

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEROPENEM İLE KAPLI ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN  
ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Nurullah ÇİFTÇİ**

**DOKTORA TEZİ**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Prof. Dr. Uğur ARSLAN**

**Konya-2023**

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEROPENEM İLE KAPLI ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN  
ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN *İN VİTRO*  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**Nurullah ÇİFTÇİ**

**DOKTORA TEZİ**

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**  
**Prof. Dr. Uğur ARSLAN**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Projesi (ÖYP)  
Koordinatörlüğü tarafından 2017-ÖYP-015 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Konya-2023**



## ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitim sürecim boyunca ders ve tez dönemimde akademik bilgilerini ve deneyimlerini paylaşan, tezimin her aşamasında karşılaştığım tüm sorunlarıma çözümleyici yaklaşımlar sunan, öğrencilik sürecimde desteğini ve teşviğini eksik etmeyen, öğrencisi olmaktan memnuniyet duyduğum değerli danışmanım, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Uğur ARSLAN'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitim sürecinde akademik bilgi ve deneyimlerini paylaşan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, Prof. Dr. Hatice TÜRK DAĞI'na ve Doç. Dr. Salih MAÇİN'e teşekkür ederim. Biyokimyasal analiz ve Laboratuvar çalışmalarını birlikte yaptığımız değerli hocalarım Prof. Dr. Gülşin ARSLAN'a ve Doç. Dr. İdris SARGIN'a gösterdikleri sabır ve ilgiden dolayı teşekkür ederim. Tez sürecinde birlikte çalıştığımız Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Araştırma görevlileri ve laboratuvar çalışanlarına verdikleri desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana desteklerini her zaman hissettiğim, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her zaman sabır gösteren değerli babam, annem, eşim, oğlum ve kardeşlerime ayrıca teşekkür etmek istiyorum.

Ayrıca bu çalışmanın yapılmasında 2017-ÖYP-015 proje numarası ile maddi olanak sağlayan Selçuk Üniversitesi ÖYP koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Nurullah ÇİFTÇİ  
Konya/2023

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	v
<b>ÖZET</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Nanopartiküllerin Tanımı.....	2
1.3. Nanoteknolojinin Tarihçesi.....	3
1.4. Nanopartikül Çeşitleri.....	4
1.4.1. Metal Nanopartiküller.....	5
1.4.2. Metal oksit nanopartiküller.....	5
1.4.3. Bimetalik nanopartiküller.....	5
1.4.4. Kompozit nanopartiküller.....	6
1.4.5. Karbon Yapıda Nanopartiküller.....	6
1.4.6. Zeolite ve Silika Temelli Nanopartiküller.....	6
1.4.7. Seramik Nanopartiküller.....	6
1.4.8. Yarı İletken Nanopartiküller.....	7
1.4.9. Polimerik Nanopartiküller.....	7
1.4.10. Lipid Temelli Nanopartiküller.....	8
1.4.11. Metal-Organik Çerçevesel.....	8
1.5. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri.....	8
1.5.1. Turkevich Yöntemi.....	9
1.5.2. Brust-Schiffrin Yöntemi.....	10
1.5.3. Tohum Büyütme Yöntemi.....	11
1.5.4. Diğer Sentez Yöntemleri.....	12
1.6. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	13
1.6.1. Partikül Boyutu.....	14
1.6.2. Yüzey Yükü.....	17
1.6.3. Yüzey Hidrofobikliği.....	17
1.6.4. İlaç Salınımı.....	17
1.7. Nanopartiküllerin Tıpta Kullanım Alanları.....	18
1.7.1. Nanopartiküllerin Tanı Amaçlı Kullanımı.....	18
1.7.2. Nanopartiküllerin Tedavi Amaçlı Kullanımı.....	23
1.8. Karbapenemler.....	26
1.8.1. Kimyasal Özellikleri.....	27

1.8.2. Etki Mekanizması .....	27
1.8.3. Direnç Mekanizması .....	28
1.8.4. Farmakokinetik .....	29
1.8.5. Yan etkiler.....	30
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>31</b>
2.1. Örneklerin Toplanması .....	31
2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar .....	31
2.2.1. Mueller Hinton Broth.....	31
2.2.2. Gold (III) Chloride Hydrate .....	31
2.2.3. Trisodyum Sitrata .....	32
2.2.4. Meropenem Trihydrate .....	32
2.3. Altın Nanopartiküllerin Sentezi .....	32
2.4. Nanopartiküllerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu.....	34
2.4.1. Spektrofotometre ile Boyut Analizi .....	34
2.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Partikül Boyutu ve Morfoloji Analizi .....	34
2.5. Altın Nanopartiküllerin Antibiyotik ile Kaplanması .....	35
2.6. Meropenem Konsantrasyon Eğrisi .....	36
2.7. İn Vitro Antibakteriyel Duyarlılık Testi .....	36
2.8. Hücre Kültürü .....	37
2.9. Meropenem Kaplı Altın Nanopartiküllerin Bakteri ile İlişkisinin TEM Mikroskobu ile Görüntülenmesi .....	37
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>39</b>
3.1. Örneklerin Toplanması ve Çalışılması .....	39
3.2. Nanopartikül Sentezi ve Spektrofotometre ile Kalibrasyonu .....	39
3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Nanopartikül Boyut Analizi.....	41
3.4. Antibiyotik Bağlanması ve TEM Görüntüleri .....	43
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Sonuçları.....	44
3.6. Bakteri ve Nanopartikül+Antibiyotik Etkileşiminin TEM Görüntüleri .....	47
3.7. Hücre Kültürü Sonuçları.....	48
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>55</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>56</b>
<b>7. EKLER</b> .....	<b>64</b>
7.1. EK-A Etik Kurul Raporu .....	64
<b>8. TURNİTİN RAPORU</b> .....	<b>65</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerikan Birleşik Devletleri
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Ag	Gümüş
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American type culture collection
Au	Altın
AuNP	Altın nanopartikül
BT	Bilgisayarlı tomografi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CRP	C reaktif protein
CTAB	Hekzaderasil trimelamonyum bromür
DLS	Dinamik ışık saçılımı
$\lambda_{max}$	Maksimum dalga boyu
g	Gram
HAADF	Yüksek açısallık halka şeklindeki karanlık alan
HaCat	Human keratinocyte cell line
HAP	Hidroksiapatit
HAuCl <sub>4</sub>	Kloraurik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
GSBL	Genişlemiş spektrumlu $\beta$ -laktamaz direnci
IL-1	Interlökin 1
IL-6	Interlökin 6
IV	Damar içi
LSPR	Lokalize yüzey plazmon rezonansı
m	Metre
mem	Meropenem
MIK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
Mg	Miligram
mm	Milimetre

$\mu\text{m}$	Mikrometre
mM	Milimolar
M.Ö.	Milattan önce
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
M.S.	Milattan sonra
$\text{NaBH}_4$	Sodyum borhidrür
ncHAP	Nanoseramikler
NIR	Near infrared
Nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tampon
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
PVP	Vinil piroliden
QDs	Kuantum dots
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
T	Zaman
TEM	Geçirimli Elektron mikroskobu
TNF- $\alpha$	Tumor nekroz faktör-alfa
TOABr	Tetraoktilamonyum bromür
UV	Ultraviöle
Y.Y.	Yüzyıl



# ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## Meropenem ile Kaplı Altın Nanopartiküllerin Antimikrobiyal ve Sitotoksik Etkisinin *In Vitro* Olarak Araştırılması

Nurullah ÇİFTÇİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü

Doktora Tezi/Konya, 2023

Karbapenemler en geniş spektrumlu B- laktam grubu antibiyotiklerdendir ve çoklu ilaç direncine sahip Gram negatif/pozitif aerob/anaerob bakterilere karşı etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler klinisyenler tarafında son çare ilaç olarak kullanılmaktadır. Antimikrobiyal ajanların biyolojik olarak çözünen ve biyo uyumlu nanoparçacıklar ile kapsüllenmesi, zamana bağlı kontrollü ilaç salınımına imkan sağlayabilir. Böylece, ilacın hem dolaşımdaki yarı ömrü arttırılabilir hem de ilacın daha yüksek konsantrasyonlarda enfeksiyon bölgesinde bulunmasını sağlayabilir. Bu çalışmada karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenemi altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlayarak karbapenem direncine sahip *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *S. marcessens* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı *in vitro* ortamda etkinliğini ve yapacağımız hücre kültürü çalışması ile de sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Altın nanopartiküllerin sentezi Turkevic yöntemine göre indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılarak yapıldı. Trisodyum sitrat oranına bağlı olarak farklı boyutlarda nanopartikül sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu Uv-vis Spektrofotometre ve TEM mikroskobu kullanılarak yapıldı. Meropenem ile kaplı altın nanopartiküllerin antimikrobiyal etkileri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. Hücre kültürü çalışmaları Alamar Blue ile Sitotoksisite Tayini yöntemine göre yapılmıştır. Çalışmamız CCD18Co (ATCC CRL-1459) insan sağlıklı kolon epitel hücre hatları kullanılarak yapıldı.

Bu çalışmada, 1 Ocak 2020-31 Aralık 2021 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kültür örneklerinden izole edilen 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae*, 20 *P. aeruginosa*, 20 *E. coli*, 20 *Proteus spp.* ve iki *Serratia spp* suşları ve ATCC 700603 *K. pneumoniae* ve ATCC 25922 *E. coli* suşları dahil toplam 104 suş çalışmaya dahil edilmiştir. 2,5 ml tri sodyum sitrat ile sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutu 10,92 nm, 5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 25,98 nm ve 10 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 36 nm olarak hesaplandı. Meropenem bağlanma konsantrasyonu 2,5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte meropenem konsantrasyonu 0,964 (%73,5) 5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte 0,938 (%71) ve 10 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte bağlanma konsantrasyonu 0,804 (%61) olarak hesaplanmıştır. İncelediğimiz çoklu ilaç direncine sahip 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae* ve 20 *P. aeruginosa* suşlarında hem saf meropenemlere karşı hemde mem+AuNP kombinasyonlarına karşı herhangi bir antimikrobiyal etki saptanmadı. İncelediğimiz *E. coli* ve *Proteus spp.* ve *S. marcessens* suşlarında mem+NPS kombinasyonunun meropeneme göre daha etkili olduğu ve 10-20 nm boyutundaki nanopartiküllerin diğerlerine kıyasla daha etkili olduğu saptandı. Yaptığımız çalışmadan da anlaşılacağı üzere altın nanopartiküllerin meropenem ile kaplanması hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı, ancak yüksek konsantrasyonlarda hücreler üzerinde sitotoksik etki yarattığı saptandı.

Sonuç olarak, nanopartiküllerin antibiyotikler ile kaplanarak etkinliğinin artırılması bakteriyel enfeksiyonların tedavisi açısından önem arz etmektedir. Ancak, bizim çalışmamız ve literatürdeki diğer çalışmalar *in vitro* koşullarda nanopartiküllerin etkinliklerini incelemek üzere hazırlanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* etki farklı olabilmektedir. Bu nedenle bu etkinin hayvan deneyleri veya insanlar üzerinde *in vivo* çalışmaları yapılarak etkinliklerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Altın Nanopartikül; Hücre Kültürü; Meropenem

## SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY  
SELCUK UNIVERSITY  
INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

### Investigation of In Vitro Antimicrobial and Cytotoxic Effect of Gold Nanoparticles Capped with Meropenem

Nurullah CIFTCI

Department of Medical Microbiology

Ph.D. THESIS/KONYA-2023

Carbapenems are among the broad-spectrum B-lactam group antibiotics and are used effectively against Gram-negative/positive aerobic/anaerobic bacteria with multi-drug resistance. These antibiotics are used by clinicians as drugs of last resort. Encapsulation of antimicrobial agents with biodegradable and compatible nanoparticles may allow time-dependent controlled drug release. Thus, it can both increase the circulating half-life of the drug and provide higher concentrations of the drug at the site of infection. In this study, meropenem, which is one of the carbapenem group antibiotics, binds to the surface of gold nanoparticles, and its efficacy in vitro against carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *S. marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

The synthesis of gold nanoparticles was carried out according to the Turkevich method using trisodium citrate as a reducing agent. Depending on the trisodium citrate ratio, different sizes of nanoparticles were synthesized. The characterization of the synthesized nanoparticles was performed using UV-vis Spectrophotometer and TEM microscope. Antimicrobial effects of gold nanoparticles coated with meropenem were performed by broth microdilution method. Cell culture studies were performed according to the Cytotoxicity Assay method with Alamar Blue. Our study was performed using CCD18Co (ATCC CRL-1459) human healthy colon epithelial cell lines.

In this study, 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae*, 20 *P. aeruginosa*, 20 *E. coli*, 20 *Proteus spp.* and two *Serratia spp* strains and ATCC 700603 *K. pneumoniae* and ATCC 25922 *E. coli* strains were included in the study. The size of gold nanoparticles synthesized with 2.5 ml of tri sodium citrate was calculated as 10.92 nm, the size of gold nanoparticles prepared with 5 ml of trisodium citrate was calculated as 25.98 nm and the size of gold nanoparticles prepared with 10 ml of trisodium citrate was calculated as 36 nm. Meropenem binding concentration was calculated as 0.964 (73.5%) in the sample prepared with 2.5 ml trisodium citrate, 0.938 (71%) in the sample prepared with 5 ml trisodium citrate and 0.804 (61%) in the sample prepared with 10 ml trisodium citrate. . No antimicrobial effect was detected against both pure meropenems and mem+AuNP combinations in 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae* and 20 *P. aeruginosa* strains with multidrug resistance. The *E. coli* and *Proteus spp.* and *S. marcescens* strains, the combination of mem+NPS was found to be more effective than meropenem, and nanoparticles with a size of 10-20 nm were more effective than the others. As it can be understood from our study, it was determined that the coating of gold nanoparticles with meropenem did not have negative effects on cell viability, but it had a cytotoxic effect on cells at high concentrations.

As a result, increasing the efficiency of nanoparticles by coating them with antibiotics is important for the treatment of bacterial infections. However, our study and other studies in the literature were prepared to examine the activities of nanoparticles in vitro. The in vitro and in vivo effect may be different. For this reason, it is important to evaluate the effectiveness of this effect by performing animal experiments or in vivo studies on humans.

**Keywords:** Cell culture, Gold nanoparticles, Meropenem

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Giriş ve Amaç

Karbapenemler en geniş spektrumlu B- laktam grubu antibiyotiklerdendir ve çoklu ilaç direncine sahip Gram negatif/pozitif aerob/anaerob bakterilere karşı etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler klinisyenler tarafında son çare ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdikleri direnç hastaların tedavisinde ciddi zorluklar ortaya çıkarmaktadır. Bakterilerin karbapenemlere karşı direnç geliştirme sıkıntısının üstesinden gelmek için araştırma stratejileri geliştirilmiştir. İlk olarak, aynı veya farklı mekanizmaya sahip iki veya üç antibiyotik ile kombinasyon tedavisi uygulanarak sinejistik etki ile direnç gelişimini engellenebilmektedir. Ancak, kombinasyon tedavisi uygun dozlarda ve doğru bir şekilde uygulanabilirse direnç gelişimini geciktirebilir. Ayrıca kombinasyon tedavisinin sonucunda hastaya yüksek dozlarda antibiyotik verilmesi ve iki ilacın potansiyel etkileşimi sonucu oluşabilecek yan etkiler gibi dezavantajları bulunmaktadır. İkinci strateji ise antibiyotiğin kendisini *in vivo* hidrolizden koruyarak, antibakteriyel etkisinin azalmasını önlemektir (Paczkowska ve ark 2016). Üçüncü strateji ise karbapenemlerin işaretlenen hedefe ulaşmasını sağlayan akılcı ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesidir. Ancak, bu yöntem halen geliştirilebilmiş değildir ve bilim adamları problemlerin çözümü için çalışmaktadırlar (Drulis-Kawa ve ark 2006). Antibiyotiklerin etkilerini arttırmak için en son kullanılan stratejilerden biri antibiyotikleri metalik nanopartiküller ile birleştirip etkilerinin artırılmasıdır (Brooks ve Brooks 2014, Pei ve Yeo 2016). Nanopartikülleri bakterilerin hücre geçirgenliğini arttırması, efluks pompa sistemini azaltması ve biofilm oluşumunu önlemesi gibi özellikleri ile direnç oluşumunda engelleyebilirler (Huh ve Kwon 2011, Pelgrift ve Friedman 2013). Bu metalik nanopartiküller kullanılarak aminoglikozid, ampisilin, amoksisilin, siprofloksasin ve vankomisin gibi antibiyotiklerin etkileri başarılı bir şekilde arttırılmıştır (Tom ve ark 2004, Hondow ve ark 2012, Rastogi ve ark 2012, Gannimani ve ark 2016, Kalita ve ark 2016).

Antimikrobiyal ajanların biyolojik olarak çözünen ve uyumlu nanoparçacıklar ile kapsüllenmesi, zamana bağlı kontrollü ilaç salınımına imkan sağlayabilir. Böylece, ilacın hem dolaşımdaki yarı ömrü arttırabilir hem de ilacın daha yüksek konsantrasyonlarda enfeksiyon bölgesinde bulunmasını sağlayabilir. Bu özelliklerine bağlı olarak enfeksiyon olgularında daha düşük dozlarda ve daha az sıklıkla tedavi uygulanmasına imkan sağlayarak ilaçların olası yan etkilerinden hastayı korumuş olmaktadır (Lim ve ark 2016, Mekkawy ve ark 2017). Metalik nanopartiküller arasında altın nanopartiküllerin insan vücuduna uyum göstermesi ve farklı

boyutlarda ve şekillerde kesiminin kolay olmasından dolayı uygulanmasında diğer nanopartiküllere kıyasla avantajları bulunmaktadır. Ayrıca, ilaç kaplanmasına uygunluğuna ilaveten güçlü bir elektrostatik adsorbsiyon gücüne sahip olması ve kovalent bağlama yüzeyine sahip olması gibi avantajları da bulunmaktadır (Vigderman ve Zubarev 2013).

Bu çalışmada karbapenem grubu antibiyotiklerden meropenemi altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlayarak karbapenem direncine sahip *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *S. marcessens* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı *in vitro* ortamda etkinliğine ve yapacağımız hücre kültürü çalışması ile de sitotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, farklı boyutlarda kesilmiş nanopartiküller kullanılarak, partikül boyutuna bağlı antimikrobiyal etkideki değişimlerin araştırılması amaçlanmaktadır. Yapacağımız hücre kültürü çalışması ile hem nanopartiküllerin hücreler üzerine etkisini hem de meropenem kaplı nanopartiküllerin hücreye geçişinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 1.2. Nanopartiküllerin Tanımı

Nano terimi Yunanca cüce anlamına gelen ‘nanos’ kelimesinden türetilmiştir ve nanopartikül küçük partiküller olarak adlandırılmaktadır. 2006 yılında American Society for Testing and Materials (ASTM) yapmış olduğu tanımlamaya göre nanopartiküller ‘iki veya üç boyutu 0,001  $\mu\text{m}$ 'den (1 nm) daha büyük ve yaklaşık 0,1  $\mu\text{m}$ 'den (100 nm) küçük uzunluklara sahip olan ve boyuta bağlı bir özellik gösteren veya göstermeyen çok yüzlü parçacık’ olarak adlandırılmıştır (ASTM 2006). Nanobilim ve nanoteknoloji birbirinden farklı kavramlardır. Nanobilim 1-100 nm arasında değişen nanopartiküllerin yapılarının ve moleküllerinin incelenmesidir. Nanoteknoloji ise nanopartiküllerin pratik uygulamasını yani maddeler üzerinde 1-100 nanometre boyutlarda gerçekleştirilen işleme, ölçüm, tasarım, modelleme ve düzenleme gibi çalışmalara olanak veren bir bilim dalıdır (Mansoori ve Soelaiman 2005).

Nanobilimin gelişmesi M.Ö. 5. yy’da antik Yunanlılara kadar dayandığı düşünülmektedir. Antik Yunanlılarda günümüz bilim adamlarının atom olarak adlandırdığı şekliyle maddenin devamının olduğunu ve sonsuz bir şekilde daha küçük parçalara bölünebileceğini veya küçük ve yok edilemez parçacıkların bir araya gelmesinden oluştuğunu düşünmüşlerdir. Nanoteknoloji 21. yy’ın en umut verici teknolojilerinden biridir. Nanoteknoloji nanometre ölçeğinde maddeyi gözlemleyerek, ölçerek, manipüle ederek, birleştirerek, kontrol ederek ve üreterek nanobilim teorilerini pratik uygulamalara dönüştürme yeteneğidir. Bir başka deyişle Nanoteknoloji, Teknolojik olarak maddeye atom ve molekül

seviyesinde gelişmiş veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmayı hedefleyen, yeni ve hızla gelişen bir teknoloji alanıdır (Mansoori ve Soelaiman 2005, Roco 2007).

### 1.3. Nanoteknolojinin Tarihçesi

Nanopartiküller tarihte insanlar tarafından ilk olarak M.S. 4. yy'da Romalılar tarafından kullanılmıştır. İngiltere'deki bir müzede sergilenen tarihi bir kadeh tarihi cam endüstrisinin önemli bir örneği olarak sergilenmektedir(Freestone ve ark 2007).

Dikroik cam olarak bilinen bir camdan yapılan bu kadehler farklı ışık şartlarında renk değiştirme özelliğine sahiptir. 1990 yılında Bilim Adamları Taramalı Elektron Mikroskopunu inceleme yaparak kadehlerde görülen farklı renklerin nedeninin 50-100 nm boyutlarında nanopartikül kullanılmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Barber ve Freestone 1990). X-ray analizlerinde ise bu nanopartiküllerin gümüş ve altın karışımından oluştuğu tespit edilmiştir. Benzer durum Orta Çağın son dönemlerinde inşa edilen klişelerin camlarında da görünmektedir(Wagner ve ark 2000, Freestone ve ark 2007). 9-17. yy arasında islam dünyasında yapılan parlak ve ışıltılı seramiklerin yapılmasında nanopartiküller kullanılmıştır. Daha sonra Avrupalılar gümüş, bakır ve diğer nanopartikülleri kullanmışlardır. İtalyanlar 16. yy'da Osmanlılardan etkilenecek kullandıkları çanak çömleklerde nanopartikülleri kullanmışlardır. 13. - 18. yy'da Damascus (Şam) kılıçlarını üretirken, güç, esneklik, keskinlik mukavemet yeteneği sağlamak için nanoteller ve karbon nanotüpler kullanmışlardır. Bu renkler ve metalik özellikler nanopartiküllerin özellikleri bilinmeden tesadüf olarak bulunmuştur (Reibold ve ark 2006). 1857 yılında Micheal Faraday altının koloidal süspansiyonlarının hazırlanışını ve özelliklerini incelemiştir. Faraday altın nanopartiküllerinin farklı ışık kaynakları altında renk değiştirdiğini bulmuştur(Faraday 1857).

Nobel ödüllü fizikçi bilim adamı Richard Feynman'ın 1959 yılında "There is plenty of room at the bottom" (Küçük şeylerle yapılacak daha çok şey var) adlı konuşmasında nanoteknolojiye değinmesi nanoteknoloji hareketinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Richard Feynman konuşmasında nanoteknolojiden "inanılmaz küçüklükteki partiküllerin diyarı" olarak bahsetmiş; minyatürize edilmiş enstrümanlar ile nano yapıların ölçülebileceğini ve yeni amaçlar doğrultusunda küçük birimlerde farklı partiküllerin sentezlenebileceğini söylemiştir. Nanoteknolojiye olan ilginin gün geçtikçe artmasının temel nedeni; Nanoteknolojik araştırmalar, maddenin temel bilgisindeki eksiklikleri tamamlaması, nanoteknolojinin yeni uygulamalar vaat etmesi, endüstriyel protiplendirmenin ticari boyut

kazanmasıyla elde edilen yüksek kar marjı nedeniyle fizik, elektronik, iletişim, enerji üretimi, tekstil, ilaç, gıda gibi neredeyse tüm bilim dallarında en popüler çalışma konularından bir tanesi olarak değerlendirilmektedir (Roco 2007, Rai ve ark 2009).

Nanoteknoloji terim olarak ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından, “ileri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji” olarak tanımlanmıştır (Ramsden, 2005). 1981 yılında, Nanometre düzeyinde atom ve moleküllerin incelemesinde kullanılan “Taramalı Tünelleme Mikroskobu” ve 1985 yılında Atomik Kuvvet Mikroskobunun geliştirilmesiyle nanoteknoloji hızla gelişmeye başlamıştır (Drexler, 1986).

21. yy’da nanobilim ve nanoteknolojiye olan ilgi artmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda nanoteknolojinin pek çok insan hastalığının tanısında ve tedavisinde büyük bir potansiyele sahip olduğu vurgulanmıştır(Kinnear ve ark 2017). Bu nedenle bio-nanoteknoloji pek çok bilim adamı tarafından nanobilim en ilgi çekici alanlarından biri olarak kabul edilmektedir. Son 10 yılda nanopartiküllerin uygulanması ile tanı, ilaç taşınması ve moleküler görüntüleme gibi birçok biyoloji ile ilişkili alanlarda araştırmalar yapılmış ve muazzam sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri’nde (ABD) eczanelerde nanomateryal içeren pek çok tıbbi ürün bulunabilmektedir. Nanofarmasötikler arasında ilaç taşınması ve rejeneratif ilaçlara ilaveten nanopartiküllerin antibakteriyel etkileri, biomarkerların saptanmasında kullanılan bioçipler, nanoelektrotlar veya nanobiyosensörler kullanılmaktadır (Weissig ve ark 2014).

#### **1.4. Nanopartikül Çeşitleri**

Nanomateryaller, kriterlerine göre farklı gruplarda sınıflandırılabilirler. Genellikle, nanomateryaller boyut, morfoloji, yapı ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır(Gleiter 2000). Nanomateryaller boyut ve şekillerine göre 4 gruba ayrılırlar. Sıfır boyutlu nanopartiküller 100 nm’nin altında ve kübik, nano çubuklar, polygon, küre, metal ve quantum dots’lardan oluşmaktadır. Tek boyutlu nanopartiküller metalik, polimerik, seramik, nanotüpler ve nanotelleri içermektedir. 2 boyutlu nanopartiküller tek veya çok katlı kristal veya amorf ince filmler ve nano kaplamaları içermektedir. 3 boyutlu nanopartiküllere ise 100 nm’nin üzerinde karon nanotüpler, poly kristaller örnek verilebilir(Aversa ve ark 2018, Shiau ve ark 2018).

### **1.4.1. Metal Nanopartiküller**

Metal nanopartiküller, altın, demir, gümüş ve diğer metalik nanopartiküllerden oluşmaktadır. Bu nanomateryallerin normal hallerine göre çok daha iyi kimyasal, optik ve elektriksel özellik göstermektedirler (Asghari ve ark 2016). Nanopartiküllerin boyutları sentez yöntemleri ile ilişkili olarak değişebilmektedir. Partikül boyutlarını nanopartikül düzeyine indirgeyerek atomik koordinatlar ve doymamış alanlar arasındaki artan mesafe nedeniyle nanopartiküllerin yüzeyindeki atomlar daha aktif hale geleceklerdir. Metal nanopartiküllerin aktif olmuş yüzeyleri kataliz ve adsorbsiyon süreçleri açısından önem arz etmektedir. Genel olarak, metal NP'ler ışığı Pt, Pd, Ni ve Ru gibi bantlar arası geçiş ve Al, Ag, Au ve Cu gibi bant içi geçiş yoluyla emebilir. Yapılan çalışmalarda metal nanopartiküllerin katalitik aktivitelerinin ışık etkisi ile arttırıldığı saptanmıştır(Kim ve Lee 2018).

### **1.4.2. Metal oksit nanopartiküller**

TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO, and SiO<sub>2</sub> gibi metal oksitlerin çoğu sol-jel veya hidrotermal reaksiyonlar tarafından sentezlenir. Nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin değişmesinden dolayı, bu metal oksit parçacıkların kimyasal sensör, yarı iletkenlik gibi birçok uygulamada önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu materyallerin daha önemli bir özelliği ise yüksek bir şekilde aktif yüzey alanı oluşturmalarıdır. Nanopartikül yüzeyleri kolay bir şekilde modifiye edilerek polimer zincirlerine eklenmesi, kaplama ajanı olarak kullanılması gibi çeşitli reaksiyonlarda kullanılabilir(Das ve ark 2020). Bu tür yüzey modifikasyonları materyallerin özelliğini değiştirmektedir. Örneğin, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>'ün farklı yağ asitleri ile modifikasyonu ile yüzeyine eklenen hidrofobik özellikten dolayı su içerisinde presipitasyon oluşturabilmektedir(Chu ve ark 2017).

### **1.4.3. Bimetalik nanopartiküller**

Bimetalik nanopartiküller benzersiz özellik gösteren iki metalik bileşenden oluşmaktadır. Bu metalik bileşimler maddeye elektriksel ve optik özelliklerine bağlı kimyasal stabilite ve reaktivite sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda bimetalik nanopartiküllerin yapısı sentez koşulları ve bileşimdeki metallerin karışımları gibi birçok faktöre göre değişmektedir. Bu değişimler metallere elde edilen nanopartiküllere manyetik ve optik özelliklerine ilaveten yüzey aktivitesi ve stabilite kazandırmaktadır(Saleh 2020).

#### **1.4.4. Kompozit nanopartiküller**

Kompozitler, birkaç fazdan oluşan, fazlardan birinin boyutları 100 nm'den küçük olan katı malzemeler veya fazlar arasında nano ölçekte tekrarlama mesafesine sahip yapılardır(Lozhkomoev ve ark 2019). Nanometre boyut aralığındaki fiziksel boyutlar, kompozit yapıların oluşturulması sürecinde her zaman kullanılır. Çeşitli malzemelerin kombinasyonu ile oluşturulan kompozit nanopartiküller maddeye esneklik, su emme, optik özellikler, aşınma ve parlaklık koruma gibi özellikler kazandırır. Materyallerin kombinasyonu ile oluşan nanokompozitlerin materyallerin yüzey alanını 0,156 m<sup>2</sup>/g'den 2,75 m<sup>2</sup>/g'ye çıkardıkları saptanmıştır. Ayrıca, bu kompozitlerin maddelerin adsorbsiyon kapasitelerini önemli bir şekilde arttırdığı da bildirilmiştir (Parker ve ark 2012).

#### **1.4.5. Karbon Yapıda Nanopartiküller**

Karbon temelli nanopartiküller birçok multidisipliner alanda önemli bir şekilde kullanılmaktadır. Karbon, grafit, amorf karbon ve elmas gibi çeşitli formlara sahip katı hal bir allotroptur. Bu karbon nanopartiküller hibritleşmiş karbon atomlarının farklı boyutlarda geliştirilmesi ile elde edilmektedir (Li ve ark 2019). Karbon temelli nanopartiküller iletkenlik, mekanik özellikler, kimyasal stabilite ve termal özellikler gibi farklı fiziksel ve kimyasal özellikler kazandırmaktadır. Bu nedenle karbon temelli nanopartiküller kullanım alanlarının genişliği nedeniyle çok ilgi görmektedir (Sumi ve Chitra 2019).

#### **1.4.6. Zeolite ve Silika Temelli Nanopartiküller**

Zeolit bazlı nanopartiküller, elverişli yüzey kimyası ve mezoporlu yapıları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Silikaların mezoporlu morfolojisi ve por boyutu, hidroliz hızı ve reaksiyon koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Silika nanopartiküllerin por boyutları 2-50 nm arasında değişmektedir. Bu farklılıklar pH, asidik ortam ve kullanılan hidrofobik bileşiklere göre değişmektedir (Kumar ve ark 2018).

#### **1.4.7. Seramik Nanopartiküller**

Nanoseramik terimi, 100 nm'den küçük metal veya metal olmayan katı, inorganik ve ısıya dayanıklı seramikten oluşan nanopartikülleri ifade etmektedir. Nanoseramikleri elde etmek için pek çok fiziksel ve kimyasal yöntem bildirilmiştir (Pokropivny ve Skorokhod 2007). Bu malzemelerin yapısının gelişmiş, elektro-optik, süper iletken, ferromanyetik ve ferroelektrik özellikler sergilediği bulunmuştur. Benzer şekilde, Ti katkılı BiFeO<sub>3</sub> nanoseramiklerin yapısal ve fiziksel özellikleri farklı konsantrasyonlar ile değiştirilebilir. Bu değişim malzemelerin



oksijen boşluklarının ortadan kaldırılması ile malzemenin yapısal olarak bozulmasının önüne geçmektedir (Tian ve ark 2018). Kalsiyum hidroksiapatit gözenekli nanoseramikler (ncHAP), yüksek saflıkta hidroksiapatit (HAP) ve metilselülozun birlikte çökeltilmesiyle hazırlanmaktadır. NcHAP'ın özgül yüzey alanı ve gözenekliliği sinterleme sıcaklıklarına bağlıdır. Nanopartiküllerin yüzey yükleri ile bakteriler arasındaki etkileşimler, antimikrobiyal aktivite yeteneğini etkilemektedir(Xu ve ark 2019).

#### **1.4.8. Yarı İletken Nanopartiküller**

Yarı iletken nanopartiküller 4eV'den daha düşük enerjiye sahiptir. Yarı iletkenler örnek olarak silikon, germanyum, arsenit ve periyodik tablodaki yarı metaller (metalloid) örnek olarak verilebilir. Bu maddelerin modifiasyonu ile nano boyutlarda yüzey alanı artırılarak kimyasal ve fiziksel özelliklerinde değişiklikler yapılabilmektedir. Porlu yapıda olan C/Zn yarı iletkeni, nanomateryal haline getirilerek yüksek iletkenliğe sahip olduğu saptanmıştır(Yan ve ark 2019). Yarı iletken maddeler içsel ve dışsal yarı iletkenler olmak üzere 2 gruba ayrılır. İçsel olanlar yapısında diğer metalleri bulundurmada saf halde bulunanlar, dışsal yarı iletkenler ise diğer metaller ile birleşerek yarı iletken özellik kazananlardır.

#### **1.4.9. Polimerik Nanopartiküller**

Polimerik nanopartiküller doğal ve sentetik olan nanoboyutta katı partiküllerdir. Bu maddeler çoğunlukla ilaç sanayisinde ve tıbbi uygulamalarda ilaç salınımını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküller dört grupta incelenebilir(Okrugin ve ark 2017, Fu ve ark 2019, Sur ve ark 2019, Yang ve ark 2020). Bunlar;

i) Amfifilik blok kopolimerlerin belirli bir çözücü içinde kendi kendine birleşmesiyle oluşturulan polimerik miseller. Bunlardan kitosan polimerik misellerin stabilitesi, biyolojik olarak parçalanması, düşük toksisiteleri ve nanoboyutları ile ilaç salınımlarında kullanılabilirler (Yang ve ark 2020).

ii) Ortalama boyutu 10-1000 nm olan biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden oluşan polimerik nanopartiküller. Bunlar geniş bir şekilde hedeflenen bölgelere ilaç taşınmasında kullanılmaktadır (Sur ve ark 2019).

iii) Dendrimerler 15 nm'den daha düşük boyuta sahip üç boyutlu yapıdaki makro moleküllerdir. Bu maddeler, yapıları, boyutları ve çok değerlikli olması gibi özelliklerinden dolayı farmasötik ve tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılan yeni bir polimerik nanopartikül türüdür (Okrugin ve ark 2017).

iv) Polimerik nanokompozitler, maddeye üstün özellik ve karakteristik kazandırmak için kullanılan diğer nano dolgular ve polimerlerin bir kombinasyonu ile oluşturulmaktadır (Fu ve ark 2019).

#### **1.4.10. Lipid Temelli Nanopartiküller**

Lipid temelli nanopartiküller, özellikle lipozomlar ve nano yapıda lipid taşıyıcıları ilaçların seçici taşınması veya hedeflenmesinde kullanılmaktadır. Çünkü bunlar insanlar için düşük toksisiteye sahip, hidrofilik ve hidrofobik molekülleri taşıyabilir ve ilaç salınımını insan vücudunda hedeflenen bölgede gerçekleştirebilmektedir. Katı lipid nanopartiküller düşük toksisiteye sahip olması, ucuz olması, bölgeye spesifik hedefleme, kimyasal ve fiziksel stabilite ve hidrofilik ve hidrofobik moleküllerin kontrolü gibi birçok avantajları bulunmaktadır (Zhong ve Zhang 2019). Yapılan diğer çalışmalarda lipid temelli nanopartiküllerin avantajlarının yanında ilaç yüklenmesinde sınırlı kapasiteye sahip olması ve saklanma süreçlerinde kristalleşmesi gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Nano boyutlardaki lipid taşıyıcıları katı lipid nanopartiküllere kıyasla artmış stabilitesi ve ilaç salınımını daha iyi kontrol etmesiyle daha avantajlıdır. Lipozomlar 50-100 nm boyutlarında değişmekte ve kolesterol ve fosfolipid gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Bunlar, azaltılmış toksisiteleri ve artmış çözünürlüklerinden dolayı özellikler sitotoksik ilaçların taşınmasında ve hedeflenmesinde kullanılabilirler (Meikle ve ark 2019).

#### **1.4.11. Metal-Organik Çerçeveler**

Metal-organik çerçeveler inorganik metal iyonları ile organik ligantlardan oluşmaktadır. Bu maddelelerin yüksek yüzey alanına sahip olması, yüzey modifikasyonunun kolay olması ve sağlam bir yapıda olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Metal-organik çerçeveler yüzeylerindeki nanopartiküllerin yüksek reaktivite göstermesinden dolayı destek materyali olarak kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonu için destek olarak kullanılan Fe-BTC MOFs malzemeleri, enzim ve malzeme yüzeyi arasındaki daha kolay etkileşimler sayesinde farklı reaktiviteye ve iyi enzim immobilizasyonuna sahiptir (Gascón ve ark 2018).

### **1.5. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri**

Altın nanopartiküllerin sentezlenmesi dört yöntemle yapılmaktadır. Bunlar;

- 1) Turkevich Yöntemi
- 2) Brust-Schiffrin Yöntemi
- 3) Tohum- Büyütme Yöntemi
- 4) Diğer Yöntemler

- a) Elektrokimyasal Yöntem
- b) Sonokimyasal Yöntem
- c) Fotokimyasal Yöntem

### 1.5.1. Turkevich Yöntemi

Altın nanopartiküllerin sentezinde indirgeyici ajan olarak sitrat ilk olarak Turkevich ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Bu yöntemde altın nanopartiküller, yüksek sıcaklıkta  $\text{HAuCl}_4$  çözeltisine hızlı bir şekilde eklenen trisodyum sitratın bir süre bekletilmesi ile sentezlenmektedir. Turkevich'in bu sentez yöntemi ile yaklaşık olarak 200 nm boyutunda nanopartiküller elde etmiştir (Turkevich ve ark 1951). Turkevich, Faraday'ın koloidal altın sentezlenmesi için eter fosfor çözeltisinin indirgeyici ajan olarak kullanılması önerisinden yola çıkarak, bu çözeltinin  $\text{AuCl}_4$  çözeltisi ile karıştırılmasıyla suda emülsiyon oluşturduğunu ve altın iyonlarının fosfor damlacıkları tarafından adsorbe edilerek metalik altın haline indirgenip takiben yüzeye göç ederek çekirdek oluşturacak büyüklüğe ulaşması, şeklinde açıklamıştır. 1973 yılında Frens aynı yöntemi kullanmış, ancak trisodyum sitrat oranını değiştirerek Turkevich'e kıyasla daha küçük boyutlarda (20-150nm) altın nanopartikül sentezlemiştir (Frens 1973). Daha sonraki yıllarda altın nanopartiküllerin sentezi için Turkevich-Frens yöntemi olarak adlandırılan karma bir yöntem geliştirilmiştir.

Günümüzde halen bu yöntemle sentezlenen nanopartiküllerin oluşum mekanizmaları incelenmektedir. Kimling ve ark. yaptıkları çalışmada, nanopartiküllerin sentezi aşamasında reaksiyon koşullarının partiküllerin morfolojisini etkilediği özellikle de çözeltideki yüksek sitrat konsantrasyonunun küçük boyutlarda nanopartikül oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir (Kimling ve ark 2006). Düşük sitrat konsantrasyonunun büyük boyutlu nanopartiküllerin oluşmasına ve topaklanmasına neden olduğu gösterilen çalışmada, düşük sıcaklıklarda daha büyük çaplı ve molekül ağırlığı yüksek partiküllerin elde edilmesine neden olduğu gösterilmiştir (Kimling ve ark 2006). Polte ve ark.'da bu görüşe benzer olarak reaksiyon sıcaklığı ve çözeltinin başlangıç konsantrasyonunun nanopartiküllerin sentez sürecinde önemli olduğu görüşünü desteklemişlerdir (Polte ve ark 2010).

Kumar ve ark. Turkevich yönteminin mekanizmasını incelemiş ve sentez reaksiyonu süresince seri ve paralel olarak gerçekleşen birçok reaksiyon adımının ilk basamağında sitrat iyonlarının oksidasyonu sonucu dikarboksilik aseton oluşumu olarak belirtilmiştir. Devamında ise çözeltideki altın sitrat ile indirgenir ve dikarboksilik aseton ile kompleks meydana getirirler. Bu kompleksi altın tekrar indirgenerek altın atomları oluşur. Bu atomlar ortamdaki diğer altın

iyonlarını adsorbe ederek tekrar dikarboksilik aseton kompleksi oluştururlar. Tekrarlayan reaksiyonlar ile topaklanma meydana gelir ve bu büyüklük kritik değere ulaştığında altın nanopartiküllerin çekirdeği oluşmuş olur (Kumar ve ark 2007).

Turkevich yönteminde nihai ürün özelliklerine etki eden diğer bir parametre ise reaksiyon sıcaklığıdır. Yapılan çalışmalara göre daha yüksek sıcaklıklar, indirgeme işlemi için gereken aktivasyon enerjisi elde etmek için gereken zamanı kısaltmakta [44] ancak yüksek sıcaklık çözeltinin buharlaşması ve reaktant konsantrasyonlarının değişmesi gibi sonucu görece büyük boyutlu nanopartiküller elde edilmektedir.

### 1.5.2. Brust-Schiffrin Yöntemi

1993 yılında Mulvaney ve Giersig, sitrat stabilize Altın nanopartikülleri ligand değişimi reaksiyonlarına tabi tutarak ilk defa alkantiyoller ile stabilize etmiş, ANP'lerin sentezini gerçekleştirmiş ve bu kolloidlerin yüzey özelliklerini araştırmışlardır (Giersig ve Mulvaney 1993). 1994 yılında Brust ve çalışma grubu tarafından alkantiyoller ile stabilize edilmiş altın nanopartiküllerin doğrudan sentezini gerçekleştirecek bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem daha sonra Brust-Schiffrin yöntemi olarak adlandırılmıştır (Brust ve ark 1994).

Tiyollü ligandlar kullanarak iki fazlı bir sistemde gerçekleştirilen bu yöntemde sulu fazda çözülmüş durumda olan  $AuCl_4^-$  iyonları faz değişim ajanı olarak kullanılan tetraoktilamonyum bromür (TOABr) vasıtasıyla organik faza aktarılır. Daha sonrasında ligandın varlığında sodyum borhidrür ile indirgenir. Tiyol uç gruplarının altına olan yüksek afinitesine bağlı olarak, organik fazda indirgenen altın iyonlarının yüzeyi tiyol uç gruplu ligand ile kaplanarak kolloidal stabilite sağlanmış olur. Bu yöntem iki fazda gerçekleştiği için iki fazlı transfer yöntemi olarak da adlandırılır (Brust ve ark 1994).

Bu yöntem, tek tabaka kaplanmış, kararlı ve görece monodispers ANP kolloidlerin kolay ve hızlı bir şekilde sentezlenmesine olanak tanır. ANP çapı, 1,5 ila 5 nm arasındadır ve Au: ligand oranı ile indirgemenin gerçekleştiği sıcaklık ve karıştırma hızı ile hassas olarak ayarlanabilmektedir (Hostetler ve ark 1998).

Bu yöntemle sentezlenen altın nanopartiküller bir ayrışma olmaksızın organik çözücülerde çözülebilir. Altın nanopartiküllerin yüzey özellikleri istenildiği gibi ligand değişim reaksiyonları ile değiştirilebilir. Başlangıç S/Au mol oranı reaksiyonun çekirdeklenme-büyüme-pasivasyon adımlarına doğrudan etki ettiğinden ve kükürt içeren ligandların büyüme sürecini engellemediğinden, daha küçük partiküllerin oluşumuna imkan

sağlamaktadır (Hostetler ve ark 1996, Hostetler ve ark 1999). Nanopartikül boyutunu belirleyen diğer iki parametre sıcaklık ve sodyum borhidrür ekleme hızı olup genelde düşük sıcaklık (0-10 °C) ve yüksek sodyum borhidrür ekleme hızı küçük boyutlu ve monodispers nanopartiküllerin sentezlenmesine imkan tanımaktadır. Brust-Schiffirin yöntemi, 1995 yılında p-merkaptofenol ile stabilize edilmiş altın nanopartiküllerin, faz transfer maddesi TOABr olmaksızın metanol çözeltisinde sentezlendiği başka bir prosedürle geliştirilmiş (Brust ve ark 1995) ve bu sayede TOABr'den kaynaklanan saflaştırma problemi ortadan kaldırılmıştır. Metanol, hem H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, hem de p-merkaptofenolu çözebildiği için tek fazlı bir sistemlerde kullanılabilen mükemmel bir çözücüdür. Metanol, etanol veya su gibi H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> ile aynı çözücü içinde çözünebilen herhangi bir tiyol uç gruplu ligand, altın nanopartikül sentezi için tek fazlı bir sistemin kullanılmasına izin vermektedir. Sonraki yıllarda, modifiye Brust-Schiffirin yöntemi olarak da adlandırılan bu prosedür temel alınarak fonksiyonel tiyol ligandla stabilize altın nanopartiküllerin üzerinde yoğunlaşan çok sayıda çalışma yapılmıştır (Hostetler ve ark 1999).

### 1.5.3. Tohum Büyütme Yöntemi

Tohum-büyütme yöntemi, altın nanopartiküllerin sentezi için kullanılan diğer bir yöntemdir. Diğer yöntemlere kıyasla, tohum-büyütme yöntemi ile partiküller aşamalı olarak büyütülür. Bu nedenle bu yöntem, boyut ve şekil kontrollü altın nanopartikül sentezlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tohum-büyütme yöntemi iki basamaklı bir reaksiyon ile gerçekleştirilir. İlk olarak, küçük boyutlu altın nanopartiküller hazırlanır. İkinci olarak, hazırlanan bu partiküller, H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>'ün yanı sıra indirgeyici bir ajan içeren bir "büyütme" çözeltisine eklenip, bu partiküllerin kontrollü bir şekilde daha büyük partiküllere dönüşmesi sağlanır. Reaksiyonun ikinci kısmında kullanılan indirgeyici ajanlar, tohum olarak kullanılan altın partiküllerin mevcut olduğu çözeltide katalizör olarak Au(III)'ü Au(0)'a indirgeyen zayıf indirgen maddelerdir. Zayıf indirgen maddelerin kullanılmasının nedeni, reaksiyon sırasında indirgenen Au(0)'ların sadece altın tohumların yüzeyinde bir araya gelmesine izin vererek yeni parçacık çekirdeği oluşumunu engellemeleridir. Büyüme süreci tekrarlanabilir bir süreçtir ve zayıf indirgen maddelerin kullanılması nedeniyle, ikinci adım, birinci adımdan daha yavaştır. Sentezlenen altın nanopartiküllerin tohum büyümesi sırasında etkili olan parametreler, ilk adımdaki tohumların oluşumu, indirgeyici maddelerin nicelik ve niteliğidir (Zhao ve ark 2013).

Tohum büyüme yöntemi ile ilgili ilk Altın nanopartikül sentez çalışması Natan tarafından (Brown ve Natan 1998), sitrat indirgeyicili bir çözeltide Au tohumlarının kullanılması ile küresel altın nanopartiküllerin eldesi için önerilmiştir. Murphy ve grubu (Jana

ve ark 2001, Nikoobakht ve El-Sayed 2003), buzla soğutulmuş NaBH<sub>4</sub> çözeltisini H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> ve sitrat karışımı bir çözeltiye damla damla ekleyerek 3,5 nm boyutunda sitrat kaplı ANP sentezini gerçekleştirmiştir. Daha sonra, bu partiküller H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, askorbik asit ve hekzadesil trimetilamonyum bromür (CTAB) içeren büyütme çözeltilerinde tohum olarak değişik oranlarda eklenerek nano çubukların sentezinde kullanılmıştır. Çalışmada, sentezde kullanılan tohum-metal tuzu oranının değiştirilmesiyle 4,6-18 nm aralığında farklı uzunluklarda (1-2,5 aralığında en-boy oranına sahip) nano çubukların sentezi gerçekleştirilmiştir. El-Sayed, 2003 yılında yayınladığı çalışmada, büyüme çözeltisinde indirgeyici olarak sadece CTAB kullanarak tohum büyütme yöntemine katkıda bulunmuştur (Nikoobakht ve El-Sayed 2003).

#### **1.5.4. Diğer Sentez Yöntemleri**

##### **Elektro-Kimyasal Yöntem:**

Nanoparçacıkların elektrokimyasal üretimi Reetz ve diğerleri tarafından incelenmiştir. Bu çalışmalarda, elektrolit çözeltileri için iki elektrotlu bir düzenek ve stabilizatör olarak tetraalkilamonyum tuzları kullanılarak nano boyutlu geçiş metali partiküllerinin elektrokimyasal yöntemle hazırlanabileceği gösterilmiştir (Reetz ve ark 1995). Elektrokimyasal yöntem, genel olarak anot ve katod olarak görev yapan iki metal plakanın bir elektrolit çözeltisine daldırılarak sistemden belirli bir akımın belirli bir süre geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Genelde elektrolit çözelti, reaksiyon sonucu oluşan nanopartiküller metal kümeler için stabilizörler olarak da görev yapan tetraalkilamonyum tuzlarından oluşur. Sistemden akım geçirilmeye başlamasıyla anot olan metal oksitlenerek, oluşan metal katyonları katoda doğru göç eder ve elektrolit çözeltisi ve katot ara yüzeyinde tekrar sıfır oksidasyon basamağına yükseltgenerek metalik forma dönüşür. Amonyum stabilizatörlerinin varlığı hem katod yüzeyinde oluşan metal partiküllerinin aglomerasyonunu engeller, hem de nanopartiküllerin mimarisinde etkili olur (Reetz ve Helbig 1994).

##### **Sonokimyasal Yöntem:**

ANP sentez yöntemlerinden biri de sonokimyasal yöntem olarak adlandırılan ve atmosferik koşullar altında herhangi bir ısıtma, soğutma ve karıştırma işlemi yapmaksızın ultrasonik sistemler kullanılarak gerçekleştirilen sentez yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak 20-50 nm boyutunda ve oldukça dar bir boyut dağılımına sahip ANP ve ANR elde edilebilmektedir (Okitsu ve ark 2009, Lee ve ark 2012).

### **Fotokimyasal Yöntem:**

Altın iyonlarının fotokimyasal yöntemlerle indirgenmesi, sentez sürecinde nanopartikülleri kirletebilecek indirgeyici ajanların aşırı kullanılmaması avantajına sahiptir. Elde edilen nanoparçacıklar, yüzeylerinin temizliği nedeniyle katalitik uygulamalarda yaygın olarak uygulanmaktadırlar. Ultraviyole (UV), yüzey aktif maddeler varlığında altın öncüllerini uyarmak için yaygın olarak kullanılan bir ışık kaynağıdır. Han ve ark., 2000 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada formamit çözeltisi içindeki  $AuCl_4^-$ 'ü oda sıcaklığında, UV ışığı ve poli(vinil piroolidon) (PVP) varlığında indirgeyerek, 15nm'lik ANP sentezlemişlerdir (Han ve Quek 2000).

### **Biyomoleküler Yöntem:**

Biyomoleküller canlı organizmalar tarafından vücudun biyolojik işlevlerini yerine getirmek için üretilen moleküller olarak bilinirler. Bu moleküller Au(III) iyonlarını Au(0) atomlarına indirgeyebilen hidroksil ve karbonil fonksiyonel gruplarına sahiptir. Bu gruplar, indirgenmiş altın nanopartikülleri oluşturmak üzere kullanılabilir. Biyomoleküller kullanılarak sentezlenen homojen nanopartiküller biyomoleküllerin toksik olmaması ve çevre için zararının olmaması nedeniyle son yıllarda çok fazla rağbet görmektedir. Aminoasitler nanopartiküllerin sentezlenmesi için etkili bir indirgeyici ajan olarak kullanılmaktadır. Maruyama ve ark. yaptıkları çalışmada aminoasitleri kullanarak 4-7 nm boyutlarında altın nanopartiküller sentezlediklerini bildirmişlerdir. 20 aminoasit arasından L-histidin'i kullanarak tetraauric asidi  $AuCl_4^-$ , altın nanopartiküllere indirgemişlerdir (Maruyama ve ark 2015).

### **1.6. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Nanopartiküllerin karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi gelişmiş mikroskobik teknikler kullanılarak boyut, morfoloji ve yüzey yüküne dayanmaktadır. Partiküllerin boyut dağılımı, ortalama parçacık çapı ve yüzey yükü gibi özellikler nanopartiküllerin hem fiziksel stabilitesini hem de *in vivo* dağılımını etkiler. Nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve boyutu elektron mikroskobu tekniği ile saptanabilmektedir. Nanopartiküllerin yüzey yükü partiküllerin fiziksel stabilitesini, yeniden dağılılabirliğini ve *in-vivo* performanslarını etkilemektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin karakterizasyonu sırasında yüzey yüklerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir (Bhatia 2016). Nanopartiküllerin farklı araç ve yöntemler ile karakterizasyonu tablo 1.1.'de verilmiştir (Vyas 2002).

Tablo 1.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri (Vyas 2002).

Parametre	Karakterizasyon Yöntemi
Taşıyıcı-İlaç Etkileşimi	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
Yüzey Yük Saptanması	Lazer Doppler Anemometre
Yüzey Kimyasal Analizi	Statik İkinci İyon Kütle Spektrofotometrisi Yüzey Alan Ölçüm Cihazı (Sorptometre)
İlaç Stabilitesi	Nanopartiküllerden Elde Edilen İlacın Biyolojik Analizi İlacın Kimyasal Analizi
Nanopartiküllerin Dağılım Stabilitesi	Kritik Flokülasyon Sıcaklığı (CFT) Atomik Kuvvet Mikroskopisi
Nanopartiküllerin Boyut ve Dağılımı	Lazer Defraktometresi Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)
Salınım Profili	Su içerisindeki ve fizyolojik şartlar altındaki Salınım Karakteristikleri
Yüzey Hidrofobikliği	Rose Bengal Boyasını Bağlama Su Temas Açısı Ölçümü X-ray Fotoelektron Spektroskopisi

### 1.6.1. Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu, öncelikle partikül boyutuna ve morfolojisine göre değerlendirilmektedir. Elektron mikroskoplarının sayesinde nanopartiküllerin partikül boyutuna ilaveten morfolojileri değerlendirilebilmektedir (Betancor ve Luckarift 2008).

### Foton Korelasyon Spektroskopisi veya Dinamik Işık Saçılımı

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) veya dinamik ışık saçılması (DLS) gibi hızlı ve popüler teknikler, nano ve mikron altı aralıklardaki koloidal süspansiyonlarda bulunan nanoparçacıklarının boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Bu teknikte, küresel parçacıkların çözümü, parlayan monokromatik ışığa (lazer) maruz kaldıklarında bir Doppler kaymasına neden olur. Bu tür monokromatik ışığa maruz kalma, hareketli parçacığa çarparak gelen ışığın dalga boyunun değişmesine neden olur. Dalga boyundaki değişimin boyutu



partikülün boyutunu belirlemektedir. Bu parametre partikülün boyut dağılımı ve ortamdaki hareketinin değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Bu da partikülün difüzyon katsayısının ölçülmesine ve otokorelasyon fonksiyonunun kullanılmasına daha fazla yardımcı olmaktadır. Dinamik ışık saçılımı (DLS), parçacık boyutu ve boyut dağılımının doğru tahmini için en sık kullanılan tekniktir(de Assis ve ark 2008).

### **Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)**

Bu elektron mikroskobu tabanlı teknik, nanoparçacıkların doğrudan görselleştirilmesiyle boyut, şekil ve yüzey morfolojisini belirler. Bu nedenle taramalı elektron mikroskobu, morfolojik ve boyutlandırma analizinde çeşitli avantajlar sunar. Ancak, boyut dağılımı ve tüm nanopartiküllerin ortalaması hakkında sınırlı bilgi sağlarlar (Jores ve ark 2004). SEM tarafından değerlendirilen ortalama boyut, dinamik ışık saçılımı ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak değerlendirme yapılmaktadır. Bu teknikler zaman alıcıdır, maliyetlidir ve sık sık boyutlandırma dağılımı hakkında tamamlayıcı bilgiye ihtiyaç duyar (Molpeceres ve ark 2000, Bhatia 2016).

### **Geçirimli Elektron Mikroskobu**

Nanoyapıların incelenmesindeki deneysel zorlukların başında çok küçük yapıda olmalarından dolayı geleneksel yöntemler ile fiziksel özelliklerinin ölçülememesinden kaynaklanmaktadır. Geçirimli elektron mikroskobu tekniği ile numunenin görüntülenmesi, kırınımı ve spektroskopik bilgileri nanometre altı seviyelerdeki görüntülenebilmektedir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelenmesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan, milyon katı büyütmelede malzemenin kristalagrofik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasını olanaklı kılan bir tekniktir (EKİNCİ 2016).

TEM ve SEM’de benzer bilgiler elde edilmesine rağmen TEM’de görüntüleme için farklı teknik kullanılmaktadır. TEM mikroskobunda bir elektron demeti çok ince bir numuneden geçirildiğinde numune ile etkileşime girer ve numunenin yüzey özellikleri elde edilir (Molpeceres ve ark 2000). TEM için numune hazırlama karmaşık ve zaman alıcıdır. Çünkü, elektron geçirgenliği için örneklerin ultra ince hazırlanması gerekmektedir. Elektron mikroskobunda incelenecek numune kesinlikle katı malzeme olmak zorundadır ve 3 mm

çapında, 100 mm'den daha ince ve elektron geçirgenliğine sahip (bir kaç mm) bir disk olarak hazırlanma zorunluluğu sorun yaratabilir. Dolayısıyla elektron geçirgenliğine uygun olarak hazırlanamamış bir numuneden bir görüntü kontrastı elde etmek mümkün olamamaktadır (EKİNCİ 2016).

TEM ile görüntülemenin diğer yöntemlere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bunlar;

1. Yüksek açısız halka şeklindeki karanlık alan (HAADF) dedektörü kullanılarak numune hakkındaki daha detaylı bilgilerin toplanması (kaydedilen görüntülerde numunenin kimyasal bileşimi ile ilgili farklı kontrast seviyelerine sahip olması)
2. HAADF dedektörü diğer tekniklere kıyasla kontrastı daha iyi olduğu için biyolojik örneklerde (100-120 nm kalınlığında) kalın lekeli bölümlerin kontrastını arttırmak için kullanılabilir.
3. HAADF-TEM görüntüleri birleştirilerek, nanopartiküllerin atomik yapısını ve bileşimini bir daha iyi çözünürlükte görüntülemeye imkan sağlar.
4. TEM cihazında nanometre altı ölçüm yapacak electron probları bulunmasından dolayı örneklerin şekil, boyut, kusurları, kristal yapıları ve yüzey yapıları ile detaylı bilgi verebilmektedirler (Bhatia 2016).

### **Atomik Kuvvet Mikroskobu**

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), tekniği kullanılarak iletken, yarıiletken ve manyetik özellik gösteren örneklerin yanı sıra polimer, seramik, alaşım, camsı materyaller, sentetik ve biyolojik membranlar gibi yalıtkan olan hemen hemen her türlü numune yüzeyi hakkında da morfolojik bilgi almak mümkündür (Yin ve ark 2015).

Bu teknik taramalı elektron mikroskobu (bu teknik, örneği bir prob yardımı ile tarayarak yüzey görüntülerini oluşturması esasına dayanır) olarak da bilinmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajı çok yüksek çözünürlükte görüntülerin elde edilebilmesidir. Atomik kuvvet mikroskobu, numunelerin atomik ölçekte bir prob ucu kullanılarak mikron altı seviyede fiziksel olarak taranmasına dayanır ve partikül boyutu ölçümünde ultra yüksek çözünürlük sunar (Zur Mühlen ve ark 1996). Örneğin özelliğine bağlı olarak görüntüleme genellikle temaslı veya temassız olarak elde edilmektedir. Temaslı modda topoğrafik harita probun örnek yüzeyine boylu boyunca temas etmesiyle, temassız modda ise probun örneğin yüzeyinde temas etmeden gezdirilmesi ile görüntü oluşturulur.

Atomik kuvvet mikroskobunun en büyük avantajı iletken olmayan örneklerin hiçbir işleme tabi tutulmadan görüntülenebilmesidir. Bu özellik hassas biyolojik ve polimerik nano ve mikro yapıların görüntülenmesinde kullanılabilir (Shi ve ark 2003). Ayrıca, atomik kuvvet mikroskobu nanopartiküllerin boyutları, boyut dağılımı ve gerçek görüntüleri ile ilgili (herhangi bir matematiksel hesap yapmadan) en doğru sonucu verir (Polakovič ve ark 1999).

### **1.6.2. Yüzey Yükü**

Yüzey yükü ve yoğunluğu, nanopartiküllerin biyolojik çevre ile etkileşimini ve bunların biyoaktif bileşiklerle elektrostatik etkileşimlerini belirler. Kolloidal maddelerin stabilitesi genellikle nanopartiküllerin zeta potansiyeli ile analiz edilir. Zeta potansiyeli yüzey yükünün indirekt ölçülmesidir. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerin ölçülmesi saklanma koşullarını doğrudan ilgilendirir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri (pozitif veya negatif yüksek zeta potansiyeli değerleri) kararlılığı sağlamak ve partiküllerin agregasyonunu önlemek için önemlidir. Ayrıca, zeta potansiyel değerleri ile yüzey hidrofobikliğini ve nanokapsüller içinde kapsüllenen veya yüzey üzerine kaplanmış malzemenin yapısını değerlendirmede kullanılabilir (Otsuka ve ark 2003).

### **1.6.3. Yüzey Hidrofobikliği**

Yüzey hidrofobikliğinin belirlenmesi için hidrofobik etkileşim kromatografisi, bifazik bölümlenme, problemlerin adsorpsiyonu, temas açısı ölçümleri vb. gibi teknikler kullanılabilir. X-ışını foton korelasyon spektroskopisi gibi modern teknikler sadece yüzey hidrofobikliğini belirlemekle kalmaz, aynı zamanda nanoparçacıkların yüzeyindeki belirli kimyasal grupların tanımlanmasına da izin verir (Scholes ve ark 1999).

### **1.6.4. İlaç Salınımı**

Nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesi, polimer kütlesi başına bağlanan ilaç miktarı olarak tanımlanır veya başka bir ifadeyle bir mg polimer başına mol olarak ilaç miktarı veya mg polimer başına mg ilaç miktarı veya yüzde olarak polimere oranı şeklinde verilebilir. Bu parametreyi belirlemek için ultrasantrifüjleme, ultra filtreleme, jel filtreleme veya santrifüj ultrafiltrasyondan sonra UV spektroskopisi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi çeşitli teknikler kullanılır. İlaç salınım analizi için kullanılan yöntemler, aynı zamanda, ilaç salınım mekanizmasını değerlendirmek için daha sık kullanılan ilaç yükleme analizlerine benzerdir (Kreuter 1983, Magenheimer ve ark 1993).

## 1.7. Nanopartiküllerin Tıpta Kullanım Alanları

Nanoteknolojinin tanı ve tedavi amaçlı kullanılmasına nanotıp denilmektedir (Jain ve Stylianopoulos 2010). Nanotıp, biyomedikal uygulamaya uygun nanomalzemeler geliştirmek için biyoloji, tıp, kimya, fizik ve diğer disiplinlerin bir araya getirildiği multi disiplinler bir alandır (Wicki ve ark 2015). Nanopartiküller boyutları ve yapılarından dolayı (birkaç nanometreden birkaç yüz nanometreye kadar), biyolojik varlıklarla nanoyapılı olmayan malzemelere kıyasla daha farklı bir yoldan etkileşime girer. Örneğin nanoaprtiküllerin boyutlarının çok küçük olmasından dolayı yüzey-hacim oranları nanoyapılı olmayan malzemelerden çok daha yüksektir(Albanese ve ark 2012). Ayrıca, nanopartiküller farklı türde nanoparçacıklar sunan ve benzer kimyasal bileşime sahip nanoyapılı olmayan malzemelerin özelliklerinden büyük ölçüde farklı olan benzersiz termal, elektriksel, manyetik ve optik özellikler göstermektedir (Chen ve ark 2016).

Nanopartiküllerin tasarımı doğru biyomedikal uygulamalar için hayati öneme sahiptir. Bu parametrelerden en önemlisi nanopartikül boyutu, kimyasal bileşimleri ve yüzey karakteristikleri gelmektedir (Chen ve ark 2016). Örneğin, nanopartiküllerin boyutu tedavi amaçlı uygulamalardan sonra *in vivo* görüntülerde önem arz etmektedir. Eğer partikül boyutları çok büyük olursa bunlar hedeflenen doku veya organlara ulaşamayacakları için hedeflenen tedavi gerçekleşmemiş olacaktır. Eğer nanopartiküller çok küçük boyutlarda olursa (10 nm'den daha küçük), böbrekler tarafından idrarla atılacak ve dokularda yeterli bir şekilde birikimi engelleneceğinden dolayı tedavi amacına ulaşmamış olacaktır. Nanopartiküllerin boyutu *in vitro* tanı için de temel bir parametredir. Genellikle nanoparçacık süspansiyonunun optik özelliklerini belirler ve boyutta bir değişiklik olması, maruziyetten sonra ölçülen tepkide değişikliklere yol açacaktır (Paris ve Vallet-Regí 2018).

### 1.7.1. Nanopartiküllerin Tanı Amaçlı Kullanımı

Nanotıpta, son yıllarda nanopartiküllerin tanı amacı ile kullanılması ile ilgili çalışmalar umut verici bir şekilde artmıştır. Nanopartiküller, patolojik olarak ilgili analitlerin *in vitro* tespiti için ve *in vivo* görüntüleme ajanları olarak kullanılmaktadırlar (Paris ve Vallet-Regí 2018).

### Nanopartiküllerin *In Vitro* Tanı Amaçlı Kullanılması

Nanopartiküllerin boyutu (100 nm altındakiler), birçok biyomolekül (enzim, antikor, diğer proteinler) ile aynı boyutlardadır ve nanopartiküller ve biyomoleküller arasında

etkileşime imkan sağlamaktadır. Nanopartiküllerin bu özellikleri kullanılarak *in vitro* tanı amaçlı testler geliştirilmektedir. Nanopartiküllerin boyutlarından dolayı yüksek yüzey alanına sahip olmaları tek bir nanopartikül üzerinde birden fazla biyomolekül etkileşime girmesine böylelikle de potansiyel olarak yüksek hassasiyette testler geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Chen ve ark 2016).

Biyolojik sıvılarda patolojik olarak ilgili analitlerin son derece hassas tespiti, birçok hastalığın teşhisini önemli ölçüde iyileştirebilir ve erken teşhis sayesinde birçok hastanın prognozunu potansiyel olarak iyileştirebilir. İnorganik nanopartiküller, özellikle altın, kuantum dots ve süperparamanyetik nanopartiküller *in vitro* tanı için özellikle kullanılmaktadır. *In vitro* tanı için geliştirilen farklı stratejiler, ölçülen parametreye ve bu tespit için kullanılan nanopartikül tiplerine göre ayrılmaktadır (Azzazy ve Mansour 2009).

### **Floresan Nanopartiküllere Dayalı Testler**

Floresan nanopartiküller üretmek için sensör görevi gören çeşitli moleküller kullanılabilir. Örneğin, organik floroforların nanopartiküllerin yüzeyine veya içine yerleştirilmeleri ile sensörler elde edilebilir. Bu sistemler, belirli uyarana maruz kaldıktan sonra floresandaki bir değişiklik vasıtasıyla pH, oksijen konsantrasyonu ve sıcaklıktaki değişiklikleri tespit edebilecek şekilde ayarlanmaktadır (Azzazy ve Mansour 2009, Chen ve ark 2016). Quantum dots'lar (QDs) organik boyalara kıyasla çok daha stabil olmaları ve dar bir emisyon bandı sundukları için sensör olarak kullanımlarında büyük avantajlar sağlamaktadırlar. Ancak, yapılarında ağır metal bulundurdıkları için biyomedikal uygulamalarda kullanılamamaları büyük bir dezavantajdır. Nanopartiküller ise QDs'ların aksine hasta kişinin organizmasına toksik etki oluşturmamaktadır. Sensör temelli QDs'ler sıcaklık ve pH ölçümü yapmak amaçlı üretilmektedir. Örneğin, maltozu tespit eden bir sensör maltoz bağlayan proteinin yüzeyine QDs'lerin yapılandırılması ile üretilmiştir (Medintz ve ark 2003, Azzazy ve Mansour 2009).

Benzer şekilde nanopartiküller de *in vitro* tanı amaçlı kullanılmaktadır. Biyolojik sıvıların near infrared (NIR) ışını ile uyarılması ile ultraviyole ışın altında görülebilecek istenmeyen potansiyel biyolojik moleküllerin görüntülenmesi engellenmiş olur. Daha sonra ölçüm istenen spektrumda kolaylıkla yapılabilir. Ayrıca, nanopartiküllerin uyarılma ve emisyon spektrumları, çevrelerinden nispeten bağımsızdır, bu da onları biyolojik sıvılarda genellikle çok karmaşık olan analitlerin tespiti için iyi bir seçim haline getirir. Bu nanopartiküller sıcaklık, oksijen, nükleik asit, antijen ve pek çok diğer biyomoleküllerin tanısı amacıyla geliştirilmektedir (Azzazy ve Mansour 2009).

## Plazmonik Nanopartiküllere Dayalı Testler

Plazmonik nanopartiküller (özellikle altın nanopartiküller), *in vitro* tanı amaçlı sensörler geliştirmek için ana bileşen olarak çok kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir (Chen ve ark 2016). Lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR), ışıkla uyarıldıklarında bazı metalik (örneğin altın) nanoparçacıkların yüzeyindeki toplu elektron yükü salınımlarından kaynaklanan bir durumdur. Bu bir yüzey olayı olduğundan, nanoparçacığın yüzeyindeki herhangi bir değişiklik (veya boyuta oldukça bağımlı olduğu için boyutunda), LSPR'de ve dolayısıyla nanoparçacık süspansiyonunun optik özelliklerinde kolorimetrik yöntemler ile tespit edilebilecek değişikliğe neden olacaktır.

Plazmonik nanoparçacıkların yüzeyi, herhangi bir test için bir tanıma molekülü içerecek şekilde değiştirilebilir. İstenen molekül ile hazırlandıktan sonra, tanıma ligandıyla etkileşime bağlı olarak yüzeyde meydana gelen bir değişiklik, numunenin renginde bir değişikliğe yol açacaktır. Renk değişikliğinin ölçülmesi ve analiz edilmesi ile konsantrasyona göre bir sonuç elde edilmektedir. Bu testlere verilebilecek en güzel örnek insan gonadotropin hormonunu saptayan altın nanopartikül temelli evlerde uygulanan hamilelik testleridir (Azzazy ve Mansour 2009, Paris ve Vallet-Regí 2018). Numunede analit bulunduğu nanoparçacık agregasyonundan kaynaklanan biyomolekülleri belirlemek için altın nanosensörler de geliştirilmiştir.

Numunede analit bulunduğu nanoparçacık agregasyonundan kaynaklanan biyomolekülleri belirlemek için altın nanosensörler de geliştirilmiştir. Agregasyona bağlı olarak nanoparçacık boyutu ve şeklindeki değişiklik, genellikle çıplak gözle algılanabilecek büyüklükte bir değişikliğe neden olur. Örneğin, altın nanoparçacıklara tek iplikli DNA bağlanmasıyla, agregasyonu ve yüzey plazmon rezonansı indükleyerek ortamdaki DNA'yı tespit etmeye yönelik sistemler (Azzazy ve Mansour 2009, Chen ve ark 2016).

Plazmonik nanopartiküllerin floroforlarla etkileşimi ile farklı tipte nanosensörler de geliştirilebilmektedir. Floresan bir molekül, bir plazmonik nanoparçacığın yüzeyine yakın olduğunda, floroforun dipol kaynaklı bir sönmesi gerçekleşmektedir. Floroforun yüzeyden kaldırılması ile molekül tekrar floresan özellik kazanmakta ve örnekte saptanabilir hale gelmektedir. Bu etkiye dayalı bir sistem, analitin neden olduğu altın nanopartiküllerin yüzeyinden bir floresan polimerin spesifik yer değiştirmesinden dolayı numunedeki proteinleri tespit etmek için geliştirilmiştir (You ve ark 2007).

## **Süperparamanyetik Nanoparçacıklara Dayalı Testler**

*In vitro* tanı amaçlı çok çeşitli (özellikle demir oksit nanopartiküller)süperparamanyetik nanopartiküller üretilmektedir. Dış bir manyetik alana maruz kaldıktan sonra süperparamanyetik nanopartiküller (yüzeyleri tanı ligandları ile kaplanmış), örnek ortamından spesifik bir maddeyi yakalamak için kullanılmaktadır(Azzazy ve Mansour 2009). Örneğin, C-reactif proteinin (CRP) immünolojik yöntemler ile saptanması bu nanopartiküller sayesinde olmaktadır. Bu yöntemde nanopartiküllerin yüzeyleri CRP için spesifik bir monoklonal antikor ile kaplanmıştır. Sedimentasyonu kolaylaştırmak için poliklonal anti-CRP antikorunu da silika nanopartiküllerin yüzeyine yapıştırılmıştır. Örnekte ki CRP miktarına bağlı olarak, sedimentin manyetik geçirgenliğinde artış görülmektedir (Ibraimi ve ark 2006). Süperparamanyetik nanopartiküller yüzeylerinin patojenik hücrelere spesifik antikorlar ile kaplanması ile patojenik hücreleri, sağlıklı hücrelerden ayırmak için de kullanılabilir (Bryant ve ark 2007).

## **Nanopartiküllerin Elektrik Özelliklerine Dayalı Testler**

Farklı nanopartiküllerin gösterdikleri kendilerine has elektrik özellikleri nedeniyle (Karbon nanotüpleri gibi) *in vitro* nanosensörlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Tek duvarlı karbon nanotüplerin 1600 m<sup>2</sup>/g'ye varan yüksek yüzey alanı, yüzeylerine çok miktarda antikor bağlanmasına olanak sağlar. Tek duvarlı karbon nanotüplerin uzunlamasına eksenleri boyunca yüksek elektrik iletkenlikleri (genellikle balistik elektron iletimi olarak adlandırılır), istenen performansa sahip nanosensörlerin geliştirilmesini sağlar.

Bu tür yöntemler, ticari olarak üretilen immun tanı testlerinden daha iyi performansa sahip Prostat Spesifik Antijen saptama kitinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır (Rusling ve ark 2009, Ji ve ark 2010).

## **Nanopartiküllerin *In Vivo* Tanı Amaçlı Kullanılması**

Tıpta tanı alanında nanoteknoloji uygulaması, nanoparçacıkların *in vivo* görüntüleme ajanları olarak kullanılmasıdır. Kanser gibi çeşitli hastalıklı dokuların spesifik özellikleri nedeniyle nanopartiküller seçici olarak bu patolojik dokulara yerleşmektedir. Nanopartiküller, *in vivo* ortamda görüntü üretmek için tasarlanmışsa, klinisyen belirli bir hastalığın patolojik durumuna ilişkin tanı ve hastalığın seyri konusunda fikir sahibi olmasına imkan sağlamaktadır. Bu durum hastalığın tanı süresinde kısılma, zamanında doğru tedavi ve cerrahi müdahale ile tedavi başarısı sağlamaktadır (Paris ve Vallet-Regí 2018).

Nanopartiküllerin birkaç farklı yöntemle *in vivo* görüntü elde edilebilmektedir. Bunlar, optik görüntüleme, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), radyoizotop görüntüleme ve X-ışını bilgisayarlı tomografi (BT) gibi görüntüleme yöntemleridir. Son yıllarda, özel olarak üretilen nanopartiküller ile farklı görüntüleme modellerinin aynı anda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu yöntem sayesinde birden fazla yöntemin avantajları kullanılarak nanopartiküller sayesinde tek bir görüntü oluşturulabilecektir (Paris ve Vallet-Regí 2018).

### **Optik Görüntüleme**

Optik görüntüleme yöntemleri, nanopartiküllerin optik özelliklerinden dolayı oluşturdukları kontrast farkına ve çevre dokulardan gelen sinyallere göre görüntü oluşturmaktadırlar. Şuan kullanımda olan optik görüntüleme cihazlarının çoğu nanopartiküllerin oluşturdukları floresan ışımayı saptamaktadır (Paris ve Vallet-Regí 2018).

Fotoakustik görüntüleme optik biyo-görüntüleme amacıyla kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu yöntem oluşturulan akustik dalgaların nanopartiküller tarafından emilmesi ile oluşan ısı sonucu kontrast farkının tespit edilmesi esasına dayanır. Optik görüntülemenin daha yüksek kontrastını ve ultrason görüntülemenin daha yüksek penetrasyon ve uzaysal çözünürlüğü ile birleştirdiği için bu yöntemin çeşitli avantajları vardır (Witte ve ark 2008, Chen ve ark 2016).

### **Manyetik Rezonans Görüntüleme**

Bu yöntemle görüntüleme, organ/dokularda protonların spin-kafes gevşemesi (T1) veya spin-spin gevşemesi (t2) gibi iki yöntemle oluşmaktadır. Manyetik rezonans görüntüleme ile yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler oluşturulur, ancak tekniğin hassasiyetini artırmak için genellikle kontrast artırıcı ajanlara ihtiyaç duyulur. Bu kontrast ajanları hangisinin daha iyi kontrast sağladığına bağlı olarak T1 veya T2 ajanlarına ayrılabilen manyetik olarak aktif maddelerdir(Paris ve Vallet-Regí 2018). En yaygın T1 kontrast ajanları, manyetik ajan olarak aktif dietilamin pentaasetik asit veya tetraazasiklododekan tetraasetik asit ile muamele edilen  $Gd^{+3}$  içeren türlerdir (Chen ve ark 2016). Serbest kalabilen  $Gd^{+3}$  iyonlarının toksisitesi hakkında bazı endişeler olsa da, klinik ortamda en yaygın kullanılan MRI kontrast maddeleridir.  $Gd$  (III) iyonları, MRI kontrastını arttırmak için farklı tipte inorganik nanopartiküller ile de birleştirilebilir. Farklı görüntüleme yetenekleri sağlayabilen nanopartiküllerin kullanımı, tek



bir formülasyon ile farklı görüntüleme modeli oluşturacağından hastalıkların tanı ve tedavisinde umut verici gelişmeler yaşanmaktadır.

Süperparamanyetik demir oksit ( $Fe_3O_4$ ) nanoparçacıkları, negatif T2 kontrast ajanları olarak kullanılabilir (çünkü protonun spin-spin gevşemesini azaltırlar ve bu nedenle koyu bir kontrast verirler). Bunlar klinik olarak MR görüntülemelerinde sıklıkla kullanılırlar ve toksik olmamaları nedeniyle büyük avantaj sağlarlar (Chen ve ark 2016).

## **Radyoizotop Görüntüleme**

Farklı nanopartikül tiplerine radyoaktif izotopların dahil edilmesi, *in vivo* görüntüleme için kullanımlarına izin verir. Biyogörüntüleme için kullanılacak radyoaktif izotoplar, düşük enerji yayacak şekilde radyoaktif olmayacak şekilde seçilir. Radyoizotop görüntülemenin en yaygın yöntemleri pozitron emisyon tomografisi ve tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisidir. Nanopartiküller, çok sayıda radyoizotop etiketlemesine izin vererek, büyük bir hassasiyet sağlar ve görüntülemeyi gerçekleştirmek için gereken kontrast madde miktarını azaltır. PET görüntüleme için nanopartikülleri elde etmenin en yaygın yolu, nanopartiküllerin yüzeyinde şelatörlerin kullanılması ve nanopartiküllerin matrisi içinde iyon değişimi ile radyo-etiketledir (Chen ve ark 2016, Paris ve Vallet-Regí 2018).

## **X-Ray Bilgisayarlı Tomografi**

Bilgisayarlı tomografi görüntüleme, bir bilgisayar programı tarafından işlendikten sonra tomografik bir görüntü üretmek için birkaç X-Ray taramasının kullanılması esasına dayanır. Bilgisayarlı tomografi kontrastı sert dokular için çok yüksektir, ancak kontrast maddeye ihtiyaç duyulduğundan yumuşak dokuların görüntülenmesi amaçlandığında yeterli değildir. Yüksek değere sahip atomlar, X-ray görüntülemelerinde yüksek kontrast sağladıklarından dolayı sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bu nedenle farklı şekillerdeki altın nanopartiküller BT görüntülemelerinde kullanılmaktadır. Altın nanopartiküllerin kullanılma nedenleri arasında X-ray'deki yüksek kontrastın yanı sıra, kolay üretilmeleri, biyouyumluluğu ve BT görüntülemeyi diğer optik modellerle birleştirmek için optik özelliklerini ince ayarlayabilme kapasiteleridir (Liu ve ark 2012).

### **1.7.2. Nanopartiküllerin Tedavi Amaçlı Kullanımı**

Nanopartiküller, iki farklı yaklaşıma dayalı olarak tedavi amaçlı kullanılabilir. Birinci yöntemde nanopartikül terapötik ajan olarak kullanılır ( materyal bazlı tedavi), ikinci yöntemde

nanopartikül terapötik bir molekül için taşıyıcı (nano-ilaç taşıma sistemi) olarak kullanılır. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaları geleneksel tedavi yöntemlerinde karşılaşılan birçok sorunun üstesinden gelmektedir. Bunlar özellikle toksik ilaçlar ve hidrofobik olanların stabil olarak uygulanması zor olduğu için bu problemlerin üstesinden gelmek için kullanılır. Bundan dolayı nanopartiküller çok çeşitli ilaçların biyo-yararlarını artırır, toksik etkilerini azaltır ve hedefe özgüllüğünü artırır. İlaçların nanopartiküllere bağlanması, ilacı fizyolojik ortama maruz kaldığında (enzimatik bozulma gibi) meydana gelebilecek bozulmadan da koruyabilir (Chen ve ark 2021). Nanopartiküller enfeksiyonlar hastalıkları, osteoporosis, gen tedavisi ve kanser tedavisi gibi hastalıklarda kullanılmaktadır. Ancak, araştırmaların çoğu kanser tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır (Chen ve ark 2021).

### **Nanopartiküllerin Kanser Tedavisinde Kullanılması**

Nanotıp araştırmalarının büyük çoğunluğunun kansere odaklanmasının en önemli nedeni, gelişmiş geçirgenlik ve hedefe tutunma yeteneğindedir. Bu etki pek çok tümör'ün hızlı ve agresif büyümesinden kaynaklanmaktadır (Matsumura ve Maeda 1986). Bu hızlı ve kontrolsüz büyüme sırasında, tümör hücreleri, yeterli besin almak ve metabolizmalarından atık ürünleri çıkarmak için kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) indükleyebilir. Bu damarlar sağlıklı kan damarlarının aksine, hızlı ve düzensiz oldukları için kusurlu kan damarlarının oluşumuna yol açar. Bu kılcal damarlar duvarlarında sağlıklı doku ve organlardakinden daha büyük gözenekler bırakır. Bu gözeneklerin varlığı, sağlıklı bir dokuda mümkün olmayan büyük makromoleküllerin ve nanopartiküllerin hastalıklı bölgeye girişine izin verir (gelişmiş geçirgenlik). 1980'lerde bu durumun keşfi ile tedavinin etkisini değiştirmeden tümör olan dokulara daha fazla miktarda anti-tümör ilaçların verilmesine izin vereceğinden, potansiyel olarak ilacın dozunu azaltacağı ve dolayısıyla yan etkilerini azaltacağı için tümörleri tedavi etmek amacıyla nanopartiküllerin kullanılmasının önü açılmıştır (Wicki ve ark 2015).

Hücre geçirgenliğinin artması tümör bölgesinde nanopartikül birikimi, nanopartiküllerin kan dolaşımındaki süresine bağlıdır. Nanopartiküllerin damar içine enjeksiyonundan sonra, hücreye geçiş ve yapışma etkisinin gerçekleşmesi bir dizi adımda gerçekleşmektedir. İlk olarak nanopartiküller kan dolaşımında süspansiyon içinde stabil olarak kalmalıdır. Aksi takdirde, nanopartiküllerin agregasyonu kan damarlarının tıkanmasına yol açarak hastanın hayatını tehlikeye atacaktır. Daha sonra, nanopartiküller, tümöre yeterli miktarda tedavi edici etki yapacak kadar uzun süre kan dolaşımında kalmalıdır. Nanopartiküllerin dolaşımda kalma süresini etkileyen en önemli durum nanopartiküllerin opsonizasyonudur. Herhangi bir yüzey modifikasyonu olmayan nanopartiküller kana

geçtiklerinde, farklı proteinlerin bir karışımı ile kaplanırlar. Nanopartiküllerin bu proteinler ile kaplanması, bileşimindeki opsoninlerin varlığı nedeniyle sistemik dolaşımdan temizlenmesini hızlandırmaktadır. Bu problemin önüne geçebilmek için uygulanabilecek en önemli strateji nanopartiküllerin yüzeyinin protein adsorpsiyonunu engelleyecek yüksek hidrofilik kısımlarla modifiye edilmesinden ibarettir. Bu amaçla en yaygın kullanılan molekül polietilen glikoldür (Wicki ve ark 2015).

Nanopartiküllerin tümör dokularına geçiş oranı enjekte edilen dozun %1'i kadar olduğu tespit edilmiştir (Wilhelm ve ark 2016). Bu oran çok az gibi görünse de, herhangi bir nanotaşıyıcı olmadan serbest ilacın tümör bölgelerine ulaşacağı miktardan çok daha yüksektir (Lammers ve ark 2016). Ayrıca, sistemik kan basıncı ve nanopartikülün tümör dokularını geçişini arttırmak için anjiyotensin II enjekte edilmesi, tümör içindeki iç basıncın azaltılması, tümör damarlarının geçirgenliğini arttırmak gibi çeşitli stratejiler uygulanabilmektedir(O'Neill ve ark 2009, Chauhan ve ark 2012, Maeda ve ark 2013).

### **Nanopartiküllerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanılması**

Nanopartiküller antibiyotikler ile birlikte kombine edilerek enfeksiyon hastalıklarının antimikrobiyal tedavisinde kullanılmaktadır. Nano-antibiyotikler, doğal yapıları gereği antimikrobiyal aktivitelere sahip nanopartiküller (Ag nanopartikülleri, fullerenler veya kitosan nanopartikülleri gibi) kullanılarak veya antimikrobiyal ilaçları salabilen ajanlar olarak geliştirilebilir (Huh ve Kwon 2011). Örneğin, *Francisella tularensis* gibi hücre içi patojenlerin tedavisi için antibiyotik yüklü mezogözenekli silika nanopartiküller önerilmektedir (Li ve ark 2015). *Francisella tularensis* bakterisi konakçı makrofaj hücrelerini enfekte etmektedir. Makrofajlar, nanopartiküller kan dolaşımına geçtikten sonra büyük miktarlarda nanopartikülleri yutma eğiliminde olan fagositlerdir. Üzerinde moksifloksasin bulunan nanopartiküller fagositler tarafından yutulduktan sonra nanopartiküller yüzeyinde antibiyotiği salarak hücre içinde bulunan bakterilerin ölmesine neden olmaktadır. Antimikrobiyal direnç ile ilgili mücadelede antibiyotik-nanopartikül kombinasyonları ile ilgili çalışmalar son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Nano-antibiyotikler farklı etki mekanizmaları ile (gümüş veya metal nanopartiküller antibiyotik direncini indüklemeden bakterileri öldürmektedir), enfeksiyon bölgesinin daha iyi hedeflenmesi veya ilaç-nanopartikül (kombine tedavi) kombinasyonları ile tedavide avantaj sağlamaktadır (Li ve ark 2015).

### **Nanopartiküllerin Osteoporozda Kullanılması**

Kemik erimesi (Osteoporozis), günümüzde yaşlı popülasyonun sağlık konusunda en sık yaşadığı sorunlardan biridir. Osteoporoz'un tedavisinde anabolik (kemik üretimini arttıran) ve antirezorptif (kemik erimesini azaltan) tedavinin etkinliğini arttırmak için nanopartiküller kullanılmaktadır. Bu genellikle kemik erimesinin olduğu bölgede ilaç konsantrasyonunu arttırmak için nanopartiküllerin kullanılması esasına dayanmaktadır. Osteoporoz tedavisinde nanopartiküllerin yüzeyi farklı bifosfonatlarla (kemiğin inorganik fazında bulunan kalsiyum) veya farklı proteinlerin kolajen bağlayıcı ajanları (dolayısıyla kemiğin ana organik bileşeni olan kolajen hedeflenir) ile kaplayarak ilaçların hedeflenen kemiğe gönderilmesi şeklinde gerçekleştirilmektedir. Nanopartiküller hedeflenen dokuda biriktikten sonra üzerinde bağlı bulunan paratiroid hormonu ve morfogenetik proteinleri gibi kemik tedavisinde kullanılan ilaçları ortama bırakırlar (Luhmann ve ark 2012).

### **Nanopartiküllerin Gen Tedavisinde Kullanılması**

Çok sayıda hastalığa bir veya birkaç genin bozulması neden olur ve gen tedavisi ile bu genetik bozukluktan kaynaklanan patolojileri tedavi etmek için genlerin yapısında modifikasyonların yapılması anlamına gelmektedir. Gen tedavisinin etkili olmasının önünde bazı engeller bulunmaktadır. Bunlar; nükleik asitin (DNA veya RNA) degradasyonunun engellenmesi, hedeflenen hücrelerin yeterli miktarda almaması, nükleik asitin sitoplazma ve endolizozomal sistemin dışına salınması gibi problemler yaşanmaktadır.

### **1.8. Karbapenemler**

Günümüzde var olan veya geliştirilmekte olan antibiyotiklerin yarısından fazlası  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler uzun bir süre, güvenli bir şekilde reçete edilen antibakteriyel ajanlardır. Bunların yaygın bir şekilde kullanımları antibiyotiklerin etkisini kısıtlayan dirençlere neden olmuştur. Özellikle, hastaneye yatan hastalarda çoklu antibiyotik direncine sahip patojenlerle enfeksiyon oranlarında artışlar görülmektedir. Bunun sonucu olarak bu hastaların hastaneye yatış sürelerinde uzamalar meydana gelmektedir (Bonfiglio ve ark 2002).

Karbapenemler,  $\beta$ -laktamların en güçlü sınıfıdır ve bu nedenle, genellikle hastanede en ağır hastaların tedavisi için ayrılmıştır. Karbapenemlerin anaerob bakterileride içeren Gram negatif ve Gram pozitiflere karşı geniş spektrumlu etkileri bulunmaktadır (Bonfiglio ve ark 2002). Son zamanlarda, penisilinler, sefalosporinler, florokinolonlar ve aminoglikozidlere karşı direnç arttığından dolayı karbapenemlerin klinik kullanımında artmıştır. Özellikle nozokomiyal pnömoni, komplike idrar yolu enfeksiyonları, komplike intraabdominal enfeksiyonlar, febril

nötropeni, septisemi ve menenjit gibi enfeksiyonlarda ampirik olarak karbapenemler kullanılmaktadır(Colardyn 2005, Richards 2005, Tellado ve Wilson 2005).

### 1.8.1. Kimyasal Özellikleri

Diğer  $\beta$ -laktamlarda olduğu gibi dört zincirli laktam halkası ve nitrojen ve tetrahedral karbon atomu içeren 5 zincirli tiazolidin ikinci halkasına sahiptir. Penisilinlerde ikinci halka beş zincirli tiazolidin halkası, sefalosporinlerde ise altı zincirli dihydrothiazine halkası içermektedir. Bu nedenle, karbapenemlerin temel yapısı penisilinlerinkinden yalnızca kükürt yerine bir karbon atomunun bağlanması ve ikincil halkadaki karbon atomları arasında doymamış bir bağın varlığı ile farklılık göstermektedir. Karbapenemlerin iki halkalı yapısına yan zincirler bağlanarak kendi içlerindeki farklılıklar oluşturulmaktadır(Bonfiglio ve ark 2002). Bu yan zincirler  $\beta$ -laktamaz üreten bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite de önemli bir fayda sağlamaktadır(Bonfiglio ve ark 2002, Zhanel ve ark 2005). Günümüze kadar meropenem, imipenem, ertapenem ve doripenem olmak üzere dört çeşit karbapenem üretilmiştir.

### 1.8.2. Etki Mekanizması

Karbapenemler, diğer  $\beta$ -laktamlar gibi PBP'lere bağlanırlar ve bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan sentezini bozarak etki gösterirler. Bunun sonucunda bakteri hücre duvarında hasara neden olarak hücre lizisine veya ölümüne yol açar. Bu etki gram pozitif bakterilerde hücre yüzeyinde olurken, Gram negatiflerde ise hücre duvarı ve hücre zarı arasındaki periplazmik aralıktan geçerek etki gösterir. Bu periplazmik aralıktan geçebilme yeteneği PBP'lere yüksek afinite ile bağlanmalarından kaynaklanmakta ve karbapenemlerin diğer antibiyotiklere kıyasla daha geniş etki göstermesine neden olmaktadır (Ueda ve Sunagawa 2003, Davies ve ark 2008).

Karbapenem sınıfının üyeleri, büyük ölçüde PBP'ler için benzer afiniteler sergiler ve benzer antimikrobiyal aktivite potansiyeline sahiptirler. Imipenem özellikle PBP 2 bağlanmakla birlikte PBP1a ve PBP1b'e bağlanır ve PBP3'e ise düşük affinite gösterir. Meropenem ise Özellikle PBP 2,3,4'e bağlanır. Ertapenem en güçlü bağlanma affinitesini PBP 2 ve 3 e karşı gösterir. Ancak, imipeneme bezner şekilde PBP 1a, 1b, 4 ve 5 e karşıda düşük affinite ile bağlanır. Yapılan çalışmalar doripenemin PBP2 ve 3'e meropeneme benzer şekilde bağlandığını göstermektedir (Davies ve ark 2008).

Karbapenemler hızlı ve bakterisidal etkiye sahiptirler. Diğer birçok antibiyotiklerin aksine karpabenemler klinik olarak önemli Gram negative, non fermentatiflere (*P. aeruginosa*,

*A. baumannii* ve *B. cepacia*) ve anaeroplara karşı etkilidirler (Tellado ve Wilson 2005). Tüm  $\beta$  laktamlar içerisinde Gram negatiflere karşı en etkili antibiyotikler karbapenemlerdir. Bu etki birçok faktörden kaynaklanmaktadır. Diğer  $\beta$  laktam antibiyotiklerin aksine karbapenemler genişlemiş spektrumlu  $\beta$  laktamaz direnci (GSBL) ve AmpC üreten suşlara karşı daha stabildir. Ayrıca, bu grup antibiyotikler  $\beta$  laktamlar içerisinde Gram negatiflere karşı post antibiyotik etkiye sahip tek antibiyotiklerdir (Lomaestro ve Drusano 2005, Psathas ve ark 2007).

Konsantrasyona bağımlı etki gösteren aminoglikozidler ve florokinolonların aksine diğer  $\beta$  laktamlar gibi karbapenemlerde zamana bağlı etki gösterirler. Bu durum serbest ilaç konsantrasyonunun minimum inhibitör konsantrasyonu ( $\%T > MİK$ ) aştığı dozlama aralığının yüzdesiyle doğrudan ilişkilidir. Karbapenemler diğer  $\beta$  laktamlara kıyasla daha düşük  $\%T > MİK$  değerlerinde etki göstermektedir. Ancak, bu değerler patojene ve antibiyotik türüne göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin, karbapenemler için  $\%20$  ( $\%T > MİK$ ) ihtiyaç duyulmakta iken, penisilinler için bu oran  $\%30$  ve sefalosproiner için  $\%40$ 'dır. Benzer şekilde maksimum öldürme için gerekli  $\%T > MİK$  karbapenemler için  $\%40$  iken penisilinler için  $\%50$ , sefalosporinler için  $\%60-70$ 'dir. Bundan dolayı karbapenemlerin çoğu IV infüzyon şeklinde uygulanır. Etkinlik doğrudan  $\%T > MİK$  ile ilişkili olduğundan, infüzyon süresinin uzatılması, dozda artış gerektirmeden etkinliği artırabilir (Drusano 2003, DeRyke ve ark 2006, Lorente ve ark 2006). Hem imipenem hemde meropenem stabil olmadıkları için bunların ekstra önlem alınmadan 3 saatten fazla IV olarak kullanılmaması gerekmektedir. Çünkü, bu antibiyotiklerde  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 3,5-5,5 saat arasında yaklaşık  $\%10$  bozunma gerçekleşmektedir. Doripenem ise diğerlerine kıyasla daha stabil (12 saate kadar) halde kalmaktadır (Viaene ve ark 2002).

### 1.8.3. Direnç Mekanizması

Karbapenemler geniş spektrumlu etki ederler ancak bazı mikroorganizmalar intrinsik direnç göstermektedir. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) PBP2a'ya *E. faecium* ise PBP5'e düşük bağlanma affinitesi gösterdiği için bu bakterilerde direnç görülmektedir (Zhanel ve ark 2005). Bakterilerde kazanılmış  $\beta$  laktamaz direnci ise karbapenemlerin hızlı hidrolize edilmesinden sorumludur. Bunlar, IMP, VIM ve SPM gruplarına ait olan sınıf B metallo- $\beta$  laktamazlar, SME, NMC/IMI ve KPC gruplarına ait olan sınıf A enzimleri ve çeşitli sınıf D (OXA) enzimlerdir (Livermore ve ark 2003). Bu enzimler genellikle karbapenemazlar olarak isimlendirilselerde tüm penisilin ve sefalosporinlerin hidrolize edilmesinden sorumludurlar. En güçlü sınıf B metallo- $\beta$  laktamazlar *S. maltophilia* ve *Aeromonas* spp. tarafından kromozomal olarak kodlanmaktadır (Fritsche ve ark 2005, Zhanel ve ark 2005).

$\beta$  laktam grubu antibiyotiklerin çoğuna intrinsik dirençli olan *P. aeruginosa* karbapenem grubu antibiyotiklere genellikle duyarlıdır. Ertapenem, membran geçirgenliğini azaltması ve effluks pompasına yüksek afinite ile bağlanma kombinasyonundan dolayı klinik olarak yeterli anti-pseudomonal aktivite göstermektedir(Amin ve ark 2005). *P. aeruginosa*'daki imipenem direnci kromozomal AmpC ve OprD porin kaybının kombine etkisi sonucu oluşmaktadır. OprD porin kaybının imipenem, doripenem ve meropenem için MİK değerlerinde artmaya neden olmasına rağmen direnç görülebilmesi için AmpC üretmeleri gerekmektedir(Mushtaq ve ark 2010). Meropenem ve doripenem direncinin yüksek effluk pompası ekspresyonu ile ilişkili olmasına rağmen imipenem de effluks pompası ile alakalı direnç görülmemektedir(Amin ve ark 2005, Mushtaq ve ark 2010). Doripenem ve meropenemin imipeneme kıyasla anti pseudomonal aktivitesinin daha iyi olduğu düşünülmektedir. Çünkü, bu antibiyotiklere direnç gelişebilmesi için birden fazla direnç mekanizmasının bir arada gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu durumun gerçekleşme ihtimali zor olduğu için imipeneme kıyasla daha zor direnç görülmektedir.

#### **1.8.4. Farmakokinetik**

Şuan mevcut olan karbapenemlerin tamamı intestinal yolda emilmedikleri için parenteral ajan olarak sınıflandırılmaktadırlar. İmipenem ve meropenemin vücut sıvılarına geçişini iyi olduğu bilinmektedir. İmipenem ile yapılan çalışmalar bu antibiyotiğin dokulara geçişinin iyi olduğunu raporlamışlardır. Yapılan bir çalışmada 500 mg IV olarak imipenem uygulamasından 1-2 saat sonra, balgamda 1,6 mg/L, tonsillerde 2,2 mg/kg, Prostatik dokularda 5,3 mg/kg, kadın genital organlarında 2,2-3,8 mg/kg, renal kortekste 16-79 mg/kg ve renal medullada 14-102 mg/kg antibiyotik konsantrasyonuna rastlanmıştır (Nix ve ark 2004). Dokulardaki tepit edilen antibiyotik konsantrasyonunun birçok aerobik bakterinin MİK değerinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. 1000 mg IV imipenem uygulamasından sonraki 1-8 saati takiben beyin omurilik sıvısındaki (BOS) antibiyotik konsantrasyonları sağlıklı grup için 0,6-0,9 mg/L, meninksleri enfekte olan hastalarda ise bu oran 1,1-2,3 mg/L olarak saptanmıştır(Laethem ve ark 2003, Nix ve ark 2004). Meropenemin dokulardaki sıvılara kolay ve hızlı bir şekilde dağıldığı bilinmektedir. IV olarak 1000mg meropenem uygulamasından 1,5-2,5 saat sonra akciğerlerde 1,43-8,23 mg/kg, kolonda 0,65-4,52 mg/kg, safra kesesinde 3,93 mg/kg ve deride 4,21-5,95 mg/kg oranlarında birikim olduğu tespit edilmiştir. Meropenemin BOS a geçişine bakıldığında 20 mg/kg uygulandıktan sonra 0,1-2,8 mg/L ve 40 mg/kg uygulamadan sonra 0,3-6,5 mg/L olarak ölçülmüştür(Zhanel ve ark 2007).

İmipenem DHP-1 tarafından hızlı metabolize edilmektedir ve *in vivo* olarak yarı ömrünü tamamlaması ve böbreklerde toksik etki yaramasını önlemek için silastatin ile birlikte kullanılması önerilmektedir. Hem imipenem hemde silastatin yaklaşık bir saatlik benzer yarı ömürleri bulunmaktadır. Silastatin ile birlikte uygulandığında imipenemin %60-70'inin değişmeden idrarla atılmaktadır (Zhanel ve ark 2007). Meropenem ve ertapenem DHP-1'e daha stabildir ve tek başına uygulanabilmektedir. Meropenemin yaklaşık %70'i böbreklerden atılmaktadır. Ertapenem ise böbreklerden filtre edilerek veya salgılar ile birlikte vücuttan elimine edilmektedir. Ertapenem uygulamasından sonra yaklaşık %80'inin idrarda tespit edildiği görülmüştür (Nix ve ark 2004, Zhanel ve ark 2007).

### 1.8.5. Yan etkiler

İmipenem/silastatin, meropenem ve ertapenemin kullanımdan sonraki yan etkileri ile ilgili pekçok çalışma bulunmaktadır. Meropenem ve imipenem/silastatin uygulamasının yan etkilerinin hafif ve kendini sınırlayan etkiler olduğu bildirilmektedir. Meropenem ve imipenem/silastatin uygulamasının en sık karşılaşılan yan etkileri enjeksiyon bölgesinde kızarıklık, ishal, kızarıklık, mide bulantısı, kusma ve kaşıntı olarak raporlanmıştır. Bu yan etkilerin hafiften orta şiddetli etkilere dönüşebileceği ve meropenem tedavisi başladıktan sonra hastaların %1,4'ünde, imipenem/silastatin uygulamasından sonra %1,8'inde tedavi kesilmesi gerektiği bildirilmiştir. Ertapenemin yan etkilerinin ise diğer karbapenemlerden biraz daha farklı olabilmektedir. Bu etkiler arasında en sık diyare, damar komplikasyonları, mide bulantısı ve baş ağrısı şeklinde olmuştur. Gastrointestinal şikayetlerden ve kızarıklıktan dolayı Hastaların %1,2'sinde tedavi kesildiği bildirilmiştir (Nix ve ark 2004, Teppler ve ark 2004, Zhanel ve ark 2007).

Diğer  $\beta$  laktamlar gibi karbapenemlerde laboratuvar test sonuçlarını etkilemektedir. Örneğin karaciğer enzimlerinden olan alanin aminotransferaz, alkalın fosfataz ve laktat dehidrogenaz gibi enzimlerin değerlerinde geçici yükselmelere neden olmaktadır. İmipenem ve meropenemin ise bunlara ilave olarak serum kreatinin ve üre değerlerinde yükselmelere neden olduğu bildirilmektedir (Zhanel ve ark 2007). Meropenem ve imipenem kullanımından sonra en sık görülen hematolojik değişiklik trombositosis ve eosinofilidir (hastaların %2'sinden azında). Laboratuvar testlerindeki bu yükselmelerin meropenem ve imipenem açısından anlamlı bir anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Teppler ve ark 2004, Zhanel ve ark 2007).



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kültür koleksiyonunda bulunan *E. coli* American Type Culture Collectin (ATCC) 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 standart suşları kullanıldı. Ayrıca, çeşitli hasta örneklerinde üreyen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. marcessens* suşları çalışmaya dahil edilmiştir.

### 2.2. Çalışmada Kullanılan Besiyeri ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm cam aletler kullanılmadan önce 3:1 oranında hazırlanan HCl/HNO<sub>3</sub> kral suyu çözeltisi ve distile su ile 3 defa yıkandı.

#### 2.2.1. Mueller Hinton Broth

1 Litre saf su için formül

Sığır Eti Ektraktı	: 2 g
Kazein Asit Hidrolizatı	: 17,5 g/L
Nişasta	: 1,5 g/L
pH	: 7,3 ±0,3

Mueller Hinton broth Sigma Aldrich (ABD) firmasından toz halinde hazır şekilde temin edilmiştir. Dehidre besiyeri, 34 g/L konsantrasyonda damıtık su içinde ısıtılarak eritilir. Besiyerinin sterilizasyonu otoklavda 123 °C'de 1 ATM basınçta 15 dakika sterilize edilip, steril Petri kutularına 12,5'er mL olacak şekilde dökülmüştür. Hazır haldeki besiyerleri kısa sürede kullanılana kadar +4 °C'de bekletilmiştir.

#### 2.2.2. Gold (III) Chloride Hydrate

Formül	: CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
Molekül Ağırlığı	: 237.93 g/mol

Altın (III) klorür hidrat 27988-77-8 katalog numarası ile Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır. %99.995 saflıkta toz halinde alınan altın (III) klorür hidrat nanopartikül sentezinde kullanılmak üzere uygun şartlarda saklanmıştır.

### 2.2.3. Trisodyum Sitrat

Formül :  $C_6H_5O_7Na_3$

Molekül Ağırlığı : 258.07 g/mol

Sitrik asit trisodyum tuzları ( $\geq 98$ ) toz halinde Sigma Aldrich firmasından 68-04-2 katalog numarası ile satın alınmıştır.

### 2.2.4. Meropenem Trihydrate

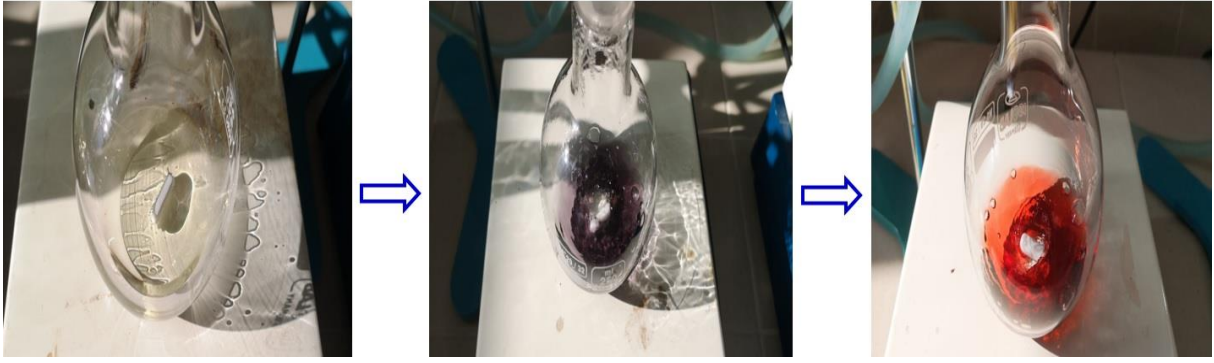
Formül :  $C_{17}H_{25}N_3O_5S \cdot 3H_2O$

Molekül Ağırlığı : 437.51 g/mol

Karbapenem grubu antibiyotiklerden olan meropenem trihydrate (%98 HPLC) 10 mg olacak şekilde 119478-56-7 katalog numarası ile Sigma Aldrich firmasından toz halinde saf halde satın alınmıştır. Firma önerileri doğrultusunda optimum koşullarda toz halinde ve sıvı halde stok solüsyon hazırlanarak saklanmıştır.

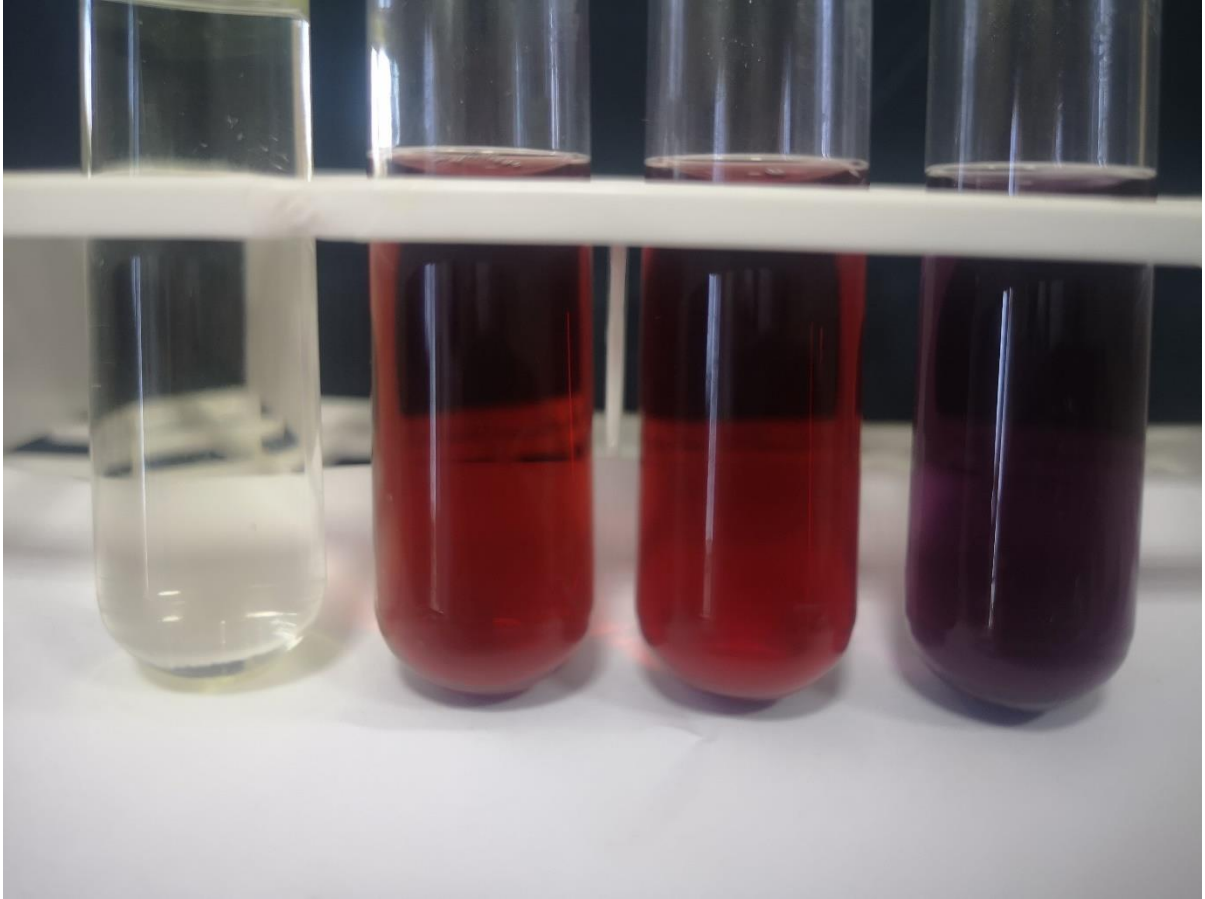
## 2.3. Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Tüm cam malzemeler kullanılmadan önce 3/1 oranında HCl/HNO<sub>3</sub> ve distile su ile 3 kez yıkandı ve kurutuldu. 1 g HAuCl<sub>4</sub> 250 ml deiyonize suda çözülürerek 10 mM HAuCl<sub>4</sub> stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra 25 mL stok çözeltiden alınarak 250 mL deiyonize suda 1mM HAuCl<sub>4</sub> olacak şekilde seyreltildi. 20 mL stok altın çözeltisinden 3 örnek olacak şekilde balon jøjeye aktarılarak içerisinde homojen karışımı sağlaması için manyetik balık atılarak ısıtma plakalı manyetik karıştırıcıya bırakıldı. Çözelti kaynama sıcaklığına geldiğinde hazırlanan 3 farklı çözelti üzerine sırasıyla 2,5 mL, 5 mL ve 10 mL trisodyum sitrat hızlıca ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) ilave edildi. Sodyum sitrat ilavesi ile birlikte çözelti rengi önce gri sonra da bordo/kırmızı renge (Şekil 2.1) dönüşüncüye kadar (yaklaşık 30 dk) ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bekletildi. İnkübasyon süresinden sonra çözelti karanlık ortamda oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Çözeltiler soğuduktan sonra 20 000 rpm'de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atılıp elde edilen nanopartiküller fosfat tampon (PBS, Ph=7,4) içerisinde ileride kullanmak üzere karanlık ortamda saklanmıştır.



Şekil 2.1. Nanopartikül sentezi.

Altından nanopartikül sentezi sırasında indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat oranına bağlı olarak nanopartikül boyutlarında farklılıklar olmaktadır. Bu farklılıklar sentez esnasında çözeltilerin renk farklılıkları ile anlaşılabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Altın nanopartiküllerin sentez sırasında nanopartikül boyutuna bağlı renk farklılıkları.

A. Altın çözeltisi      B. 2,5 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan çözelti      C. 5 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan çözelti      D. 10 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan çözelti

## 2.4. Nanopartiküllerin Fiziko-Kimyasal Karakterizasyonu

### 2.4.1. Spektrofotometre ile Boyut Analizi

Altın nanopartikül dağılımının absorbands değeri spektrofotometre (UV-vis 1800 Shimadzu, Japan) cihazı kullanılarak yapıldı. Sentezlenen partiküllerden yaklaşık 2 mL örnek kuartz küvetlere aktarılarak 200 ile 600 nm dalga boyu aralığında tarandı. Spektrum ölçümleri sonucunda maksimum dalga boyu ( $\lambda_{\max}$ ) ve yarı maksimumda tam genişlik gibi iki önemli bulgu elde edildi. Saptanan  $\lambda_{\max}$  değeri ile standart eğri grafiği kullanılarak Mie teorisine göre partikül boyut hesaplaması yapılmaktadır (Ghosh ve ark 2004). Partikül boyutu aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$d(\text{nm}) = 2,511 \times \lambda_{\max}(\text{nm}) - 1294,8$$

Bu denklem, sentezlenen nanopartiküllerin boyutunu tahmin etmek için maksimum dalga boyu ve nanopartikül boyutu arasındaki ilişkiye dayanmaktadır.

### 2.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Partikül Boyutu ve Morfoloji Analizi

Sentezlenen altın nanopartiküllerin morfolojik özellikleri ve partikül boyut analizleri Geçirimli Elektron Mikroskobu (Jeol Jem-2100, Japonya) cihazı ile 200 kV'de çalışılmıştır. Numuneler, karbon kaplı bakır gridler üzerine bir damla altın nanopartikül süspansiyonu konularak ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak hazırlandı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Nanopartiküllerin elektron mikroskobunda incelenme için hazırlanması.

Tüm örnekler 50x-2 000 000x büyütme aralığında incelenmiştir. Bütün TEM ölçümleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) görüntüsü.

## 2.5. Altın Nanopartiküllerin Antibiyotik ile Kaplanması

Sentezlenen altın nanopartikülden 1 ml balon jöjeye aktarıldı ve üzerine manyetik karıştırıcıda 1 mL meropenem ilave edilerek altın nanopartiküller meropenem ile kaplandı. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda buz banyosunda (0°C) 2 saat inkübe edildi. Bağlanmayan antibiyotik molekülleri 14 000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek pipet yardımıyla çözülden başka bir tüpe aktarıldı. Antibiyotiklerin bağlanma kapasitesi ve ilaç konsantrasyonu, çözeltinin süpernatant kısmındaki bağlanmayan antibiyotiklerin 295 nm dalga boyunda UV-spektrofotometre ile ölçüldü. Bağlanma kapasitesi aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Shaker ve Shaaban 2017).

Bağlanma kapasitesi % = [(Toplam meropenem- süpernatanttaki meropenem)/ toplam meropenem]×100

## 2.6. Meropenem Konsantrasyon Eğrisi

Antibiyotik+altın nanopartikül çözeltisinde bağlanmayan antibiyotik miktarı süpernatantta kalan antibiyotiklerin UV-vis spektrofotometre ile konsantrasyon analiz eğrisi çizilerek hesaplanmıştır. Bu amaçla stok solüsyonda bulunan antibiyotik çözeltisinden aşağıdaki konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

1. 0,00625 mg/mL
2. 0,0125 mg/mL
3. 0,025 mg/mL
4. 0,05 mg/mL
5. 0,1 mg/mL

Hazırlanan çözeltilerin konsantrasyonları UV-vis spektrofotometre cihazı ile 295 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Daha sonra süpernatantta serbest halde bulunan antibiyotik moleküllerinin konsantrasyonları ölçülmüş ve konsantrasyon grafiği çizilerek bağlanma kapasitesi ve ilaç konsantrasyonu hesaplanmıştır. Çalışmanın kalibrasyon grafiği çizildiğinde  $R^2=0,999$ ,  $y= 26,399x$  olarak elde edilmiştir. Ayrıca, TEM mikroskobu ile altın nanopartiküller yüzeyleri incelenerek antibiyotik ile kaplanmaları kontrol edilmiştir.

## 2.7. *İn Vitro* Antibakteriyel Duyarlılık Testi

Çalışmamızda meropenem kaplı altın nanopartiküllerin Gram negatif bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Hem hasta örneklerinden izole edilen suşlar hem de laboratuvar koleksiyonumuzda bulunan standart suşlar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmamızda tüm antimikrobiyal duyarlılık test çalışmaları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. Ayrıca, izolatların meropeneme karşı MİK değerleri hem sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile hem de VITEK 2 otomatize sistemi ile doğrulanmıştır. Antimikrobiyal çalışmalardan önce suşlar canlandırılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilerek tüm çalışmalar taze kolonilerden yapılmıştır. Çalışmamızda her bir suş için saf meropenem, saf altın nanopartikül ve üç farklı boyutta hazırlanmış ve meropenem ile kaplanmış altın nanopartiküllerin ayrı ayrı MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır. Tüm antimikrobiyal sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2021) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Çalışma kısaca şu şekilde yapılmıştır;

8×12 hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 100 µL Mueller-Hinton buyyon ilave edilmiştir. İlk kuyucuklara hazırlanmış stok çözeltilerden 100 µL NPS, Meropenem, NPS(15nm)+ Mem, NPS (35 mm)+ mem, NPS (100nm)+ mem kombinasyonları ilave edildi. Daha sonra birinci kuyucuktan diğer kuyucuklara seri dilüsyonlar (0,125-500 µl) yapıldı. Tüm izolatlar 0,5 McFarland standardı bulanıklığında süspansiyon hazırlandıktan sonra son konsantrasyon  $5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde her bir kuyucuğa (11. kuyucuk hariç) 100 µl ilave edildi. 11. Kuyucuk sterilite kontrolü (besiyeri+nps, mem ve diğer kombinasyonlar), 12. kuyucuk ise üreme kontrolü olarak (sadece bakteri+besiyeri) olacak şekilde çalışıldı. Hücre kültür kapları 37°C’de 16-20 saat inkübasyondan sonra en az iki uzman tarafından değerlendirilerek MIK değerleri not edildi. Üremenin olmadığı en düşük meropenem konsantrasyonu MIK değeri olarak kaydedildi. Her çalışmada kalite kontrol olarak ayrıca ATCC E. coli 25922 suşu kullanılarak testin güvenilirliği kontrol edildi.

## **2.8. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü çalışmaları Alamar Blue ile Sitotoksisite Tayini yöntemine göre yapılmıştır. Çalışmamız CCD18Co (ATCC CRL-1459) insan sağlıklı kolon epitel hücre hatları kullanılarak yapıldı. Besiyeri olarak Lonza Minimum Essential Medium Eagle (EMEM, Catalog #: 12-611Q) kullanıldı. Hücreler 96 kuyucuklu platalere her kuyucukta 200 µl  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Daha sonra hücreler; AuNPs, AuNPs-antibiyotik, antibiyotiklere; 0 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında muamele edildi. Devamında hücreler 48 saat, 37 °C’de, %5 CO<sub>2</sub> ortamda inkübe edildi. Alamar Blue (İnvitrogen DAL1100), her kuyucuğa 200 µL eklerenek 3 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından 570 ve 600 nm’lerde okuma yapıldı. IC<sub>50</sub> sonuçları GraphPad Prism 8.1 programında oluşturulan sigmoidal grafik ile elde edildi.

## **2.9. Meropenem Kaplı Altın Nanopartiküllerin Bakteri ile İlişkinin TEM Mikroskobu ile Görüntülenmesi**

75 mesh bakır-karbon formar grid üzerine damlatılan numuneler (yaklaşık 10 µL) 10 dakika grid’e yapışması için bekletildi. Daha sonra fazla olan numuneler kurutma kağıdı yardımı ile alındı. 8 dakika uranil asetat ile boyama işlemi yapıldı ve devamında 5 kez yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan boyalar ortamdaki uzaklaştırıldı. Devamında örnekler ikinci boyama olan kurşun sitrat ile karanlık ortamda muamele edildi. Son olarak örnekler tekrardan 3 defa yıkanarak 24 saat kurumaya bırakıldı. Tüm yıkama işlemleri saf su ile yapıldı. Bütün

TEM ölçümleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır.





### 3. BULGULAR

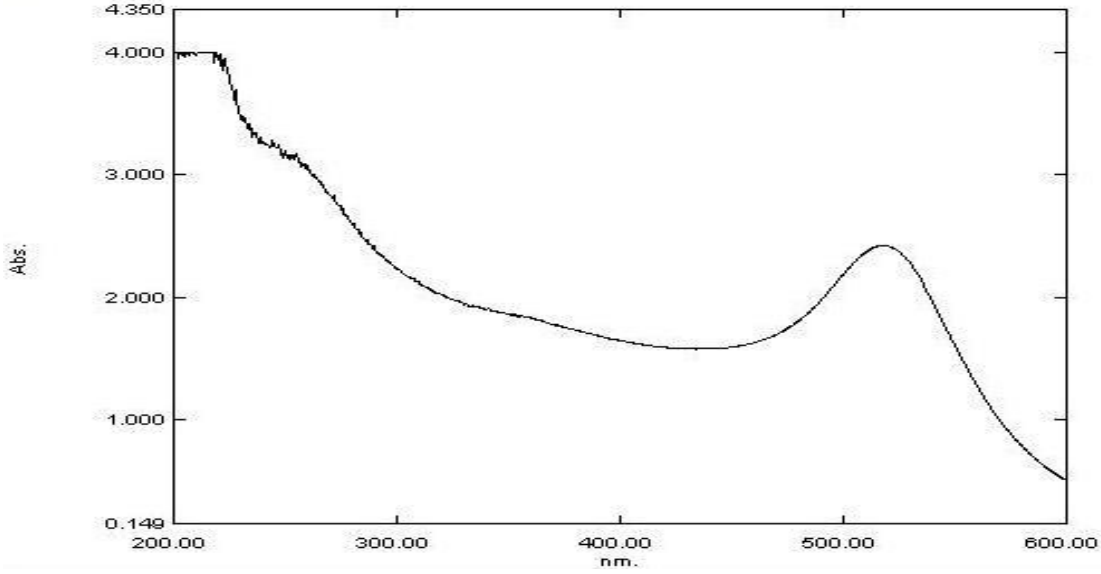
#### 3.1. Örneklerin Toplanması ve Çalışılması

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri çoklu ilaç direncine sahip bakterilere uygun antibiyotik seçiminde yaşanmaktadır. Uygun antibiyotik seçimi ve enfeksiyon bölgesine sağlıklı organlara zarar vermeden yeterli miktarda antibiyotik taşınması önem arz etmektedir. Bu nedenle çalışmamızda hücre geçişinde antibiyotiklere avantaj sağlayacak altın nanopartiküller ile antibiyotik kombinasyonlarının *in vitro* etkisi araştırıldı.

Bu çalışmada, 1 Ocak 2020-31 Aralık 2021 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kültür örneklerinden izole edilen 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae*, 20 *P. aeruginosa*, 20 *E. coli*, 20 *Proteus spp.* ve iki *Serratia spp* suşları ve ATCC koleksiyonunda bulunan ATCC 700603 *K. pneumoniae* ve ATCC 25922 *E. coli* suşları dahil toplam 104 suş çalışmaya dahil edildi. Tüm suşlar izole edildikten sonra çalışılana kadar -20°C’de saklandı. Suşlar kullanılacağı zaman %5 koyun kanlı besiyerine ekimleri yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm çalışmalar taze kolonilerden yapıldı.

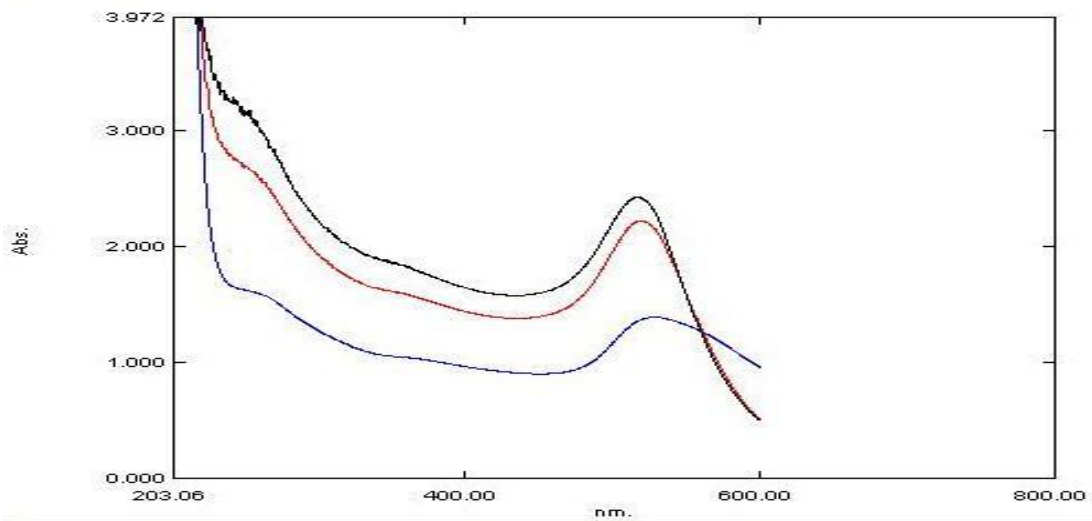
#### 3.2. Nanopartikül Sentezi ve Spektrofotometre ile Kalibrasyonu

Altın nanopartiküller, trisodium citrate ile hydrogen tetrachloroaurate’ın indirgenmesi ile sentezlenmiştir. Kullanılan trisodium sitrat konsantrasyonu sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutlarının kontrol edilmesinde önemlidir. Nanopartikül sentez kontrolü spektrofotometre cihazı ile absorpsiyon ölçümü ile yapıldı. Nanopartikül sentezi sırasında altının sarı renkten kırmızı-mor renge dönüşmesi ile 530 nm’de absorpsiyon bantlarının görünmesi nanopartikül sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sentezlenmiş nanopartiküllerin spektrofotometre analizi.

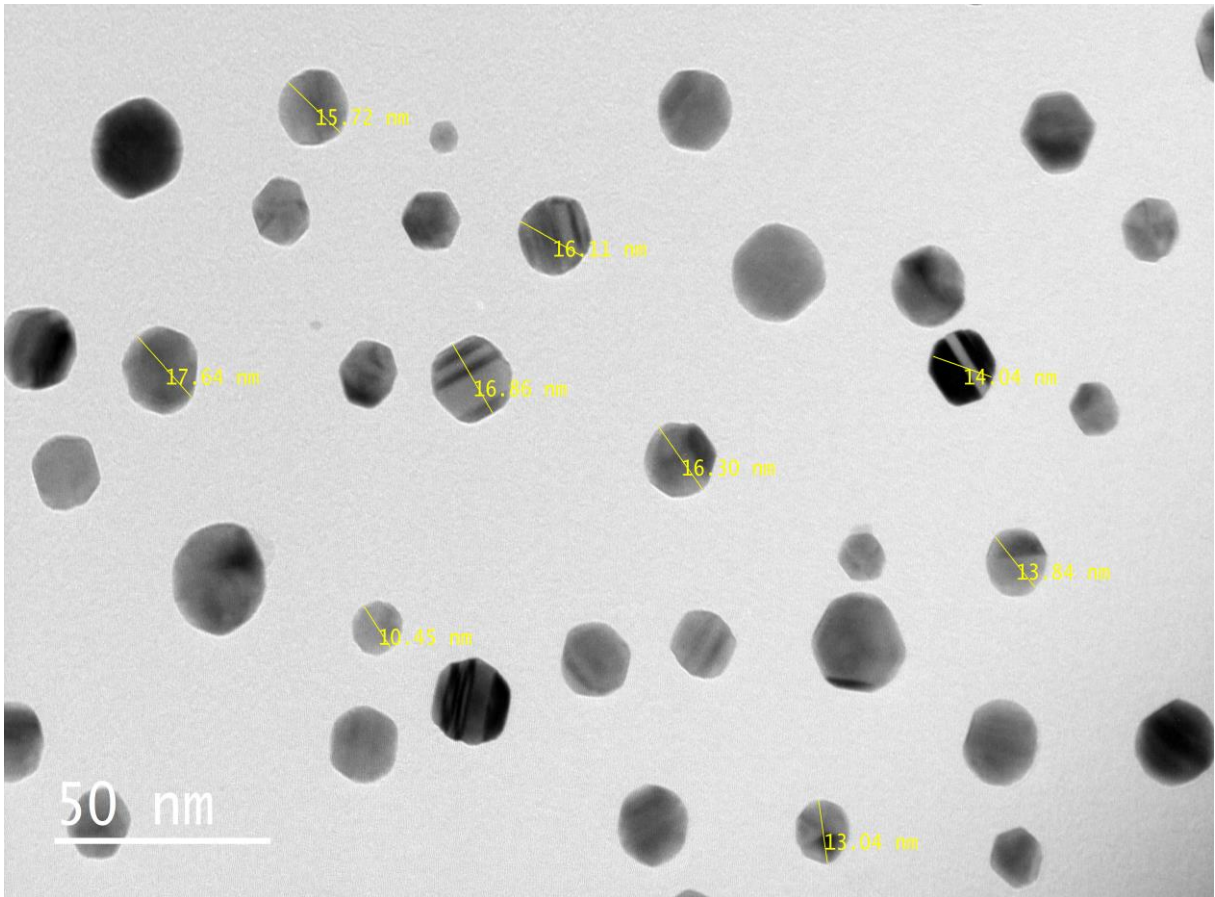
Altın nanopartiküllerin sentezlenmesi ile bağlantılı olarak hydrogen tetrachloroaurate çözeltisinin karakteristik açık sarı rengi kademeli olarak değiştikçe bant yoğunluğu kademeli olarak artış göstermiştir. Sentezlenen nanopartiküllerden 2,5 mL, 5 mL, 10 mL sitrat ilavesi ile sentezlenen altın nanopartiküllerin spektrofotometre ölçümleri sırası ile 520 nm, 526 nm ve 530 nm dalga boyu olarak ölçüldü (Şekil 3.2). Bu değerlere göre 2,5 mL tri sodyum sitrat ile sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutu 10,92 nm, 5 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 25,98 nm ve 10 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 36 nm olarak hesaplandı.



Şekil 3.2. 3 farklı boyutta sentezlenmiş olan nanopartiküllerin spektrofotometre analizleri (Siyah: 2,5 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş AuNPs, Kırmızı: 5 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş AuNPs, Mavi: 10 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş AuNPs).

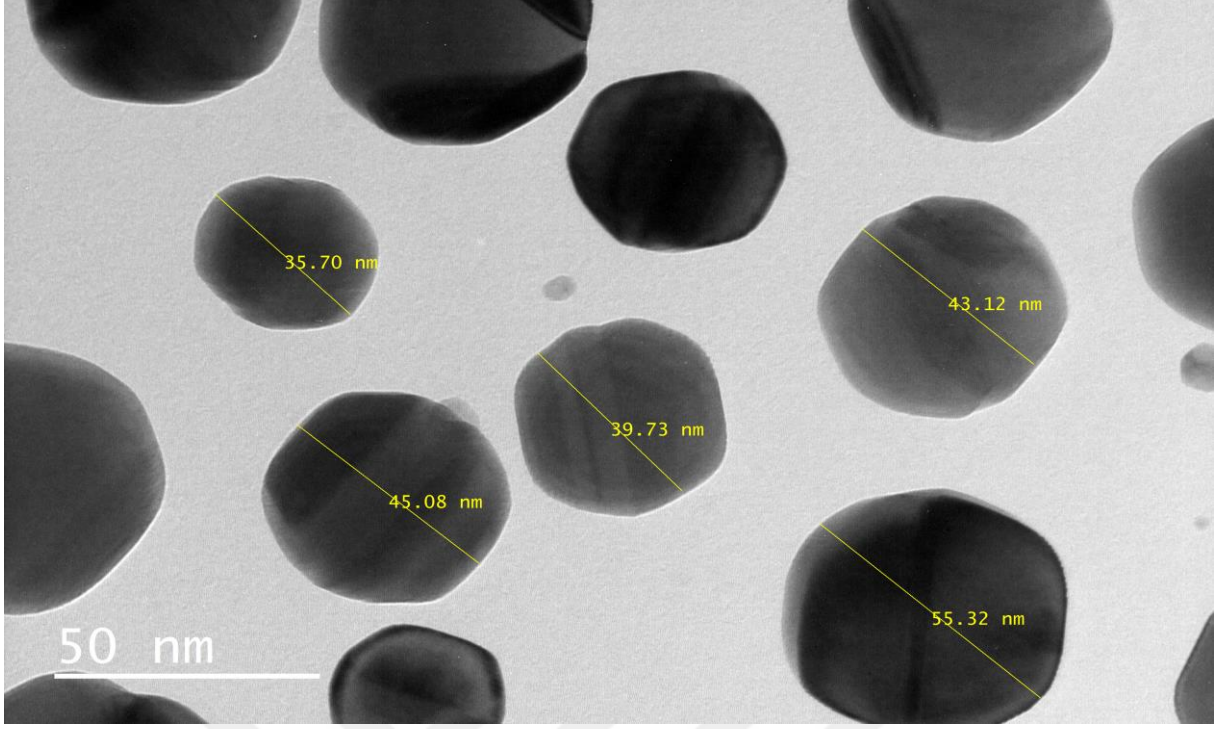
### 3.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Nanopartikül Boyut Analizi

Altın nanopartiküllerin sentezi sırasında kullanılan trisodyum sitrat miktarının nanopartiküllerin boyutlarına etki etmektedir. Yaptığımız çalışmada trisodyum sitrat konsantrasyonu arttıkça partikül boyutlarında artış olduğu görülmektedir. Bunun nedeni yüksek konsantrasyonlarda kullanılan sitrat iyonlarının altın atomlarını hızlı bir şekilde indirgediği ve bunun sonucunda daha büyük partiküller halinde çökelme olmaktadır. Spektrofotometre ölçümleri sonucunda 2,5 mL trisodyum sitrat ilavesi ile elde edilen nanopartikül boyutu 10,92 nm olarak hesaplandı. Aynı nanopartiküllerin TEM mikroskobu görüntüleri incelendiğinde (şekil 3.3) rastgele seçilen on partikülün ortalama boyutu yaklaşık 12 nm olarak ölçüldü.



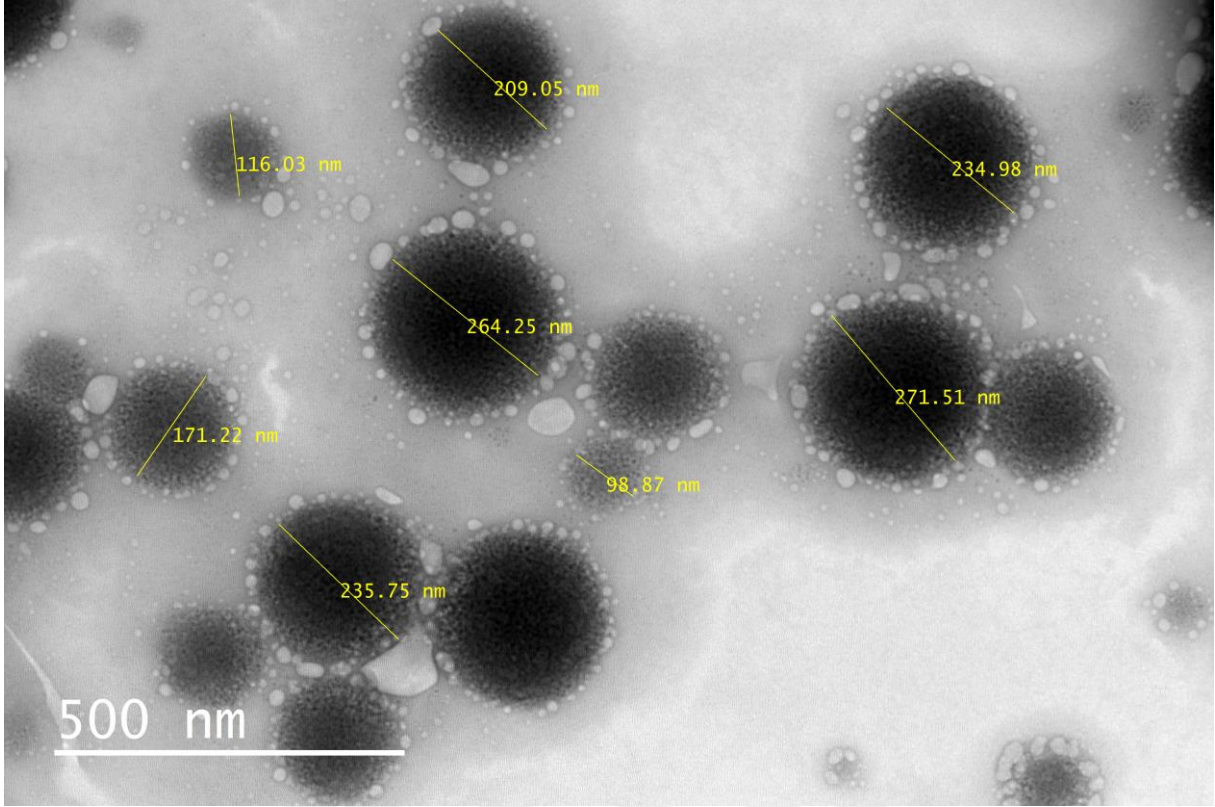
Şekil 3.3. 2,5 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin TEM mikroskop görüntüsü (10-20 nm).

5 mL trisodyumsitrat ilavesi ile hazırlanan nanopartiküllerin boyutları UV-vis spektrofotometre ile ortalama 25,98 nm olarak hesaplandı. TEM mikroskobu görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin ortalama boyutlarının ortalama 40 nm olduğu tespit edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 5 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin TEM mikroskop görüntüsü (30-55 nm).

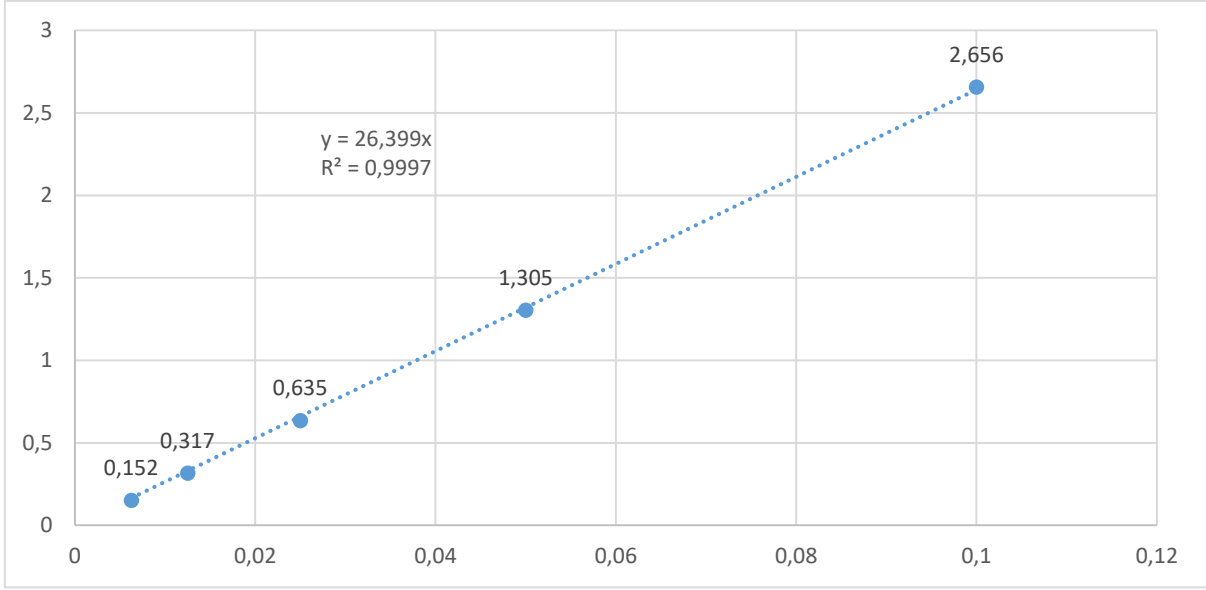
Spektrofotometre ölçümleri sonucunda 10 mL trisodyum sitrat ilavesi ile elde edilen nanopartikül boyutu 36 nm olarak hesaplandı. Aynı nanopartiküllerin TEM mikroskobu görüntüleri incelendiğinde (şekil 3.5) rastgele seçilen sekiz partikülün ortalama boyutu yaklaşık 198 nm olarak ölçüldü. 5 mL trisodyum sitrat ilavesi ile hazırlanan nanopartiküllerin boyutlarının 2,5 mL ile hazırlanana göre daha büyük olduğu 10 mL ile hazırlananlara göre daha küçük olduğu saptandı. Bu nedenle, elde ettiğimiz verilere göre trisodyum sitrat ilavesinin nanopartikül boyutlarını etkilediği sonucu çıkarılmaktadır. Ayrıca, nanopartiküllerin karakterizasyonunda sıklıkla UV-vis spektrofotometre ve TEM mikroskobu kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz veriler arasında trisodyum sitrat yoğunluğuna bağlı partikül boyutunun arttığı/azaldığı görüldü. Ancak, UV-vis spektrofotometre ve TEM mikroskobu arasında 2,5 ve 5 mL sitrat ile sentezlenen nanopartiküller arasında uyum ancak diğer nanopartiküller arasında boyut farklılıkları bulunmaktadır. Bu nedenle nanopartiküllerin sentezlendikten sonra karakterizasyonlarında spektrofotometre önemli olsa bile TEM mikroskobundan elde edilen verilere göre çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.



Şekil.3.5. 10 mL trisodyum sitrat ile sentezlenmiş altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü (50-270 nm).

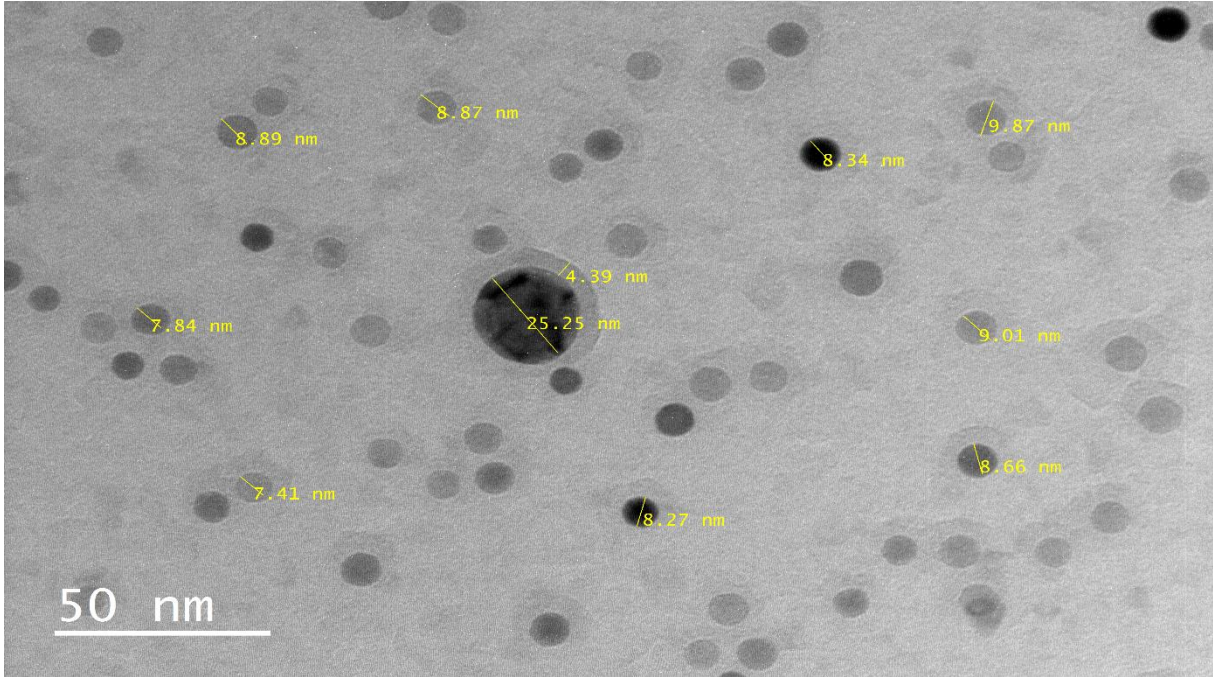
### 3.4. Antibiyotik Bağlanması ve TEM Görüntüleri

Meropenemin nanopartiküller tarafından bağlanma miktarı konsantrasyon grafiği çizilerek hesaplandı. Bu amaçla, saf haldeki meropenemden farklı konsantrasyonlarda (0,00625, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1) çözelti hazırlanarak UV-vis spektrofotometre cihazı ile ölçülerek konsantrasyon grafiği çizildi. Devamında antibiyotik ve nanopartiküllerin birlikte bulunduğu çözelti santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmındaki çözelti alınıp UV-vis spektrofotometre ile ölçüldü (Şekil 3.6.). Meropenem bağlanma konsantrasyonu 2,5 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte meropenem konsantrasyonu 0,699 (%73,5) 5 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte 0,765 (%71) ve 10 mL trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte bağlanma konsantrasyonu 0,804 (%61) olarak hesaplandı.



Şekil 3.6. Meropenem konsantrasyon grafiği.

Nanopartiküllerin antibiyotikler ile kaplanması ayrıca TEM mikroskobu ile görüntüledi. TEM mikroskobundan elde edilen görüntülerde altın nanopartiküllerin etrafının yaklaşık 4 nm boyutunda meropenem ile kaplandıkları görüntüledi (Şekil 3.7.).

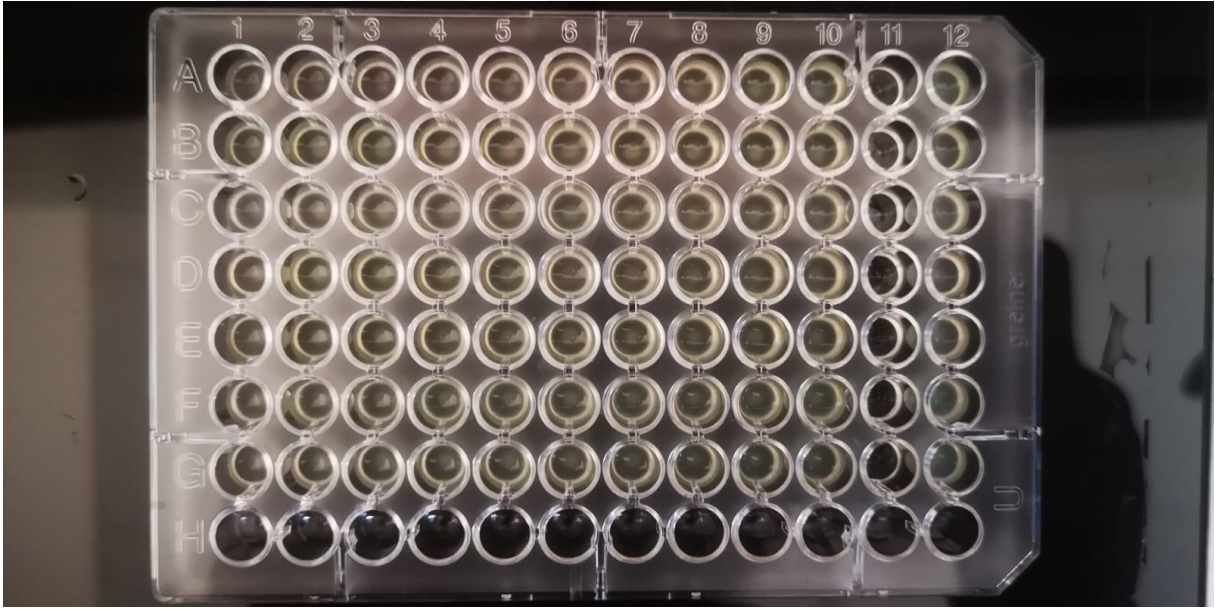


Şekil 3.7. Meropenem ile kaplanmış nanopartiküllerin TEM mikroskobu görüntüsü.

### 3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Sonuçları

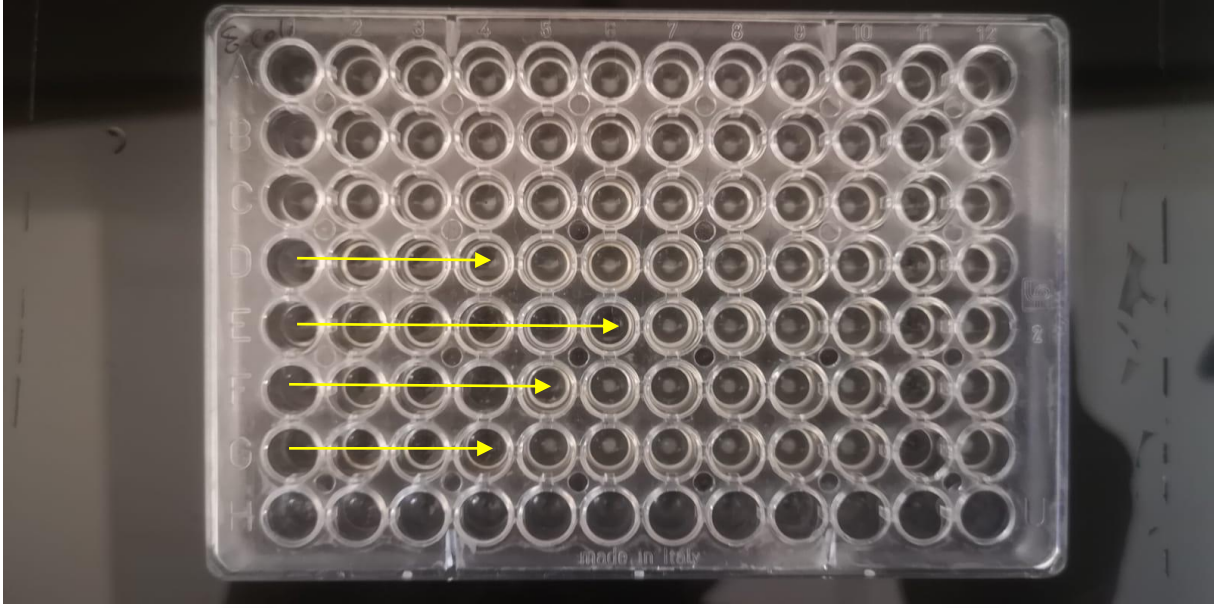
Bu çalışmada toplam 20 *K. pneumoniae*, 20 *A. baumannii*, 20 *P. aeruginosa*, 20 *E. coli*, 20 *Proteus spp.*, 2 *Serratia marcescens* suşu olmak üzere toplam 102 bakteri suşunun

meropeneme karşı duyarlılığı araştırılmıştır. *Proteus* suşlarının 16'sı *P. mirabilis*, 4'ü *P. vulgaris* olarak tanımlandı. Tüm çalışmalar ve antimikrobiyal duyarlılık sonuçları EUCAST (2022) kriterlerine göre değerlendirildi. *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşları meropenem'e karşı dirençli suşlardan, *E. coli* ve *Proteus* ve *Serratia* suşları ise meropenem'e karşı duyarlı ancak MİK değeri artmış veya dirençli suşlardan seçildi. Çalışmamızda üç farklı boyutta sentezlenen altın nanopartiküllerin saf hallerinin antimikrobiyal etkileri araştırıldı ve AuNP'lerin tüm suşlara karşı antimikrobiyal etkilerinin olmadığı tespit edildi. Ayrıca, çalışmamızda meropenem ve mem+AuNP'lerin (üç farklı boyutta) antimikrobiyal etkileri incelendi. MEM+AuNP'lerin, aynı konsantrasyonlarda saf halde bulunan meropenemlere göre daha etkili oldukları tespit edildi. İncelediğimiz çoklu ilaç direncine sahip 20 *A. baumannii*, 20 *K. pneumoniae* ve 20 *P. aeruginosa* suşlarında hem saf meropenemlere karşı hemde mem+AuNP kombinasyonlarına karşı herhangi bir antimikrobiyal etki saptanmadı (Şekil 3.8).



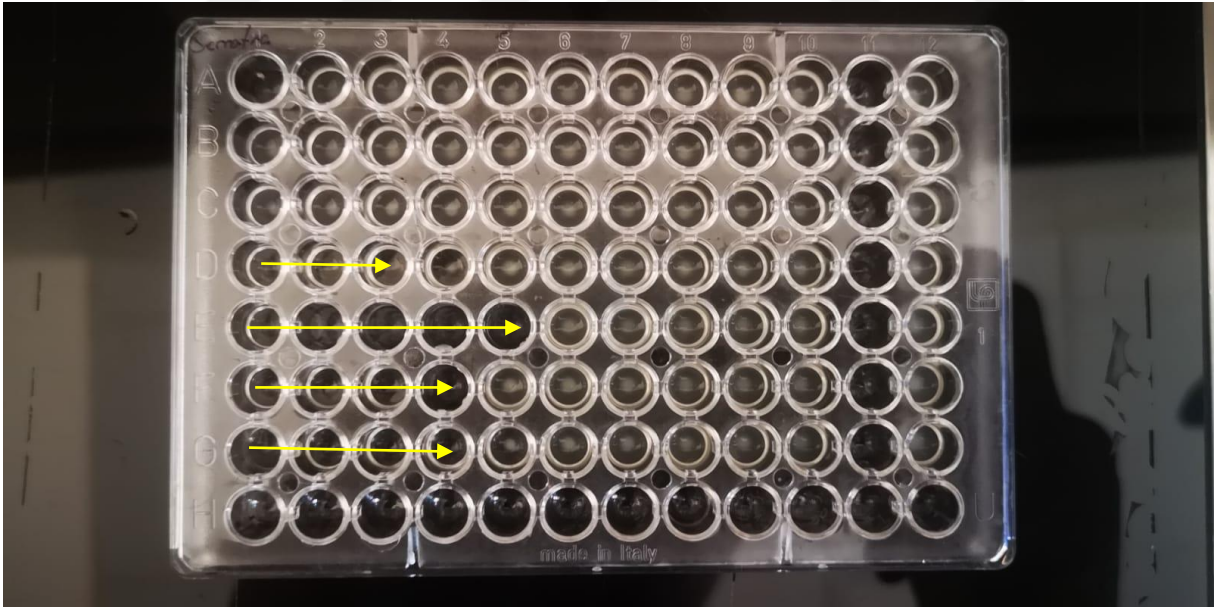
Şekil 3.8 *K. pneumoniae* ile yapılan MİK çalışması (Başlangıç Konsantrasyonu: 64µg/mL, A: 15 nm NPS, B: 35 nm NPS, C: 50+ nm NPS, D: Meropenem, E: 15nm NPS+mem, F: 35 nm NPS+mem, G: 50+ nm NPS+mem).

İncelediğimiz *E. coli* ve *Proteus spp.* suşlarında mem+NPS kombinasyonunun meropeneme göre daha etkili olduğu ve 10-20 nm boyutundaki nanopartiküllerin diğerlerine kıyasla daha etkili olduğu saptandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 *E. coli* suşu ile yapılan MİK çalışması (başlangıç konsantrasyonu 64µg/ml, A: 15 nm NPS, B: 35 nm NPS, C: 50+ nm NPS, D: Meropenem, E: 15nm NPS+mem, F: 35 nm NPS+mem, G: 50+ nm NPS+mem).

*S. marcessens* suşları ile yapılan çalışmada MİK değeri Mem+Nps (10-20 nm)<Mem+Nps (30-50nm)= Mem+Nps (50-200 nm)< mem olarak tespit edildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 *S. marcessens* ile yapılan MİK çalışması (başlangıç konsantrasyonu 64µg/ml A: 15 nm NPS, B: 35 nm NPS, C: 50+ nm NPS, D: Meropenem, E: 15nm NPS+mem, F: 35 nm NPS+mem, G: 50+ nm NPS+mem).

*E. coli* ile yapılan çalışmada üç suş da nanopartikül kombinasyonlarının meropeneme karşı daha etkili tespit edilmemiştir. *Proteus spp* suşlarında ise aynı durum iki suşta görüldü.



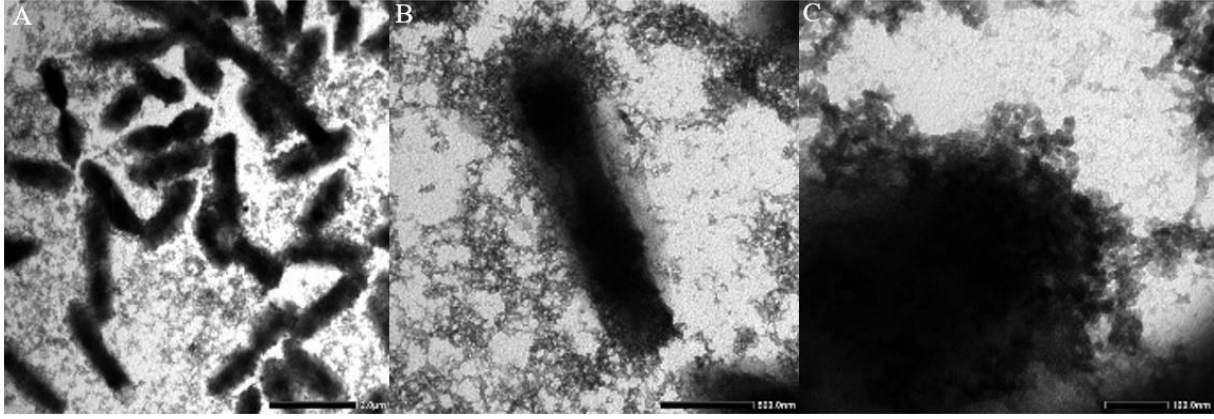
Yaptığımız tüm çalışmada nanopartiküllerin etkili veya meropenem ile eşdeğer etkiye sahip olduğu tespit edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 *E. coli* ve *Proteus* suşlarına karşı meropenem ve mem+nps kombinasyonlarının etkisi.

Suş	<i>E. coli</i> (MIK)				<i>Proteus spp.</i> (MIK)			
	Mem	Mem+NPS (10-20 nm)	Mem+NPS (30-50 nm)	Mem+NPS (50-200 nm)	Mem	Mem+NPS (10-20 nm)	Mem+NPS (30-50 nm)	Mem+NPS (50-200 nm)
1	8	2	4	8	8	4	8	8
2	8	4	4	8	8	2	8	8
3	16	16	16	16	1	0,25	0,5	0,5
4	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	1
5	1	0,5	1	1	2	1	2	2
6	2	1	1	2	1	0,5	1	1
7	2	0,5	1	1	4	2	4	4
8	2	2	2	2	8	2	4	8
9	2	0,5	1	1	1	1	1	1
10	2	1	1	1	1	0,5	1	1
11	2	0,5	1	1	2	1	1	2
12	2	0,5	1	1	4	1	2	2
13	4	1	1	2	16	16	16	16
14	4	1	2	2	16	8	16	16
15	4	2	2	2	8	4	8	8
16	4	1	2	2	8	8	8	8
17	4	4	4	4	2	1	2	2
18	4	2	2	2	16	8	16	16
19	4	1	2	2	1	0,5	0,5	1
20	8	4	4	8	2	1	2	2

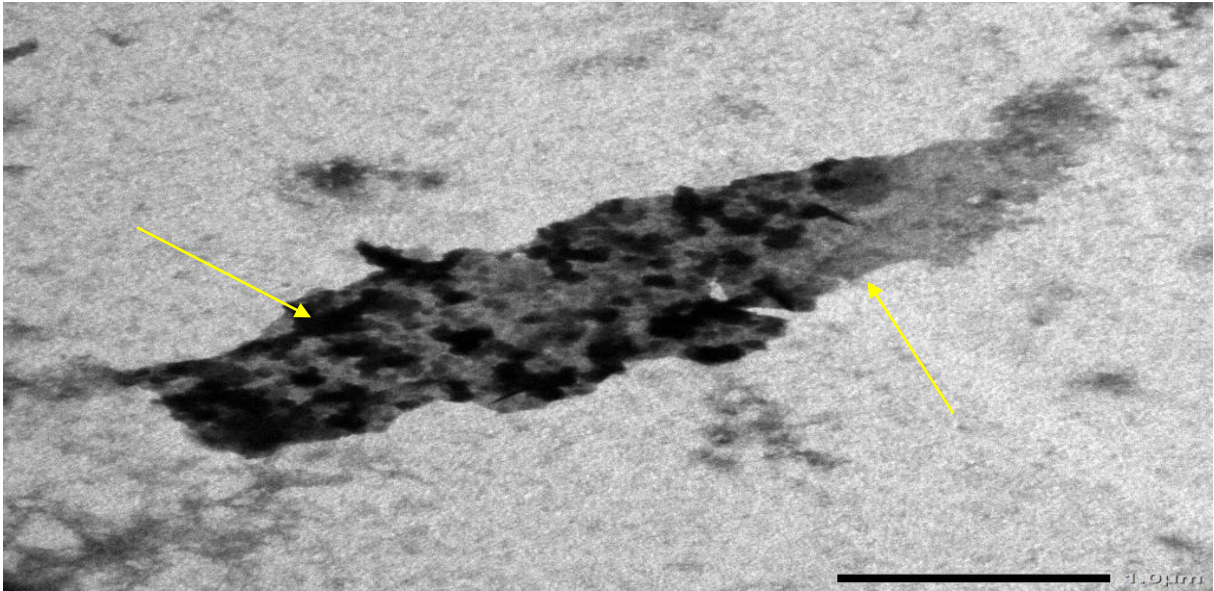
### 3.6. Bakteri ve Nanopartikül+Antibiyotik Etkileşiminin TEM Görüntüleri

Nanopartikül+antibiyotik kombinasyonunun bakteriler üzerine olan etkileri TEM mikroskobu aracılığı ile görüntülendi (şekil 3.11). Nanopartikül+antibiyotik kombinasyonu bakteri hücreleri üzerine tutunduktan sonra nanopartiküller aracılığıyla hücre duvarında porlar açarak veya hücre duvarındaki porlardan geçerek bakteri hücresi içerisine antibiyotikler taşınmış olur. Görüntülerden de anlaşılacağı gibi nanopartiküllerin bakteri hücreleri etrafında ve yüzeyinde yoğunlaştıkları gözlemlendi.



Şekil 3.11 Farklı yakınlaşma oranları ile bakteri hücresi (*E. coli*) ile nps+antibiyotik kompleksinin etkileşimi (A. 0,2  $\mu$ m, B. 500 nm, C. 100 nm).

Daha yakından incelenen görüntülerde ise nps+antibiyotik kombinasyonlarının bakteri hücreleri üzerine tutundukları ve hücre içerisine girdikleri tespit edildi (şekil 3.12).

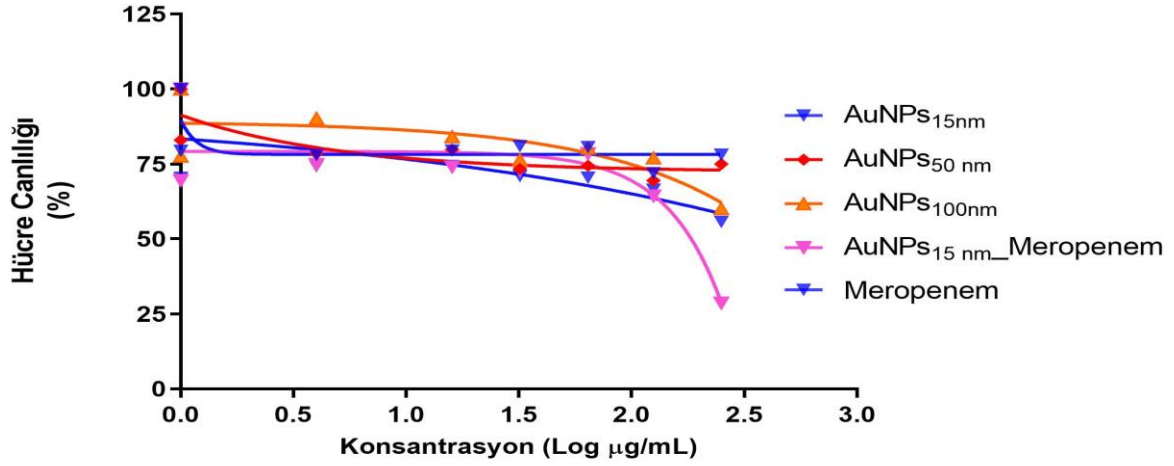


Şekil 3.12 NPS+antibiyotik kombinasyonunun bakteri hücre (*E. coli*) içerisindeki görüntüsü.

### 3.7. Hücre Kültürü Sonuçları

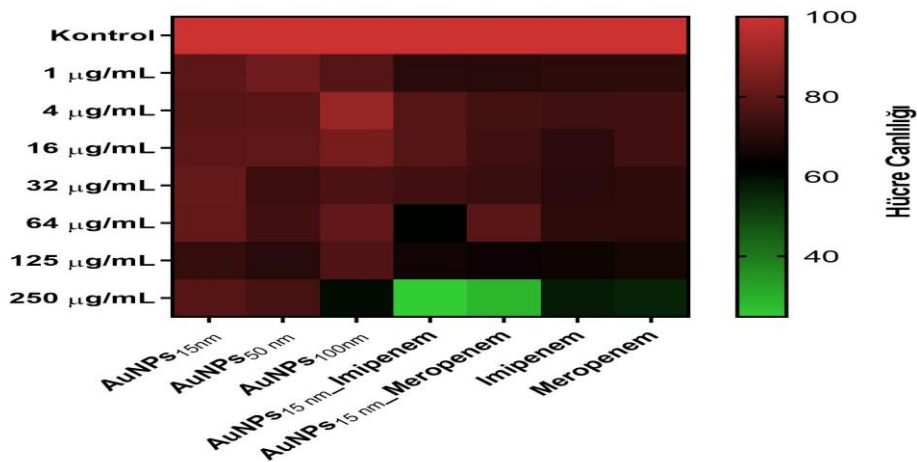
Altın nanopartiküllerin sitotoksik etkisi Alamar Blue Yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla altın nanopartiküllerin tek başlarına ve kombine sitotoksik etkileri CCD18co insan kolon epitel hücreleri üzerinde çalışıldı. Altın nanopartiküllerin 15 nm ve 50 nm kadar olan en düşük boyutlarda CCD18co hücreleri canlılığı üzerinde hiçbir etkilerinin bulunmadığı saptandı. Nanopartikül boyutu arttığında (yaklaşık 100 nm) konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığında hafif bir şekilde azalma olduğu tespit edildi. Meropenemin tek başına etkisi incelendiğinde ise düşük konsantrasyonlarda bile hücre canlılığını azalttığı görüldü. Altın

nanopartiküllerin en etkili olduğu en düşük boyuttaki nanopartiküllerin meropenem ile birlikte etkisi incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda hücreler üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ancak konsantrasyon arttığı zaman hücre canlılığına önemli ölçüde etkisi olduğu tespit edildi (Şekil 3.13, Şekil 3.14). Bunun nedeni olarak altının ağır metal olmasından dolayı yüksek konsantrasyonlarda canlı hücrelerde yoğun miktarlarda birikerek toksik etki yapmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.



Şekil 3.13 Saf antibiyotik, Saf altın nanopartikülü ve AuNP+MEM kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi.

Yaptığımız çalışmadan da anlaşılacağı üzere altın nanopartiküllerin meropenem ile kaplanmasının hücre canlılığı üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı, ancak yüksek konsantrasyonlarda hücreler üzerinde sitotoksik etki yarattığı saptandı. Bu nedenle, altın nanopartiküllerin insanlar üzerinde kullanımlarında sitotoksik etki ile karşılaşmamak için konsantrasyon analizlerinin yapıldıktan sonra uygulanmasını önermekteyiz (Şekil 3.13).



Şekil 3.14 Meropenem, AuNP ve AuNP+MEM kombinasyonunun hücre kültürü sonuçları.

#### 4. TARTIŞMA

Metalik nanopartiküller, daha düşük erime noktasına sahip olmaları, daha yüksek spesifik yüzey alanları, spesifik optik özellikler ve mekanik dayanımları gibi farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler. Bunlar arasında altın nanopartiküllerin çok küçük olmaları, yüzey alanlarının yüksek olması, stabil ve sitotoksik olmaması nedeniyle hedeflenen dokulara ilaç taşınması, görüntüleme, tanı ve tedavi gibi tıpta bir çok alanda kullanılmaktadır (Khan ve ark 2014). Bu çalışmada toksisitesi düşük veya olmayan, antibiyotikler ile kaplanabilen ve etkinliği arttırılabilen altın nanopartiküllerin sentezlenmesi, karakterizasyonu, antibiyotikler ile kombine etkisi ve model hücreler ile *in vitro* etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla altın nanopartiküllerin sentezinde kullanılacak yöntemler incelendiğinde kimyasal, elektrokimyasal, ışınlama, sonokimyasal, solvotermal ve fotokimyasal gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır (Faraday 1857, Wender ve ark 2011). Michael Faraday, koloidal altın nanopartiküllerin oluşumunu inceleyen ilk kişiydi ve  $[AuCl_4]^-$ 'ün indirgenmesi için fosfor kullanmıştır (Faraday 1857). Son zamanlarda altının indirgenmesinde  $NaBH_4$ , tiyosulfat, sodyum sitrat, askorbik asit, alkoller ve aminler gibi pek çok indirgeyici ajan kullanılmaktadır (Li ve ark 2011, Lien ve ark 2011). Turkevich yöntemi, altının sodyum sitratın sıcak sulu çözeltisinde indirgenerek 15-20 nm'lik kolloidler verdiği en çok uygulanan yöntemlerden biridir (Turkevich ve ark 1951). Sıklıkla kullanılan diğer bir yöntem Brust ve ark. 3-5 nm altın nanopartiküller elde etmek için  $NaBH_4$  kullanılmaktadır ve partikül boyutunu tiyol konsantrasyonunu değiştirerek gerçekleştirmektedir (Brust ve ark 1994). Bizim çalışmamızda, en sık kullanılan yöntemlerden biri olan Turkevich yöntemine göre altın nanopartiküllerin sentezinde trisodyum sitrat yöntemi kullanarak ve sitrat konsantrasyonu ayarlanarak 2,5 ml tri sodyum sitrat ile sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutu 10,92 nm, 5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 25,98 nm ve 10 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan altın nanopartiküllerin boyutu 36 nm olacak şekilde sentezlenmiştir.

Nanopartiküllerin sentezlendikten sonra boyutlarının ölçülmesi ve analiz edilmesi yapılacak çalışmalar için önem arz etmektedir. Bu nedenle karakterizasyon yöntemleri nanopartiküllerin şekil, boyut, yapı gibi fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi vermek amacıyla kullanılmaktadır. Metalik nanopartiküllerin karakterizasyonu için kullanılan en yaygın teknik, nanopartiküllerin çekirdeğinin bir fotomikrografını oluşturan ve numunelerin partikül boyutu, boyut dağılımı ve polidispersitesi hakkında bilgi sağlayan yüksek çözünürlüklü transmisyon elektron mikroskopudur (Ibraheem ve ark 2014, Iqbal ve ark 2015). UV-vis spektrofotometresi, karakteristik yüzey plazmon absorpsiyonuna sahip yoğun renkli koloidal dispersiyonların

analizi için kullanılır. Nanopartiküller sentezlendiğinde karakteristik yüzey plazmon rezonans tepe noktalarına sahip olan ve dolayısıyla UV-vis spektrumları genellikle önemli ölçüde farklı olan farklı boyuttaki nanopartiküller bulunmaktadır ve bunların analizinde UV-vis spektrofotometre yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Haiss ve ark 2007, Abdelhalim ve ark 2012). Yapılan çalışmalara benzer olarak, çalışmamızda sentezlediğimiz nanopartiküllerin boyut ve şekil gibi özellikleri için TEM mikroskobu ve UV vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Ayrıca, altın nanopartiküller antibiyotik ile kaplandıktan sonra UV-vis spektrofotometre ile konsantrasyon analizi ve TEM mikroskobu ile meropenem ile kaplanmış nanopartiküllerin görüntüleri elde edilmiştir. Uv-vis spektrofotometre ile yapılan partikül boyut analiz değerleri TEM mikroskobu ile yapılan ölçümlere uyumlu sonuçlanmıştır.

Nanopartiküllerin antibiyotik ile kaplanmasında en yüksek bağlama oranı en küçük boyutlardaki nanopartiküllerde yüksek, nanopartikül boyutu arttıkça bağlama kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Shakeer ve Shaaban yapmış oldukları çalışmada 35 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin antibiyotik bağlama kapasitesini sırasıyla %72 ve %73 olarak bildirmişlerdir. 70 nm altın nanopartiküllerin ilaç bağlama kapasitesini ise sırasıyla %48 ve %46 olarak tespit etmişlerdir. Altın nanopartiküllerin boyutu 200 nm çıktığında ise bağlama kapasitesi %41 ve %43 olarak saptanmıştır (Shaker ve Shaaban 2017). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde nanopartikül boyutundaki azalmaya bağlı antibiyotik bağlama konsantrasyonunda artış görülmüştür. Meropenem bağlanma konsantrasyonu 2,5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte meropenem konsantrasyonu %73,5 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte %71 ve 10 ml trisodyum sitrat ile hazırlanan örnekte bağlanma konsantrasyonu %61 olarak hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesindeki bu düşüş, koloidal sistemlerin yüzey yükleme verimliliğinin yüzey alanlarından önemli ölçüde etkilendiğini, böylelikle de nanopartikül boyutundaki azalmaya yüzey alanında dramatik bir artışa neden olduğunu göstermektedir (Gupta ve ark 2016).

Shakeer ve Shaaban antibiyotik ile kapladıkları altın nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliğinin arttığını ve inceledikleri imipenem ve meropenem'in altın nanopartiküller ile kaplandıktan sonra bakterilerin MİK değerlerinde dramatik düşüşler olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, imipenem ve meropeneme karşı artmış direnci bulunan *P. mirabilis* ve *A. baumannii* suşlarını incelenmiş ve antimikrobiyal etkinliği imipenem için  $Ipm-ANP35 > Ipm-ANP70 > Ipm-ANP200 > Ipm$ , meropenem için ise  $Mem-ANP35 > Mem-ANP70 = Mem-ANP200 > mem$  şeklinde tespit etmişlerdir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları incelendiğinde antimikrobiyal etkinin dört kat veya daha fazla şekilde arttığını bildirmişlerdir.

Her iki antibiyotik için altın nanopartiküller ile kombine etki sadece antibiyotiklerin etkinliğinden üç veya dört kat daha etkili bulunmuştur (Shaker ve Shaaban 2017). Bu çalışmada meropenem imipenem göre daha etkili bulunmuştur. Bunun nedeni olarak imipenem ve meropenemden her ikisinde penisilin bağlayan proteine (PBP) bağlanmasına karşın meropenemin afinitesinin daha yüksek olduğunu, meropenemin bakterinin dış membranından difüzyonunun daha iyi olduğunu ve bakteri hücre duvar sentezini daha iyi inhibe ettiği için meropenemin etkinliğinin daha iyi olduğunu bildirmiştir (Zhanel ve ark 2007, Nicolau 2008). Esmaeillou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, gümüş nanopartiküller vankomisin ile kaplanmış ve *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. faecalis*'in MİK değerlerinde dramatik bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir (Esmaeillou ve ark 2017). Gu ve ark yapmış oldukları çalışmada ise altın nanopartiküllerin yüzeyi vankomisin ile kaplanmış ve *E. faecalis* karşı etkinliğinin arttığı bildirilmiştir (Gu ve ark 2003). Shahverdi ve ark yaptıkları çalışmada yaklaşık 14 farklı antibiyotığın gümüş nanopartikül ile kombine etkisini disk difüzyon yöntemi ile incelemiş ve saf antibiyotiğe kıyasla kombine uygulamada zon çaplarında artışlar olduğunu tespit etmişlerdir (Shahverdi ve ark 2007).

Yaptığımız çalışmada altın nanopartiküllerin tek başına farklı boyutlarda ve yoğunlukta bakteriler üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarda da altın nanopartiküllerin tek başına bir etkilerinin olmadığı ancak antibiyotikler ile kombine olduğunda etkinliğinin arttığı bildirilmiştir (Shaker ve Shaaban 2017). Örneğin, Payne ve ark tarafından yapılan çalışmada kanamisin 20 nm boyutundaki altın nanopartiküller ile kombine edilmiş ve hücre içi geçişte ve kanamisin dirençli Gram negatif ve pozitif bakterilere karşı etkinliğinin arttığı bildirilmiştir (Payne ve ark 2016). Benzer şekilde altın nanopartiküllerin vankomisin (Gu ve ark 2003), siprofloksasin (Rosemary ve ark 2006), ampisilin (Brown ve ark 2012), amoksisilin (Kalita ve ark 2016), aminoglikozitler ve kinolonlar (Grace ve Pandian 2007) gibi antibiyotiklerle konjugatları antibakteriyel aktiviteyi önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, peptit immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin, çoklu ilaca dirençli izolatlarla karşı hedefleme yeteneği sergilediği ve antibakteriyel aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Kuo ve ark 2016). Yaptığımız çalışmada altın nanopartiküllerin tek başlarına hiçbir antibakteriyel etki göstermedikleri ancak antibiyotikler ile kombine edildiği zaman *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da etkisiz ancak *E.coli*, *Proteus spp.* ve *S. marcescens*'de ise etkilerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bu veriler literatürdeki diğer çalışmalar ile uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

Altın nanopartiküller ilaç taşınması, radyoterapi, gen terapisi, biyosensör, hücre görüntülenmesi ve kanser tedavileri gibi tıpta yoğun bir şekilde kullanılmasının yanında gıda ve içecek sektöründe de kullanımı artmıştır (Chandra ve ark 2010, Pissuwan ve ark 2011, Sani ve ark 2021). Altın nanopartiküller biyomedikal ve endüstriyel alanlarda yoğun bir şekilde kullanım potansiyelleri bulunmasına rağmen, uzun veya kısa kullanımının insan ve çevre üzerine etkisi ile ilgili kısıtlı bilgiler bulunmaktadır. Nanopartiküllerin tam klinik uygulamalara geçmeden önce, aktivitelerinin *in vivo* düzeyde uygun bir hayvan modelinde ve nihayetinde insan gönüllülerde araştırılması önem arz etmektedir (Viale ve ark 2015). Temel olarak bunun nedeni, bu nanopartiküllerin vücuttan atılmaları için biyoyumluluk ve toksisite ile ilgili yeterince bilgi olmamasıdır. Yapılan çalışmalarda, nanopartiküllerin damar içine (IV) uygulamadan sonra başta karaciğer olmak üzere farklı doku ve organlara büyük oranda dağılım gösterdiğini (Balasubramanian ve ark 2010, Hirn ve ark 2011, Morais ve ark 2012) raporlamıştır.

Yapılan çalışmalar sentezlenen nanopartiküllerin vücutta uzun bir süre immun yanıt oluşturmadan kalabileceğini göstermiştir. Bunun nedeni olarak yüzey yükleri ve boyutlarının çok küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Altın nanopartiküllerin toksisitesi ile yapılan çalışmalar incelendiğinde toksisitesinin düşük olduğunu bildiren çalışmalar bulunmasına rağmen, kullanılan doza bağlı toksik etki yaratabileceğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Yah 2013). Lopez-Chaves ve ark yaptıkları çalışmada, HT-29, HepG2 hücreleri ve wistar ratlarına 10,30 ve 60 nm altın nanopartiküller verilmiş ve hücreler ve organ dağılımları ve toksisteleri incelenmiştir. Elde edilen veriler nanopartiküllerin karaciğer, bağırsak, üriner sistem, böbrek ve dalağa geçtiğini, elektron mikroskopuyla yapılan incelemede ise kolon hücreleri ve karaciğer de geçtiğini göstermiştir. Organlara geçişte nanopartiküllerin boyutlarının önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir (Lopez-Chaves ve ark 2018).

Altın nanopartiküllerin boyuta (0,8-15 nm) bağlı toksisitesi dört farklı hücre hattında araştırılmış, test edilen en küçük nanopartiküllerden birinin (1,4 nm), 15 nm'ye kadar olan diğer altın nanopartiküllerle karşılaştırıldığında en yüksek toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, külçe altının buharlaştırılması ve öğütülmesiyle elde edilen küresel altın nanopartiküllerin toksik etki oluşturduğu ve daha küçük boyutlardaki partiküllerin interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (Bondarenko ve ark 2013). Yine yapılan çalışmalar CTAB kaplı altın nanopartiküllerin küresel altın nanopartiküllerden (30 nm) HaCat (human keratinocyte cell line) hücre hattında daha toksik olduğunu göstermiştir (Bondarenko ve ark 2013, Barkur ve ark

2020). Akciğer fibroblastları üzerinde yapılan çalışmalarda ise 20 nm boyutunda altın nanopartiküllerin toksik olmadığı, ancak önemli miktarda oksidatif DNA hasarı oluşturduğu yönünde bulgular elde edilmiştir. Ayrıca dermal fibroblast hücre hattında altın nanopartiküller nedeniyle anormal aktin ve hücre dışı matriks oluştuğu tespit edilmiştir (Bondarenko ve ark 2013). Sıçanlarda yapılan deri çalışmalarında, daha küçük boyutlu altın nanoparçacıklarının derinin daha derin bölgesinde biriktiği, daha büyük parçacıkların ise çoğunlukla epidermis ve dermiste yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (Bondarenko ve ark 2013, Fard ve ark 2015). Son yapılan ilginç çalışmalardan birinde Barkur ve ark. (2020), 10-100 nm arasındaki farklı boyutlardaki altın ve gümüş nanopartiküllerin eritrositler ile etkileşimini Mikro-Raman spektroskopisi ile incelemiş ve her iki nanopartikülün boyuta bağlı olmaksızın hemoglobinin oksijen bağlamasını bozduğu ve gümüş nanopartiküllerin oksidatif strese yol açarak daha toksik olduğunu bildirmişlerdir (Barkur ve ark 2020). Yaptığımız çalışmada 3 farklı boyutta sentezlediğimiz altın nanopartiküllerin CCD18Co (ATCC CRL-1459) insan sağlıklı kolon epitel hücre hatları kullanılarak sitotoksikite analizleri yapıldı ve elde edilen sonuçlar nanopartiküllerin hücreler üzerinde tek başına toksik bir etki yaratmadığı ancak antibiyotikler ile kombine edilmesinde hücre canlılığı üzerinde düşük konsantrasyonlarda etkisiz olduğu ancak yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerine olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir. Literatürde altın nanopartiküllerin canlı hücreler üzerinde toksik etkileri olduğuna/olmadığına dair çalışmalar bulunmakta ancak kesin bir tanımlama yapılamamaktadır.

Sonuç olarak, altının trisodyum sitrat ile indirgenerek nanopartikül haline getirilebileceği ve indirgeyici ajanın miktarının ayarlanarak partikül boyutunun ayarlanabileceği tespit edilmiştir. Altın nanopartiküllerin boyutunun azalması ile yüzey alanının arttığı, böylelikle antibiyotik bağlama kapasitelerinin arttığı ve antimikrobiyal etkinlerinde artış olduğu saptanmıştır. Altın nanopartiküllerin antibiyotikler ile kaplanabileceği ve bu nedenle nanopartiküllerin antimikrobiyal çalışmalarda antibiyotikler ile kombine edilerek kullanılabilmesi gösterilmiştir. Nanopartiküllerin tam klinik uygulamalara geçmeden önce, aktivitelerinin *in vivo* düzeyde uygun bir hayvan modelinde ve nihayetinde insan gönüllülerde araştırılması önem arz etmektedir (Viale ve ark 2015). Temel olarak bunun nedeni, bu nanopartiküllerin vücuttan atılmaları için biyouyumluluk ve toksisite ile ilgili yeterince bilgi olmamasıdır. Yapılan çalışmalarda, nanopartiküllerin IV uygulamadan başta karaciğer olmak üzere farklı doku ve organlara büyük oranda dağılım gösterdiğini (Balasubramanian ve ark 2010, Hirn ve ark 2011, Morais ve ark 2012) ancak birkaç çalışmada bu ürünlerin hepato-biliyer sistemde gerçekleştiğini raporlamıştır (Morais ve ark 2012).



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, altın nanopartiküllerin antimikrobiyal ajanlar ile kombinlenerek bakteriler üzerindeki etkisinin artırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, altın nanopartiküllerin sentezlenmesi sırasında indirgeyici ajan konsantrasyonunun partikül boyutuna etki ettiği saptanmıştır. Partikül boyutunun ölçülmesinde UV-vis spektrofotometre ile Mie teorisine göre ve TEM ile hesaplanmıştır. Bizim çalışmamız, altın nanopartiküllerin trisodyum sülfat ile indirgenerek nanopartikül sentezinin yapılabileceğini ve kullanılan indirgeyici ajan konsantrasyonuna göre nanopartikül boyutunun ayarlanabileceğini göstermiştir. Çalışmamızda, altın nanopartiküllerin meropenem ile kaplanabileceğini ve antimikrobiyal etkinlikte çoklu ilaç direncine sahip *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* ve *A. baumannii*'de etkisiz olduğu ancak *E. coli*, *Proteus* ve *Serratia* grubu bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir. Yapılan hücre kültür çalışmasında nanopartiküllerin hücreler üzerinde tek başına etkilerinin olmadığı, meropenemin ise etkinliğinin düşük olduğu ancak meropenem AuNPS kombinasyonunun etkinliği arttırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, nanopartiküllerin antibiyotikler ile kaplanarak etkinliğinin artırılması bakteriyel enfeksiyonların tedavisi açısından önem arz etmektedir. Ancak, bizim çalışmamız ve literatürdeki diğer çalışmalar *in vitro* koşullarda nanopartiküllerin etkinliklerini incelemek üzere hazırlanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* etki farklı olabilmektedir. Bu etkinin hayvan deneyleri veya insanlar üzerinde *in vivo* çalışmaları yapılarak etkinliklerinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle, bu verileri destekleyecek daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdelhalim MAK, Mady MM, Ghannam MM, 2012. Physical properties of different gold nanoparticles: ultraviolet-visible and fluorescence measurements. *J Nanomed Nanotechnol*, 3, 3, 178-94.
- Albanese A, Tang PS, Chan WC, 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual review of biomedical engineering*, 14, 1-16.
- Amin NE, Giske CG, Jalal S, Keijser B, Kronvall G, Wretling B, 2005. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *Apmis*, 113, 3, 187-96.
- Asghari F, Jahanshiri Z, Imani M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M, 2016. Antifungal nanomaterials: synthesis, properties, and applications. In: *Nanobiomaterials in antimicrobial therapy*. Eds: Elsevier, p. 343-83.
- ASTM E, 2006. 2456-06 "Terminology for Nanotechnology." . ASTM international, 2.
- Aversa R, Modarres MH, Cozzini S, Ciancio R, Chiusole A, 2018. The first annotated set of scanning electron microscopy images for nanoscience. *Scientific data*, 5, 1, 1-10.
- Azzazy HM, Mansour MM, 2009. In vitro diagnostic prospects of nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*, 403, 1-2, 1-8.
- Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Liya EY, 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, 2034-42.
- Barber DJ, Freestone IC, 1990. An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*, 32, 1, 33-45.
- Barkur S, Lukose J, Chidangil S, 2020. Probing nanoparticle–cell interaction using micro-Raman spectroscopy: silver and gold nanoparticle-induced stress effects on optically trapped live red blood cells. *Acs Omega*, 5, 3, 1439-47.
- Betancor L, Luckarift HR, 2008. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in biotechnology*, 26, 10, 566-72.
- Bhatia S, 2016. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In: *Natural polymer drug delivery systems*. Eds: Springer, p. 33-93.
- Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A, 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of toxicology*, 87, 7, 1181-200.
- Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G, 2002. Recent developments in carbapenems. *Expert opinion on investigational drugs*, 11, 4, 529-44.
- Brooks BD, Brooks AE, 2014. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Advanced drug delivery reviews*, 78, 14-27.
- Brown AN, Smith K, Samuels TA, Lu J, Obare SO, Scott ME, 2012. Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology*, 78, 8, 2768-74.
- Brown KR, Natan MJ, 1998. Hydroxylamine seeding of colloidal Au nanoparticles in solution and on surfaces. *Langmuir*, 14, 4, 726-8.
- Brust M, Fink J, Bethell D, Schiffrin D, Kiely C, 1995. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16, 1655-6.
- Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R, 1994. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid–liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 801-2.
- Bryant H, Sergatskov D, Lovato D, Adolph NL, Larson RS, Flynn ER, 2007. Magnetic needles and superparamagnetic cells. *Physics in Medicine & Biology*, 52, 14, 4009.
- Chandra P, Das D, Abdelwahab AA, 2010. Gold nanoparticles in molecular diagnostics and therapeutics. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 5, 2.

- Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Popović Z, Chen O, Kamoun WS, Bawendi MG, Fukumura D, Jain RK, 2012. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nature nanotechnology*, 7, 6, 383-8.
- Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN, 2016. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chemical reviews*, 116, 5, 2826-85.
- Chen YJ, Chang WH, Li CY, Chiu YC, Huang CC, Lin CH, 2021. Direct synthesis of monolayer gold nanoparticles on epoxy based photoresist by photoreduction and application to surface-enhanced Raman sensing. *Mater Design*, 197.
- Chu P, Zhang H, Zhao J, Gao F, Guo Y, Dang B, Zhang Z, 2017. On the volume resistivity of silica nanoparticle filled epoxy with different surface modifications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 99, 139-48.
- Colardyn F, 2005. Appropriate and timely empirical antimicrobial treatment of ICU infections—a role for carbapenems. *Acta Clinica Belgica*, 60, 2, 51-62.
- Das L, Das P, Bhowal A, Bhattacharjee C, 2020. Synthesis of hybrid hydrogel nano-polymer composite using Graphene oxide, Chitosan and PVA and its application in waste water treatment. *Environmental Technology & Innovation*, 18, 100664.
- Davies TA, Shang W, Bush K, Flamm RK, 2008. Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 4, 1510-2.
- de Assis DN, Mosqueira VCF, Vilela JMC, Andrade MS, Cardoso VN, 2008. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Tc-fluconazole nanocapsules. *International journal of pharmaceuticals*, 349, 1-2, 152-60.
- DeRyke CA, Lee SY, Kuti JL, Nicolau DP, 2006. Optimising dosing strategies of antibacterials utilising pharmacodynamic principles. *Drugs*, 66, 1, 1-14.
- Drulis-Kawa Z, Gubernator J, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A, 2006. A comparison of the in vitro antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11, 3, 360-75.
- Drusano G, 2003. Prevention of resistance: a goal for dose selection for antimicrobial agents. *Clinical Infectious Diseases*, 36, Supplement\_1, S42-S50.
- EKİNCİ DDD, 2016. Altın nanopartikül ve altın nanopartikül/indirgenmiş grafen oksit kompozit yapılarının ilaç salım sistemi olarak kanser tedavisinde kullanımı.
- Esmailou M, Zarrini G, Rezaee MA, 2017. Vancomycin capped with silver nanoparticles as an antibacterial agent against multi-drug resistance bacteria. *Adv Pharm Bull*, 7, 3, 479.
- Faraday M, 1857. X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 147, 145-81.
- Fard JK, Jafari S, Eghbal MA, 2015. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, 5, 4, 447.
- Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C, 2007. The Lycurgus cup—a roman nanotechnology. *Gold Bull*, 40, 4, 270-7.
- Frens G, 1973. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature physical science*, 241, 105, 20-2.
- Fritsche T, Stilwell M, Jones R, 2005. Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report (2003). *Clinical microbiology and infection*, 11, 12, 974-84.
- Fu S, Sun Z, Huang P, Li Y, Hu N, 2019. Some basic aspects of polymer nanocomposites: A critical review. *Nano Materials Science*, 1, 1, 2-30.
- Gannamani R, Ramesh M, Mtambo S, Pillay K, Soliman ME, Govender P, 2016.  $\gamma$ -Cyclodextrin capped silver nanoparticles for molecular recognition and enhancement of antibacterial activity of chloramphenicol. *Journal of inorganic biochemistry*, 157, 15-24.
- Gascón V, Jiménez MB, Blanco RM, Sanchez-Sanchez M, 2018. Semi-crystalline Fe-BTC MOF material as an efficient support for enzyme immobilization. *Catalysis Today*, 304, 119-26.

- Ghosh SK, Pal A, Kundu S, Nath S, Pal T, 2004. Fluorescence quenching of 1-methylaminopyrene near gold nanoparticles: size regime dependence of the small metallic particles. *Chem Phys Lett*, 395, 4-6, 366-72.
- Giersig M, Mulvaney P, 1993. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir*, 9, 12, 3408-13.
- Gleiter H, 2000. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta materialia*, 48, 1, 1-29.
- Grace AN, Pandian K, 2007. Quinolone antibiotic-capped gold nanoparticles and their antibacterial efficacy against gram positive and gram negative organisms. *Journal of Bionanoscience*, 1, 2, 96-105.
- Gu H, Ho P-L, Tsang KW, Wang L, Xu B, 2003. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture vancomycin-resistant enterococci and other gram-positive bacteria at ultralow concentration. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 51, 15702-3.
- Gupta A, Landis RF, Rotello VM, 2016. Nanoparticle-based antimicrobials: surface functionality is critical. *F1000Research*, 5.
- Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG, 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Analytical chemistry*, 79, 11, 4215-21.
- Han M, Quek C, 2000. Photochemical synthesis in formamide and room-temperature coulomb staircase behavior of size-controlled gold nanoparticles. *Langmuir*, 16, 2, 362-7.
- Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, Wenk A, Lipka J, Schäffler M, Takenaka S, Möller W, Schmid G, Simon U, 2011. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 77, 3, 407-16.
- Hondow N, Brydson R, Wang P, Holton MD, Brown MR, Rees P, Summers HD, Brown A, 2012. Quantitative characterization of nanoparticle agglomeration within biological media. *J Nanopart Res*, 14, 7, 1-15.
- Hostetler MJ, Green SJ, Stokes JJ, Murray RW, 1996. Monolayers in three dimensions: synthesis and electrochemistry of  $\omega$ -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 17, 4212-3.
- Hostetler MJ, Templeton AC, Murray RW, 1999. Dynamics of place-exchange reactions on monolayer-protected gold cluster molecules. *Langmuir*, 15, 11, 3782-9.
- Hostetler MJ, Wingate JE, Zhong C-J, Harris JE, Vachet RW, Clark MR, Londono JD, Green SJ, Stokes JJ, Wignall GD, 1998. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir*, 14, 1, 17-30.
- Huh AJ, Kwon YJ, 2011. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release*, 156, 2, 128-45.
- Ibraheem D, Iqbal M, Agusti G, Fessi H, Elaissari A, 2014. Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 79-91.
- Ibraimi F, Kriz D, Lu M, Hansson L-O, Kriz K, 2006. Rapid one-step whole blood C-reactive protein magnetic permeability immunoassay with monoclonal antibody conjugated nanoparticles as superparamagnetic labels and enhanced sedimentation. *Anal Bioanal Chem*, 384, 3, 651-7.
- Iqbal M, Valour J-P, Fessi H, Elaissari A, 2015. Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. *Colloid and Polymer Science*, 293, 3, 861-73.
- Jain RK, Stylianopoulos T, 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*, 7, 11, 653-64.
- Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ, 2001. Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, 19, 4065-7.
- Ji S-r, Liu C, Zhang B, Yang F, Xu J, Long J, Jin C, Fu D-l, Ni Q-x, Yu X-j, 2010. Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806, 1, 29-35.

- Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mäder K, 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *Journal of Controlled Release*, 95, 2, 217-27.
- Kalita S, Kandimalla R, Sharma KK, Katakai AC, Deka M, Kotoky J, 2016. Amoxicillin functionalized gold nanoparticles reverts MRSA resistance. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 720-7.
- Khan A, Rashid R, Murtaza G, Zahra A, 2014. Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 13, 7, 1169-77.
- Kim C, Lee H, 2018. Light-assisted surface reactions on metal nanoparticles. *Catal Sci Technol*, 8, 15, 3718-27.
- Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A, 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 32, 15700-7.
- Kinnear C, Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A, 2017. Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. *Chemical reviews*, 117, 17, 11476-521.
- Kreuter J, 1983. Physicochemical characterization of polyacrylic nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 14, 1, 43-58.
- Kumar S, Gandhi K, Kumar R, 2007. Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46, 10, 3128-36.
- Kumar S, Malik M, Purohit R, 2018. Synthesis of high surface area mesoporous silica materials using soft templating approach. *Materials Today: Proceedings*, 5, 2, 4128-33.
- Kuo Y-L, Wang S-G, Wu C-Y, Lee K-C, Jao C-J, Chou S-H, Chen Y-C, 2016. Functional gold nanoparticle-based antibacterial agents for nosocomial and antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine-Uk*, 11, 19, 2497-510.
- Laethem T, De Lepeleire I, McCrea J, Zhang J, Majumdar A, Musson D, Rogers D, Li S, Guillaume M, Parneix-Spake A, 2003. Tissue penetration by ertapenem, a parenteral carbapenem administered once daily, in suction-induced skin blister fluid in healthy young volunteers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 4, 1439-42.
- Lammers T, Kiessling F, Ashford M, Hennink W, Crommelin D, Storm G, 2016. Cancer nanomedicine: is targeting our target? *Nature Reviews Materials*, 1, 9, 1-2.
- Lee J-H, Choi SU, Jang SP, Lee SY, 2012. Production of aqueous spherical gold nanoparticles using conventional ultrasonic bath. *Nanoscale research letters*, 7, 1, 1-7.
- Li C, Li D, Wan G, Xu J, Hou W, 2011. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. *Nanoscale research letters*, 6, 1, 1-10.
- Li Z, Clemens DL, Lee B-Y, Dillon BJ, Horwitz MA, Zink JI, 2015. Mesoporous silica nanoparticles with pH-sensitive nanovalves for delivery of moxifloxacin provide improved treatment of lethal pneumonic tularemia. *Acs Nano*, 9, 11, 10778-89.
- Li Z, Wang L, Li Y, Feng Y, Feng W, 2019. Carbon-based functional nanomaterials: Preparation, properties and applications. *Compos Sci Technol*, 179, 10-40.
- Lien NTH, Hoa VX, Duong VTT, Van Tinh N, Nhung TH, 2011. Synthesis and optical properties of colloidal gold nanoparticles for biomedical applications. *Communications in Physics*, 21, 1, 63-.
- Lim YH, Tiemann KM, Hunstad DA, Elsabahy M, Wooley KL, 2016. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8, 6, 842-71.
- Liu Y, Ai K, Liu J, Yuan Q, He Y, Lu L, 2012. A high - performance ytterbium - based nanoparticulate contrast agent for in vivo X - ray computed tomography imaging. *Angewandte Chemie*, 124, 6, 1466-71.
- Livermore DM, Sefton AM, Scott GM, 2003. Properties and potential of ertapenem. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 52, 3, 331-44.

- Lomaestro BM, Drusano G, 2005. Pharmacodynamic evaluation of extending the administration time of meropenem using a Monte Carlo simulation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, 1, 461-3.
- Lopez-Chaves C, Soto-Alvaredo J, Montes-Bayon M, Bettmer J, Llopis J, Sanchez-Gonzalez C, 2018. Gold nanoparticles: distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14, 1, 1-12.
- Lorente L, Lorenzo L, Martín MM, Jiménez A, Mora ML, 2006. Meropenem by continuous versus intermittent infusion in ventilator-associated pneumonia due to gram-negative bacilli. *Annals of Pharmacotherapy*, 40, 2, 219-23.
- Lozhkomoiev A, Pervikov A, Chumaevsky A, Dvilis E, Paygin V, Khasanov O, Lerner M, 2019. Fabrication of Fe-Cu composites from electroexplosive bimetallic nanoparticles by spark plasma sintering. *Vacuum*, 170, 108980.
- Luhmann T, Germershaus O, Groll J, Meinel L, 2012. Bone targeting for the treatment of osteoporosis. *Journal of controlled release*, 161, 2, 198-213.
- Maeda H, Nakamura H, Fang J, 2013. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced drug delivery reviews*, 65, 1, 71-9.
- Magenheim B, Levy M, Benita S, 1993. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure. *International journal of pharmaceutics*, 94, 1-3, 115-23.
- Mansoori GA, Soelaiman TF, 2005. Nanotechnology—an introduction for the standards community. *Journal of ASTM International*, 2, 6, 1-22.
- Maruyama T, Fujimoto Y, Maekawa T, 2015. Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. *J Colloid Interf Sci*, 447, 254-7.
- Matsumura Y, Maeda H, 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46, 12 Part 1, 6387-92.
- Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM, 2003. Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nature materials*, 2, 9, 630-8.
- Meikle TG, Strachan JB, Conn CE, 2019. Lipid nanomaterials for the delivery of antimicrobial peptides. *Methods in Microbiology*, 46, 173-95.
- Mekkawy AI, El-Mokhtar MA, Nafady NA, Yousef N, Hamad MA, El-Shanawany SM, Ibrahim EH, Elsabahy M, 2017. In vitro and in vivo evaluation of biologically synthesized silver nanoparticles for topical applications: effect of surface coating and loading into hydrogels. *Int J Nanomed*, 12, 759.
- Molpeceres J, Aberturas M, Guzman M, 2000. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *Journal of microencapsulation*, 17, 5, 599-614.
- Morais T, Soares ME, Duarte JA, Soares L, Maia S, Gomes P, Pereira E, Fraga S, Carmo H, de Lourdes Bastos M, 2012. Effect of surface coating on the biodistribution profile of gold nanoparticles in the rat. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 1, 185-93.
- Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM, 2010. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro: Activity against Characterized Isolates, Mutants, and Transconjugants and Resistance Selection Potential. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 7, 3078-.
- Nicolau DP, 2008. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9, 1, 23-37.
- Nikoobakht B, El-Sayed MA, 2003. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials*, 15, 10, 1957-62.
- Nix DE, Majumdar AK, DiNubile MJ, 2004. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ertapenem: an overview for clinicians. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, suppl\_2, ii23-ii8.

- O'Neill BE, Vo H, Angstadt M, Li KP, Quinn T, Frenkel V, 2009. Pulsed high intensity focused ultrasound mediated nanoparticle delivery: mechanisms and efficacy in murine muscle. *Ultrasound in medicine & biology*, 35, 3, 416-24.
- Okitsu K, Sharyo K, Nishimura R, 2009. One-pot synthesis of gold nanorods by ultrasonic irradiation: the effect of pH on the shape of the gold nanorods and nanoparticles. *Langmuir*, 25, 14, 7786-90.
- Okrugin B, Neelov I, Leermakers F, Borisov OV, 2017. Structure of asymmetrical peptide dendrimers: Insights given by self-consistent field theory. *Polymer*, 125, 292-302.
- Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K, 2003. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced drug delivery reviews*, 55, 3, 403-19.
- Paczkowska M, Mizera M, Szymanowska-Powałowska D, Lewandowska K, Błaszczak W, Gościańska J, Pietrzak R, Cielecka-Piontek J, 2016.  $\beta$ -Cyclodextrin complexation as an effective drug delivery system for meropenem. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 99, 24-34.
- Paris JL, Vallet-Regí M, 2018. Nanostructures for imaging, medical diagnostics and therapy. In: *Fundamentals of Nanoparticles*. Eds: Elsevier, p. 1-28.
- Parker HL, Hunt AJ, Budarin VL, Shuttleworth PS, Miller KL, Clark JH, 2012. The importance of being porous: polysaccharide-derived mesoporous materials for use in dye adsorption. *Rsc Adv*, 2, 24, 8992-7.
- Payne JN, Waghwan HK, Connor MG, Hamilton W, Tockstein S, Moolani H, Chavda F, Badwaik V, Lawrenz MB, Dakshinamurthy R, 2016. Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. *Frontiers in microbiology*, 7, 607.
- Pei Y, Yeo Y, 2016. Drug delivery to macrophages: challenges and opportunities. *Journal of Controlled Release*, 240, 202-11.
- Pelgrift RY, Friedman AJ, 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced drug delivery reviews*, 65, 13-14, 1803-15.
- Pissuwan D, Niidome T, Cortie MB, 2011. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Journal of controlled release*, 149, 1, 65-71.
- Pokropivny V, Skorokhod V, 2007. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering: C*, 27, 5-8, 990-3.
- Polakovič M, Görner T, Gref R, Dellacherie E, 1999. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres: II. Modelling of drug release. *Journal of controlled release*, 60, 2-3, 169-77.
- Polte J, Erler R, Thunemann AF, Sokolov S, Ahner TT, Rademann K, Emmerling F, Kraehnert R, 2010. Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution. *Acs Nano*, 4, 2, 1076-82.
- Psathas P, Kuzmission A, Ikeda K, Yasuo S. Stability of doripenem for injection (500 mg) in representative infusion fluids and containers. American Society of Hospital Pharmacists Summer Meeting.
- Rai M, Yadav A, Gade A, 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27, 1, 76-83.
- Rastogi L, Kora AJ, Arunachalam J, 2012. Highly stable, protein capped gold nanoparticles as effective drug delivery vehicles for amino-glycosidic antibiotics. *Materials Science and Engineering: C*, 32, 6, 1571-7.
- Reetz MT, Helbig W, 1994. Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 16, 7401-2.
- Reetz MT, Helbig W, Quaiser SA, Stimming U, Breuer N, Vogel R, 1995. Visualization of surfactants on nanostructured palladium clusters by a combination of STM and high-resolution TEM. *Science*, 267, 5196, 367-9.
- Reibold M, Paufler P, Levin A, Kochmann W, Pätzke N, Meyer D, 2006. Carbon nanotubes in an ancient Damascus sabre. *Nature*, 444, 7117, 286-.

- Richards G, 2005. The therapeutic challenge of Gram-negative sepsis: Prolonging the lifespan of a scarce resource. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 18-22.
- Roco MC, 2007. National nanotechnology initiative-past, present, future. *Handbook on nanoscience, engineering and technology*, 2.
- Rosemary M, MacLaren I, Pradeep T, 2006. Investigations of the antibacterial properties of ciprofloxacin@ SiO<sub>2</sub>. *Langmuir*, 22, 24, 10125-9.
- Rusling JF, Sotzing G, Papadimitrakopoulou F, 2009. Designing nanomaterial-enhanced electrochemical immunosensors for cancer biomarker proteins. *Bioelectrochemistry*, 76, 1-2, 189-94.
- Saleh TA, 2020. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, 101067.
- Sani A, Cao C, Cui D, 2021. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and biophysics reports*, 26, 100991.
- Scholes P, Coombes A, Illum L, Davis S, Watts J, Ustariz C, Vert M, Davies M, 1999. Detection and determination of surface levels of poloxamer and PVA surfactant on biodegradable nanospheres using SSIMS and XPS. *Journal of Controlled Release*, 59, 3, 261-78.
- Shahverdi AR, Fakhimi A, Shahverdi HR, Minaian S, 2007. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 2, 168-71.
- Shaker MA, Shaaban MI, 2017. Formulation of carbapenems loaded gold nanoparticles to combat multi-antibiotic bacterial resistance: In vitro antibacterial study. *International Journal of Pharmaceutics*, 525, 1, 71-84.
- Shi HG, Farber L, Michaels JN, Dickey A, Thompson KC, Shelukar SD, Hurter PN, Reynolds SD, Kaufman MJ, 2003. Characterization of crystalline drug nanoparticles using atomic force microscopy and complementary techniques. *Pharmaceutical research*, 20, 3, 479-84.
- Shiau B-W, Lin C-H, Liao Y-Y, Lee Y-R, Liu S-H, Ding W-C, Lee J-R, 2018. The characteristics and mechanisms of Au nanoparticles processed by functional centrifugal procedures. *J Phys Chem Solids*, 116, 161-7.
- Sumi N, Chitra K, 2019. Fullerene C<sub>60</sub> nanomaterial induced oxidative imbalance in gonads of the freshwater fish, *Anabas testudineus* (Bloch, 1792). *Aquatic Toxicology*, 210, 196-206.
- Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, Sadhu V, 2019. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 100397.
- Tellado JM, Wilson SE, 2005. Empiric treatment of nosocomial intra-abdominal infections: a focus on the carbapenems. *Surgical infections*, 6, 3, 329-43.
- Teppler H, Gesser RM, Friedland IR, Woods GL, Meibohm A, Herman G, Mistry G, Isaacs R, 2004. Safety and tolerability of ertapenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, suppl\_2, ii75-ii81.
- Tian Y, Xue F, Fu Q, Zhou L, Wang C, Gou H, Zhang M, 2018. Structural and physical properties of Ti-doped BiFeO<sub>3</sub> nanoceramics. *Ceramics International*, 44, 4, 4287-91.
- Tom RT, Suryanarayanan V, Reddy PG, Baskaran S, Pradeep T, 2004. Ciprofloxacin-protected gold nanoparticles. *Langmuir*, 20, 5, 1909-14.
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J, 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- Ueda Y, Sunagawa M, 2003. In vitro and in vivo activities of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1 $\beta$ -methylcarbapenems with potent activities against multiresistant gram-positive bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 8, 2471-80.
- Viaene E, Chanteux H, Servais H, Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM, 2002. Comparative stability studies of antipseudomonal  $\beta$ -lactams for potential administration through portable elastomeric pumps (home therapy for cystic fibrosis patients) and motor-operated syringes (intensive care units). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 8, 2327-32.



- Viale P, Giannella M, Tedeschi S, Lewis R, 2015. Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century: a never ending threat for clinicians. *Current opinion in pharmacology*, 24, 30-7.
- Vigderman L, Zubarev ER, 2013. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. *Advanced drug delivery reviews*, 65, 5, 663-76.
- Vyas S, (2002). Khar RK. Targetted and controlled drug delivery novel carrier systems. 1st edn, CBS publishers and distributors.
- Wagner F, Haslbeck S, Stievano L, Calogero S, Pankhurst Q, Martinek K-P, 2000. Before striking gold in gold-ruby glass. *Nature*, 407, 6805, 691-2.
- Weissig V, Pettinger TK, Murdock N, 2014. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomed*, 9, 4357.
- Wender H, Andrezza ML, Correia RR, Teixeira SR, Dupont J, 2011. Synthesis of gold nanoparticles by laser ablation of an Au foil inside and outside ionic liquids. *Nanoscale*, 3, 3, 1240-5.
- Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J, 2015. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release*, 200, 138-57.
- Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, Chan WC, 2016. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature reviews materials*, 1, 5, 1-12.
- Witte RS, Kim K, Agarwal A, Fan W, Kopelman R, Kotov N, Kipke D, O'Donnell M. Enhanced photoacoustic neuroimaging with gold nanorods and PEBBLEs. *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2008: The Ninth Conference on Biomedical Thermoacoustics, Optoacoustics, and Acousto-optics*, 685614.
- Xu X, Yang Y, Wang X, Su X, Liu J, 2019. Low-temperature preparation of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ZrO<sub>2</sub> nanoceramics via pressureless sintering assisted by amorphous powders. *J Alloy Compd*, 783, 806-12.
- Yah CS, 2013. The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomedical Research (0970-938X)*, 24, 3.
- Yan X-W, Joharian M, Naghiloo M, Rasuli R, Hu M-L, Morsali A, 2019. Metal-organic framework derived porous 2D semiconductor C/ZnO nanocomposite with the high electrical conductivity. *Materials Letters*, 252, 325-8.
- Yang X, Lian K, Tan Y, Zhu Y, Liu X, Zeng Y, Yu T, Meng T, Yuan H, Hu F, 2020. Selective uptake of chitosan polymeric micelles by circulating monocytes for enhanced tumor targeting. *Carbohydr Polym*, 229, 115435.
- Yin PT, Shah S, Chhowalla M, Lee K-B, 2015. Design, synthesis, and characterization of graphene-nanoparticle hybrid materials for bioapplications. *Chemical reviews*, 115, 7, 2483-531.
- You C-C, Miranda OR, Gider B, Ghosh PS, Kim I-B, Erdogan B, Krovi SA, Bunz UH, Rotello VM, 2007. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose'sensors. *Nature nanotechnology*, 2, 5, 318-23.
- Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L, Hoban DJ, 2005. Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert review of anti-infective therapy*, 3, 1, 23-39.
- Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA, 2007. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67, 7, 1027-52.
- Zhao P, Li N, Astruc D, 2013. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordin Chem Rev*, 257, 3-4, 638-65.
- Zhong Q, Zhang L, 2019. Nanoparticles fabricated from bulk solid lipids: Preparation, properties, and potential food applications. *Advances in colloid and interface science*, 273, 102033.
- Zur Mühlen A, Zur Mühlen E, Niehus H, Mehnert W, 1996. Atomic force microscopy studies of solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 13, 9, 1411-6.

## **7. EKLER**

### **7.1. EK-A Etik Kurul Raporu**



## 8. TURNİTİN RAPORU

### MEROPENEM İLE KAPLI ALTIN NANOPARTİKÜLLERİN ANTİMİKROBİYAL VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

% <b>15</b>	% <b>14</b>	% <b>3</b>	% <b>4</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>8</b>
<b>2</b>	<b>dergipark.org.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<b>Submitted to Selçuk Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>dspace.yildiz.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>www.dokapsempozyum.org</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>George G Zhanel. "Comparative Review of the Carbapenems", Drugs, 2007</b> Yayın	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>vs1.doczz.fr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

