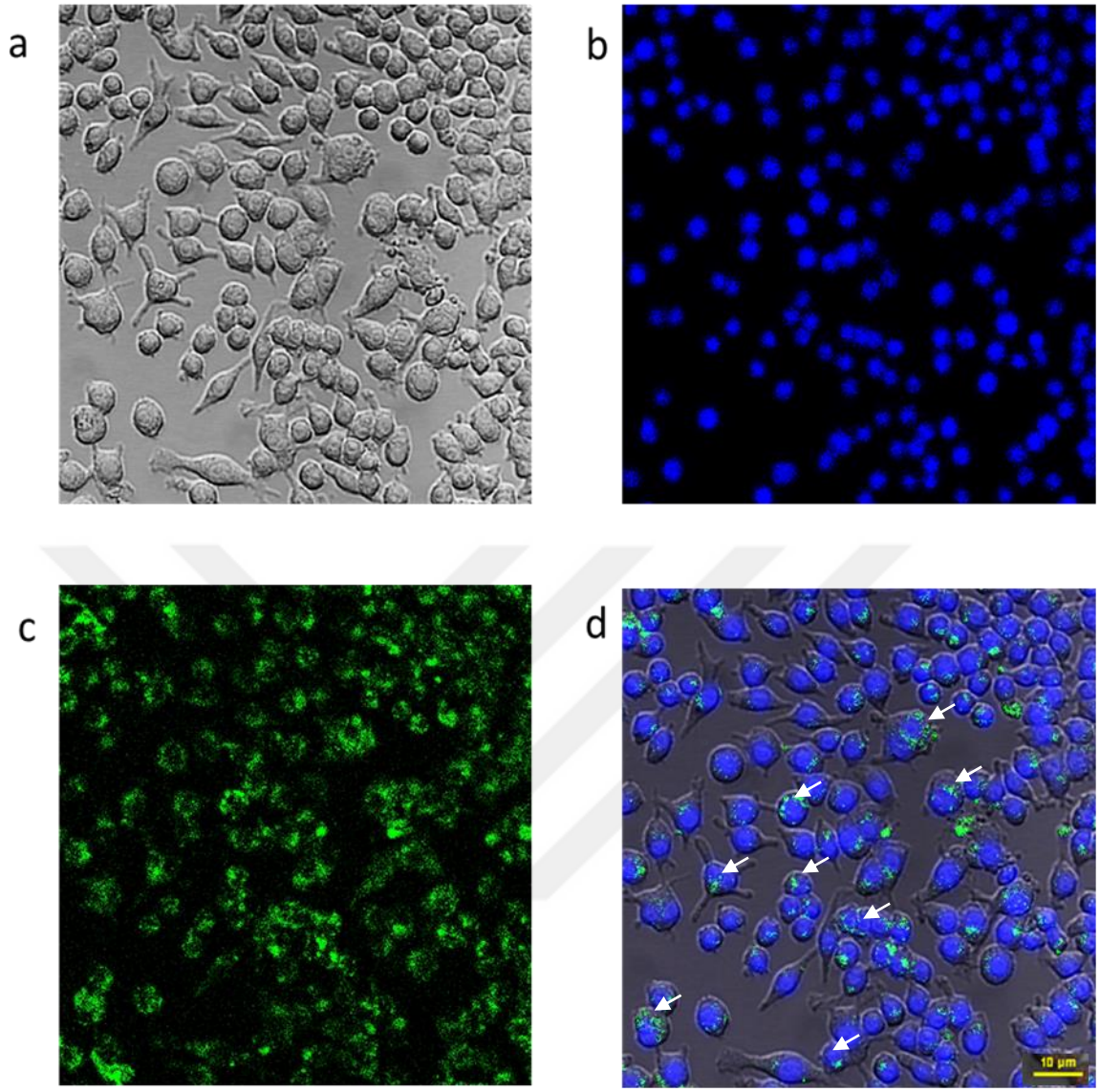
Hazırlanan farklı AuNK-HBsAg* formülasyonlarının rHBsAg* antijeninin intrasellüler lokasyonunu nasıl etkilediği konfokal mikroskopi yöntemi ile araştırıldı [150]. Boyama öncesi hücre yüzeyine yapışan parçacıklar PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Devamında hücreler paraformaldehit ile fikse edilerek hücre morfolojileri korundu. Nanoparçacıklar ve hücreler arasındaki etkileşimi göstermek için hücre membranı Alexa Fluor 680 Phalloidin (kırmızı), hücre çekirdeği ise DAPI (mavi) ile boyandı. Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg'nin hücre içi lokalizasyonunu takip edebilmek için lizozomlar LysoTracker probu (turuncu) ile boyandı. Konfokal mikroskobun z-yığınlama (z-stack) özelliği kullanılarak hücrelerin 3 boyutlu (3D) görüntüleri alındı. 3D görüntüler hücre yüzeyine yapışan ve hücre içine alınan parçacıkları efektif bir şekilde ayırt etmeyi sağladı.

Resim 4.10'da AuNK:HBsAg* ile 24 saat inkübe edildikten sonra çekirdekleri DAPI ile boyanan RAW 264.7 hücreleri ($4x10^5$ hücre/ml) görülmektedir. Resim 4.10a makrofajların genel görüntülerini (TD detektör ile çekilen beyaz alan görüntüsü), 4.10b sadece DAPI (mavi) ile işaretli hücre çekirdeklerini, 4.10c sadece Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg* antijenlerinin hücre içi lokasyonlarını göstermektedir. Resim 4.10d ise DAPI, Alexa Fluor 488 ve beyaz alan görüntülerinin birleştirilmiş (*merged*) halidir. Konfokal mikroskop görüntüleri nanoparçacıkların efektif bir şekilde RAW 264.7 hücreleri tarafından internalize edildiğini ve sitoplazmik kompartımanlarda akümüle olup hücre çekirdeğine girmediğini göstermiştir.

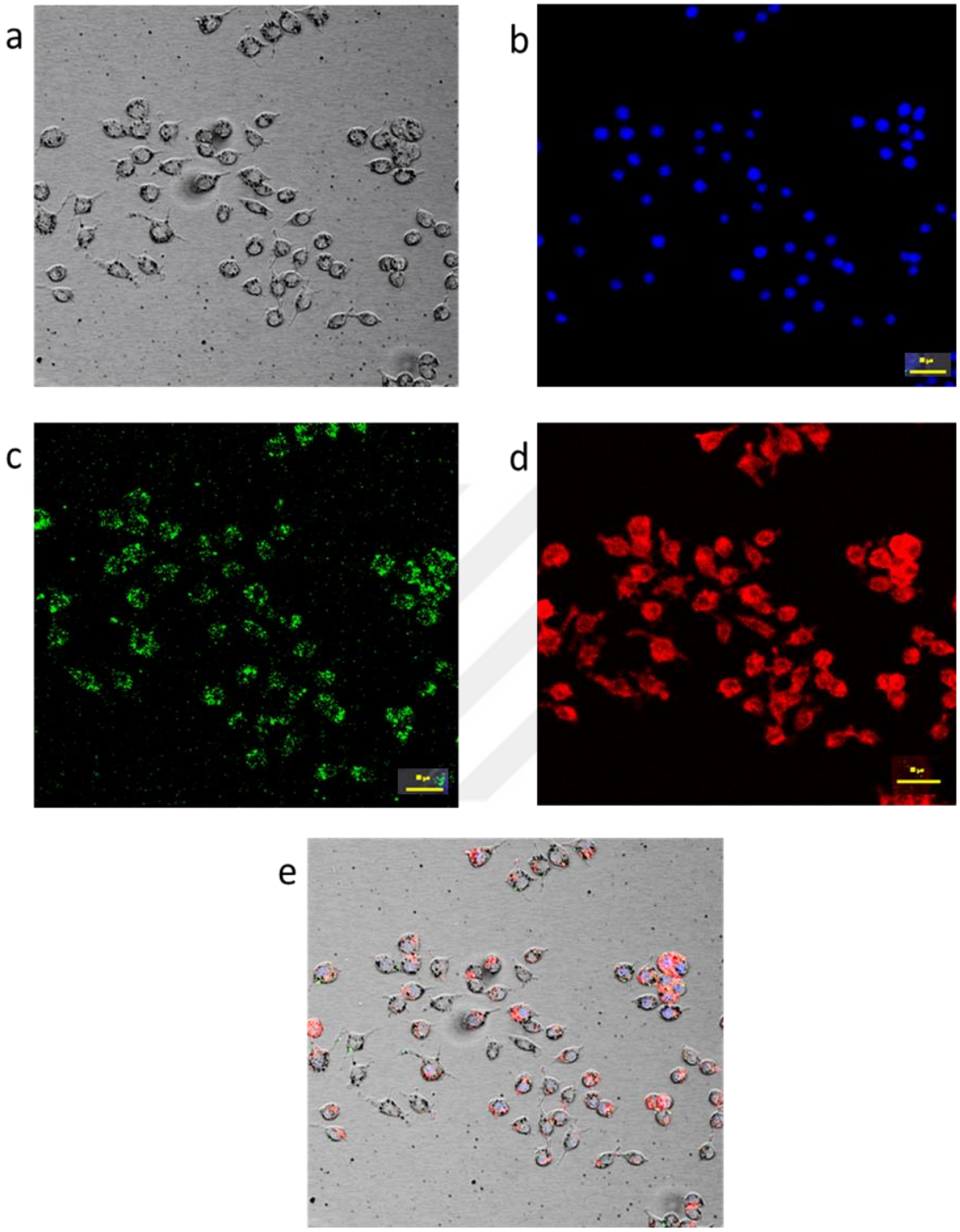
Resim 4.11'de AuNK:HBsAg* ile 24 saat inkübe edildikten sonra çekirdekleri DAPI (mavi), hücre iskeletleri (aktin filamentleri) Alexa Fluor 680 Phalloidin (kırmızı) ile boyanan RAW 264.7 hücreleri görüntüledi. Resim 4.11a hücre içine alınan AuNK parçacıklarını (siyah noktalar) beyaz alanda net bir şekilde göstermektedir. Resim 4.11b DAPI (mavi) işaretli hücre çekirdeklerini, Resim 4.11c Au nanokafeslere adsorbe Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg* antijenlerinin hücre içi lokasyonlarını, Resim 4.12d Alexa Fluor 680 (kırmızı) işaretli hücre membranlarını göstermektedir. Resim 4.11e ise tüm kanalların üst üste çakıştırılmış (*merged*) görüntüsüdür. Alexa Fluor 680 Phalloidin ile hücre membranları

boyanmış hücrelerden alınan imajlar incelendiğinde Au nanokafeslere adsorbe olan rHBsAg antijeninin hücre içine alınıp sitoplazmada lokalize olduğu bir kez daha doğrulanmıştır.

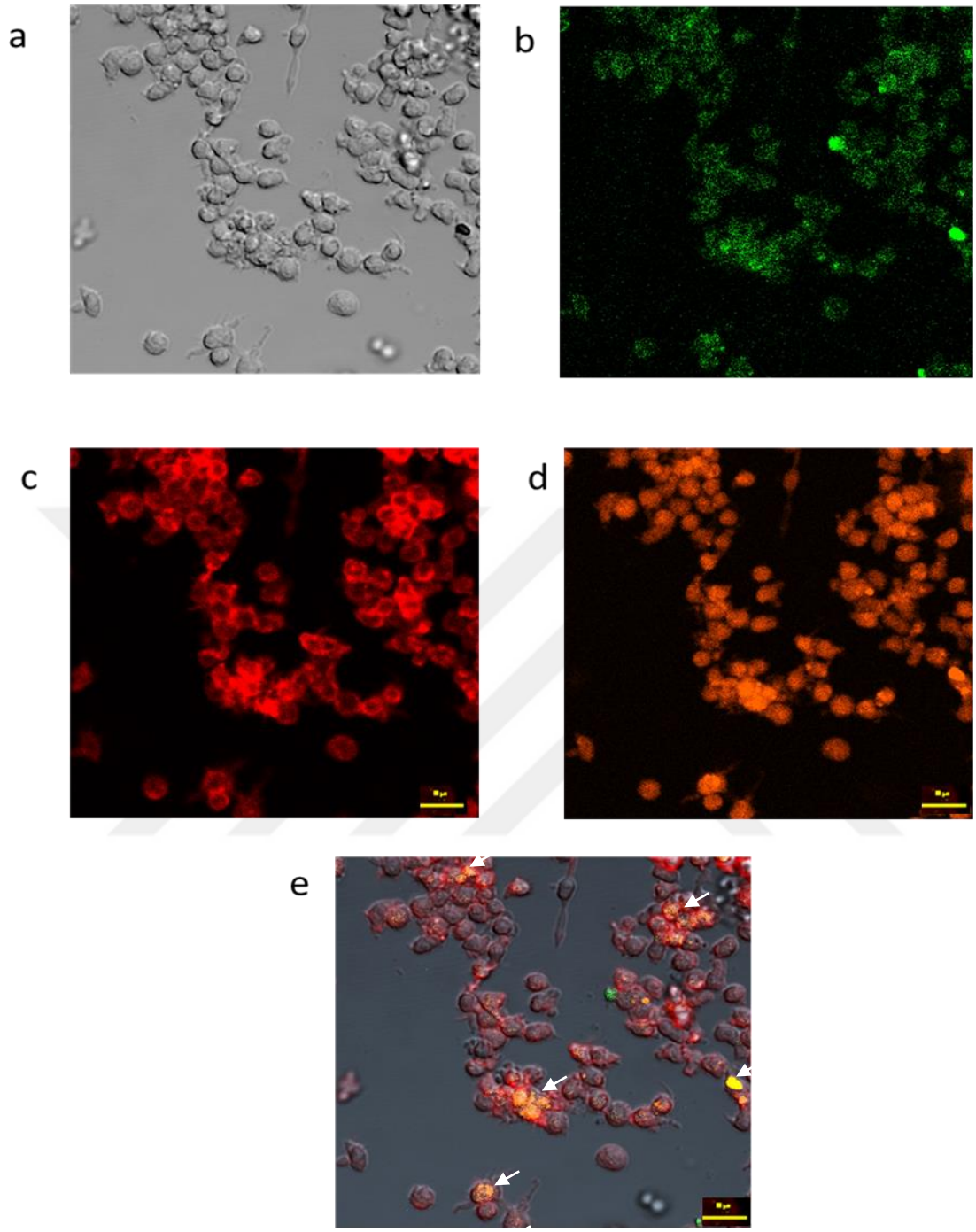
Resim 4.12'de AuNK:HBsAg* ile 24 saat muamele edildikten sonra çekirdekleri DAPI (mavi), hücre membranları Alexa Fluor 680 Phalloidin (kırmızı) ve lizozomları LysoTracker Red DND-99 (turuncu) ile boyanan RAW 264.7 hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülendi. Resim 4.12a hücrelerin beyaz alan görüntüsünü, Resim 4.12b Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg* antijenlerinin hücre içi internalizasyonunu, Resim 4.12c Alexa Fluor 680 Phalloidin (kırmızı) işaretli hücre membranlarını, Resim 4.12d LysoTracker Red DND-99 (turuncu) işaretli sitoplazmadaki lizozomları göstermektedir. Resim 4.12e ise tüm kanalların çakışmış halidir. Au nanokafeslere adsorbe Hepatit B yüzey antijenlerinin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin lizozomlarında lokalize olduğu (sarı alanlar) görülmüştür.



Resim 4.10. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve çekirdekleri DAPI ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri. Au nanokafeslere adsorbe Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg* ile 24 saat inkübe edilen RAW 264.7 hücreleri (c), DAPI (mavi) çekirdek boyası (1 µg/ml) ile boyandı (b). Beyaz oklar sitoplazmada biriken AuNK:HBsAg* yapılarını göstermektedir. Ölçek çubuğu 10 µm'dir.



Resim 4.11. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve hücre membranları Phalloidin ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri. Au nanokafeslere adsorbe Alexa Fluor 488 (yeşil) işaretli rHBsAg* (c) ile 24 saat inkübe edilen RAW 264.7 hücrelerinin ($4x10^5$ hücre/ml), çekirdekleri DAPI (mavi; 1µg/ml) (b), hücre membranları Phalloidin (kırmızı; 5 ünite/ml) (d) ile boyandı. Ölçek çubuğu 10 µm'dir.



Resim 4.12. AuNK:HBsAg* ile inkübe edilen ve lizozomları LysoTracker Red ile boyanan makrofaj hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri. RAW 264.7 hücreleri AuNK:HBsAg* (yeşil) ile 24 saat inkübe edildikten sonra (b), hücre membranları Phalloidin (kırmızı; 5 ünite/ml) (c), lizozomları LysoTracker Red (turuncu; 100 nM) (d) ile boyandı. Hücre içine alınan nanoparçacıklara bağlı antijenler lizozom organellerinde (sarı noktalar) tespit edildi (e). Ölçek çubuğu 10 µm'dir.

4.9. Au Nanokafeslerin MHC Sınıf I, MHC Sınıf II ve CD86 Moleküllerine Etkisinin Akım Sitometri ile Analizi

Altın nanokafeslerin makrofaj hücrelerinin antijen sunumunda ve aktivasyonunda görev alan MHC sınıf I, MHC sınıf II ve yardımcı stimülan CD86 moleküllerinin ekspresyonu üzerine etkisi akım sitometri tekniğiyle araştırıldı [3, 150]. Hücreler 24 saat rHBsAg (40 µg/ml), AuNK (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml), alum (5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml), AuNK:HBsAg (5 µg/ml:40 µg/ml, 10 µg/ml:40 µg/ml, 15 µg/ml:40 µg/ml ve 20 µg/ml:40 µg/ml) veya Alum:HBsAg (5 µg/ml:40 µg/ml, 10 µg/ml:40 µg/ml, 15 µg/ml:40 µg/ml ve 20 µg/ml:40 µg/ml) ile inkübe edildi. Muamele görmemiş hücreler negatif kontrol, LPS (1 µg/ml) ile 24 saat uyarılan hücreler pozitif kontrol seçildi. Hücreler fenotip analizi için MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 moleküllerine spesifik bağlanan monoklonal antikorlarla boyandı. Akım sitometrisi ile MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon düzeylerine bakıldı. Sonuçlar floresan pozitif hücre yüzdeleri analiz edilerek Çizelge 4.7, Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da verildi. Bu sonuçlara göre LPS (1 µg/ml) ile 24 saat uyarılan makrofajlarda uyarılmamış hücrelere oranla $CD86^+$ hücre yüzdesinde yaklaşık 5 kat ve MHC sınıf II^+ hücre yüzdesinde ise yaklaşık 3 kat artış saptandı.

Çizelge 4.7'de rHBsAg antijeninin Au nanokafeslerle birlikte hücreye verilmesinin makrofajlardaki CD86 molekülü yüzey ekspresyonunu arttırdığı gösterildi. Sadece rHBsAg (40µg/ml) ile 24 saat inkübasyon sonrası %11,45 ± 0,35 olan $CD86^+$ makrofaj hücre yüzdesi AuNK:HBsAg (20 µg/ml:40 µg/ml) inkübasyonu sonrası %34,65 ± 0,49'a yükseldi. Antijenin alum adjuvanı ile birlikte verilmesinin CD86 pozitif hücre yüzdesine etkisi Au nanokafeslerdeki kadar vurgulu olmadı. En yüksek alum dozunun kullanıldığı formülasyonda bile $CD86^+$ hücre yüzdesi %20 ± 0,27 ölçüldü. MHC sınıf I^+ hücre yüzdeleri uyarılmamış ve LPS ile uyarılmış hücre grupları da dâhil olmak üzere tüm gruplarda %90'ın üzerinde bulundu. RAW 264.7 makrofaj hücre hattında farklı formülasyonların MHC sınıf I moleküllerinin yüzey ekspresyonlarına *in vitro* şartlarda hiçbir etkisi olmadı. MHC sınıf II molekül ekspresyon seviyeleri ise sadece yüksek konsantrasyonda (15 µg/ml:40 µg/ml ve 20 µg/ml:40 µg/ml) AuNK içeren formülasyonlarla uyarılan hücrelerde yalnız HBsAg (%27,6 ± 0,57) ile uyarılan hücrelere oranla artış gösterdi (%29,55 ± 0,35 ve %31,5 ± 0,28).

Alum formülasyonları için artış değil hatta sadece rHBsAg ile inkübe edilen hücrelere oranla azalma gözlendi (< %27,6).

Çizelge 4.7. Farklı formülasyonlarla uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri

GRUPLAR	CD86 (%)	MHC Sınıf II (%)	MHC Sınıf I (%)
Hücre Kontrol	11,15 ± 2,13	17,07 ± 0,50	95,20 ± 5,47
HBsAg (40 µg/ml)	11,45 ± 0,35	27,6 ± 0,57	96,9 ± 2,15
LPS (1 µg/ml)	50,65 ± 1,85	50,75 ± 0,93	96,43 ± 2,97
AuNK (5 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	23,8 ± 0,28	26,8 ± 0,14	97,05 ± 2,31
AuNK (10 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	28,5 ± 0,71	28,55 ± 0,49	97,8 ± 3,21
AuNK (15 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	30,75 ± 0,07	29,55 ± 0,35	98,3 ± 2,26
AuNK (20 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	34,65 ± 0,49	31,5 ± 0,28	97,9 ± 1,87
Alum (5 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	16,4 ± 0,85	18,3 ± 0,28	92,7 ± 0,85
Alum (10 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	17,5 ± 0,75	22,15 ± 0,35	94,8 ± 2,99
Alum (15 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	18,3 ± 0,28	23,65 ± 0,21	95,4 ± 1,35
Alum (20 µg/ml):HBsAg (40 µg/ml)	20 ± 0,27	25,65 ± 0,34	96 ± 3,11

Çizelge 4.8'de farklı konsantrasyonlarda Au nanokafes ya da alum ile inkübe edilen RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre popülasyon yüzdeleri gösterildi. Au nanokafesler ile uyarılan hücrelerin $CD86^{+}$ hücre yüzdesinin

uyarılmamış kontrol hücrelerine (%11,15 ± 2,13) oranla arttığı, özellikle AuNK (35 µg/ml) için bu artışın yaklaşık 2,5 katına çıktığı (%26,75 ± 0,35) tespit edildi. Sadece alum ile uyarılan hücrelerde CD86 moleküllerinin yüzey ekspresyonlarında önemli bir artış olmadı. MHC sınıf II ekspresyonu hem AuNK hem de alum içeren gruplarda negatif kontrol hücrelerine oranla arttı. MHC sınıf I^+ makrofaj hücre yüzdesi tüm gruplarda %90'ın üzerinde saptandı.

Çizelge 4.8. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri

GRUPLAR	CD86 (%)	MHC Sınıf II (%)	MHC Sınıf I (%)
Hücre Kontrol	11,15 ± 2,13	17,07 ± 0,50	95,20 ± 5,47
LPS (1 µg/ml)	50,65 ± 1,85	50,75 ± 0,93	96,43 ± 2,97
AuNK (5 µg/ml)	15,4 ± 2,69	21,7 ± 1,13	92,65 ± 5,59
AuNK (10 µg/ml)	21,7 ± 2,26	25,85 ± 0,07	98,3 ± 1,12
AuNK (15 µg/ml)	18,35 ± 0,21	23,8 ± 1,41	99,11 ± 0,14
AuNK (25 µg/ml)	22,9 ± 3,82	27,25 ± 0,92	97,25 ± 0,92
AuNK (35 µg/ml)	26,75 ± 0,35	30,45 ± 0,35	97,15 ± 0,92
Alum (5 µg/ml)	10,85 ± 0,35	23,45 ± 0,21	96,6 ± 0,15
Alum (10 µg/ml)	12,05 ± 0,70	24 ± 0,14	97,1 ± 1,20
Alum (15 µg/ml)	13,65 ± 0,35	23,05 ± 1,20	97,7 ± 0,70
Alum (20 µg/ml)	14,55 ± 0,7	26,9 ± 0,57	97,3 ± 1,16

Çizelge 4.9'da sadece farklı dozlarda Au nanokafesler ile uyarılan hücreler dışında AuNK ve LPS ile birlikte 24 saat uyarılan hücrelerin fenotip profilleri verildi. Sadece LPS ile uyarılan hücrelere oranla Au nanokafes ve LPS ile birlikte uyarılan hücrelerde CD86 ve MHC sınıf II moleküllerinin yüzey ekspresyonlarında azalma saptandı. CD86 ve MHC sınıf II moleküllerinde görülen ve doz bağımlı artan bu düşüş paterni MHC sınıf I ekspresyonu için tespit edilmedi.

Çizelge 4.9. AuNK ve LPS ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin MHC sınıf I, MHC sınıf II ve CD86 pozitif hücre yüzdeleri

GRUPLAR	CD86 (%)	MHC Sınıf II (%)	MHC Sınıf I (%)
Hücre Kontrol	11,15 ± 2,13	17,07 ± 0,50	95,20 ± 5,47
LPS (1 µg/ml)	50,65 ± 1,85	50,75 ± 0,93	96,43 ± 2,97
AuNK (5 µg/ml)	15,4 ± 2,69	21,7 ± 1,13	92,65 ± 5,59
AuNK (15 µg/ml)	18,35 ± 0,21	23,8 ± 1,41	99,11 ± 0,14
AuNK (25 µg/ml)	22,9 ± 3,82	27,25 ± 0,92	97,25 ± 0,92
AuNK (5 µg/ml)+LPS (1 µg/ml)	41,05 ± 1,20	46,9 ± 0,57	93,12 ± 1,1
AuNK (15 µg/ml)+LPS (1 µg/ml)	37,65 ± 0,92	42,7 ± 1,70	95,4 ± 1,22
AuNK (25 µg/ml)+LPS (1 µg/ml)	34,65 ± 0,49	40,95 ± 0,35	95,7 ± 1,15

4.10. RAW 264.7 Hücrelerinin Sitokin Salgılama Profil Analizi

AuNK, alum, AuNK:HBsAg, Alum:HBsAg veya LPS içeren kombinasyonlarla 24 saat uyarım sonrası makrofaj hücrelerinin sitokin salgılama profilini araştırmak için hücre süpernatantlarında ELİSA yöntemiyle interlökin (İL)-1β, İL-4, İL-10, İL-6, İL-12 ve tümör nekroz faktörü (TNF)-α sitokin protein ekspresyonları analiz edildi. Pozitif kontrol uyarıcı olarak 1 µg/ml lipopolisakkarit (endotoksin, LPS) kullanıldı. Sonuçlar Gen5 (Sürüm 2.00) yazılım programıyla analiz edildi. Deneylerde yüksek toksisite göstermeyen dozlar kullanıldı. Bu nedenle sitokin üretiminin indüklenmesi ya da inhibisyonu Au nanokafeslerin sitotoksik etkilerinden kaynaklanmadığı düşünülmektedir.

4.10.1. İL-12 salınımı

Fagositik hücreler tarafından üretilen proinflamatuar İL-12 sitokini esasen aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılanır. Ancak yapılan ELİSA testleri sonucunda LPS (1 µg/ml) ile uyarılmış pozitif hücre grubu da dâhil olmak üzere hiçbir örnekte İL-12 tespit edilemedi. Test farklı deneylerden elde edilen LPS (1 µg/ml) ile uyarılmış hücre süpernatant örnekleri ile iki defa 4 tekrarlı çalışıldı fakat niceleyici deteksiyon yapılamadı. Standart eğri grafiğinde (R^2= 0,999) standart hata payı çok düşük olduğu için örneklerdeki İL-12 miktarının kitin deteksiyon limitinin altında olduğu düşünüldü. ELİSA yönteminden daha hassas olan akım sitometrisi ile yapılan bir çalışmada da aynı şekilde LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücre süpernatantlarında İL-12 tespit edilememiştir. Bunun nedeni olarak LPS uyaranına karşı hücre hatlarının primer türetilmiş makrofaj hücrelerine oranla düşük sitokin cevabı vermesi gösterilmiştir [151]. Bu projede de RAW 264.7 hücre hattı için İL-12 sitokin ekspresyonu açısından benzer bir sonuç alınmıştır.

4.10.2. TNF-α salınımı

Multi-fonksiyonel bir sitokin olan TNF-α özellikle yerel ve sistemik inflamasyonda etkili bir pirojendir. TNF-α salınımı viral enfeksiyonlar ve endotoksinler (LPS ve diğer bakteriyel toksinler), doku yaralanması ve DNA hasarı ile tetiklenebilir. Çizelge 4.10'da 24 saatlik uyarım sonucu toplanan ve örnek dilüenti ile 1:1 seyreltilen farklı süpernatant örneklerinde tespit edilen TNF-α (pg/ml) konsantrasyonları verildi. LPS (1 µg/ml) ile

uyarılmış hücrelerin TNF-α salınımında uyarılmamış hücrelere oranla beklenildiği gibi bir artış saptandı [177]. Düşük konsantrasyonda (5 µg/ml ve 10 µg/ml) AuNK ve alum ile stimüle edilen makrofajlarda yüksek düzeyde TNF-α üretimi saptandı. Sadece yüksek konsantrasyonda Au nanokafes (25 µg/ml ve 35 µg/ml) ile uyarılan hücrelerde uyarılmamış hücre kontrol grubundan daha düşük TNF-α sitokin yanıtı bulundu. Au nanokafes (15 µg/ml, 25 µg/ml ve 35 µg/ml) ile uyarılan hücrelerde LPS ile uyarılan hücrelere oranla azalmış TNF-α sekresyonu tespit edildi. Örnek dilüenti içinde hazırlanan AuNK süspansiyonunda TNF-α sitokini saptanmadı. Böylece Au nanokafeslerin intrinsik özelliklerinden kaynaklı TNF-α sitokin cevabını etkileyebilecek herhangi bir interferansın olmadığı sonucuna varıldı.

Çizelge 4.10. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin TNF-α yanıtı

GRUPLAR	TNF-α (pg/ml)
Hücre Kontrol	495,05 ± 1,313
LPS (1 µg/ml)	>2098,435
HBsAg (20 µg/ml)	1351 ± 13,483
AuNK (5 µg/ml)	>2098,435
AuNK (10 µg/ml)	>2098,435
AuNK (15 µg/ml)	820,167 ± 2,599
AuNK (25 µg/ml)	193,497 ± 6,028
AuNK (35 µg/ml)	69,907 ± 0,755
Alum (5 µg/ml)	>2098,435
Alum (10 µg/ml)	>2098,435

4.10.3. İL-10 salınımı

Makrofajların hücresel fonksiyonlarını ve sitokin sentezlerini bloke eden baskılayıcı etkiye sahip İL-10 sitokin yanıtının değerlendirilmesi Au nanokafeslerin immünmodülasyon

özelliklerinin belirlenmesinde büyük önem arz etmektedir. Çizelge 4.11'de farklı örneklerde tespit edilen İL-10 (pg/ml) konsantrasyonları verildi. LPS (1 µg/ml) ile uyarılan makrofajlarda başka çalışmalarda da görüldüğü üzere İL-10 salınımı saptandı [178]. RAW 264.7 hücrelerinde Au nanokafeslerin ve alumun İL-10 üretimine hiçbir etkisi olmadı. Ancak makrofajlar farklı konsantrasyonlardaki AuNK'lar (5 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml) ve LPS (1 µg/ml) ile birlikte 24 saat uyarıldığında İL-10 salınımında yaklaşık 3 kat artış izlendi. Au nanokafeslerin LPS'nin İL-10 sitokin yanıtını arttırdığı çıkarımına varıldı. AuNK'ların İL-10 üzerinden LPS'nin inflamatuar etkisini düzenlediği görüldü. Alumun (5 µg/ml) ise makrofajlarda 24 saatlik uyarım sonrası LPS'nin İL-10 salınımını azaltıcı etkisi saptandı. AuNK'ların makrofajlarda LPS kaynaklı Th1 cevabını düzenleyici etkisi alum için bulunmadı. İL-10 kitinin ölçebildiği eşik değeri 5 pg/ml'dir.

Çizelge 4.11. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-10 yanıtı

GRUPLAR	İL-10 (pg/ml)
Hücre Kontrol	33,80 ± 1,799
LPS (1µg/ml)	659,72 ± 14,608
AuNK (5µg/ml)	saptanamadı
AuNK (10µg/ml)	saptanamadı
AuNK (15µg/ml)	saptanamadı
AuNK (25µg/ml)	saptanamadı
Alum (5µg/ml)	31,88 ± 3,578
Alum (10µg/ml)	21,76 ± 3,08
Alum (20µg/ml)	7,62 ± 0,917
AuNK (5 µg/ml)+LPS (1µg/ml)	1584,61 ± 47,574
AuNK (15 µg/ml)+LPS (1µg/ml)	>2000
AuNK (25 µg/ml)+LPS (1µg/ml)	2022,00 ± 35,658
Alum (5 µg/ml)+LPS (1µg/ml)	263,85 ± 24,664

4.10.4. İL-1β salınımı

İL-1β proinflamatuar özelliğe sahip bir endojen pirojendir. Çizelge 4.12'de 24 saatlik uyarım sonucu farklı makrofaj süpernatant örneklerinde tespit edilen İL-1β (pg/ml) konsantrasyonları verildi. AuNK:HBsAg ve Alum:HBsAg formülasyonları da dahil olmak üzere Au nanokafeslerin ve alumun RAW 264.7 hücrelerinde İL-1β salınımına hiçbir etkisi olmadı. Ancak makrofajlar farklı konsantrasyonlardaki AuNK'lar (5 µg/ml ve 15 µg/ml) ve LPS (1 µg/ml) ile birlikte 24 saat uyarıldığında İL-1β salınımında sadece LPS ile uyarılan hücrelere oranla yaklaşık 3 kat artış tespit edildi. Daha yüksek dozlarda (25 µg/ml) ise LPS ile uyarılmış hücre grubuna oranla İL-1β miktarında azalma saptandı. İL-1β kitinin ölçebildiği eşik değeri 1,2 pg/ml'dir.

Çizelge 4.12. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-1β yanıtı

GRUPLAR	İL-1β (pg/ml)
Hücre Kontrol	saptanamadı
LPS (1µg/ml)	9,16 ± 0,688
HBsAg (20 µg/ml)	saptanamadı
AuNK (5µg/ml)	saptanamadı
AuNK (10µg/ml)	saptanamadı
AuNK (15µg/ml)	saptanamadı
AuNK (25µg/ml)	saptanamadı
Alum (5µg/ml)	saptanamadı
Alum (10µg/ml)	saptanamadı
Alum (20µg/ml)	saptanamadı
AuNK (5 µg/ml) + LPS (1µg/ml)	24,94 ± 1,234
AuNK (15 µg/ml) + LPS (1µg/ml)	25,24 ± 0,324
AuNK (25 µg/ml) + LPS (1µg/ml)	7,752 ± 0,618

4.10.5. İL-6 salınımı

İL-6 multi-fonksiyonel immün sistem cevaplarını ve akut faz reaksiyonlarını düzenleyen ve konak savunmasında önemli rol oynayan bir sitokindir. Spontan olarak hücreler tarafından

sentezlenmeyen bu sitokinin üretimi LPS ya da viral enfeksiyonlar ile indüklenir. Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi LPS (1 µg/ml) ile 24 saat uyarılan hücreler hariç diğer hücre kültür süpernatantlarında İL-6 salınımı tespit edilmedi. LPS ile uyarılan makrofajlarda TNF-α sitokinindeki artış İL-6 üretimini tetiklemektedir [179]. Bu çalışmada da aynı ilişki saptandı. Au nanokafeslerin İL-6 üretimi üzerine herhangi bir etkisi bulunmadı. AuNK:HBsAg ve Alum:HBsAg formülasyonları ile 24 saat uyarılan makrofajlarda da İL-6 salınımını tespit edilmedi. Ancak makrofajlar farklı konsantrasyonlardaki AuNK'lar (5 µg/ml, 15 µg/ml ve 25 µg/ml) ve LPS (1 µg/ml) ile birlikte 24 saat uyarıldığında 25 µg/ml Au nanokafes konsantrasyonu için LPS ile uyarılmış hücre grubuna oranla İL-6 salınımında azalma saptandı. Au nanokafeslerin LPS'nin İL-6 sitokin yanıtını 25 µg/ml konsantrasyonu için azalttığı çıkarımına varıldı. İL-6 kitinin ölçebildiği eşik değeri 6,5 pg/ml'dir.

Çizelge 4.13. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-6 yanıtı

GRUPLAR	İL-6 (pg/ml)
Hücre Kontrol	saptanamadı
LPS (1 µg/ml)	>2098.435
HBsAg (20 µg/ml)	saptanamadı
AuNK (5 µg/ml)	saptanamadı
AuNK (15 µg/ml)	saptanamadı
AuNK (25 µg/ml)	saptanamadı
Alum (5 µg/ml)	saptanamadı
Alum (10 µg/ml)	saptanamadı
Alum (15 µg/ml)	saptanamadı
Alum (20 µg/ml)	saptanamadı
AuNK (5 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)	>2098.435
AuNK (15 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)	>2098.435
AuNK (25 µg/ml) + LPS (1 µg/ml)	1786,84 ± 12,77

4.10.6. İL-4 salınımı

İL-4 özellikle T hücreleri tarafından salgılanarak İL-2, IFN-γ ve TNF-α sitokinlerinin üretimini baskılayan bir sitokindir. Bu sitokin Ig E ve Ig G_1 izotip dönüşümü tetikler ve MHC sınıf II ekspresyonunu arttırır. İL-4 TNF, İL-1 ve İL-6 üretimini makrofajlarda inhibe eder. Çizelge 4.14'de AuNK (5 µg/ml, 10 µg/ml ve 25 µg/ml ve 35 µg/ml) ve ile uyarılan hücrelerin İL-4 salınımının uyarılmamış ve LPS (1 µg/ml) ile uyarılmış hücre gruplarından daha yüksek olduğu bulundu. İL-4 kitinin ölçebildiği eşik değeri 2 pg/ml'dir.

Çizelge 4.14. AuNK ve alum ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin İL-4 yanıtı

GRUPLAR	İL-4 (pg/ml)
Hücre Kontrol	9,81 ± 6,422
LPS (1 µg/ml)	18,66 ± 4,22
HBsAg (20 µg/ml)	4,60 ± 1,33
AuNK (5 µg/ml)	48,07 ± 4,487
AuNK (10 µg/ml)	42,92 ± 4,478
AuNK (25 µg/ml)	54,82 ± 5,223
AuNK (35 µg/ml)	49,12 ± 3,127
Alum (5 µg/ml)	saptanamadı
Alum (7,5 µg/ml)	8,34 ± 1,147
Alum (10 µg/ml)	saptanamadı

RAW 264.7 hücrelerinin sitokin profili değerlendirildiğinde Au nanokafeslerle uyarılan makrofajlarda 10 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlar için TNF-α salınımındaki azalma AuNK'ların doz bağımlı anti-inflamatuvar etki gösterebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca AuNK'ların yüksek dozlarda (25 µg/ml) makrofajların LPS kaynaklı Th1 cevabını İL-1β ve İL-

6 üzerinden düzenleyerek azalttığı saptanmıştır. Sonuçlar Th1 yanıtını inhibe ederek inflamasyonu düzenleyen İL-10 sitokin üretimi açısından değerlendirildiğinde ise AuNK'ların İL-10 üzerinden LPS'nin inflamatuvar etkisini düzenleyebileceği (immünmodülasyon) gösterilmiştir. Anti-inflamatuar Th2 yanıtını destekleyen İL-4 sitokini ise AuNK'larla uyarılan makrofajlarda uyarılmayan hücrelerden daha yüksek tespit edilmiştir. Sonuç olarak Au nanokafeslerin inflamasyonu düzenleyerek Th1/Th2 dengesinde etkili olabilecek bir faktör olduğu kanısına varılmıştır.

5. TARTIŞMA

Altın nanokafeslerin makrofaj hücreleri ile etkileşiminin RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modellerinde *in vitro* şartlarda araştırılmasını amaçlayan bu tezde altın nanokafesler literatürle uyumlu olarak istenilen büyüklük ve yapısal özelliklerde sentezlendi [130, 131]. AuNK büyüklüğünün yaklaşık 50 nm seçilmesinin sebebi, literatürde 40-60 nm boyutlarındaki nanoparçacıkların memeli hücreleri tarafından endositik yolakla verimli bir şekilde internalize edildiğinin gösterilmesidir [9, 120].

Makrofajlarda Au nanokafes kaynaklı sitotoksisite ve NO üretimindeki modülasyonların araştırılması; hücre içi nanoparçacık-antijen alımının ve hücre içi nanoparçacık-antijen lokalizasyonunun gösterilmesi; Au nanokafeslerin antijen sunumu, hücre aktivasyonu ve sitokin profiline etkilerinin araştırılması gibi *in vitro* deneylerde, immünoloji temelli çalışmalarda kullanımı geniş kabul gören RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı (antijen sunucu hücre prototipi) kullanıldı [150, 160, 180]. RAW 264.7 hücrelerinde XTT metodu ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile yapılan sitotoksisite deneyleri sonucunda Au nanokafeslerin biyouyumlu olduğu doz aralığı belirlendi. Hücresel fonksiyon analiz testlerinde toksik olmayan dozlar kullanılarak canlı hücre cevapları elde edildi. Yüksek dozlarda ortaya çıkan sitotoksik etkinin literatürde de belirtildiği üzere altın nanokafeslerin inkübasyonu sırasında yapısında bulunan Ag atomlarının Ag^{+} iyonları şeklinde ortama salınmasından ya da metalik gümüşün oksitlenmesinden kaynaklı olabileceği düşünüldü [12, 181]. Aluma oranla makrofajlarda düşük toksisite gösteren Au nanokafeslerin aşı taşıma sistemlerinde kullanılmasının uygun olduğu değerlendirildi. Ayrıca realistik düşünüldüğünde *in vivo* koşullarda AuNK'ların makrofajlarla etkileşiminin *in vitro* koşullardaki gibi uzun süreli ve sürekli (24-48 saat gibi) olması muhtemel olmadığı için terapötik uygulamalarda sitotoksisitenin çok daha az problematik olacağı ön görüldü [154].

Nitrik oksit (NO) bakteri, virüs, mantar ve parazit gibi çeşitli patojenlere karşı konak savunmasında ve normal fizyolojik koşullarda çeşitli patofizyolojik olayların (nöronal kominikasyon, vazodilatasyon ve nörotoksisite gibi) regülasyonunda rol alan önemli bir moleküldür. Ancak aşırı NO üretimi akut ve kronik inflamasyonla ilişkili doku hasarını

indükler. Bu nedenle kronik inflamatuar hastalıkların (ateroskleroz, iskemik reperfüzyon, hipertansiyon ve septik şok gibi inflamatuar hastalıklar) tedavisi için NO üretimini inhibe eden yeni ajanlar üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır [93]. Memeli bağışıklık sisteminin önemli komponentlerinden olan makrofajlar lökosit migrasyonu öncesi yabancı ajanlara karşı hızlı bir savunmada anahtar rol oynar. Makrofaj hücreleri patojenik mikroplara ve tümörlere karşı sitotoksik ve sitostatik etki gösteren kısa ömürlü NO serbest radikali gibi çeşitli medyatörler üretir [182]. Makrofajların en güçlü aktivatörlerinden biri olan lipopolisakkarit (LPS) gram negatif bakterilerin hücre duvar komponentlerindendir ve proinflamatuvar sitokin (TNF-α, İL-1β ve İL-6 gibi) ve NO üretiminde pozitif uyarıcı etki yapar. Makrofajlarda NO üretiminin regülasyonu iNOS enzimi tarafından yapılır. iNOS'u kodlayan gen LPS tarafından indüklenir ve LPS Toll-benzeri reseptör (TLR) ilişkili sinyalizasyon yolakları üzerinden (transkripsiyon faktörü NF-κB içeren) makrofajları aktive eder. Ayrıca TNF-α, İL-1β ve İFN-γ gibi sitokinler de LPS ile birlikte iNOS indüksiyonunu arttırır [183]. Bu sebeple, LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından üretilen NO üretiminin inhibisyonu anti-inflamatuvar ajanların tespiti için uygun bir *in vitro* modeldir. PEG ile kaplı altın nanoparçacıkların kullanıldığı bir çalışma Au NP'lerin LPS tarafından indüklenmiş NO üretimini ve iNOS ekspresyonunu RAW 264.7 hücrelerinde inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun NF-κB ve STAT1 aktivasyonunun bloke edilmesi sonucu gerçekleştiğini göstermiştir [94]. Bu tez çalışmasında Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 2647 hücrelerinde doz bağımlı olarak NO akümülasyonunu azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak Au nanokafesler makrofajların inflamatuar cevaplarını düzenleyebilmektedir. AuNK'ların NO inhibisyon özelliği sayesinde kronik inflamasyonun kontrol altına alınmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Au nanokafes temelli antijen taşıma sistemi oluşturmak için fiziksel adsorpsiyona dayalı karıştırma tekniğiyle HBsAg proteini nanoparçacıklara hiçbir kimyasala maruz kalmadan bağlandı. Adsorpsiyon ile nanoparçacıklara antijen bağlama yöntemi protein yapıdaki antijenlerin yapısal stabilitesinin korunması açısından uygun olduğu için seçildi [4]**.** Antijen adsorpsiyon karakterizasyonu çalışması sonucunda Au nanokafeslerin çok küçük dozlarda bile yüksek bağlama kapasitesine sahip olduğu görüldü. AuNK'ların yüksek adsopsiyon kapasitesinin içi boşluklu ve duvarları porlu

yapısından kaynaklı olduğu düşünüldü. Antijen miktarı sabit tutulup nanokafes ve alum miktarlarının değiştirildiği formülasyonlarda pozitif yüklü alumun adsorpsiyon kapasitesinin alum miktarı ile doğru orantılı arttığı tespit edildi. Bunun yanısıra artan AuNK miktarı ile orantılı HBsAg antijeninin adsorbsiyon kapasitesinin artmamasının nedeni olarak, negatif yüklü Au nanokafeslerin nötral pH ortamında negatif yüklü HBsAg parçacıkları ile elektrostatik etkileşimden dolayı %100 bağlanma yapamamış olma ihtimali değerlendirildi [165, 171]. *In vitro* antijenite testi sonuçlarına göre HBsAg'nin Au nanokafeslere bağlanmasının protein yapısında antijenite kaybı ile sonuçlanabilecek ciddi alterasyonlar meydana getirmediği kanısına varıldı. HBsAg antijenitesini muhafaza eden AuNK-HBsAg formülasyonları konfokal mikroskopi ve akım sitometri ile hücre içi antijen alımı, sunumu ve makrofaj aktivasyon çalışmaları için uygun bulundu.

Nanoparçacıkların taşıyıcı olarak kullanılabilmesinin en temel şartı antijen sunucu hücreler tarafından kolayca hücre içine alınabilmesidir. AuNK-HBsAg formülasyonlarının makrofajlar tarafından hücre içine alımı akım sitometri ve konfokal mikroskopi teknikleriyle araştırıldı. Bu yöntemlerle zeta potansiyeli negatif olan Au nanokafeslerin hücre içine efektif bir şekilde alındığı görüldü. Negatif yüklü nanoparçacıklar ile negatif yüklü hücre membranı arasındaki itme gücüne karşı AuNK'ların yüksek miktarlarda hücre içine alınması pasif difüzyon dışında reseptör aracılı endositoz ile bu alımın gerçekleştiğini gösterdi. Bu sonuç yüklü nanoparçacıkların "epitop benzeri" yapılar oluşturduğu ve hücre membran yüzeyinde bulunan reseptörler tarafından tanınıp bağlanarak hücre içine alındığı hipotezini desteklemektedir [184].

Yapılan birçok çalışma nanopartikül temelli formülasyonların güçlü hücresel ve hümoral immün cevap oluşturabildiğini göstermiştir [126]. Örneğin, 2-50 nm büyüklükte nanoparçacık içeren antijen taşıma sistemleri dendritik hücre (DC) ve makrofajların antijen alımını arttırmış, yardımcı stimülatör ve antijen sunum moleküllerinde (CD40, CD80, CD83, CD86, MHC sınıf I, ve MHC sınıf II) ve sitokin üretimlerinde artışa neden olmuştur. Ayrıca parçacık-temelli bu sistemler depo etkisi yaparak antijenin kontrollü salımını sağlamış ve antijenin ASH'ler tarafından sürekli sunulma ihtimalini arttırmıştır [4]. Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma da nanoparçacıkların kayda değer adjuvan etkilerinin olduğunu ve bu etkiyi lokal lökositleri özellikle makrofajları aktive ederek

yaptıklarını göstermiştir. *İn vivo* deneylerde NP'ler doz bağımlı antijen spesifik IgG üretimini arttırmıştır. MHC sınıf II molekülleri antijen sunucu hücreler tarafından naif T hücrelerine sunum yapılmasında elzemdir. Nanoparçacıklar ile stimüle edilen makrofajların MHC II ekspresyonundaki artış bu nanoparçacıkların adjuvan etkilerinin önemli bir sebebi olarak düşünülmüştür [176]. AuNK alımı sonrası aktive olan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde artan CD86 ve MHC sınıf II yüzey molekül ekspresyonları antijen sunumunda ve T hücrelerin uyarılmasında Au nanokafeslerin immünstimülan özelliğinin aluma oranla yüksek olduğunu göstermiştir. AuNK ve LPS ile eş zamanlı uyarılan makrofajlarda sadece LPS ile uyarılan makrofajlara oranla CD86 ve MHC II üretiminde görülen azalma ise Au nanokafeslerin LPS'nin RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerindeki etkisini modüle ettiğini diğer deneylerde elde edilen sonuçları (NO üretiminde azalma ve İL-10 üretiminde artış gibi) destekler şekilde göstermiştir. Bu sonuçlar Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücreleri üzerindeki anti-inflamatuar etkisini desteklemektedir [185].

Nanoboyuttaki parçacık temelli taşıma sistemleri (immünstimülan kompleksler (ISCOM: *Immunostimulating complex*), altın nanoparçacıklar, lipozomlar, polimerler ve virozomlar gibi) nanotıp alanındaki yeni gelişmeleri yönlendirmektedir. Antijen ve immünstimülan yapıların fiziksel olarak birlikte taşındığı altın NP'ler; antijeni degradasyondan koruyarak, sadece hedeflenmiş hücrelerin immün aktivasyonunu başlatıp sistemik yan etkileri azaltarak, ASH tarafından alımı arttırarak, antijen ve adjuvanın birlikte aynı ASH'ye ulaştırılmasını sağlayarak ve hücresel immün cevabı başlatarak immün terapilerde ön plana çıkmaktadır. Kullanılan immünmodülatörün (adjuvan) özelliklerine göre yardımcı T hücre-1 (Th1) ya da yardımcı T hücre-2 (Th2) cevabı tetiklenmektedir [186].

Doğal immün sistem hücreleri olan makrofajlar inflamasyonu ve immün cevabı başlatan ve LPS ile uyarıldıklarında aktive olarak çeşitli proinflamatuar faktörleri sekrete eden hücrelerdir [9]. Fakat aşırı inflamasyon doku hasarı ve patalojik durumların oluşumuna neden olur. İL-1β, İL-6 ve TNF-α sitokin yanıtları LPS kaynaklı makrofaj aktivasyonuna karşı çeşitli ajanların anti-inflamatuar özelliklerinin belirlenmesinde analiz edilmektedir. Bu projede Au nanokafeslerle uyarılan makrofaj hücrelerindeki TNF-α salınımındaki azalma 10 µg/ml'den yüksek konsantrasyonlar için AuNK'ların doz bağımlı anti-inflamatuvar etki

gösterebileceğini ortaya koydu. Ayrıca AuNK'ların yüksek dozlarda makrofajların LPS kaynaklı Th1 cevabını İL-1β ve İL-6 üzerinden düzenleyerek azalttığı saptandı. Th1 yanıtını inhibe ederek inflamasyonu düzenleyen İL-10 sitokin üretimi açısından ise AuNK'ların İL-10 üzerinden LPS'nin inflamatuvar etkisini düzenleyebileceği (immünmodülasyon) görüldü. Anti-inflamatuar Th2 yanıtını destekleyen İL-4 sitokini ise AuNK'larla uyarılan makrofajlarda uyarılmayan hücrelerden daha yüksek tespit edildi. Sonuç olarak Au nanokafeslerin inflamasyonu düzenleyerek Th1/Th2 dengesinde etkili olabilecek bir faktör olduğu kanısına varıldı.

Nanotıp alanında Au nanokafeslerin kullanımını cazip kılan birçok faktör vardır: i) büyük miktarlarda (~ 0,7 gr/sentez) ve yüksek kalitede sentezlenebilirler; ii) delikli duvarları ve boşluklu içyapıları ilaç yüklemesi ve salımı için kullanıma uygundur; iii) parçacık büyüklükleri (20-500 nm) kontrol edilerek biyodağılımları ve dokulardan penetrasyonları optimize edilebilir; iv) optik özellikleri sayesinde farklı görüntüleme tekniklerinde kullanılabilirler; v) iyi mekanik esnekliğe ve stabiliteye sahip kristalleri sayesinde farklı *in vivo* çevrelerde bütünlüklerini koruyabilirler; vi) atomik olarak düz olan yüzeyleri sayesinde biyomoleküller ve ligantlar ile işaretlenip fonksiyonalize edilmeye uygundurlar [140]. Altın nanokafeslerin yüzey özellikleri değiştirilerek (yüzey yükü gibi) hücre zarı, sitoplazma ve hatta çekirdek gibi spesik bir bölgeye yönlendirilebileceği düşünülmektedir. AuNK'ların kompleks *in vivo* şartlarda immün sistem ile olan etkileşimi derinlemesine araştırılmalı ve klinik uygulamalar öncesinde karşılaşılabilecek yan etkiler çok iyi analiz edilmelidir.

Nanoparçacık kaynaklı immün cevaplar nanobiyomedikal uygulamalarda faydalı ya da zararlı olabilir. Nanoparçacıkların immünmodülasyon özelliklerinden faydalanırken sistemik yan etkileri azaltmak için istenmeyen immün cevapların engellenmesi gerekmektedir. İmmün cevapları etkileyen faktörler (parçacık kompozisyonu, yüzey kimyası, büyüklüğü, plazma proteinlerini bağlaması ve temas yolu gibi) çeşitli ve karmaşıktır. Nanoparçacıklar ve sistemik immün sistem arasındaki etkileşim tıp alanındaki nanoteknolojik uygulamalar için büyük önem arzetmektedir. Au nanokafeslerin nanoimmünmodülasyon özellikleri titizlikle araştırılmalıdır [83]. Özellikle, bu tez ile Au nanokafeslerle makrofajlar arasındaki etkileşimin etkileri (aktivasyon ya da inhibisyona)

araştırılarak bu alanda literatürde bulunan eksikliğin giderilmesi ve AuNK temelli biyomedikal uygulamaların yönlendirilmesi amaçlanmıştır [187].

Makrofaj hedefli ilaç taşıma sistemleri tasarlanırken çevre şartlarının etkisiyle makrofaj plastisitesi ve heterojenitesinde meydana gelebilecek değişimler göz ardı edilmemelidir. Makrofajların eksojen maddelere karşı primer savunucu olduğu düşünülürse nanotaşıyıcı makrofaj etkileşimi sonucu ortaya çıkabilecek potansiyel immünmodülatör etkiler detaylıca analiz edilmelidir. Herşeye rağmen makrofajlar biyolojik sistemlerde kolay ulaşılabilir ve yaygın hücreler oldukları için rasyonel şekilde tasarlanmış nanomalzemelerin kullanıldığı makrofaj hedefli ilaç taşıma sistemleri yeni nesil teşhis ve tedavi yaklaşımlarına büyük katkı sağlayacaktır [21].

Bu tez çalışması hücre hattı kullanılarak yapılan *in vitro bir* çalışmadır. Bu projede *in vitro* şartlarda gösterilen Au nanokafeslerin immün sistem üzerine makrofaj hücre kaynaklı etkisi *in vivo* hayvan modelleriyle antikor titreleri ve T hücre cevapları ölçülerek test edilmelidir. Moleküler teknikler kullanılarak AuNK'ların efektör mekanizmaları ve hangi sinyalizasyon yolakları üzerinden etkilerini gerçekleştirdiği süregelen projelerde analiz edilmelidir. Sonuç olarak, AuNK'lar makrofajlarda immünregülatuar etkiye sahiptir. Bu projede elde edilen sonuçlar yapılacak *in vivo* çalışmalar ve sonrasındaki klinik deneyler için önemli bir yol gösterici olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Porlu duvarları ve boşluklu iç yapılarıyla Au nanokafesler biyoaktif maddeleri taşıyabilme özellikleri sayesinde ilaç salımı ve kanser terapi çalışmalarında ön plana çıkmaktadır. AuNK'lar sahip oldukları üstün optik özelliklerinden dolayı (multi-foton lüminesans ve ayarlanabilen dalga boylarında güçlü optik saçılma/absorpsiyon) multi-foton mikroskopi, optik koherans tomografi ve fotoakustik mikroskopi gibi uygulamalarda kontrast madde olarak kullanılmaya uygundur. Yoğunlukla karaciğer ve dalakta akümüle olan Au nanokafeslerin immün sistem komponentleri ile olan etkileşiminin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Ancak, literatürde AuNK'ların immün sistem hücreleri ile etkileşimini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Au nanokafeslerin immün sistem üzerine sitotoksik etkilerini (immünotoksisite) araştırmak için standart prosedürler mevcut değildir. Ayrıca, AuNK'ların immünmodülatör özellikleri ayrıntılı şekilde bilinmemektedir. Bu çalışmada altın nanokafeslerin makrofaj hücreleri ile etkileşimi RAW 264.7 hücre hattı-HBsAg modellerinde *in vitro* şartlarda araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, bilimsel literatüre çok büyük katkı sağlayacak ve AuNK temelli uygulamalara immünolojik açıdan yeni bir bakış açısı getirecektir.

Altın nanokafeslerin ve hazırlanan özgün AuNK-HBsAg formülasyonlarının makrofajların metabolik aktivitelerini, antijen alımını, işlemesini, sunumunu ve aktivasyonunu nasıl etkilediği; XTT ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile hücre canlılığı ve proliferasyonu, akım sitometri ile hücre yüzey belirteçleri, konfokal mikroskopi ile hücre içi antijen lokalizasyonu ve ELİSA testleri ile sitokin cevapları analiz edilerek aydınlatıldı. Sonuç olarak; i) AuNK'ların biyouyumluluğunun RAW 264.7 makrofajlarında alum adjuvanından yüksek olduğu; ii) Au nanokafeslerin LPS ile uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde NO üretimini baskıladığı; iii) AuNK'ların makrofajların HBsAg alım kapasitesini arttırdığı; iv) AuNK'ya bağlanan HBsAg'nin antijenik özelliklerinin değişmediği; v) AuNK-HBsAg formülasyonlarının kolayca hücre içine alınıp sitoplazma ve lizozomda akümüle olduğu; vi) AuNK ve AuNK-HBsAg formülasyonlarının makrofajların antijen sunum ve stimülasyon özelliklerini arttırdığı; vii) AuNK'ların RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde daha çok anti-inflamatuar (Th2) cevabı destekler yönde sitokin profili oluşturduğu tespit edildi. Bu

tezden elde edilen sonuçların Au nanokafeslerin nanomedikal uygulamalarının optimizasyonuna büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Makrofaj hücreleri bulunduklara dokulara göre fenotip ve fonksiyon açısından farklı matürasyon özellikleri sergileyebilir. Bu tezde ölümsüzleşmiş ve transforme edilmiş sekonder RAW 264.7 fare makrofaj hücre hattı ile yapılan *in vitro* deneylerin *ex vivo* primer makrofaj hücrelerinde (dalak kökenli makrofajlar, kemik iliği kökenli makrofajlar gibi) yapılması Au nanokafeslerin makrofaj hücrelerine etkilerinin detaylandırılması için aydınlatıcı olabilir. Au nanokafesler ve immün sistem arasındaki etkileşim konusundaki bilgilerin arttırılması için bu tezden elde edilen *in vitro* veriler *in vivo* immünizasyon deneyleri ile zenginleştirilebilir. Antijen spesifik IgG cevabı ve IgG1/IgG2a oranının belirlenmesiyle hangi tip (Th1 ya da Th2) T hücre yanıtının tetiklendiği bulunabilir. Ayrıca farelerde AuNK içeren formülasyonların intraperitonel enjeksiyonu sonrası abdominal sıvıdaki sitokin sekresyon seviyelerine bakılarak (TNF-α, IFN-γ gibi) peritoneal lökosit aktivasyonu tespit edilebilir. AuNK'ların pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar etkileri hangi sinyalizasyon mekanizmaları üzerinden gerçekleştirdiği detaylı bir şekilde incelenebilir.

RAW 264.7 hücrelerinde NO üretiminde görülen AuNK ilişkili düşüşün moleküler mekanizmalarının aydınlatılması nanoterapilerin geniş çaplı etkilerinin tespiti açısından önemlidir. LPS ve Au nanokafeslerle uyarılmış RAW 264.7 hücrelerinde iNOS geninin transkripsiyon ve protein ekspresyon seviyelerindeki değişimin gerçek zamanlı PCR (*real time polymerase chain reaction*) ve Western blot gibi metotlarla araştırılması Au nanokafesler tarafından NO inhibisyon mekanizmalarının aydınlatılması açısından yol gösterici olacaktır. Ayrıca AuNK'ların makrofajlarda LPS tarafından indüklenmiş NO üretimini azaltırken hangi sinyalizasyon yolakları üzerinden (MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), NF-κB and IFN-β/STAT1 yolakları gibi) etki gösterdiğinin bulunması nanoteröpatik ajanların tasarımına ışık tutacaktır.

Altın nanokafeslerin hücre içine alımı farklı reseptörler aracılığıyla olabilir (klatrin ve kaveolin gibi). Reseptörlerin tek tek bloke edilmesi yöntemiyle hangi yolağın (klatrin-aracılı ya da kaveolin-aracılı gibi) hücre içi altın nanokafes alımında aktif rol oynadığı tespit

edilebilir. AuNK'ların hücre içi alım mekanizmalarının aydınlatılması yeni taşıma sistem tasarımlarında faydalı olabilir.

Nanoparçacıkların biyouyumluluğu yapısal ve yüzeysel özellikler de dâhil birçok faktöre bağlıdır. Nanomedikal uygulamaların şu anki gelişme evresinde uzun süreli (yılları kapsayan) toksisite analiz raporları mevcut değildir. Bundan dolayı yıllar sonra ortaya çıkabilecek nanoparçacık kaynaklı (özellikle biyobozunur olmayan nanoparçacıklar için) sağlık problemleri tam olarak bilinememektedir. AuNK'ların ne kadar süre sonra egzositozla hücre dışına atılacağı uzun süreli toksik etkinin tahmin edilmesi açısından önemlidir. Au nanokafeslerin kullanılacağı biyomedikal uygulamalarda bu durum mutlaka risk analizinde göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, Au nanokafesler, özellikleri (büyüklük, yüzey yükü, bağlanan ligantlar gibi) amaçlanan hedefler doğrultusunda tasarlanarak çeşitli nanotıp uygulamalarında başarılı sonuçlar ortaya koyma potansiyeline sahip yeni nesil multi fonksiyonel nanomateryaller arasında ön plana çıkan ajanlardır. Bu tez Au nanokafes temelli immünterapilerde yol gösterici olacak ve akabinde yapılacak birçok çalışmaya da ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Haldar, M., ve Murphy, K. M. (2014). Origin, Development, and Homeostasis of Tissue-resident Macrophages. *Immunological Reviews, 262*(1), 25-35.

2. Wang, J., Zhu, R., Gao, B., Wu, B., Li, K., Sun, X., Liu, H., ve Wang, S. (2014). The enhanced immune response of hepatitis B virus DNA vaccine using SiO2@LDH nanoparticles as an adjuvant. *Biomaterials, 35*(1), 466-478.

3. Park, M. C., Kim, D., Lee, Y., ve Kwon, H.-J. (2013). CD83 expression induced by CpG-DNA stimulation in a macrophage cell line RAW 264.7. *BMB Reports, 46*(9), 448-453.

4. Mody, K. T., Popat, A., Mahony, D., Cavallaro, A. S., Yu, C., ve Mitter, N. (2013). Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery. *Nanoscale, 5*(12), 5167-5179.

5. Chen, X., Liu, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, W., Fan, B., Ma, X., Yuan, Q., Ma, G., ve Su, Z. (2014). Enhanced Humoral and Cell-Mediated Immune Responses Generated by Cationic Polymer-Coated PLA Microspheres with Adsorbed HBsAg. *Molecular Pharmaceutics, 11*(6), 1772-1784.

6. Saptarshi, S. R., Duschl, A., ve Lopata, A. L. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology, 11*(1), 26.

7. Wang, W., Yan, T., Cui, S., ve Wan, J. (2012). A bioresponsive controlled-release biosensor using Au nanocages capped with an aptamer-based molecular gate and its application in living cells. *Chemical Communications, 48*(82), 10228-10230.

8. Chen, Y.-S., Hung, Y.-C., Liau, I., ve Huang, G. S. (2009). Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters, 4*(8), 858-864.

9. Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., Ijiro, K., ve Sawa, H. (2013). Gold Nanoparticles as a Vaccine Platform: Influence of Size and Shape on Immunological Responses in Vitro and in Vivo. *American Chemical Society Nano, 7*(5), 3926-3938.

10. Hutter, E., Boridy, S., Labrecque, S., Lalancette-Hébert, M., Kriz, J., Winnik, F. M., ve Maysinger, D. (2010). Microglial Response to Gold Nanoparticles. *American Chemical Society Nano, 4*(5), 2595-2606.

11. Cai, X., Li, W., Kim, C. H., Yuan, Y., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2011). In vivo quantitative evaluation of the transport kinetics of gold nanocages in a lymphatic system by noninvasive photoacoustic tomography. *ACS Nano, 5*(12), 9658-9667.

12. Wang, Y., Black, K. C., Luehmann, H., Li, W., Zhang, Y., Cai, X., Wan, D., Liu, S. Y., Li, M., Kim, P., Li, Z. Y., Wang, L. V., Liu, Y., ve Xia, Y. (2013). Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment. *ACS Nano, 7*(3), 2068-2077.

13. Zhang, A. W., Guo, W. H., Qi, Y. F., Wang, J. Z., Ma, X. X., ve Yu, D. X. (2016). Synergistic Effects of Gold Nanocages in Hyperthermia and Radiotherapy Treatment. *Nanoscale Res Lett, 11*(1), 279.

14. Au, L., Zheng, D., Zhou, F., Li, Z. Y., Li, X., ve Xia, Y. (2008). A quantitative study on the photothermal effect of immuno gold nanocages targeted to breast cancer cells. *ACS Nano, 2*(8), 1645-1652.

15. Wang, Y., Liu, Y., Luehmann, H., Xia, X., Wan, D., Cutler, C., ve Xia, Y. (2013). Radioluminescent gold nanocages with controlled radioactivity for real-time in vivo imaging. *Nano Letters, 13*(2), 581-585.

16. Li, W., Cai, X., Kim, C., Sun, G., Zhang, Y., Deng, R., Yang, M., Chen, J., Achilefu, S., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2011). Gold nanocages covered with thermally-responsive polymers for controlled release by high-intensity focused ultrasound. *Nanoscale, 3*(4), 1724-1730.

17. Li, W., Brown, P. K., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2011). Gold nanocages as contrast agents for photoacoustic imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging, 6*(5), 370-377.

18. Zhang, Y. S., Wang, Y., Wang, L., Wang, Y., Cai, X., Zhang, C., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2013). Labeling Human Mesenchymal Stem Cells with Gold Nanocages for in vitro and in vivo Tracking by Two-Photon Microscopy and Photoacoustic Microscopy. *Theranostics, 3*(8), 532-543.

19. Yavuz, M. S., Cheng, Y., Chen, J., Cobley, C. M., Zhang, Q., Rycenga, M., Xie, J., Kim, C., Song, K. H., Schwartz, A. G., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2009). Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nature Materials, 8*(12), 935-939.

20. Sag, D., Cekic, C., Wu, R., Linden, J., ve Hedrick, C. C. (2015). The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity. *Nature Communications, 6*, 6354.

21. Pei, Y., ve Yeo, Y. (2016). Drug delivery to macrophages: Challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release, 240*, 202-211.

22. Zhou, T., Cui, X., Zhou, Y., Guo, J., Rong, Y., ve Chen, W. (2015). Switch regulation of interleukin-1 beta in downstream of inflammatory cytokines induced by two micro-sized silica particles on differentiated THP-1 macrophages. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 39*(1), 457-466.

23. Yue, H., Wei, W., Fan, B., Yue, Z., Wang, L., Ma, G., ve Su, Z. (2012). The orchestration of cellular and humoral responses is facilitated by divergent intracellular antigen trafficking in nanoparticle-based therapeutic vaccine. *Pharmacological Research, 65*(2), 189-197.

24. Mantegazza, A. R., Magalhaes, J. G., Amigorena, S., ve Marks, M. S. (2013). Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic, 14*(2), 135-152.

25. Mukherjee, S., Chen, L.-Y., Papadimos, T. J., Huang, S., Zuraw, B. L., ve Pan, Z. K. (2009). LPS driven Th2 cytokine production in macrophages is regulated by both MyD88 and TRAM. *Journal of Biological Chemistry*.

26. Singh, M., Harris-Birtill, D. C. C., Markar, S. R., Hanna, G. B., ve Elson, D. S. (2015). Application of gold nanoparticles for gastrointestinal cancer theranostics: A systematic review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11*(8), 2083-2098.

27. Smith, D. M., Simon, J. K., ve Baker Jr, J. R. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology, 13*(8), 592-605.

28. Li, Z., Sun, L., Zhang, Y., Dove, A. P., O'Reilly, R. K., ve Chen, G. (2016). Shape Effect of Glyco-Nanoparticles on Macrophage Cellular Uptake and Immune Response. *American Chemical Society Macro Letters, 5*(9), 1059-1064.

29. Patra, C. R., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., ve Mukherjee, P. (2010). Fabrication of Gold Nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews, 62*(3), 346-361.

30. Moon, J. J., Huang, B., ve Irvine, D. J. (2012). Engineering Nano- and Microparticles to Tune Immunity. *Advanced Materials, 24*(28), 3724-3746.

31. Lee, I.-H., Kwon, H.-K., An, S., Kim, D., Kim, S., Yu, M. K., Lee, J.-H., Lee, T.-S., Im, S.-H., ve Jon, S. (2012). Imageable Antigen-Presenting Gold Nanoparticle Vaccines for Effective Cancer Immunotherapy In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition, 51*(35), 8800-8805.

32. Sharma, V., Park, K., ve Srinivasarao, M. (2009). Colloidal dispersion of gold nanorods: Historical background, optical properties, seed-mediated synthesis, shape separation and self-assembly. *Materials Science and Engineering Reports, 65*, 1-38.

33. Her, S., Jaffray, D. A., ve Allen, C. (2015). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

34. Cao-Milán, R., ve Liz-Marzán, L. M. (2014). Gold nanoparticle conjugates: recent advances toward clinical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery, 11*(5), 741-752.

35. Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., ve Wyatt, M. D. (2005). Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small, 1*(3), 325-327.

36. Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A. M., Goldsmith, E. C., ve Baxter, S. C. (2008). Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Accounts of Chemical Research, 41*(12), 1721-1730.

37. Lim, Y. T., Cho, M. Y., Choi, B. S., Noh, Y.-W., ve Chung, B. H. (2008). Diagnosis and therapy of macrophage cells using dextran-coated near-infrared responsive hollow-type gold nanoparticles. *Nanotechnology, 19*(37), 375105.

38. Rao, S., Huang, C., Tata, U., Wu, P., Arora, N., Ahn, J., Lin, V. K., Hao, Y., ve Chiao, J.-C. (2014). Evaluation of Cytotoxic Effects of Different Concentrations of Porous Hollow Au Nanoparticles (PHAuNPs) on Cells. *Journal of Nanotechnology, 2014*, 7.

39. Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., ve Xia, Y. (2014). Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition, 53*(46), 12320-12364.

40. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., ve El-Sayed, M. A. (2007). Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2*(5), 681-693.

41. Chen, X.-J., Sanchez-Gaytan, B. L., Qian, Z., ve Park, S.-J. (2012). Noble metal nanoparticles in DNA detection and delivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 4*(3), 273-290.

42. Kumar, D., Saini, N., Jain, N., Sareen, R., ve Pandit, V. (2013). Gold nanoparticles: an era in bionanotechnology. *Expert Opinion on Drug Delivery, 10*(3), 397-409.

43. Tucker-Schwartz, J. M., Beavers, K. R., Sit, W. W., Shah, A. T., Duvall, C. L., ve Skala, M. C. (2014). In vivo imaging of nanoparticle delivery and tumor microvasculature with multimodal optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express, 5*(6), 1731-1743.

44. Chen, P. C., Mwakwari, S. C., ve Oyelere, A. K. (2008). Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnology, Science and Applications, 1*, 45-65.

45. Austin, L. A., Mackey, M. A., Dreaden, E. C., ve El-Sayed, M. A. (2014). The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Archives of Toxicology, 88*(7), 1391-1417.

46. Paciotti, G. F., Myer, L., Weinreich, D., Goia, D., Pavel, N., McLaughlin, R. E., ve Tamarkin, L. (2004). Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery. *Drug Delivery, 11*(3), 169-183.

47. Khlebtsov, N., ve Dykman, L. (2011). Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews, 40*(3), 1647-1671.

48. Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Schleh, C., Wenk, A., Lipka, J., Schäffler, M., Takenaka, S., Möller, W., Schmid, G., Simon, U., ve Kreyling, W. G. (2011). Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 77*(3), 407-416.

49. Almeida, J. P. M., Figueroa, E. R., ve Drezek, R. A. (2014). Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 10*(3), 503-514.

50. Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., ve Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology, 40*(4), 328-346.

51. Dykman, L. A., ve Khlebtsov, N. G. (2017). Immunological properties of gold nanoparticles. *Chemical Science*.

52. Sonavane, G., Tomoda, K., ve Makino, K. (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 66*(2), 274-280.

53. Balasubramanian, S. K., Jittiwat, J., Manikandan, J., Ong, C.-N., Yu, L. E., ve Ong, W.-Y. (2010). Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials, 31*(8), 2034-2042.

54. Sadauskas, E., Danscher, G., Stoltenberg, M., Vogel, U., Larsen, A., ve Wallin, H. Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 5*(2), 162-169.

55. Albanese, A., Tang, P. S., ve Chan, W. C. W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering, 14*, 1-16.

56. Longmire, M., Choyke, P. L., ve Kobayashi, H. (2008). Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine (London, England), 3*(5), 703-717.

57. De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J. A. M., ve Geertsma, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials, 29*(12), 1912-1919.

58. Elsabahy, M., ve Wooley, K. L. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chemical Society Reviews, 41*(7), 2545-2561.

59. Imbuluzqueta, E., Gamazo, C., Lana, H., Campanero, M. Á., Salas, D., Gil, A. G., Elizondo, E., Ventosa, N., Veciana, J., ve Blanco-Prieto, M. J. (2013). Hydrophobic Gentamicin-Loaded Nanoparticles Are Effective against Brucella melitensis Infection in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57*(7), 3326-3333.

60. Kai, M. P., Brighton, H. E., Fromen, C. A., Shen, T. W., Luft, J. C., Luft, Y. E., Keeler, A. W., Robbins, G. R., Ting, J. P. Y., Zamboni, W. C., Bear, J. E., ve DeSimone, J. M. (2016). Tumor Presence Induces Global Immune Changes and Enhances Nanoparticle Clearance. *American Chemical Society Nano, 10*(1), 861-870.

61. Dobrovolskaia, M. A., ve McNeil, S. E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology, 2*(8), 469-478.

62. Shang, L., Nienhaus, K., ve Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology, 12*(1), 5.

63. Dykman, L. A., ve Khlebtsov, N. G. (2014). Uptake of Engineered Gold Nanoparticles into Mammalian Cells. *Chemical Reviews, 114*, 1258-1288.

64. Walkey, C. D., Olsen, J. B., Guo, H., Emili, A., ve Chan, W. C. W. (2012). Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *Journal of the American Chemical Society, 134*(4), 2139-2147.

65. Austin, L. A., Ahmad, S., Kang, B., Rommel, K. R., Mahmoud, M., Peek, M. E., ve El-Sayed, M. A. (2015). Cytotoxic effects of cytoplasmic-targeted and nuclear-targeted gold and silver nanoparticles in HSC-3 cells – A mechanistic study. *Toxicology in Vitro, 29*(4), 694-705.

66. Kettler, K., Veltman, K., van de Meent, D., van Wezel, A., ve Hendriks, A. J. (2014). Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environmental Toxicology and Chemistry, 33*(3), 481-492.

67. Saira, F., Mackey, M. A., Qureshi, R., ve Mahmoud, M. A. (2016). In vitro investigations of gold nanocages: Toxicological profile in human keratinocyte cell line. *Food and Chemical Toxicology, 97*, 89-95.

68. Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., Schmid, G., Brandau, W., ve Jahnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small, 3*.

69. Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., ve Plebanski, M. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods, 40*(1), 1-9.

70. Garay, R. P., El-Gewely, R., Armstrong, J. K., Garratty, G., ve Richette, P. (2012). Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opinion on Drug Delivery, 9*(11), 1319-1323.

71. Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Wu, X., Zhao, Y., Li, Y., ve Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials, 31*(30), 7606-7619.

72. Mironava, T., Hadjiargyrou, M., Simon, M., Jurukovski, V., ve Rafailovich, M. H. (2010). Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology, 4*(1), 120-137.

73. França, A., Aggarwal, P., Barsov, E. V., Kozlov, S. V., Dobrovolskaia, M. A., ve González-Fernández, Á. (2011). Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine (London, England), 6*(7), 1175-1188.

74. Bartneck, M., Keul, H. A., Singh, S., Czaja, K., Bornemann, J., Bockstaller, M., Moeller, M., Zwadlo-Klarwasser, G., ve Groll, J. (2010). Rapid Uptake of Gold Nanorods by Primary Human Blood Phagocytes and Immunomodulatory Effects of Surface Chemistry. *American Chemical Society Nano, 4*(6), 3073-3086.

75. Bruinink, A., Wang, J., ve Wick, P. (2015). Effect of particle agglomeration in nanotoxicology. *Archives of Toxicology, 89*(5), 659-675.

76. Khan, J. A., Pillai, B., Das, T. K., Singh, Y., ve Maiti, S. (2007). Molecular Effects of Uptake of Gold Nanoparticles in HeLa Cells. *ChemBioChem, 8*(11), 1237-1240.

77. Rosi, N. L., Giljohann, D. A., Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K. R., Han, M. S., ve Mirkin, C. A. (2006). Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. *Science, 312*(5776), 1027-1030.

78. Aueviriyavit, S., Phummiratch, D., ve Maniratanachote, R. (2014). Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells – Induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles. *Toxicology Letters, 224*(1), 73-83.

79. Liu, X., Huang, N., Li, H., Jin, Q., ve Ji, J. (2013). Surface and size effects on cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir, 29*(29), 9138-9148.

80. Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S. J. H., Gil, P. R., Montenegro, J.-M., Braeckmans, K., Müllen, K., Nienhaus, G. U., Klapper, M., ve Parak, W. J. (2013). Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. *American Chemical Society Nano, 7*(4), 3253-3263.

81. Goodman, C. M., McCusker, C. D., Yilmaz, T., ve Rotello, V. M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry, 15*(4), 897-900.

82. Fratoddi, I., Venditti, I., Cametti, C., ve Russo, M. V. (2015). How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. *Nano Research, 8*(6), 1771-1799.

83. Jiao, Q., Li, L., Mu, Q., ve Zhang, Q. (2014). Immunomodulation of Nanoparticles in Nanomedicine Applications. *BioMed Research International, 2014*, 19.

84. Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R. R., ve Sastry, M. (2005). Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir, 21*(23), 10644-10654.

85. Yen, H.-J., Hsu, S.-h., ve Tsai, C.-L. (2009). Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small, 5*(13), 1553-1561.

86. Sumbayev, V. V., Yasinska, I. M., Garcia, C. P., Gilliland, D., Lall, G. S., Gibbs, B. F., Bonsall, D. R., Varani, L., Rossi, F., ve Calzolai, L. (2013). Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1β-Induced Pro-Inflammatory Responses. *Small, 9*(3), 472-477.

87. Cheung, W.-H., Chan, V. S.-F., Pang, H.-W., Wong, M.-K., Guo, Z.-H., Tam, P. K.-H., Che, C.-M., Lin, C.-L., ve Yu, W.-Y. (2009). Conjugation of Latent Membrane Protein (LMP)-2 Epitope to Gold Nanoparticles as Highly Immunogenic Multiple Antigenic Peptides for Induction of Epstein−Barr Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Responses in Vitro. *Bioconjugate Chemistry, 20*(1), 24-31.

88. Cruz, L. J., Rueda, F., Cordobilla, B., Simón, L., Hosta, L., Albericio, F., ve Domingo, J. C. (2011). Targeting Nanosystems to Human DCs via Fc Receptor as an Effective Strategy to Deliver Antigen for Immunotherapy. *Molecular Pharmaceutics, 8*(1), 104-116.

89. Villiers, C., Freitas, H., Couderc, R., Villiers, M.-B., ve Marche, P. (2010). Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *Journal of Nanoparticle Research, 12*(1), 55-60.

90. Małaczewska, J. (2015). Effect of oral administration of commercial gold nanocolloid on peripheral blood leukocytes in mice *Polish Journal of Veterinary Sciences* (Vol. 18, pp. 273).

91. Yang, G., Lee, K., Lee, M., Ham, I., ve Choi, H.-Y. (2012). Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production by chloroform fraction of Cudrania tricuspidata in RAW 264.7 macrophages. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine, 12*(1), 250.

92. Kim, H. K., Cheon, B. S., Kim, Y. H., Kim, S. Y., ve Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology, 58*(5), 759-765.

93. Joo, T., Sowndhararajan, K., Hong, S., Lee, J., Park, S.-Y., Kim, S., ve Jhoo, J.-W. (2014). Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of Ulmus pumila L. *Saudi Journal of Biological Sciences, 21*(5), 427-435.

94. Ma, J. S., Kim, W. J., Kim, J. J., Kim, T. J., Ye, S. K., Song, M. D., Kang, H., Kim, D. W., Moon, W. K., ve Lee, K. H. (2010). Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF-κB and IFN-β/STAT1 pathways in RAW 264.7 cells. *Nitric Oxide, 23*(3), 214-219.

95. Liu, Z., Li, W., Wang, F., Sun, C., Wang, L., Wang, J., ve Sun, F. (2012). Enhancement of lipopolysaccharide-induced nitric oxide and interleukin-6 production by PEGylated gold nanoparticles in RAW264.7 cells. *Nanoscale, 4*(22), 7135-7142.

96. Zhang, Q., Hitchins, V. M., Schrand, A. M., Hussain, S. M., ve Goering, P. L. (2011). Uptake of gold nanoparticles in murine macrophage cells without cytotoxicity or production of pro-inflammatory mediators. *Nanotoxicology, 5*(3), 284-295.

97. Zaman, M., Good, M. F., ve Toth, I. (2013). Nanovaccines and their mode of action. *Methods, 60*(3), 226-231.

98. Gosens, I., Post, J. A., de la Fonteyne, L. J., Jansen, E. H., Geus, J. W., Cassee, F. R., ve de Jong, W. H. (2010). Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Particle and Fibre Toxicology, 7*(1), 37.

99. Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., ve West, J. L. (2003). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 100*(23), 13549-13554.

100. Qu, X., Yao, C., Wang, J., Li, Z., ve Zhang, Z. (2012). Anti-CD30-targeted gold nanoparticles for photothermal therapy of L-428 Hodgkin's cell. *International Journal of Nanomedicine, 7*, 6095-6103.

101. Choi, M.-R., Stanton-Maxey, K. J., Stanley, J. K., Levin, C. S., Bardhan, R., Akin, D., Badve, S., Sturgis, J., Robinson, J. P., Bashir, R., Halas, N. J., ve Clare, S. E. (2007). A Cellular Trojan Horse for Delivery of Therapeutic Nanoparticles into Tumors. *Nano Letters, 7*(12), 3759-3765.

102. Dreaden, E. C., Mwakwari, S. C., Austin, L. A., Kieffer, M. J., Oyelere, A. K., ve El-Sayed, M. A. (2012). Small Molecule–Gold Nanorod Conjugates Selectively Target and Induce Macrophage Cytotoxicity towards Breast Cancer Cells. *Small, 8*(18), 2819-2822.

103. Hu, M., Petrova, H., Chen, J., McLellan, J. M., Siekkinen, A. R., Marquez, M., Li, X., Xia, Y., ve Hartland, G. V. (2006). Ultrafast Laser Studies of the Photothermal Properties of Gold Nanocages. *Journal of Physical Chemistry B Letters, 110*(4), 1520-1524.

104. Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., ve El-Sayed, M. A. (2006). 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.

105. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., ve El-Sayed, M. A. (2006). Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles. *Photochemistry and Photobiology, 82*(2), 412-417.

106. Zhang, Z., Tongchusak, S., Mizukami, Y., Kang, Y. J., Ioji, T., Touma, M., Reinhold, B., Keskin, D. B., Reinherz, E. L., ve Sasada, T. (2011). Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery. *Biomaterials, 32*(14), 3666-3678.

107. Bastús, N. G., Sánchez-Tilló, E., Pujals, S., Farrera, C., Kogan, M. J., Giralt, E., Celada, A., Lloberas, J., ve Puntes, V. (2009). Peptides conjugated to gold nanoparticles induce macrophage activation. *Molecular Immunology, 46*(4), 743-748.

108. Schliehe, C., Redaelli, C., Engelhardt, S., Fehlings, M., Mueller, M., van Rooijen, N., Thiry, M., Hildner, K., Weller, H., ve Groettrup, M. (2011). $CD8^-$ Dendritic Cells and Macrophages Cross-Present Poly(D,L-lactate-co-glycolate) Acid Microsphere-Encapsulated Antigen In Vivo. *The Journal of Immunology, 187*(5), 2112-2121.

109. Zhou, X., Zhang, X., Yu, X., Zha, X., Fu, Q., Liu, B., Wang, X., Chen, Y., Chen, Y., Shan, Y., Jin, Y., Wu, Y., Liu, J., Kong, W., ve Shen, J. (2008). The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine. *Biomaterials, 29*(1), 111-117.

110. Fuller, D. H., Loudon, P., ve Schmaljohn, C. (2006). Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods, 40*(1), 86-97.

111. Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., ve McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87*(24), 9568-9572.

112. Wei, M., Chen, N., Li, J., Yin, M., Liang, L., He, Y., Song, H., Fan, C., ve Huang, Q. (2012). Polyvalent Immunostimulatory Nanoagents with Self-Assembled CpG Oligonucleotide-Conjugated Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition, 51*(5), 1202-1206.

113. Arvizo, R., Bhattacharya, R., ve Mukherjee, P. (2010). Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opinion on Drug Delivery, 7*(6), 753-763.

114. Paciotti, G. F., Kingston, D. G. I., ve Tamarkin, L. (2006). Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug Development Research, 67*(1), 47-54.

115. Lin, A. Y., Lunsford, J., Bear, A. S., Young, J. K., Eckels, P., Luo, L., Foster, A. E., ve Drezek, R. A. (2013). High-density sub-100-nm peptide-gold nanoparticle complexes improve vaccine presentation by dendritic cells in vitro. *Nanoscale Research Letters, 8*(1), 72.

116. Patra, C. R., Bhattacharya, R., Wang, E., Katarya, A., Lau, J. S., Dutta, S., Muders, M., Wang, S., Buhrow, S. A., Safgren, S. L., Yaszemski, M. J., Reid, J. M., Ames, M. M., Mukherjee, P., ve Mukhopadhyay, D. (2008). Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent. *Cancer Research, 68*(6), 1970-1978.

117. Joshi, M. D., Unger, W. J., Storm, G., van Kooyk, Y., ve Mastrobattista, E. (2012). Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *Journal of Controlled Release, 161*(1), 25-37.

118. Silva, J. M., Videira, M., Gaspar, R., Préat, V., ve Florindo, H. F. (2013). Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines. *Journal of Controlled Release, 168*(2), 179-199.

119. Toth, I., ve Skwarczynski, M. (2014). The immune system likes nanotechnology. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 9*(17), 2607-2609.

120. Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F. C., ve Plebanski, M. (2004). Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors. *The Journal of Immunology, 173*(5), 3148-3154.

121. Mahony, D., Cavallaro, A. S., Stahr, F., Mahony, T. J., Qiao, S. Z., ve Mitter, N. (2013). Mesoporous Silica Nanoparticles Act as a Self-Adjuvant for Ovalbumin Model Antigen in Mice. *Small, 9*(18), 3138-3146.

122. Knuschke, T., Sokolova, V., Rotan, O., Wadwa, M., Tenbusch, M., Hansen, W., Staeheli, P., Epple, M., Buer, J., ve Westendorf, A. M. (2013). Immunization with Biodegradable Nanoparticles Efficiently Induces Cellular Immunity and Protects against Influenza Virus Infection. *The Journal of Immunology, 190*(12), 6221-6229.

123. Mallapragada, S. K., ve Narasimhan, B. (2008). Immunomodulatory biomaterials. *International Journal of Pharmaceutics, 364*(2), 265-271.

124. Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K., ve Tokatlian, T. (2015). Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chemical Reviews, 115*(19), 11109-11146.

125. Caulfield, M. J., Shi, L., Wang, S., Wang, B., Tobery, T. W., Mach, H., Ahl, P. L., Cannon, J. L., Cook, J. C., Heinrichs, J. H., ve Sitrin, R. D. (2007). Effect of Alternative Aluminum Adjuvants on the Absorption and Immunogenicity of HPV16 L1 VLPs in Mice. *Human Vaccines, 3*(4), 139-145.

126. Lugade, A. A., Bharali, D. J., Pradhan, V., Elkin, G., Mousa, S. A., ve Thanavala, Y. (2013). Single low-dose un-adjuvanted HBsAg nanoparticle vaccine elicits robust, durable immunity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 9*(7), 923-934.

127. Au, L., Zheng, D., Zhou, F., Li, Z.-Y., Li, X., ve Xia, Y. (2008). A Quantitative Study on the Photothermal Effect of Immuno Gold Nanocages Targeted to Breast Cancer Cells. *American Chemical Society Nano, 2*(8), 1645-1652.

128. Sun, Y., Mayers, B. T., ve Xia, Y. (2002). Template-Engaged Replacement Reaction: A One-Step Approach to the Large-Scale Synthesis of Metal Nanostructures with Hollow Interiors. *Nano Letters, 2*(5), 481-485.

129. Sun, Y., ve Xia, Y. (2002). Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science, 298*(5601), 2176-2179.

130. Skrabalak, S. E., Chen, J., Sun, Y., Lu, X., Au, L., Cobley, C. M., ve Xia, Y. (2008). Gold nanocages: synthesis, properties, and applications. *Accounts of Chemical Research, 41*(12), 1587-1595.

131. Chen, J., Wiley, B., Li, Z. Y., Campbell, D., Saeki, F., Cang, H., Au, L., Lee, J., Li, X., ve Xia, Y. (2005). Gold Nanocages: Engineering Their Structure for Biomedical Applications. *Advanced Materials, 17*(18), 2255-2261.

132. Ma, C., Zhang, R., Liaw, J.-W., ve Cheng, J.-C. (2014). Plasmonic modes of nanobox, nanocage, and nanoframe. *Applied Physics A, 115*(1), 31-37.

133. Chen, J., Saeki, F., Wiley, B. J., Cang, H., Cobb, M. J., Li, Z. Y., Au, L., Zhang, H., Kimmey, M. B., Li, X., ve Xia, Y. (2005). Gold nanocages: bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents. *Nano Letters, 5*(3), 473-477.

134. Li, W., Brown, P. K., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2011). Gold nanocages as contrast agents for photoacoustic imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging, 6*(5), 370-377.

135. Chen, Y., Zhang, Y., Liang, W., ve Li, X. (2012). Gold nanocages as contrast agents for two-photon luminescence endomicroscopy imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 8*(8), 1267-1270.

136. Wang, Y., Black, K. C. L., Luehmann, H., Li, W., Zhang, Y., Cai, X., Wan, D., Liu, S.-Y., Li, M., Kim, P., Li, Z.-Y., Wang, L. V., Liu, Y., ve Xia, Y. (2013). Comparison Study of Gold Nanohexapods, Nanorods, and Nanocages for Photothermal Cancer Treatment. *American Chemical Society Nano, 7*(3), 2068-2077.

137. Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., Li, Z. Y., Zhang, H., Xia, Y., ve Li, X. (2007). Immuno gold nanocages with tailored optical properties for targeted photothermal destruction of cancer cells. *Nano Letters, 7*(5), 1318-1322.

138. Kim, C., Cho, E. C., Chen, J., Song, K. H., Au, L., Favazza, C., Zhang, Q., Cobley, C. M., Gao, F., Xia, Y., ve Wang, L. V. (2010). In vivo molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages. *ACS Nano, 4*(8), 4559-4564.

139. Wang, Y., Liu, Y., Luehmann, H., Xia, X., Brown, P., Jarreau, C., Welch, M., ve Xia, Y. (2012). Evaluating the Pharmacokinetics and In Vivo Cancer Targeting Capability of Au Nanocages by Positron Emission Tomography Imaging. *American Chemical Society Nano, 6*(7), 5880-5888.

140. Xia, X., ve Xia, Y. (2014). Gold nanocages as multifunctional materials for nanomedicine. *Frontiers of Physics, 9*(3), 378-384.

141. Demeritte, T., Fan, Z., Sinha, S. S., Duan, J., Pachter, R., ve Ray, P. C. (2014). Gold Nanocage Assemblies for Selective Second Harmonic Generation Imaging of Cancer Cell. *Chemistry – A European Journal, 20*(4), 1017-1022.

142. Xia, Y., Li, W., Cobley, C. M., Chen, J., Xia, X., Zhang, Q., Yang, M., Cho, E. C., ve Brown, P. K. (2011). Gold Nanocages: From Synthesis to Theranostic Applications. *Accounts of Chemical Research, 44*(10), 914-924.

143. Au, L., Zhang, Q., Cobley, C. M., Gidding, M., Schwartz, A. G., Chen, J., ve Xia, Y. (2010). Quantifying the Cellular Uptake of Antibody-Conjugated Au Nanocages by Two-Photon Microscopy and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *American Chemical Society Nano, 4*(1), 35-42.

144. Wang, Y., Xu, J., Xia, X., Yang, M., Vangveravong, S., Chen, J., Mach, R. H., ve Xia, Y. (2012). SV119-gold nanocage conjugates: a new platform for targeting cancer cellsvia sigma-2 receptors. *Nanoscale, 4*(2), 421-424.

145. Wang, Z., Chen, Z., Liu, Z., Shi, P., Dong, K., Ju, E., Ren, J., ve Qu, X. (2014). A multi-stimuli responsive gold nanocage–hyaluronic platform for targeted photothermal and chemotherapy. *Biomaterials, 35*(36), 9678-9688.

146. Cai, X., Li, W., Kim, C.-H., Yuan, Y., Wang, L. V., ve Xia, Y. (2011). In Vivo Quantitative Evaluation of the Transport Kinetics of Gold Nanocages in a Lymphatic System by Noninvasive Photoacoustic Tomography. *American Chemical Society Nano, 5*(12), 9658-9667.

147. Shi, P., Liu, Z., Dong, K., Ju, E., Ren, J., Du, Y., Li, Z., ve Qu, X. (2014). A Smart "Sense-Act-Treat" System: Combining a Ratiometric pH Sensor with a Near Infrared Therapeutic Gold Nanocage. *Advanced Materials, 26*(38), 6635-6641.

148. Bastús, N. G., Sánchez-Tilló, E., Pujals, S., Farrera, C., López, C., Giralt, E., Celada, A., Lloberas, J., ve Puntes, V. (2009). Homogeneous Conjugation of Peptides onto Gold Nanoparticles Enhances Macrophage Response. *American Chemical Society Nano, 3*(6), 1335-1344.

149. Skrabalak, S. E., Au, L., Li, X., ve Xia, Y. (2007). Facile synthesis of Ag nanocubes and Au nanocages. *Nature Protocols, 2*(9), 2182-2190.

150. Bancos, S., Stevens, D. L., ve 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.

151. Chamberlain, L. M., Godek, M. L., Gonzalez-Juarrero, M., ve Grainger, D. W. (2009). Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A, 88*(4), 858-871.

152. Vicente, S., Diaz-Freitas, B., Peleteiro, M., Sanchez, A., Pascual, D. W., Gonzalez-Fernandez, A., ve Alonso, M. J. (2013). A polymer/oil based nanovaccine as a single-dose immunization approach. *PloS One, 8*(4), e62500.

153. Saini, V., Jain, V., Sudheesh, M. S., Dixit, S., Gaur, R. L., Sahoo, M. K., Joseph, S. K., Verma, S. K., Jaganathan, K. S., Murthy, P. K., ve Kohli, D. (2010). Humoral and cell-mediated immune-responses after administration of a single-shot recombinant hepatitis B surface antigen vaccine formulated with cationic poly(l-lactide) microspheres. *Journal of Drug Targeting, 18*(3), 212-222.

154. Vicente, S., Peleteiro, M., Díaz-Freitas, B., Sanchez, A., González-Fernández, Á., ve Alonso, M. J. (2013). Co-delivery of viral proteins and a TLR7 agonist from polysaccharide nanocapsules: A needle-free vaccination strategy. *Journal of Controlled Release, 172*(3), 773-781.

155. Saini, V., Sahoo, M. K., Murthy, P. K., ve Kohli, D. (2009). Polymeric lamellar substrate particles as carrier adjuvant for recombinant hepatitis B surface antigen vaccine. *Vaccine, 27*(17), 2372-2378.

156. Thomas, C., Rawat, A., Hope-Weeks, L., ve Ahsan, F. (2011). Aerosolized PLA and PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine. *Molecular Pharmaceutics, 8*(2), 405-415.

157. Wang, W., Chen, C., Li, X., Wang, S., ve Luo, X. (2015). A bioresponsive controlled-release bioassay based on aptamer-gated Au nanocages and its application in living cells. *Chemical Communications, 51*(44), 9109-9112.

158. Gao, L., Fei, J., Zhao, J., Li, H., Cui, Y., ve Li, J. (2012). Hypocrellin-loaded gold nanocages with high two-photon efficiency for photothermal/photodynamic cancer therapy in vitro. *American Chemical Society Nano, 6*(9), 8030-8040.

159. Robinson, R., Gerlach, W., ve Ghandehari, H. (2015). Comparative effect of gold nanorods and nanocages for prostate tumor hyperthermia. *Journal of Controlled Release, 220, Part A*, 245-252.

160. Berghaus, L. J., Moore, J. N., Hurley, D. J., Vandenplas, M. L., Fortes, B. P., Wolfert, M. A., ve Boons, G.-J. (2010). Innate immune responses of primary murine macrophage-lineage cells and RAW 264.7 cells to ligands of Toll-like receptors 2, 3, and 4. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 33*(5), 443-454.

161. Bancos, S., Tsai, D. H., Hackley, V., Weaver, J. L., ve Tyner, K. M. (2012). Evaluation of Viability and Proliferation Profiles on Macrophages Treated with Silica NanoparticlesIn Vitrovia Plate-Based, Flow Cytometry, and Coulter Counter Assays. *International Scholarly Research Notices Nanotechnology, 2012*, 1-11.

162. Singh, R. P., ve Ramarao, P. (2013). Accumulated polymer degradation products as effector molecules in cytotoxicity of polymeric nanoparticles. *Toxicological Sciences, 136*(1), 131-143.

163. Shardlow, E., Mold, M., ve Exley, C. (2016). From Stock Bottle to Vaccine: Elucidating the Particle Size Distributions of Aluminum Adjuvants Using Dynamic Light Scattering. *Frontiers in Chemistry, 4*, 48.

164. Internet: Biosciences, A., xCELLigence RTCA DP. *ACEA BIO*. http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Faceabio.com%2Fproduct%2Frtca-dp%2F&date=2016-11-28, Son Erişim Tarihi: 28.11.2016.

165. Vicente, S., Peleteiro, M., Gonzalez-Aramundiz, J. V., Díaz-Freitas, B., Martínez-Pulgarín, S., Neissa, J. I., Escribano, J. M., Sanchez, A., González-Fernández, Á., ve Alonso, M. J. (2014). Highly versatile immunostimulating nanocapsules for specific immune potentiation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 9*(15), 2273-2289.

166. Al-Ahmad, A., Laird, D., Zou, P., Tomakidi, P., Steinberg, T., ve Lienkamp, K. (2013). Nature-Inspired Antimicrobial Polymers – Assessment of Their Potential for Biomedical Applications. *PloS One, 8*(9), e73812.

167. Du, L., Miao, X., Jia, H., Gao, Y., Liu, K., Zhang, X., ve Liu, Y. (2012). Detection of nitric oxide in macrophage cells for the assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles. *Talanta, 101*, 11-16.

168. Ahn, S., Singh, P., Castro-Aceituno, V., Yesmin Simu, S., Kim, Y.-J., Mathiyalagan, R., ve Yang, D.-C. (2016). Gold nanoparticles synthesized using Panax ginseng leaves suppress inflammatory - mediators production via blockade of NF-κB activation in macrophages. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-7.

169. Lim, H.-S., Yeji, K., Seo, C.-S., Yoo, S.-R., Jin, S.-E., Shin, H.-K., ve Jeong, S.-J. (2015). Chungsimyeonja-eum inhibits inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages and HaCaT keratinocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 15*(1), 371.

170. Shi, P., Liu, Z., Dong, K., Ju, E., Ren, J., Du, Y., Li, Z., ve Qu, X. (2014). A smart "sense-act-treat" system: combining a ratiometric pH sensor with a near infrared therapeutic gold nanocage. *Adv Mater, 26*(38), 6635-6641.

171. Lee, I. K., Jeun, M., Jang, H. J., Cho, W. J., ve Lee, K. H. (2015). A self-amplified transistor immunosensor under dual gate operation: highly sensitive detection of hepatitis B surface antigen. *Nanoscale, 7*(40), 16789-16797.

172. Tafaghodi, M., Saluja, V., Kersten, G. F. A., Kraan, H., Slatter, B., Amorij, J.-P., ve Jiskoot, W. (2012). Hepatitis B surface antigen nanoparticles coated with chitosan and trimethyl chitosan: Impact of formulation on physicochemical and immunological characteristics. *Vaccine, 30*(36), 5341-5348.

173. Greiner, V. J., Manin, C., Larquet, E., Ikhelef, N., Gréco, F., Naville, S., Milhiet, P.-E., Ronzon, F., Klymchenko, A., ve Mély, Y. (2014). Characterization of the structural modifications accompanying the loss of HBsAg particle immunogenicity. *Vaccine, 32*(9), 1049-1054.

174. Pawar, D., Mangal, S., Goswami, R., ve Jaganathan, K. S. (2013). Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 85*(3, Part A), 550-559.

175. Mishra, N., Tiwari, S., Vaidya, B., Agrawal, G. P., ve Vyas, S. P. (2011). Lectin anchored PLGA nanoparticles for oral mucosal immunization against hepatitis B. *Journal of Drug Targeting, 19*(1), 67-78.

176. Xu, Y., Tang, H., Liu, J.-h., Wang, H., ve Liu, Y. (2013). Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both in vitro and in vivo. *Toxicology Letters, 219*(1), 42-48.

177. Park, H., Kim, S., Kim, S., Song, Y., Seung, K., Hong, D., Khang, G., ve Lee, D. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydroxybenzyl Alcohol Releasing Biodegradable Polyoxalate Nanoparticles. *Biomacromolecules, 11*(8), 2103-2108.

178. Jorjao, A. L., Oliveira, F. E. d., Leao, M. V. P., Carvalho, C. A. T., Jorge, A. O. C., ve Oliveira, L. D. d. (2015). Live and Heat-Killed Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 May Induce Modulatory Cytokines Profiles on Macrophages RAW 264.7. *The Scientific World Journal, 2015*, 6.

179. Hong, G.-E., Kim, J.-A., Nagappan, A., Yumnam, S., Lee, H.-J., Kim, E.-H., Lee, W.-S., Shin, S.-C., Park, H.-S., ve Kim, G.-S. (2013). Flavonoids Identified from Korean Scutellaria baicalensis Georgi Inhibit Inflammatory Signaling by Suppressing Activation of NF-kB and MAPK in RAW 264.7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013*, 11.

180. Chamberlain, L. M., Holt-Casper, D., Gonzalez-Juarrero, M., ve Grainger, D. W. (2015). Extended culture of macrophages from different sources and maturation results in a common M2 phenotype. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103*(9), 2864-2874.

181. Mackey, M. A., Saira, F., Mahmoud, M. A., ve El-Sayed, M. A. (2013). Inducing Cancer Cell Death by Targeting Its Nucleus: Solid Gold Nanospheres versus Hollow Gold Nanocages. *Bioconjugate Chemistry, 24*(6), 897-906.

182. Du, L., Miao, X., Jia, H., Gao, Y., Liu, K., Zhang, X., ve Liu, Y. (2012). Detection of nitric oxide in macrophage cells for the assessment of the cytotoxicity of gold nanoparticles. *Talanta, 101*, 11-16.

183. Jacobs, A. T., ve Ignarro, L. J. (2001). LPS-induced expression of IFN-β mediates the timing of iNOS induction in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*.

184. Bhattacharjee, S., Ershov, D., Fytianos, K., van der Gucht, J., Alink, G. M., Rietjens, I. M. C. M., Marcelis, A. T. M., ve Zuilhof, H. (2012). Cytotoxicity and cellular uptake of tri-block copolymer nanoparticles with different size and surface characteristics. *Particle and Fibre Toxicology, 9*(1), 11.

185. Kim, S., Shin, S., Hyun, B., Kong, H., Han, S., Lee, A., Lee, S., ve Kim, K. (2012). Immunomodulatory Effects of Dioscoreae Rhizome Against Inflammation through Suppressed Production of Cytokines Via Inhibition of the NF-κB Pathway. *Immune Network, 12*(5), 181-188.

186. De Temmerman, M.-L., Rejman, J., Demeester, J., Irvine, D. J., Gander, B., ve De Smedt, S. C. (2011). Particulate vaccines: on the quest for optimal delivery and immune response. *Drug Discovery Today, 16*(13–14), 569-582.

187. Leroy, P., Sapin-Minet, A., Pitarch, A., Boudier, A., Tournebize, J., ve Schneider, R. (2011). Interactions between gold nanoparticles and macrophages: Activation or inhibition? *Nitric Oxide, 25*(1), 54-56.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YAVUZ, Emine

Uyruğu : TC

Doğum tarihi ve yeri : 13.08.1979 Düzce

Medeni hali : Evli

Telefon : 05548946543

e-mail : emineyavuz2010@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ABD	2010-devam ediyor
Yüksek Lisans	Worcester Polytechnic Institute, ABD, Biyokimya	2004
Lisans	Boğaziçi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya	2001
Lise	Düzce Arsal Anadolu Lisesi	1997

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-devam ediyor	Selçuk Üniversitesi	Uzman

Yayınlar

1- Bas, H. D., Baser, K., Yavuz E., Bolayir, H.A., Yaman, B., MD, Unlu, S., Cengel, A., Bagriacik, E. U., ve Yalcin, R. (2014). A Shift in the Balance of Regulatory T and T Helper 17 Cells in Rheumatic Heart Disease. *Journal of Investigative Medicine*, *62(1),* 78-83.

2- Ulasan, M., Yavuz, E., Bagriacik, E. U., Cengeloglu, Y., ve Yavuz, M. S. (2015). Biocompatible thermoresponsive PEGMA nanoparticles crosslinked with

3- cleavable disulfide-based crosslinker for dual drug release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 103 (1),* 243–251.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve/veya bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- YAVUZ EMİNE, UYAR ARPACI PEMBEGÜL, ŞAKALAK HÜSEYİN, ÇAVUŞOĞLU HALİT, YAVUZ MUSTAFA, BAĞRIAÇIK EMİN ÜMİT (2016). Evaluation of the adjuvant effect of goldnanocages in vitro. ICI2016, 46, 1-1274., Doi: 10.1002/eji.201670200 (Özet Bildiri/Poster)

2- YAVUZ EMİNE, UYAR ARPACI PEMBEGÜL, YAVUZ MUSTAFA SELMAN, BAĞRIAÇIK EMİN ÜMİT (2016). Immunostimulatory Effect of Biocompatible Gold Nanocages on Macrophages. NanoTR12 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

3- YAVUZ EMİNE, BAĞRIAÇIK EMİN ÜMİT, YAVUZ MUSTAFA (2016). Evaluation of the immunomodulatory effect of gold nanocages on macrophages in vitro. MIMICIII, 4 (Özet Bildiri/Poster)

4- BAS HATİCE DUYGU, BASER KAZIM, YAVUZ EMİNE, YAMAN BELMA, UNLU SERKAN, BAĞRIAÇIK EMİN ÜMİT, ÇENGEL ATİYE, YALÇIN MEHMET RIDVAN (2013). High Th17/Tregratio in rheumatic heart disease. EUROPEAN HEART JOURNAL, 34, 697-698. (Uluslararası) (Hakemli) (MAKALE Özet)



GAZİ OLMAK AYRICALIKTIR..