

**NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI  
VE PATOJEN TANILAMAYA YÖNELİK NANO BOYUTLU  
İMMÜNOSENSÖR TASARIMI**

**Hande YEĞENOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OCAK 2013**

**ANKARA**

Hande YEĞENOĞLU tarafından hazırlanan “NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI VE PATOJEN TANILAMAYA YÖNELİK NANO BOYUTLU İMMÜNOSENSÖR TASARIMI” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Belma ASLIM .....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU .....

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Belma ASLIM .....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ .....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 24 /01/ 2013

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hande YEĞENOĞLU

**NANOPARTİKÜLLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI VE  
PATOJEN TANILAMAYA YÖNELİK NANO BOYUTLU  
İMMÜNOSENSÖR TASARIMI  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hande YEĞENOĞLU**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Ocak 2013**

**ÖZET**

Manyetik özelliğe sahip olan demir-altın yapısında ve farklı şekillere sahip (küre, çubuk, küp) nanopartiküllerin biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca, bu partiküllerden biyo-uyumluluğu en yüksek bulunan avidinli küre partiküllerin patojen algılanmasında kullanılabilmesi için örnek bir immünosensör modeli tasarlanmıştır. Partiküllerin biyo-uyumluluklarının ve biyo-karakterizasyonlarının belirlenebilmesi için yapılmış biyolojik aktivite çalışmalarında; partiküllerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri, sağlıklı hücre hattında sitotoksikite ve bazı kanserli hücre hatlarında antikanserojenik özellikleri, genotoksik etkileri, bakteri yüzeyindeki tutunumları çalışılmıştır. Partiküllerin antioksidan aktiviteleri yüzde DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) giderim ve lipid peroksidasyon inhibisyonuna göre belirlenmiştir. En yüksek DPPH giderimine 5mg/mL'lik konsantrasyondaki avidin bağlı küre partiküllerin sahip olduğu (% 69,1) tespit edilmiştir. Benzer şekilde, lipid peroksidasyon gideriminde de avidin bağlı küre partiküller aynı konsantrasyonda en yüksek aktiviteyi (% 44,8) göstermiştir. Böylece küre partiküllerin kullanımının daha avantajlı olduğu saptanarak izleyen çalışmalarda avidin bağlı küre nanopartiküller kullanılmıştır. Nanopartiküllerin antikanserojenik etkilerinin saptanması amacıyla

kolorektal kanser hücre (CCL-221), serviks kanser hücre (HeLa) ve göğüs kanser hücre (Mcf-7) hatları çalışılmıştır. Sitotoksik etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla da sağlıklı hücre (gingival fibroblast) hattı çalışılmıştır. En yüksek antikanserojenik etki (%34) küre nanopartiküllerin 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonunda gözlenmiştir. Bu partikülün aynı dozdaki sitotoksik etkisi ise gingival fibroblast hücresinde %19 olarak bulunmuştur. Nanopartiküllerin neden olabileceği DNA hasar yüzdesini saptamak amacıyla genotoksisite testi uygulanmıştır. Küre ve avidin bağlı küre şeklindeki nanopartiküllerin değişik konsantrasyonlarıyla (0,005 – 0,1 mg/mL) insan kanından izole edilmiş olan lenfosit hücreleri üzerinde komet testi uygulanmış ve partiküllerin genotoksik etkisi gözlenmemiştir (% 0,66). Tüm çalışmalarda artan nanopartikül konsantrasyonları ile sonuçlar arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiş ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Yapılmış olan tutunum çalışmasında küre nanopartiküllerin *L. monocytogenes* bakterisi yüzeyinde tutunum gösterdikleri tespit edilmiştir ( $2,8 \times 10^7$  cfu/mL kadar canlı bakteriden,  $5,7 \times 10^6$  cfu/mL bakteri tutunmuştur). Biyolojik karakterizasyonu yapılmış olan nanopartiküller ile tasarlanmış olan immüno-sensör modelinde ise *L. monocytogenes*'e partiküller yüksek ve seçici bağlanma göstermiştir ( $4,6 \times 10^7$  cfu/mL kadar canlı bakteriden,  $2,1 \times 10^6$  cfu/mL bakteri tutunmuştur). İmmüno-sensör başarısını doğal bir ortamda test etmek amacıyla süt ortamı seçilmiş ve süt içerisindeki hedef bakteriyi tanılama başarısını ölçmek amacıyla Raman cihazı ile de çalışmalar yapılmıştır. Raman cihazında artan konsantrasyonlarda artan düzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (SERS) sinyalleri elde edilmiştir ve bu sonuçlar tutunma sonuçları ile de uyumlu bulunmuştur.

**Bilim Kodu** : 203.1.023  
**Anahtar Kelimeler** : Nanopartikül, biyolojik aktivite, immüno-sensör, *Listeria monocytogenes*  
**Sayfa Adedi** : 133  
**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Belma ASLIM

**STUDY ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF NANOPARTICLES AND  
IMMUNOSENSOR DESIGN TOWARDS PATHOGEN DETECTION**

**(M. Sc. Thesis)**

**Hande YEĞENOĞLU**

**GAZI UNIVERSITY**

**INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

**January 2013**

**ABSTRACT**

**Biological activities of iron-gold structures having magnetic properties and different shapes (sphere, rod, cube) have been studied. Sphere shaped particles have been observed to have the highest bio-compatibility, and a sample immunosensor model has been designed to use avidin attached sphere particles for pathogen detection. Biologic activity studies have been done to identify bio-compatibility and bio-characterization of the particles, reporting: antimicrobial and anti-oxidant activities, cytotoxicity on healthy cell lines and anti-carcinogen effects on some cancer cell lines, genotoxic effects, attachment capacity to bacterial surfaces have been investigated. Antioxidant effects of the particles have been measured in terms of percent DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) elimination and inhibition of lipid peroxidation. The highest DPPH elimination (69.1 %) has been found with avidin attached sphere particles at 5mg/mL concentration. Similarly, avidin attached sphere particles have shown the highest activity (44.8 %) of lipid peroxidation elimination at the same concentration. Thus, sphere particles has been found to be advantageous and sphere shaped avidin attached nanoparticles have been used in the rest of our studies. With the purpose of determining anti-carcinogen effects of nanoparticles, cell lines of colorectal cancer (CCL-221), cervix cancer (HeLa) and breast cancer (Mcf-7) have been studied. A healthy cell line (gingival**

fibroblast) has been studied for determining cytotoxic effects of the particles. The highest anti-carcinogen effect (34%) has been exhibited by sphere nanoparticles at 0.1mg/mL concentration. The cytotoxic effect of the particle at the same dosage on gingival fibroblast cell has been found out to be 19 percent. A genotoxicity test has been applied for measuring the DNA damage percentage that can be caused by the nanoparticles. Comet test with sphere and avidin attached sphere shaped nanoparticles has been applied on lymphocytes isolated from human blood at varying concentrations (0.005 – 0.1 mg/mL) and no genotoxic effect has been observed (0.66%). In all studies, whether a correlation exists between the measured results and the increasing nanoparticle concentrations, and the confidence level of results have been found to be significant ( $p < 0.01$ ). In the conducted attachment studies, it has been observed that sphere shaped nanoparticles have been attached successfully on the *L. monocytogenes* target bacteria ( $5.7 \times 10^6$  cfu/mL bacteria out of  $2.8 \times 10^7$  cfu/mL live bacteria). In the immunosensor model designed with biologically characterized nanoparticles high and selective attachment to *L. monocytogenes* has been observed ( $4.6 \times 10^7$  cfu/mL out of  $2.1 \times 10^6$  cfu/mL bacteria). In order to determine immunosensor success in a natural environment milk medium has been chosen and studies have been made with Raman device to determine detection success on target bacteria in milk. Using the Raman device intensified Raman scattering (SERS) stronger signals have been obtained with increasing concentrations and these measurements have been found out to be in accordance with the attachment results.

**Science Code** : 203.1.023

**Key Words** : Nanoparticles, biological activity, immunosensor, *Listeria monocytogenes*

**Page Count** : 133

**Adviser** : Prof. Dr. Belma ASLIM

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, yüksek lisans tezimi planlayan, tecrübelerini benimle paylaşıp, tezimin her aşamasında yanımda olan Sayın Hocam Prof. Dr. Belma ASLİM'a, deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarından ve deneyimlerimden faydalandığım, çalışmalarda kullanılmış olan nanopartiküllerin elde edilmesinde desteğini benden hiç esirgemeyen değerli Hocam Doç. Dr. Uğur TAMER'e, elektron mikroskobu görüntülerinin elde edilmesinde ve analizinde yardımlarından faydalandığım Sayın Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Sayın Doç. Dr. Demet ÇETİN'e, bilimsel destekleriyle beni yüreklendiren Sayın Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a, her türlü destek ve dostluklarından dolayı tüm biyoteknoloji laboratuvarında bulunan arkadaşlarıma ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, analitik kimya laboratuvarındaki arkadaşlarıma, Araş. Gör. Hilal TORUL, ve Adem ZENGİN'e, yardımlarından faydalandığım Doç. Dr. Ahmet COŞAR'a ve beni her konuda sonuna kadar destekleyen çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez kapsamında yapılmış olan çalışmalar, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 46/2010-02 kodlu projesiyle desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Nanopartiküller .....	4
2.2. Nanopartiküllerin Sensör Üretiminde Kullanımı .....	4
2.2.1. İmmünoensörler .....	8
2.3. Nanopartiküller ile Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları .....	10
2.3.1. Antioksidan aktivite .....	11
2.3.2. Antikanserojenik ve sitotoksik aktivite .....	13
2.3.3. Genotoksik aktivite .....	14
2.3.4. Antimikrobiyal aktivite .....	15
2.4. Patojen Mikroorganizmalar .....	15
2.4.1. Patojen mikroorganizmaların bulaşma yolları .....	16
2.4.2. Patojen mikroorganizmaların enfeksiyon yolları .....	17

	<b>Sayfa</b>
2.4.3. Yapılan çalışmalarda hedeflenen patojen bakteri: <i>L. monocytogenes</i> .....	19
2.4.4. Yapılan çalışmalarda kullanılan diğer bakteriler ve genel özellikleri .....	21
2.5. Manyetik Nanopartiküller ile Patojen Algılayabilen İmmüno-sensörler ve Tasarımı .....	23
2.5.1. Manyetik nanopartiküller .....	24
2.5.2. Çekirdek-kabuk bazlı nanosensörler .....	26
2.5.3. Bakteri tayini için immüno-sensör modelinin tasarlanması .....	26
2.5.4. İmmüno-lojik tanı-lama .....	29
2.6. Nanosensörlerle Patojen Algılanmasını Test Etmek Amaçlı Kullanılan Yöntemler .....	38
2.6.1. Biyoanaliz çalışmalarında teşhis edilecek örneğin hazırlanması .....	39
2.6.2. İmmün analiz yöntemleri .....	40
2.6.3. Raman spektroskopisi tekniği .....	44
2.6.4. Floresan tanı-lama yöntemi .....	45
3. MATERYAL VE METOT .....	46
3.1. Materyal .....	46
3.1.1. Çalışmada kullanılan nanopartiküller .....	46
3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler .....	47
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri .....	47
3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları .....	50
3.1.5. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması .....	50
3.2. Metot .....	51

	<b>Sayfa</b>
3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları .....	51
3.2.2. Nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi .....	51
3.2.3. Nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ....	52
3.2.4. Nanopartiküllerin sitotoksik ve antikanserojenik etkilerinin belirlenmesi .....	54
3.2.5. Nanopartiküllerin genotoksik etkisinin belirlenmesi .....	55
3.2.6. Nanopartiküllerin sensör için fonksiyonlandırılma işlemleri ..	57
3.2.7. Bakterilerin nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi .....	58
3.2.8. Raman çalışmaları .....	61
3.2.9. SEM ve TEM analizleri ile nano yüzeylerde bakteri bağlanma tespiti .....	64
3.2.10. İstatistiksel analizler .....	65
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	66
4.1. Çalışılan Mikroorganizmaların Saflık Kontrolleri .....	66
4.2. Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	67
4.3. Nanopartiküllerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	69
4.3.1. Nanopartiküllerin DPPH giderim aktivitesi .....	69
4.3.2. Plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu .....	72
4.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik ve Antikanserojenik Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	74
4.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi .....	79
4.6. Bakterilerin Nano Yüzeylere Tutunma Miktarlarının Belirlenmesi .	81
4.6.1. Yarışmalı ortamlarda bakterilerin nano yüzeylerde tutunma miktarlarının belirlenmesi .....	86

	<b>Sayfa</b>
4.6.2. Yarışmalı ortamlarda bakterilerin nanoyüzeylerde tutunma miktarlarının belirlenmesi .....	86
4.7. Raman Çalışmaları .....	90
4.8. SEM ve TEM Analiz Görüntüleri .....	95
4.8.1. SEM Görüntüleri .....	95
4.8.2. TEM Görüntüleri .....	100
5. TARTIŞMA .....	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	114
7. KAYNAKLAR .....	116
EKLER .....	130
EK-1 Gazi Üniversitesi klinik araştırmalar kurulu değerlendirme formu ....	131
ÖZGEÇMİŞ.....	133

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Nutrient sıvı besi yeri içeriği .....	47
Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin bazı bakteri türlerinde antimikrobiyal aktiviteleri .....	68
Çizelge 4.2. Değişen konsantrasyonlarda, farklı şekillere sahip manyetik, Fe-Au nanopartiküllerin ve bazı sentetik antioksidanların % DPPH giderim aktiviteleri .....	71
Çizelge 4.3. Değişen konsantrasyonlarda, farklı şekillere sahip, manyetik Fe-Au nanopartiküllerin % plazma lipid peroksidasyon giderimleri .....	73
Çizelge 4.4. Değişen konsantrasyonlarda küre ve avidinli küre formundaki manyetik Fe-Au nanopartiküllerin bazı hücre hatlarında meydana getirdikleri antikanserojenik ve sitotoksik etkiler .....	75
Çizelge 4.5. Değişen konsantrasyonlarda küre ve avidinli küre formundaki manyetik Fe-Au nanopartiküllerin insan lenfosit hücrelerinde oluşturdukları genotoksik etkiler .....	80
Çizelge 4.6. Manyetik, Fe-Au yapısındaki küre ve avidinli küre nanopartikül yüzeylerine tek tek <i>L.monocytogenes</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i> bakterilerinin tutunma kapasiteleri ....	83
Çizelge 4.7. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 suşunun, <i>L. monocytogenes</i> 'e özgü spesifik antikor bağlanarak geliştirilmiş manyetik immüno-sensör modelindeki tutunma miktarları .....	85
Çizelge 4.8. <i>L. monocytogenes</i> ile <i>S. aureus</i> bakterilerinin bulunduğu ve <i>L. monocytogenes</i> ile <i>S.typhimurium</i> bakterilerinin bulunduğu yarışmalı ortamlarda manyetik avidin bağlı küre yüzeylerdeki tutunma miktarları .....	87
Çizelge 4.9. Yarışmalı ortamlarda <i>L. monocytogenes</i> 'i tanılamaya yönelik olarak tasarlanmış olan manyetik immüno-sensör modelinde <i>L. monocytogenes</i> 'in tutunma başarısı .....	90
Çizelge 4.10. Tasarlanmış olan immüno-sensör modelinin süt ortamında bakteri yakalama başarısının Raman ve klasik sayım yöntemiyle belirlenmesi ve sonuçlarının karşılaştırılması	94

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Manyetik nanopartiküllerin mıknatıs yardımıyla ayrımı .....	26
Şekil 2.2. Biyofonksiyonel moleküllerin 2 farklı yöntemle bir nanopartiküle bağlanması .....	28
Şekil 2.3. Bir antikor molekülünün yapısı .....	31
Şekil 2.4. Hedefe yönelik hazırlanmış bir immünoşensörle bakteri tanılama ve IMS ayırma yöntemi .....	36
Şekil 2.5. Tipik bir ELISA testinde uygulanan basamaklar .....	43
Şekil 4.1. DTNB'nin $2,2 \times 10^1$ - $10^6$ cfu/mL <i>L. monocytogenes</i> derişimleri arasında gösterdiği simetrik NO <sub>2</sub> gerilme pikleri .....	91
Şekil 4.2. Tasarlanmış olan nano boyutlu immünoşensör modelinde <i>L. monocytogenes</i> bakterilerinin sensöre tutunma başarılarına göre, artan konsantrasyonlarda elde edilen SERS sinyalleriyle oluşturulmuş kalibrasyon grafiğı .....	92

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 2.1. Altın küre nanopartiküllerin ve altın nanoçubukların TEM görüntüleri .....	25
Resim 3.1. CHROMagar Listeria besi yerinde <i>L. monocytogenes</i> kolonileri .	48
Resim 3.2. CHROMagar Salmonella besi yerinde <i>S. typhimurium</i> kolonileri.	49
Resim 4.1. Çalışılmış olan patojen bakterilerin ışık mikroskobunda, 100 X'lik objektifte elde edilmiş görüntüleri .....	66
Resim 4.2. Mcf-7 hücrelerinin nanopartiküller ile muamele edildikten sonraki floresan mikroskopta çift boyama tekniği kullanılarak 40X'lik objektifle elde edilmiş görüntüleri .....	77
Resim 4.3. CCL-221 hücrelerinin nanopartiküller ile muamele edildikten sonraki floresan mikroskopta çift boyama tekniği kullanılarak 40X'lik objektifle elde edilmiş görüntüleri .....	78
Resim 4.4. Nanopartiküllerin izole edilmiş lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genotoksik etki .....	81
Resim 4.5. Manyetik nanopartiküllerin sıvı ortamlarda mıknatıs yardımıyla ayrımı .....	82
Resim 4.6. CHROMagar Listeria besi yerinde <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S. aureus</i> kolonileri .....	89
Resim 4.7. Çalışmada kullanılmış olan bakterilerin SEM görüntüleri .....	96
Resim 4.8. Küre nanopartiküllerin, ortamda tek bir bakteri varlığında ve yarışmalı ortam oluşturulduğunda bakteriler üzerindeki tutunumlarının SEM ile çekilmiş görüntüleri .....	97
Resim 4.9. <i>L. monocytogenes</i> bakterisi yüzeyinde, avidinli nanopartiküllerin tutunum SEM görüntüsü .....	98
Resim 4.10. <i>L. monocytogenes</i> bakterisi ve immüno-sensörlerin SEM görüntüsü .....	99

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.11. Yarışmalı ortamda immünoşensörlerin bakteri yüzeylerine tutunum SEM analiz görüntüleri.....	100
Resim 4.12. TEM’de <i>L. monocytogenes</i> ve <i>S.aureus</i> ile muamele edilmiş olan manyetik Fe-Au yapısındaki küre nanopartiküllerin bakteri yüzeylerindeki tutunumları.....	101
Resim 4.13. TEM’ de <i>L. monocytogenes</i> bakterisi yüzeyinde küre partiküllerin ve immünoşensörlerin tutunumları .....	102
Resim 4.14. TEM’de, yarışmalı ortamda <i>L. monocytogenes</i> bakterisinde immünoşensör tutunumu .....	103



## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
µg/mL	Mikrogram/Mililitre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Devir sayısı
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ATTC</b>	Amerikan Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
<b>Ab</b>	Antikor (Antibody)
<b>Cfu</b>	Koloni Oluşturan Birim (Colony Forming Unit)
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmünosorbent Analiz (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
<b>Ig</b>	İmmüoglobulin
<b>IMS</b>	İmmüno-Manyetik Ayırım (Immuno-Magnetic Separation)
<b>MRI</b>	Manyetik Rezonans Görüntüleme (Magnetic Resonance Imaging)

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
<b>SERS</b>	Yüzeyde Geliştirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy)
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>CHROMagar</b>	Chromogenic Media Agar
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

## 1. GİRİŞ

Nanopartiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler [Hayat, 1989]. Nanometre boyutlarındaki inorganik bileşikler diğer maddelerden daha farklıdır, çünkü elektron tutucu etkileri gibi yapısal boyutlarına özgül özelliklere de sahiptirler. Bu bileşikler “nanopartikül” olarak adlandırılırlar. 1970'lerden beri bilim insanları nanopartikülleri incelemekte ve özelliklerini belirlemeye çalışmaktadırlar [Portakal, 2008].

Fonksiyon verilebilen nano boyutlu yapıları nanopartiküller, nano çubuklar, nano teller, nano gözenekli ve nano boyutlu, çekirdek-kabuk yapıları olarak sınıflandırabiliriz [Asefa ve ark., 2009]. Nano ölçüde materyallerin kimyasal algılamada, biyomedikal çalışmalarında ve biyolojik analizlerde kullanılması verimli görülmektedir [Shimizu ve ark., 2008; Schultes ve ark., 2007]. Büyük miktarda ayarlanabilir boy ve şekil bağımlı kimyasal ve fiziksel özellikleri nanomalzemelerin ümit verici olmasını sağlamaktadır. Nanopartiküller ile oluşturulacak nanosensörler ayrıca istisnai yüzey kimyası, termal dayanıklılık, yüksek yüzey alanı ve çok gözenekli hacimleri sayesinde sensör fabrikasyonu için kullanılabilirler. Ayrıca yeni gelişmelerle yüksek düzeyde tek tip nano boyutlu materyallerin biyo-görüntüleme ve biyo-algılama için altlık olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [Asefa ve ark., 2009].

Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Portakal, 2008). Burada kullanılan nano boyutlu malzemenin manyetik olması spesifik hücrelerin ayırımında, tanınmasında kolaylık sağlayan bir özelliktir. Manyetik partiküller son yıllarda sağlık, biyokimya ve teknoloji alanlarında protein, enzim ve bunun gibi biyoaktif yapıların immobilizasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. Bu gibi tayin ve immobilizasyon

çalışmaları için nano boyutlu sensörler tasarlanabilir. Bu sensörler oldukça kısa sürede hızlı ve güvenilir sonuçlar verebilmektedir.

Nanomalzemelerin kullanım alanlarının önemli bir kısmını da bazı mikroorganizmaların tayin çalışmaları oluşturmaktadır. Çeşitli nano yapılar geliştirilerek, bakteri ile seçici olarak etkileşebilen hızlı ve doğru ölçüm yapmaya olanak sağlayan sensörler bakteri tanımlanması için kullanılabilirler. Biyomoleküllerin tayini tıp, çevre ve gıda analizinde büyük önem taşımaktadır. Antijen-Antikor, Enzim-Substrat gibi biyolojik tanıma mekanizmalarından faydalanarak hedeflenen molekülün saptanması ve miktar tayini çalışmaları sürdürülmektedir. İmmüno-sensör tasarımı antijen-antikor ilişkisine dayanmaktadır. Biyomolekül tayininde hedef molekülün bağlandığı sensör yüzeyine ihtiyaç vardır. Bu nedenle nanopartiküller poliklonal veya monoklonal antikor modifikasyonu ile hedef antijene karşı seçicilik göstererek bağlanabilirler. Bu antikor modifikasyonları sayesinde antikor kaplı nanosensör ile biyolojik hedefin antijenleri birbirlerini tanıyıp bağlanma gerçekleştirirler. Böylece ortamdan sadece istenilen hedef organizma ya da molekülün seçilimi sağlanabilir. Bu şekildeki bir sensör modeliyle gıda zehirlenmelerine neden olan patojen mikroorganizmalar, kontamine olmuş gıda ortamlarından hızlı ve güvenilir bir biçimde teşhis edilip ayrımı yapılabilirse gıdalarda tüketim güvenirliliği de arttırılmış olur.

Bu kadar geniş bir kullanım alanına sahip olan nano boyutlu malzemeler biyolojik sistemlerde ilaç ya da herhangi bir savunma mekanizması olarak da kullanılabilir. Ancak, bu tür modellemelerde bu malzemelerin canlı sistemler içerisinde meydana getirebileceği olumlu ve olumsuz biyolojik aktivitelerinin ve biyo-uyumluluklarının test edilmesi oldukça önemlidir. Özellikle biyo-uyumlu malzemeler sağlık alanında birçok tanı ve tedavide sensör veya nano ilaç olarak kullanılabilirler.

Yapılacak olan aktivite çalışmaları ile bu nanomalzemelerin biyoteknolojik sistemlerle uyumluluğunun karakterizasyonu gerçekleştirilecek ve buna bağlı olarak biyolojik uyumlu etkiye sahip nanomalzemelerin kullanım alanları ve amaçları

arttırılabilecektir. Bu nedenle bu çalışmada sensör modeli olarak kullanılacak nanopartiküllerin öncelikle antimikrobiyolojik ve antioksidan aktiviteleri, sitotoksik ve antikanserojenik etkileri, oluşturabileceği DNA hasar miktarının belirlenebilmesi için genotoksisite testleri ve bakteri yüzeyindeki tutunumları gibi biyolojik karakterizasyon çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Daha sonra bu partiküller kullanılarak *L. monocytogenes*'e karşı geliştirilen bir immünosensör modeli tasarlanmış ve bu immünosensörün seçiciliğinin ortaya konulması planlanmıştır. Bu sensörler insanları ve diğer canlıları tehdit eden hastalıkları engelleyebilecektir.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMASI**

### **2.1. Nanopartiküller**

Boyutları 100 nm ve altında olan tozlar olarak tanımlanan nanopartiküllerin, nanoboyutlu malzemelerin ve dolayısıyla da nanoteknolojinin temelini oluşturduğu söylenebilir [Gürmen ve Ebin, 2008]. Nanomateryaller son yıllarda, farklı yardımcı yapılar, kompozitler ve özellikle çeşitli sensörlerin üretilmesinde başarıyla kullanılmıştır [Asefa ve ark., 2009]. Nanoteknolojinin tıp ve biyoloji ile entegrasyonu moleküler tanı ve tedavi alanlarındaki beklentileride beraberinde getirmiştir. Nanopartiküller immünomanyetik rezonans incelemelerinde, kontrast ajanlarının geliştirilmesinde, ilaç dağıtımında ve salınımında aktarıcılarının yerine kullanılacak ve doku mühendisliğinde yapısal iskeletonun yerini alabilecektir [Sun ve ark., 2002]. Nanopartiküller farklı kimyasal yapıya sahip olan materyallerden üretilebilirler. Bu materyallerden en çok kullanılanlar; metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküllerdir. Morfolojik olarak ise nanopartiküller genellikle küre, silindir, tüp şeklinde olabilmektedirler. Nanopartiküller spesifik uygulamalara uygun yüzey modifikasyonlarının kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için uygun şekilde dizayn edilebilirler [Temur, 2010].

### **2.2. Nanopartiküllerin Sensör Üretiminde Kullanımı**

Nanomateryallerin modifikasyonlarıyla üretilen sensörler; metal, polimer, metal oksit, karbon ve silika nanomalzemelerin çeşitli yapılarında nanopartikülleri, nano telleri, nano gözenekli yapıları ve çekirdek-kabuk yapılarını içermektedir [Asefa ve ark., 2009]. Nanopartiküller kullanılarak hedefe yönelik birçok sensör modeli geliştirilmiştir. Nanopartikül bazlı sensörler, altın, gümüş, demir oksit gibi metal ve metal oksit özelliğinde olabilirler. Bu tür nanopartiküller çok sayıda sensör ve biyo-analitik cihazların üretiminde kullanılmıştır. Bu nanomateryallerde bulunan istisnai optik ve manyetik özelliklerden sensör uygulamalarında yararlanılabilir. Bu nanopartiküller genellikle organik, biyolojik yönden uyumlu, biyolojik hedefe

spesifik kabuklar ile kaplanarak istenilen özgün özelliklere minimum zarar verecek şekilde büyüklük ve hidrodinamik yarı çaptadır. Metal nanopartikül çekirdekleri, silika [Yoon ve ark., 2006; Berry ve Mater, 2005], biyolojik türler (DNA gibi), biyolojik dengeli polimerler (Poliyeten glikol, dekstran gibi) [Lacava, 2001; Prencipe ve ark., 2009] ile kaplanabilmektedir. Ayrıca hedef spesifik biyomoleküller veya floresan/Raman aktif boyalar ile sensörler oluşturulmaktadır. Metal nanopartiküllere bağlanan ligantlar polar veya polar olmayan analitlerin (1-propanol aseton ve sikloheksan) [Kim ve ark., 2005; Arbiol ve ark., 2002] absorpsiyonunda önemli bir rol oynarlar. Biyolojik aktif parçacıklarla fonksiyonel hale getirilen metal nanopartiküller; MRI (manyetik rezonans görüntüleme) ajanları olarak, biyo barkot bazlı DNA analizinde [Georganopoulou ve ark., 2004; Nam ve ark., 2004], hücre/doku görüntülemesi için ve yüzeyde geliştirilmiş Raman spektroskopisinde (SERS) kullanılabilirler [Biju ve ark., 2008]. Örnek olarak tiyol ile fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller renk ölçümünde [Zheng ve He, 2009], jel elektroforezinde [Qin ve Yung, 2007], aglomerasyon [Sato ve ark., 2005], polinükleotid [Elghanian ve ark., 1997] ve DNA belirleme analizörlerinde [Cerruti ve ark., 2006] başarıyla kullanılmıştır.

Doğal iletken özellikleri ve gözenekli yapıları olan birçok polimer [Debarnot ve Epailard, 2003; Kamloth, 2002], metalik iyonlarla ve nanomateryaller ile sabitlenip algılama uygulamalarında kullanılarak özelliklerinde gelişmeler sağlanabilir. Birçok nanopartikül sensör olarak kullanılacak kadar dayanıklı değildir ve polimerik bir matriks veya membran ile sabitlenmesi gerekir. Polimerler bir yandan nanopartiküllerin bir araya toplanmasını engelleyerek çevrelerine olan duyarlılıklarını arttırabilirken, diğer yandan da polimer içinde nanopartiküllerin bulunması polimerin veya kompozit yapısının iletkenliğini arttırabilir. Polimerin morfolojisini yönetmekteki esneklik nano kompozitlere ek bir avantaj sağlayarak kemosensör ve biyosensörlerin üretilmesini kolaylaştırmaktadır. Örnek olarak Pt, Pd, Au, metal oksit nanopartikülleri ve karbon nano tüpleri polimerik matrisler içine kapatarak karbonmonoksit, azotdioksit, amonyak gibi çeşitli gazların tespitini sağlayan hassas sensörler üretilmiştir [Xing ve ark., 2006; Forzani ve ark., 2007].

Nano boyutlu kabuk malzemeler çok ilginç elektronik, optik, manyetik, yapısal ve kimyasal özellikler gösterir. Bu özellikler yüksek hedef özel uyarlanabilirliği olan biyo-görüntü, biyo-sensör ve biyo-diagnostik uygulamalar için uygundur [Asefa ve ark., 2009]. Örnek olarak, nano boyutlu çinko oksit (ZnO) filmleri içinde altın nanopartiküllerinin bulunması malzemenin bütan gazını tespit etme yeteneğini arttırmıştır [Socol ve ark., 2007]. Bakır nanopartiküllerinin metal oksitler içine gömülmesi ile oda sıcaklığında hidrojen sülfid tespiti için hassas kimyasal sensörler üretilmiştir [Niranjan ve ark., 2002]. Bir diğer çalışmada ise soy metalleri ve metal iyonlarını metal oksitler içine yerleştirerek yüksek hassasiyette metal oksit sensörler elde edilmiştir. Yakın zamanda yeni bir kolorimetrik kemosensör paladyum komplekslerini silika içine yerleştirerek çok yanıcı olan etilen gazını algılamak için sensörler üretilmiştir. Bu sensörlerin boru hatlarında etilen kaçaklarını algılamada ve meyvelerin olgunlaşmasının izlenmesinde büyük potansiyeli vardır [Asefa ve ark., 2009].

Ayrıca daha büyük hassasiyet, hızlı cevap süresi ve seçiciliği olan kimyasal sensörlerin çekirdek-kabuk nanopartiküllerle oluşturulabileceği gösterilmiştir. Örneğin kompozit çekirdek-kabuk nanoküreler geliştirilerek çok düşük yoğunlukta çoklu-buhar algılaması yapılmıştır [Si ve ark., 2006]. Çekirdek ve kabuk toksik gaz buharlarının özelliklerine bağlı olarak üretilebilir [Asefa ve ark., 2009]. Metal oksit nanomateryallerin içine Pd ve Pt yerleştirilmesi metaloksitin yarı iletkenlik ve elektronik özellikleri üzerinde çok etkilidir [Erades ve ark., 2006]. Örnek olarak bakır ve bakır oksit gibi maddelerin içerisine çinko oksit (ZnO) yerleştirilmesi onun karbonmonoksit gibi kirletici gazların algılama özelliğini ve elektrik iletkenliğini artırır [Choi ve Choi, 2000]. Bir diğer çalışmada Zeng ve arkadaşları Zn-ZnO kompozit çekirdek-kabuk nano küreleri bakır ile doldurarak çok düşük yoğunlukta CO algılayabilen çok hassas Cu-Zn/ZnO çekirdek-kabuk nanokompozitler üretmişlerdir [Zeng ve ark., 2009].

Nanoteller, nano ölçekte algılayıcıların geliştirilmesi için yararlı olduğu ispatlanan kritik öneme sahip bir malzeme sınıfıdır. Yakın zamandaki gelişmelerde nanotellerin



metal, metaloksit, polimerler, vb. ile sentezlenmesi başarılı ve bu ortaya çıkan alanda derinlik ve genişlik sağlanmıştır. Nanoteller  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Cl}_2$  gibi toksik gazların varlığının algılanmasında kullanılmış ve nem sensörü, hidrokarbonlar, etanol, ozon,  $\text{H}_2$  için mükemmel algılama yeteneği göstermiştir. Nanotellerin yüksek alan-hacim oranı ve özgün elektronik ve optik özelliklerinin yol açtığı nanotel yüzeyindeki yüksek reaktiviteleri onların ilgi merkezi olmalarına neden olmuştur. Çeşitli hedef gaz bileşiklerine geniş bir sıcaklık aralığında yüksek hassasiyet ve seçicilik gösterirler [Asefa ve ark., 2009].

Kuantum nokta denilen yarı iletken nano kristaller 10 nm çapından küçük olmaktadır. Çeşitli boyutlardaki kuantum noktalar fizyolojik süreçleri daha az üst üste gelen parlaklık ve daha doğru şekilde görüntüleme için kullanılabilirler [Asefa ve ark., 2009]. Ligant pasifleştirilmiş kuantum noktaların kullanılması çok sayıda biyo-uyumlu, sitotoksik olmayan ve uzun ömürlü lüminant (aydınlatıcı) biyo-görüntüleme ve biyo-etiketleme cihazının ortaya çıkmasını sağlamıştır [Ma ve ark., 2007; Zaman ve ark., 2009]. Antikor veya DNA pasifleştirilmiş kuantum noktalar kullanılarak insan servik kanser (HeLa) hücrelerini [Goto ve ark., 2008] ve glioma hücrelerini [Chen ve ark., 2008] izlemek mümkündür. Örnek olarak triostilfosfin oksit (TOPO)- kaplanmış  $\text{ZnS}$ - kabuk  $\text{CdSe}$ - çekirdek kuantum noktalar Polimetakrilat polioksikarbonil 4-nitrofenol ve poli (L-laktik asit) HeLa hücrelerinin floresans görüntülemesinde kullanılmıştır [Goto ve ark., 2008]. Birçok çalışmada fibroblast hücrelere karşı hedef spesifik biyokonjugat bağların ve kuantum nokta yüzey kaplama boyutlarının akıllıca seçilmesiyle yüksek spesifikliğe ulaşılmıştır [Green, 2004]. Kuantum noktalar optik biyosensörler olarak da kullanışlıdır. Örnek olarak  $\text{CdTe}$  kuantum noktalar ve glikoz oksidaz kombinasyonları ile hidrojen peroksit sensörleri sentezlenmiştir [Yuan ve ark., 2009]. Tabaka tabaka kuantum noktaların birleştirilmesi tekniği ile etkin bir kan şekeri sensörü geliştirilmiştir [Li ve ark., 2006].

### 2.2.1. İmmünoensörler

Bazı nanomateryaller ile çeşitli ligantlar ve biyoaktif gruplarla spesifik analitler için seçici sensörler üretilebilir. İki veya daha fazla çekirdek-kabuk ve diğer kompozit yapıları nano yapıların kombinasyonu ile avantajlı hassasiyeti arttıran ve yanıt süresini azaltan sensör özellikleri elde edilebilir [Asefa ve ark., 2009]. Son yıllarda besinlerdeki bakteri patojenlerinin teşhisi için, yüksek derecede hassasiyete sahip mikroarray tabanlı sensörlerin kullanımı süreyi oldukça kısaltmaktadır. Biyosensörlerin düşük maliyetlerinin yanı sıra, çoklu çalışma olanağını da sağlaması bir diğer avantajdır [Patel, 2006].

Bakterilerin hızlı bir şekilde tanınması, tıbbi teşhis konulmasında, gıda güvenliğinde, ilaç üretiminde ve terörizm ile mücadelede önemli bir role sahiptir [Naja ve ark., 2007]. Besinlerdeki patojen mikroorganizmaların belirlenmesi gıda matrisinin karmaşıklığı ve az sayıda patojenin gıda örneğinde bulunması nedeniyle zordur [Sandhy ve ark., 2008]. Bu nedenle patojenlerin ve diğer biyomoleküllerin bağlanması için yeni analitik yöntemler gerekmektedir. İmmüno-manyetik ayırım (IMS) bu zorlukları aşan yöntem olarak görülebilir [Dudak ve Boyacı, 2008]. IMS, mikrop tanımlanması ve sayılması için son on yıl içinde geliştirilmiştir. Antikor kaplanmış paramanyetik kürecikler veya nanopartiküller, hücrelerin yüzeylerinde bulunan antijenlere bağlanırlar ve böylece hücreleri yakalayarak küreciklere bağlanan hücrelerin yoğunluğunu arttırırlar. IMS çok sayıda bakteriyal örnekler uygulanmıştır [Dudak ve Boyacı, 2008; Hibi ve ark., 2007]. Son yıllarda nano boyutlu malzemelerin ve nanoteknolojinin hızla gelişmesi ile biyoteknoloji ve patojen tanınması alanlarında manyetik nanopartiküller çok ilgi çekmektedirler. Manyetik özellikleri, düşük toksik etkileri ve biyo uyumlulukları nedeniyle manyetik nanopartiküller teşhis, ayrıştırma, ve tanı koyma alanları için manyetik rezonans görüntüleme uygulamalarında kullanılmışlardır [Güven ve ark., 2010].

Patojenik mikroorganizmaların sayısı çok fazladır ve bunların içinde algılanması gereken, farklı ortamlarda bulunan birkaç organizma olabilir. Bakteriyolojik

testlerde geleneksel mikrobiyoloji çok zaman alan bir prosedürdür. Organizmalar izole edilmeli ve çoğaltılmalıdır, ve genellikle tanımlama için bir seri biyokimyasal test tamamlanmalıdır [Heldrich, 1990]. Bu nedenle birkaç yeni yöntem, özellikle biyosensörleri kullanarak geliştirilmekte ve böylece hızlı, hassas, ve seçici bir şekilde patojenik mikroorganizmalar algılanabilmekte ve bunlara maruz kalabilecek kitlelere etkin tedavi sağlanabilmektedir [Love ve Jones, 2008].

İmmüno-sensörlerin kullanım potansiyellerinin nedeni; genel olarak kullanılabilirliği, antijen-antikor reaksiyonunun spesifik ve seçici olması ve yöntemin yüksek hassasiyetidir. Antijen-antikor kompleksi her tür algılayıcıda kullanılabilir. Antijen-antikor bağlanması ile açığa çıkan fizikokimyasal değişim elektrokimyasal olarak algılanabilen bir sinyal üretmez. Bu nedenle enzimler, floresan bileşikler, elektrokimyasal aktif altlıklar, veya avidin-biotin kompleksleri antijeni ya da antikoru etiketleyerek biyolojik tanıma olayını algılamak için kullanılırlar. Kullanılan antikorlar antijenin üstündeki epitopa seçicidir. Eğer bu epitop yaşayan canlı veya ölü bir mikroorganizmada bulunuyorsa antikor antijeni yakalayacak ve pozitif bir sinyal kaydedecektir. Konakta hastalığa neden olabilmesi için bakteriyel gıda patojenin tüketilmesi gerektiği durumda canlı olmayan hücrelerden pozitif sinyal üretilmesi yanlış bir alarm verilmesine neden olabilir [Alocilja ve Tahir, 2008].

Biyosensörler seçicilikleri, hassasiyetleri (tanıma elemanının seçimine bağlıdır) ve kısa sürede sonuç vermeleri nedenleriyle patojenik mikroorganizmaların algılanmasında ve tanımlanmasında özellikle ilgi çekmektedirler. Biyosensörler karmaşık örnek matrislerinin analizine de izin verirler [Hobson ve ark., 1996, Ivnitcki ve ark., 1999]. Korunma sağlamak amacıyla kısa sürede patojenlerin varlığı konusunda uyarı veren biyosensörler çevresel örneklerin analizinde de kullanılırlar. Bunun yarattığı ek bir problem ise örnek içinde diğer mikroorganizmaların da bulunabilmesidir. Dedektör üstünde çalışılan patojeni arka plandakilerden ayırabilmelidir ve bunun birkaç yolu vardır. Bu yöntemler arasında şunlar bulunmaktadır. a) Partiküllerin sayısındaki artışın belirlenmesi b) Biyolojik

partiküllerin sayısındaki artışın tespit edilmesi c) Patojen biyolojik ajanların algılanması veya d) Biyolojik ajanların spesifik olarak tanımlanması. Spesifik tanıma hedef analitin (ör; protein) tanımlama elemanı ile (ör; antikor) etkileşimine bağlıdır. Biyosensörlerin bir patojenik mikroorganizmayı hassas, spesifik olarak tanıması için kullanımı hala aşılması gereken önemli bir engeldir, ve başarıyı belirleyen algılama elemanının (spesifik ligant) doğası ve hedef analitin seçimidir [Labadie ve Desnier, 1992].

### 2.3. Nanopartiküller ile Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Biyolojik uyum için; malzemenin kimyasal yapısı, restorasyonun tasarımı, elde edilme yöntemleri, mekanik özellikleri, doku ile temasının şekli ve dokunun özellikleri gibi bir çok faktörün bir arada uyum içerisinde olması gereklidir. Biyolojik uyum özelliği olmayan materyaller doku reaksiyonuna yol açmaktadırlar [Hanks ve ark., 1996]. *In-vitro* koşullarda kullanılması düşünülen materyallerin vücut dokuları üzerindeki toksik etkilerinin değerlendirilmesi ve oluşturabilecekleri biyolojik reaksiyonların taklit ve tahmin edilebilmesi amacı ile *in-vitro* biyoyumluluk testleri geliştirilmiştir [Hanks ve ark., 1996; Smith ve Williams, 2001]. *In-vitro* biyoyumluluk testlerinde; vücut dokularının üzerine veya içerisine yerleştirilen malzemelere karşı gelişecek olan biyolojik reaksiyonların test ortamında oluşturulması amaçlanmaktadır [Hanks ve ark., 1996].

Ayrıca nanopartikül matrislerine çözülmüş ilaç tutuklaması, kapsüllenmesi ya da eklenmesi yapılabilmektedir. Hazırlanış metoduna göre nanopartiküller, nanoküreler ve nanokapsüller elde edilebilmektedir. Nanokapsüllerde tek bir polimer membran ile içerisindeki boşlukta ilacı hapsedebilen sistemler oluşturulabilmektedir [Mohanraj ve Chen, 2006]. Böyle bir ilaç tutuklamasının yapılacağı sistemde kullanılacak partiküllerin canlı sistemler üzerinde meydana getirebileceği etkilerinin ayrıntılı olarak araştırılması bu nano yapıların kullanımının ne kadar güvenilir olduğunun tespit edilebilmesi için oldukça önemlidir. Bu nedenle kullanılacak nano yapılarda bazı biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması avantaj sağlayacaktır.

### 2.3.1. Antioksidan aktivite

Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarında en önemli ve temel çalışmalardan birisi de çeşitli materyal ve bileşiklerin antioksidan potansiyelleridir. Antioksidanlar, serbest radikalleri giderici etkileri sayesinde biyolojik süreçlerde biyosistemler için oldukça önemli bir role sahiptir. Antioksidan aktivite çalışmaları canlı sistemler içerisinde biyomoleküllerin araştırılacak materyaller ile aralarındaki reaksiyonun gözlenmesine izin verir [Saikia ve ark., 2010].

Vücudumuzdaki biyomoleküller her gün oksijen gerektiren birçok reaksiyona uğrarlar. Bu reaksiyonların kaçınılmaz ürünü olarak serbest radikaller ortaya çıkar. Çok reaktif moleküller olan serbest radikaller hücre hasarlarına neden olurlar. Oksidasyon sonucu moleküllerin eşlenmemiş elektronlara bölünmesiyle serbest radikaller oluşur. Oksijen yaşam için metabolizma işlemlerinde gereklidir. Bu metabolizma işlemleri oksidasyon ve redüksiyon (Moleküle elektronlar ekleyen kimyasal reaksiyon) kimyasal reaksiyonlarına bağlıdır. Oksijenin zararlı etkilerinin gözlenmesine bir örnek dilimlenmiş bir elmanın havayla temas edince kahverengiye dönmesidir. Çevremizde bulunan oksitleyici ajanlar serbest radikallerle birleşip hücrelerimize zarar vererek yaşlanmaya ve kronik hastalıklara neden olurlar. Antioksidanlar serbest radikalleri zarar vermeden durdurabilir ve oksidatif reaksiyonları engelleyebilirler [Milbury ve Richer, 2007].

Antioksidanların tek rolünün serbest radikalleri etkisiz hale getirmek olduğu sanılmaktadır. Gerçekte antioksidanlar ve radikaller yaşam biyokimyasının çoğunu etkilerler. Antioksidanlar biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin düzeyini regüle ederler. Böylece zarar vermeden yararlı biyolojik fonksiyonları yerine getirmeleri sağlanır. Kaçınılmaz olarak vücuttaki kritik moleküllere zarar verilir ve böylece hücre yaşamını sürdürmek için onarım sistemlerine gerek duyar [Halliwell ve Gutteride, 2006].

### Serbest radikaller

Biyolojik sistemlerin kendi içlerinde serbest radikal oluşumuna neden olan faktörler bulunmaktadır. Ancak buldukları çevrede maruz kaldıkları kimyasal maddeler ve radyasyon gibi diğer faktörlerde bulunur. Bir biyolojik sistem içerisinde sürekli olarak reaktif türlerin oluşmasına neden olan faktörlerin sistem üzerinde güçlü etkileri olabilir [Ozdoğan, 2007].

Moleküler oksijen, temel hücre fonksiyonlarında önemli görevler alan birincil biyolojik elektron alıcısıdır. Ancak oksijenin zararlı özellikleri süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit, ve hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) elde olmayan nedenlerle oluşmasından kaynaklanır. Eğer azaltılmazsa ROS aerobik hücrelerin önemli bir tehlike kaynağı olabilir ya da ölümlerine neden olabilir [Scandalios, 2005]. Serbest radikallerin oluşumunun önlenmesinden ve gideriminden antioksidan maddeler sorumludur.

### Antioksidatif etkinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Oksidasyona neden olan reaksiyonların önlenmesinde antioksidanlar kullanılmaktadır. Bazı bileşikler antioksidatif özelliğe sahiptir. Bir bileşiğin antioksidatif etkisinin belirlenebilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları DPPH giderim aktivitesinin hesaplanması ve bileşiğin lipid peroksidasyonunu inhibe etme derecesinin saptanmasıdır.

#### *DPPH giderim aktivitesi*

DPPH serbest kök bağlama metodu, lipid oksidasyonunu önleyen antioksidanlar için kabul edilmiş genel bir mekanizmadır. Diğer metodlarla karşılaştırıldığı zaman; bu metod, antioksidan aktivitelerin nisbi olarak kısa sürede belirlenmesini sağlamaktadır. Antioksidanların DPPH serbest kökünü bağlama aktivitelerinin,

hidrojen (H) iyonu verme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [Turan, 2005].

DPPH giderim aktivitesi metodunda, test edilen örneklerin H iyonu verme kapasiteleri, stabil bir serbest kök olan DPPH maddesi kullanılarak araştırılmaktadır. H iyonu verme yatkınlığı olan bir bileşiğin varlığında DPPH kökü indirgenir ve stabil serbest kök formu oluşur [El-Nehir ve Karakaya, 2003]. Çalışmanın esası; test edilen örneğin, ortama verilmiş olan DPPH radikallerini süpürebilme yeteneğine dayanmaktadır.

#### *Plazma lipid peroksidasyon giderim yöntemi*

Antiosidanlar lipid peroksidasyonunu engellemek veya geciktirme kabiliyetine sahiptirler [Kıralan ve ark., 2004]. Birçok çalışmada, özgün polifenollerin alkoksi kökleri ve hidroksil köklerini tuttuğu, lipid peroksil köklerini indirgediği ve lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilmektedir [Turan, 2005]. Bu çalışmada örneklerin lipid peroksidasyon düzeyini düşürme başarıları spektrofotometrik yöntemle belirlenmektedir.

#### **2.3.2. Antikanserojenik ve sitotoksik aktivite**

Sitotoksik maddeler toksik şekilde hücreyi etkileyen, hücrenin fonksiyonunu bozan ya da onları öldüren maddelerdir. Antikanserojenik maddeler ise kanserli hücreleri belirli oranlarda inhibe edebilirler. Kullanılan nanopartiküllerin kullanım alanlarıyla da ilişkili olarak çeşitli kanserli ve sağlıklı hücre hatları üzerinde etkilerinin incelenmesi bu partiküllerin kullanımında avantaj sağlayacaktır. Belirli amaçlar için sentezlenmiş, tasarlanmış nano büyüklükteki birçok partikülün antikanserojenik ve sitotoksik etkileri çalışılmış ve günümüzde de hala yoğun olarak çalışmalarına devam edilmektedir.

Sitotoksisite testleri, test malzemesinin uygun hücre kültürlerindeki hücre büyüme oranı ve morfolojik özellikleri üzerine etkisinin negatif ve pozitif kontrol grupları kullanılarak değerlendirildiği bir yöntemdir [ISO 1999; ISO 1997]. Sitotoksisite testleri genellikle malzemelerin, hücre membran bütünlüğü, hücre sayısı veya büyümesi, biyosentez veya enzim aktivitesi ve hücre genetik malzemesi üzerindeki etkilerini ölçer [Tunçel, 2005]. *In-vitro* sitotoksisite testleri, diğer metabolik olaylardan farklı olarak hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi, çok sayıda örneğin kısa zamanda ve ekonomik olarak değerlendirilip kantitatif sonuçlara ulaşılabilmesi ve toksik maddelerin daha hassas değerlendirilmesi gibi avantajlara sahiptir [Schmalz, 1997].

*In-vitro* sitotoksisite testlerinin avantajları olduğu gibi bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar; her test için bir tür hücre kullanılması, kültür hücrelerinin konak hücrelerinden farklı olması, kültür ortamında enflamatuar ve diğer doku koruyucu mekanizmaların olmamasıdır [Schmalz, 1997]. Tüm sitotoksisite testlerinde, test sisteminin non-toksik, steril ve tekrarlanabilir olması da önem taşımaktadır [Tunçel, 2005].

### 2.3.3. Genotoksik aktivite

Tasarlanmış nanopartiküllerin ticari üretiminde gittikçe artan seviyelerde bir seri standart testlere ve biyolojik sistemlerde bu tasarlanmış partiküllerin toksisite potansiyellerini değerlendirme protokollerine önemle ihtiyaç duyulmaktadır [Barnes ve ark., 2008]. Bu nedenle partiküllerin sitotoksik etkilerinin yanı sıra genotoksik etkilerinin de araştırılması oldukça önemlidir.

Nanomateriyal mühendisliğinin giderek artan hakimiyetine rağmen bu materyallerin çevre sağlığı ve güvenliği üzerindeki potansiyel etkileri çok az bilinmektedir. Nanotoksikoloji alanı bu eksikliği gidermek ve sonuç elde etmek için araştırma çalışmalarından oluşmuştur. Nanotoksikoloji, nanomateriyaller ve onların *in-vitro* ve *in-vivo* fonksiyonlarının etkilerini tespit için birçok analitik metota dayanır.



Genotoksik etkinin belirlenmesinde DNA hasar tespit çalışmaları en sık başvurulan yöntemlerden birisidir. DNA hasarını belirlemek için en sık ve ortak kullanılan metot ise Komet analiz tekniğidir. Bu teknik tek hücre jel elektroforezi olarak da adlandırılmaktadır [Marquis ve ark., 2009]. Komet analiz tekniği ilk olarak Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte hücreler agaroz jel içerisine gömülme ve sonrasında elektroforez (ayırım için) ve etidyum bromid (sayım için) ile etiketleme yoluyla DNA denatürasyonu ve hücrelerin parçalanması gözlemlenmektedir [Singh ve ark., 1988]. Hücrede oluşan kuyruğun miktarı ya da elektroforez sonrası oluşan DNA fragmentlerinin sürüntüsü DNA hasarının göstergesidir. Birçok çalışma hücrenin nanopartikül ile muamele edildikten sonra DNA hasarının belirlenmesi için Komet tekniğini kullanmıştır [Jalcobsen ve ark., 2008; Barnes ve ark., 2008; Karlsson ve ark., 2008; Mroz ve ark., 2007; Colognato ve ark., 2008; Kisin ve ark., 2007].

#### **2.3.4. Antimikrobiyal aktivite**

Birçok kullanım alanına sahip olan nanopartiküller bazı mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki yaratmaktadır. Çalışılacak olan nanopartikülün bir mikroorganizma üzerindeki etkileri test edilebilmektedir. Bu durum kullanılacak olan nanopartikülün amacına yönelik olarak avantaj ve dezavantaj sağlayabilmektedir.

#### **2.4. Patojen Mikroorganizmalar**

Bakteriler dünyamızda yaşayan en eski organizmalar olup ekosistemin korunmasında temel bir rol oynarlar. İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde büyük miktarda bakteriler bulunur ve aralarında simbiyotik bir ilişki vardır. Bakterilerin yalnızca küçük bir kısmı zararlıdır ve hastalıklara neden olabilirler. Dünyamızda yılda ortalama 1-2 milyar insanın bakterilerce enfekte edildiği ve bunun % 70'inin gıdalardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir [Allos ve ark., 2004]. Uzun yıllar boyunca patojenliğin ve virulansın kesin tanımlamaları üzerinde çok miktarda tartışma yapılmıştır. Bu iki kelime sıklıkla birbirinin yerine kullanılmaktadır, fakat

patojenlik bir organizmanın hastalığa neden olabilme özelliği ve virulans organizmanın neden olduğu hastalığın göreceli olarak şiddetidir [Watson ve Brandly, 1949]. Artan şekilde görülmektedir ki virulans çok karmaşıktır ve konak ile mikroorganizma arasındaki etkileşime bağlıdır [Casadevall ve Pirofski, 2001]. Virulansın tanımındaki problemleri de göz önüne alarak virulans faktörlerinin belirlenmesinde zor olmuştur. Virulans faktörleri için öne sürülen iki tanım vardır: 1. Patojenden çıkarıldığı zaman virulansı azaltan ama canlılığı etkilemeyen komponent [Wood ve Davis, 1980]. 2. Bir patojenin hastalığa neden olmasını sağlayan mikrobiyal bir ürün [Smith, 1977].

#### **2.4.1. Patojen mikroorganizmaların bulaşma yolları**

##### Toksinler

Bazı mikroorganizmalar (*Bacillus anthracis*) ürettikleri toksinlerle hastalarda gözlenen klinik semptomlara neden olurlar. Toksinler lipopolisakkarit (endotoksinler) gibi bakterinin bütünsel bir parçası olabilirler ya da dışarı salınan moleküller (egzotoksinler) olabilirler. Toksinler sıklıkla yapıştırıcı üretimi gibi diğer fonksiyonları yerine getirirler [Tuomanen ve Weiss, 1985]. Toksin salgılanması bakteriler tarafından verilen kontrollü bir karşılığın parçası olarak regüle edilebilirler. Lipopolisakkarit (LPS) patojenik Gram negatif hücre duvarlarının içinde bulunur ve hücre öldüğünde ya da parçalandığında (otoliz ya da konağın bağışıklık sistemince) açığa çıkarlar [Love ve Jones, 2008].

##### Yapışma

Bir mikroorganizmanın bulaşma gerçekleştirebilmesinde bir diğer önemli faktör onun konak hücresine ya da bir hücre dışı matrise yapışabilme özelliğidir. Konak hücre reseptörlerine seçici olarak eklentilerin yapılmasında kullanılan makromoleküllere ve yapılarına sıklıkla adhesin denir [Krogh, 1991].

### Konak bağımsıklık sisteminden kaçınma

Bakteriyal patojenlerin yüzey elemanlarının çoğu, konağın bağımsıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olur. Polisakkaritler, proteinler, ve glikoproteinlerin karışımından oluşan kapsüller çeşitli mekanizmalarla bakteri hücrenin yüzeyinde C3 konvertazının toplanmasını inhibe ederek komplement aktivasyonunu engellerler. C3 konvertazının bakteri yüzeyinde toplanmasının önlenmesi fagositozun etkinliğini önler [Taylor ve Roberts, 2005].

### **2.4.2. Patojen mikroorganizmaların enfeksiyon yolları**

Patojenler birçok çeşitli kaynaklar yoluyla bulaşarak sağlık açısından canlı sistemlerde birçok hastalığa neden olabilmektedir. Bunlar doğal enfeksiyonlar, su ve gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve hastane enfeksiyonları olarak sınıflandırılabilir.

#### Doğal enfeksiyonlar

Patojenik bakteriler geniş alana dağılmıştır ve bakteri türlerine göre toprakta, diğer hayvan veya insanlarda, yiyeceklerde, ya da suda bulunabilirler. Bütün bunlar enfeksiyonun potansiyel kaynaklarıdır. Enfeksiyon birkaç değişik yoldan; solunumla, beslenmeyle, deri yoluyla, kontamine kanla ya da bir böcek vektörünün ısırsığıyla olabilir. Enfeksiyonun gerçekleşme yöntemi ilgili organizmaya bağlıdır ve hastalığın tahmini sonuçlarını da etkileyebilir [Mock ve Fouret, 2001]. Dünya çapında önemli olan birkaç hastalık vardır. Ancak bu çalışmada patojenik mikroorganizmaların hızlı ve hassas algılanması üç değişik alanda incelenmiştir: Su ile bulaşan patojenler, gıda ile bulaşan patojenler ve hastane enfeksiyonları [Love ve Jones, 2008].

### Su ve gıdalar

Bakteri, virüs, parazit, prion ve bakteri toksinleri gibi gıdalarla taşınan çok sayıda patojen vardır. Hastalık semptomları genelde hafif veya şiddetli gastrointestinal bulantı, kusma, veya ishaldir, ancak hayatı tehdit eden renal (böbrek), hepatik (karaciğer), ve nörolojik komplikasyonları da içerebilir. Gıdalarla bulaşan patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle “mide üşütmesi” gibi jenerik tanılarla verilir ve hastaların semptomları çok şiddetlenmedikçe tıbbi tedaviye başvurmaması nedeniyle gerçeğinden daha az sayıda rapor edilirler. Hastalık süresi değişmekte olup bakteriyal enfeksiyonlarda kısa, viral veya parazit enfeksiyonlarda kronikleşebilir. Gıdaların bakteriyal kirlenmesinde bilinen faktörler; gıdaların uygunsuz şekilde işlenmesi ve depolanması, yetersiz pişirme ya da ısıtma, çiğ ve pişirilmiş gıdalar veya taze sebzeler arasındaki çapraz kirlenme ve hizmetlilerin temizlik koşullarına uymamalarıdır. Gıdalarla bulaşan hastalıkların ABD’ de yılda 76 milyon hastalığa neden olduğu tahmin edilmektedir [Mead ve ark., 1999]. Gıdalarla sıklıkla bulaşan patojenler *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, mayalar, küfler ve mikotoksinlerdir. Gıda ile bulaşan patojenler bulaşma sıklığında, bulaşıcılıklarında, ve hastalık semptomlarında çok değişiklik gösterirler. Bazıları sadece rahatsızlık verirken bazıları hayati tehlike yaratabilirler [Love ve Jones, 2008].

### Hastane enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonları dünyanın her yerinde gelişmiş ve gelişmemiş ülkelerde görülmekte olup hasta ölümlerindeki en sık görülen nedenlerden biridir [Ponce de Leon, 1991]. Enfeksiyonlar genelde alt solunum yollarında, ameliyat yaralarında ya da boşaltım yolundadır. 2002 Dünya sağlık örgütü raporuna göre en çok enfeksiyon yoğun bakımda, akut ameliyat ve ortopedik bölümlerinde görülmektedir. Hastalar genelde yaş, diğer bir hastalık, ya da kemoterapi gibi bağışıklığı düşüren tedaviler

nedeniyle bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerdir [Geddes ve Ellis, 1985]. 2002 Dünya Sağlık Örgütü (WHO, World Health Organization) raporuna göre gıda ile taşınan patojenlerdeki gibi çeşitli organizmalar enfeksiyona neden olabilir: bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi. Bireyler, insandan insana bulaşma, bakteriler ya da kirlenmiş nesnelere temas ederek enfekte olabilirler. Bakteriyal hastane enfeksiyonlarının çoğunun nedeni *Staphylococcus aureus*, Koagülaz-negatif *Staphylococci*, *Enterococci* veya *Enterobacteriaceae*'dir.

#### **2.4.3. Yapılan çalışmalarda hedeflenen patojen bakteri: *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* kuyruklu yapısından dolayı hareketli olarak nitelendirilen Gram pozitif bir bakteri tipidir. İnsanların %1-10'u *L. monocytogenes* taşıyıcısı olabilir. Bu bakteri türüne bazı balık ve kabuklu deniz ürünleri ve 17 kuş türünde rastlanıldığı gibi hem vahşi hem de evcil olmak üzere en az 37 memeli hayvan türünde de rastlanılmıştır. *L. monocytogenes*, toprak ve diğer çevresel kaynaklarda da bulunabilir. *L. monocytogenes* spor oluşturmeyen bakteriler için, dondurma, kurutma ve ısıtma işlemlerinin yok edici etkilerine karşı oldukça dayanıklı ve dirençlidir. Birçok *L. monocytogenes*, bazı durumlara göre patojenik özellik gösterir [www.food-info.net].

*L. monocytogenes*, insanlarda ve hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli gıda kaynaklı patojenlerdendir. *L. monocytogenes*'in buzdolabı sıcaklıklarında bile çoğalıp gelişebilme yeteneği nedeniyle, özellikle tüketime hazır gıdalarda önemli bir sorun teşkil etmektedir. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdalardan kaynaklanan listeriosis vakalarına oldukça sık rastlanmaktadır [Yavuz ve Korukluoğlu, 2010]. *L. monocytogenes* geniş bir alana yayılmakta ve su, silaj, lağım suyu, mezbaha atıkları, sağlıklı ineklerin sütleri, insan ve hayvan dışkısında olduğu gibi pek çok yerde bulunabilmektedir [Farber ve Peterkin, 1991].

*L. monocytogenes* süt ve süt ürünleri, sığır ve domuz eti ile fermente sucuk gibi et ve et ürünleri, turp, lahana gibi taze ürünler ile deniz ürünlerinden ve gıdaların

hazırladığı ortamlardan izole edilmiştir [Rocourt ve Cossart, 1997; Gudbjonsdottir ve ark., 2004]. Charlton ve arkadaşları 1990 yılında yaptıkları çalışmada süt işleme alanlarından aldıkları örneklerin %12,6'sında (75/597) *Listeria* türlerini izole etmişler ve bunların yarısı *L. monocytogenes* olarak tanımlanmıştır. Çiğ süt, önemli bir *L. monocytogenes* kaynağı olarak bilinmektedir. Bu doğrultuda 1986 yılında Hays ve arkadaşları ise ABD'de inceledikleri 100 kadar çiğ süt örneğinin %12'sinden bu bakteriyi izole etmişlerdir. *Listeria*'nın çevreye yayılması; enfekte hayvandan, toprak ve yeşil yemlerin kontaminasyonuna, buradan da et ve süt hayvanlarına tekrar geçmesi şeklinde bir döngü gösterdiği bildirilmektedir. Böylece kontamine sebze, meyve, süt ve etten insanlara geçiş gerçekleşmektedir [Arda ve ark., 1999; Roche ve ark., 2009]. Listeriozise neden olan vakalar her zaman görülmekle birlikte, 1980 yıllarından başlayarak özellikle Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş süt, yumuşak peynir (Meksika tipi), lahana salatası, az pişmiş tavuk, sosis, çiğ et ürünleri, balık ve kabuklu deniz ürünleri gibi gıdaların toplu tüketimleri sonucu büyük epidemiler ortaya çıkmış ve % 30'lara varan ölümler görülmüştür [Beuchat, 1996; Gudbjonsdottir ve ark., 2004]. *L. monocytogenes* önemli bir patojendir. İnsanlarda menenjit, septisemi, konjunktivit, deri ve mukoza lokalizasyonları ve kan tablosunda monositoza neden olmaktadır. Kontamine gıda tüketimi ile düşük miktarda *L. monocytogenes* alımı, sağlıklı yetişkinlerde herhangi bir klinik belirtiyeye yol açmazken bebeklerin, çocukların, yaşlıların, hamile, ilaç veya hastalık nedeniyle bağışıklık sistemi bozuk olan kişilerin bu canlıya daha duyarlı olduğu bilinmektedir [Goulet ve ark., 2006]. Ancak etkili olduğu hastalıkların nadiren sağlıklı yetişkinlerde de görüldüğü bildirilmektedir. Bunun nedeni olarak kontamine gıda tüketimi ile çok sayıda mikroorganizmanın alınması ileri sürülebilir. Özellikle hamilelerde listeriozis enfeksiyonları, grip benzeri semptomlar göstermekte ve plasenta yolu ile fetusa geçebildiği için erken sancı, abortus, ölü doğum, yeni doğan bebeklerin erken ölümüne veya konjenital anomali doğumlara neden olabildiği gözlenmiştir. Ölüm oranı oldukça yüksektir, bebeklerde %50 ve diğer gruplarda en az %25'dir [Rhoades ve ark., 2009].

#### 2.4.4. Yapılan çalışmalarda kullanılan diğer bakteriler ve genel özellikleri

Yapılan deneylerde modifikasyonsuz ve modifikasyonlu manyetik nanopartiküller üzerinde tutunma ve hedefe spesifik bağlanma gibi mikrobiyolojik çalışmalarda ve Raman spektroskopisinde karşılaştırma amaçlı *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* bakterileride kullanılmıştır.

##### *Salmonella typhimurium*

*Salmonella*, fakültatif anaerob, Gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir. *Salmonella* cinsi içinde yalnız insanlarda, yalnız hayvanlarda ve hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık yapan birçok tür bulunmaktadır [www.mikrobiyoloji.org]. *Salmonella* etkenleri Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Salmonella* cinsine ait türlerin içerdiği serotiplerdir. Son sınıflandırmaya göre bu cinste iki tür bulunmaktadır. Bunlar *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori*'dir. Günümüzde birçok patojeni içeren *S. enterica* türü altında ise altı alt tür bulunmaktadır. İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan *Salmonella* suşlarının % 99'u *S. enterica* subsp. *enterica* alt grubuna dâhildir ve bu grup çok fazla serotip içermektedir [Brenner ve ark., 2000].

*Salmonella*'ya genellikle koliform grup bakteriler tarafından yoğun düzeyde kontamine olmuş gıdalarda rastlanır. Klasik bir gıda enfeksiyonu olarak bilinen salmonellosis etmeni nedeniyle *Salmonella*'ların gıda mikrobiyolojisindeki rolleri büyüktür. *Salmonella*'ların neden olduğu gastroenterit de ölümle sonuçlanabilir. Mikrobiyal gıda zehirlenmeleri arasında dünyada en çok görülen hastalıklardan biri olan salmonellosisin sadece ABD'de yılda 2-4 milyon kadar olan vakaya neden olduğu ve hastalık sayısının giderek arttığı tahmin edilmektedir [www.mikrobiyoloji.org].

### Staphylococcus aureus

*S. aureus* mikroskopik olarak incelendiğinde çift, kısa zincirli ve üzüm salkımı gibi olduğu gözlenen, kok şeklinde Gram pozitif bir bakteridir. Bazı suşları insanlarda hastalığa neden olan yüksek ısıya dayanıklı protein toksinleri üretme eğilimindedir [www.food-info.net]. Fransa’da gıda zehirlenmelerinde *Salmonella*’dan sonra ikinci olarak en çok salgına bakteriyal patojen *S. aureus* neden olmaktadır. Hastalık içindeki bakteri suşlarınca üretilen enterotoksinlerin kirlettiği gıdanın tüketilmesi ile gıda zehirlenmesi ortaya çıkar. Çiğ ve pişmiş et ile süt ve süt ürünleri insanlara patojen bulaşmasının ana yollarıdır [Boujday ve ark., 2008].

Stafilokoklar deri ve mukozal yüzeylerin normal florasında bulunmaktadır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık olarak %15’i devamlı olarak *S. aureus* taşıyıcısıdır. Bu oran hastanede yatan hastalarda, sağlık çalışanlarında, diabet, egzema ve ilaç bağımlılığı gibi durumlarda daha yüksektir. Toplumun %60’ı ise belirli aralıklarla burunlarında *S. aureus* taşırlar [Murray ve ark., 2002, Topçu ve ark., 2002].

Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesi *S. aureus*’ un bazı suşlarının ürettiği enterotoksinlerin sebep olduğu bir durumdur. Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmesinin başlangıç belirtileri bireyin toksine olan duyarlılığına, tüketilen kontamine gıda miktarına, gıda içinde alınan toksin miktarına ve genel anlamda hastanın sağlığına bağlı olarak hızlı ve ani gelişir. En çok görülen belirtiler; mide bulantısı kusma, karın ağrısıdır. Bazı bireyler, hastalıkla ilgili bütün bu belirtileri göstermeyebilir. Zehirlenmenin daha şiddetli olduğu durumlarda, bireyde baş ağrısı, kas krampları, kan basıncı değişiklikleri ve çarpıntı gözlemlenebilir. Genellikle, hastanın iyileşme süreci iki gündür fakat şiddetli durumlarda bu sürecin üç gün olması hatta bazen daha fazla devam etmesi beklenebilir. Staphylococcal gıda zehirlenmesinde rol alan gıdalar et ve et ürünleri; kümes hayvanları ve ürünleri; salatalar (yumurta, tuna, balık, patates ve makarna salataları gibi); fırın ürünleri (kremalı pastalar ve tartlar, çikolata); sandviçler; süt ve günlük ürünlerdir.



Hazırlanma aşamasında dikkatli bir işleme tarzı gerektiren ve bu aşamadan sonra azar azar yükselen sıcaklıklarda tutulan gıdalar, staphylococcal gıda zehirlenmesi riski altındadır [www.food-info.net].

*S. aureus*'un tespit ve sayımında genellikle standart mikrobiyolojik kültür testleri uygulanır. Bu metotlar hassas ve spesifik olmalarına rağmen zaman alıcı olmaları, kişisel beceri gerektirmeleri ve 24-48 saat aralığında sonuçlanmaları gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle patojen bileşenlerinin spesifik algılanmasında, DNA fragmentleri için genellikle PZR tabanlı analiz [McKillip ve Drake, 2004] ya da antikorlar kullanılarak immünolojik analiz yöntemleri gibi alternatif yöntemlerin geliştirilmesi için çok büyük çabalar sarf edilmektedir [Bennett, 2005; Hughes ve ark., 1999; Brett, 1998; Delibato ve ark., 2005].

## **2.5. Manyetik Nanopartiküller ile Patojen Algılayabilen İmmüno-sensörler ve Tasarımı**

Patojenik bakterilerin hızlı bir şekilde tanılanması ve teşhisi için sürekli olarak araçlar geliştirilmektedir. Kültür yöntemleri “altın” standart olarak devam etmekte, nükleik asit bazlı metotlar kullanılabilir ve üçüncü olarak da immün analiz yöntemleri tercih edilmektedir [Gracias ve McKillip, 2004; Bhunia, 2006]. Ancak immün analiz metotları diğer ikisine göre çok daha hızlıdır. Kültür metotları 24-48 saat veya daha fazla sürebilmektedir. *Mycobacterium tuberculosis* gibi bazı bakterilerin teşhisi 7-14 günlük bir süre almaktadır [Cheng ve ark., 2005]. Buna karşın antikor bazlı tanılama yöntemlerinin çoğu lateral akış ve deep stick gibi immün analiz yöntemleri ve slide bağlama testleri ile laboratuvar dışında yapılarak 10-15 dk. içinde sonuç alınabilir [Banada ve Bhunia, 2008].

Nanoteknoloji ve nanobilimin en önemli araştırma alanlarından birisi; çeşitli mikroorganizmaların kontrolü ve tayinidir [Luo ve Stutzenberger, 2008]. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin şekli, yapısı ve boyutları uygun kimyasal

yöntemlerle kontrol edilebilir. Yüzeylerine farklı kimyasal gruplar eklenerek modifikasyonlar ile yeni özellikler kazandırılabilir.

### 2.5.1. Manyetik nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller analitik biyokimya, sağlık ve biyoteknoloji alanlarında protein, enzim ve diğer biyoaktif ajanların immobilizasyonunda gittikçe artan uygulama alanları bulan en çok kullanılan materyaldir [Yang ve ark., 2004]. Manyetik nanopartiküller moleküllerin ve spesifik hücrelerin ayırımında, arındırılmasında, tanılanmasında çeşitli konsantrasyonlarda ayarlanabilirler [Hnaiein ve ark., 2008].

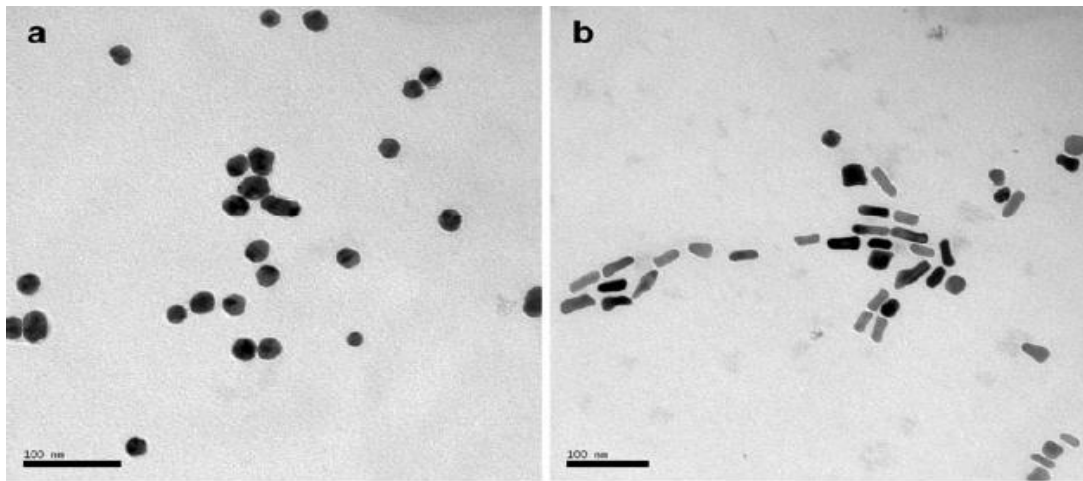
Nano boyutlu metal malzemeler, nano boyutta tanecik büyüklüğüne ve yapısına sahip metallerdir. Genelde tanecik büyüklüğü 1–100 nm arasındadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bu malzemelerin özelliklerinin çoğunlukla tanecik boyutuna bağlı olduğunu göstermiştir [Klabunde ve ark., 1996]. Sentezlemedeki gelişmelerle 2-20 nm çapındaki manyetik nanopartiküllerin boyutlarında kesin olarak kontrol yeteneği elde edilmiştir [Sun ve Zeng, 2002]. Nanomalzemelerin yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleride önemli değişimlere sebep olmaktadır. Manyetik malzemelerdeki zorlayıcı kuvvet değiştirilebilir, yüzeyin tepkimeye girme kabiliyeti ve katalitik yeteneği geliştirilebilir ve mekanik dayanıklılık beş veya daha fazla kat artırılabilir [Li ve ark., 2006].

Varshney ve arkadaşları tarafından immünomanyetik ayırma tekniği geliştirilmiş ve manyetik nanopartikül konjügelere poliklonal anti-*E. coli* antikorları ile biyotin ve streptavidin sistemi kullanılarak kaplanmış ve *E. coli* O157:H7 yakalamak için kullanılmıştır. Böylece yakalama etkinliği %69'dan 94,5'e çıkarılmıştır [Varshney ve ark., 2005].

Yapılan bir çalışmada nanopartikül bazlı immünomanyetik ayırıştırma ve eş zamanlı PZR yöntemleri birleştirilerek *L. monocytogenes* bakterisinin hızlı ve kantitatif

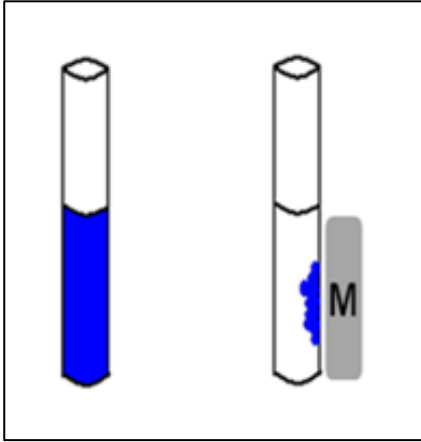
algılanması için bir yöntem geliştirilmiştir. Karboksil modifiyeli manyetik nanopartiküller tavşan anti-*L. monocytogenes* antikoru ile amin grupları aracılığıyla kovalent bağlanmıştır. Immünomanyetik nanopartiküllerin miktarı, reaksiyon ve toplama süreleri, yıkama aşaması gibi çeşitli faktörlerin en iyi değerleri araştırılarak bulunmuş ve suni olarak kirletilmiş süttten *L. monocytogenes* teşhisi için nanopartikül bazlı immünomanyetik ayırım ile eş zamanlı PZR birlikte kullanılarak başarısı ölçülmüştür [Yang ve ark., 2007].

Uygulamalarda kullanılan bakteri tayini araştırmaları için çalışılacak olan nano boyutlu yapılar çekirdek-kabuk nanomateryal bazlı modifiye edilmiş manyetik sensörlerdir. Resim 2.1’de de görüldü gibi çeşitli şekillerde (küre, küp ,çubuk vs.) sentezlenebilen bu nanoyapılar demir bir çekirdek ve bunun üzerine kaplanmış olan altın kabuk yapısından oluşmaktadır [Temur ve ark., 2010].



Resim 2.1. Altın küre nanopartiküllerin ve altın nanoçubukların TEM görüntüleri [Temur ve ark., 2010]

Nanopartikülün çekirdeğini oluşturan demir bu nanopartiküllere manyetik özellik kazandırmaktadır ve bu sayede buldukları ortamdan mıknatıs yardımıyla ayrılmaları Şekil 2.1’de gösterildiği gibi kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir.



Şekil 2.1. Manyetik nanopartiküllerin mıknatıs yardımıyla ayrımı (M: Mıknatıs)

### 2.5.2. Çekirdek–Kabuk bazlı nanosensörler

Bu malzemeler çok ilginç elektronik, optik, manyetik, yapısal ve kimyasal özellikler gösterir. Bu özellikler yüksek hedef özel uyarlanabilirliği olan biyogörüntü, biyosensör ve biyodiagnostik uygulamaları için uygundur. Buradaki çekirdek-kabuk malzemeler bazı organik ve inorganik tabakalarına nanopartikül kaplanmış yapılardan farklı olarak önemli büyüklükte çekirdek ve kabuk yapılarına sahiptir. Çekirdek-kabuk nanomalzemeler genellikle her ikisinde nanometre ölçüsündeki bir çekirdek ve kabuktan oluşup, birbirini izleyen adımlarda sentezlenerek birbirini tamamlayan özelliklere sahiptir [Potyrailo ve ark., 2008; Shi ve Asefa, 2007].

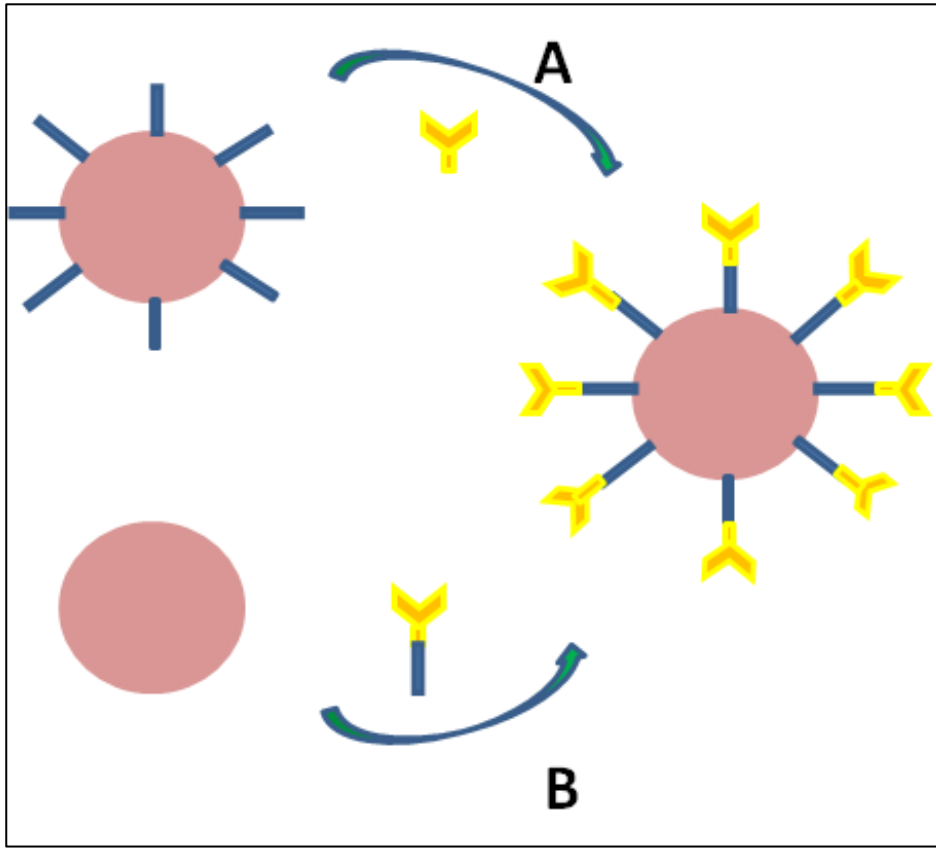
Daha büyük hassasiyet, hızlı cevap süresi ve seçiciliği olan kimyasal sensörlerin çekirdek-kabuk nanopartiküllerle oluşturulabileceği gösterilmiştir. Örnek olarak kompozit çekirdek-kabuk nanoküreler geliştirilerek çok düşük yoğunlukta çoklu buhar algılaması yapılmıştır [Li ve ark., 2006].

### 2.5.3. Bakteri tayini için immünosensör modelinin tasarlanması

Nanopartiküllerin optik, elektrokimyasal ve manyetik özellikleri teşhis yöntemlerinin hızını ve başarı oranlarını arttırabilir. Bunların çeşitli konfigürasyonlarda kullanılabilmeleri hasta başı sistemlerin ya da çok amaçlı

cihazların geliştirilmelerini sağlayabilir [Sanvicens ve ark., 2009]. Ayrıca, klinik teşhisi, gıda analizi ve çevre gözlememesi gibi çeşitli alanlarda patojen bakterilerin teşhis edilmesi için alternatif enzim ve immünoensörlerin geliştirilmesi konularında ilerlemeler kaydedilmektedir. Enzim, nükleik asit ve antikor gibi kullanılan biyolojik elemana bağlı olarak çeşitli biyosensörler geliştirilebilir [Ivnitski ve ark., 1999]. Nano yapıdaki partiküllerin boyları ayarlanabilir özelliktedir. Bu biyosensör üretimi için oldukça önemlidir. Hedef biyolojik parçaların yüksek tanılama, yüksek seçicilik ve yüksek hassasiyet ile teşhisi için en uygun biyofonksiyonlu manyetik partikül boyutlarının belirlenmesinde iki basit prensip kullanılabilir: (1) Partikül yüzeyinde birden çok ligant bulunabilmesi ve bu sayede çok yönlü etkileşimlere izin verilmesi için partikül boyutu yeterince büyük olmalıdır. (2) Yüksek yüzey alanı-hacim oranları, iyi koloid stabilite ve yüksek bağlanma için hızlı hareket sağlayacak kadar boyutları küçük olmalıdır. Örneğin; Proteinlerin ayrımında nanopartiküllerin boyutları biyomakromoleküllerin boyutlarına yakın olmalıdır. Hücrelerin yakalanmasında nanopartikül boyutu 8-10 nanometre çapında olmalıdır [Gu ve ark., 2006].

Nanosensörler iki geniş kategoriye ayrılabilirler: Hedef analitin doğrudan teşhisi için sensörler ve dolaylı teşhis yapan (etiketlenmiş) sensörler. Bu iki sensör türünün genel yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Doğrudan teşhis sensörleri bir biyospesifik reaksiyonu bir kompleks formasyon ile ortaya çıkan fiziksel değişikliklerin ölçülmesi yoluyla anında ve doğrudan belirler. Dolaylı teşhis biyosensörlerinde önceden gerçekleşen bir biyokimyasal reaksiyonun ortaya çıkardığı ürünler daha sonra bir sensör tarafından algılanır [Ivnitski ve ark., 1999].



Şekil 2.2. Biyofonksiyonel moleküllerin 2 farklı yöntemle bir nanopartiküle bağlanması (mavi kısa çubuklar parça yüzey tutucusunu göstermektedir.) **A.** Doğrudan teşhis için geliştirilen sensör modeli, **B.** Dolaylı teşhis amacıyla geliştirilen sensör modeli

Biyofonksiyonel gruplar değişik 2 yöntemle nanoyüzelere bağlanabilir. Şekil 2.2.'de görülen A yönteminde reaktif bir grup içeren bir tek molekül tabakası nanopartikül üzerinde üretilir, sonra biyofonksiyonel moleküller bu tek katmanla reaksiyona girerek biyofonksiyonel nanopartikülleri üretirler. B yönteminde ise önce yüzey ile reaksiyona girecek grup biyofonksiyonel biyomoleküle bağlanır, daha sonra bu birleşim nanopartikül ile reaksiyona girerek istenen ürünü verir. A yöntemi basit ve çeşitlenebilir bir yöntemdir, ancak tüketilmemiş reaktif gruplar geride kalabilir. B yönteminde iyi tanımlanmış bir tek tabaka üretilir, fakat yüzeyle reaksiyona girecek bir grup içeren biyofonksiyonel bir molekülün üretilmesi çok zor olabilir [Gu ve ark., 2006].

#### 2.5.4. İmmünolojik tanılama

Nanopartiküllerin yüzeyleri hedefe özel olarak seçilmiş protein yapısındaki spesifik antikorlar ile bağlanarak sensörlerin ortamda algılanması istenen bakteriye yüksek oranda tanılama ve bağlanma göstermesi sağlanabilir. Böylece özel antikorlarla fonksiyonlandırılmış nanopartiküller ve hedef organizmanın antijenleri immünolojik tanıma mekanizmaları sayesinde birbirlerine spesifik olarak bağlanabilirler.

##### Antijenler

Organizmada reaktif immün cevap oluşturabilen maddelere “immünojen” denilmektedir. Böyle bir immün cevap sonucu, kendilerine karşı spesifik antikor oluşturabilen maddelere ise “antijen” denilmektedir. Antijenlerin simgesi “Ag”dir. En güçlü antijenler makromoleküler proteinlerdir. Polisakkaridler, sentetik peptid ve polimerler bazı uygun şartlarda antijen olabilirler [Kılıçturgay, 1997]. Antikor sentezi oluşturmayan, ancak oluşmuş antikorlarla spesifik biçimde birleşen moleküllere “hapten” denir. (saf polisakkarit ve lipidler gibi). Haptenler bir protein molekülü ile birleşirse, antijen özelliği kazanarak bağışık yanıtı neden olurlar. Hapten protein bileşiğinde, protein molekülüne taşıyıcı denir [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].

Bir molekülün iyi bir antijen olabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar:

1. Molekül organizmaya yabancı olmalıdır. Bir türün bir ferdine ait moleküller, gene aynı türün başka bir ferdi için antijenikse, bu moleküller izoantijendirler. Bir molekül, konağın moleküllerine ne kadar yabancı ise, o konak için o kadar iyi antijen olarak kabul edilir.
2. Molekülün mol ağırlığı 10 KD'dan fazla olmalıdır. İstenilen antijenlerin moleküler ağırlıkları ise genellikle 100 KD'dan fazladır.

3. Molekül, immün sistemi stimüle edecek süre kadar konakta kalabilmeli, hemen öldürücü toksik etki göstermemelidir.
4. Molekül, organizma ile uygun biyolojik ilişki kurabilmek yönünden, kimyasal kompleksite'ye sahip olmalıdır.
5. Molekül elektrik yükü taşımalıdır. Çünkü elektrik yüklü gruplar, sulu ortamda moleküle erirlik kazandırarak çevre ile daha iyi temas etmelerini, dolayısıyla onların immün sistem hücrelerine kolay girmelerini sağlayan hidrofilik nitelik taşırlar.
6. Antijenin konağa verilmiş yolu ve dozu da immün cevabın şiddetini ve kalitesini etkileyebilir. İyi bir immün cevap için, uygun yoldan verilecek yeterli doz seçilmelidir [Kılıçturgay, 1997].

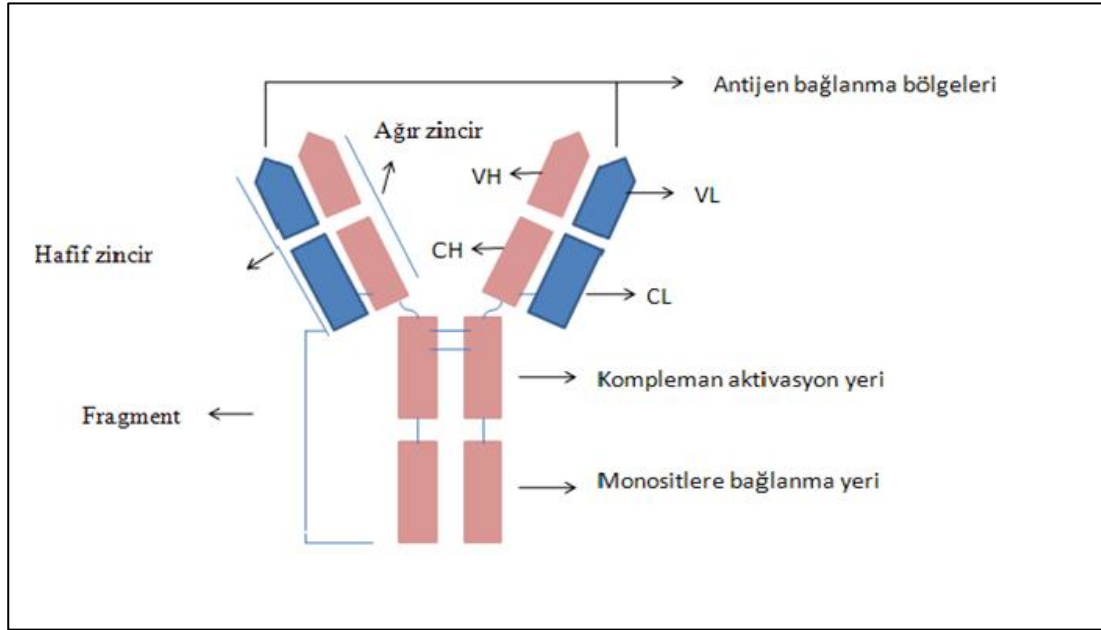
Enfeksiyonlara karşı bağışıklıkta yüzeysel antijenler özellikle önem kazanmaktadır. Mikroorganizmaların hücre içi yapılarında antijeniktir, fakat bu antijenlerin etkin olabilmesi için hücrelerin parçalanması gereklidir [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].

### Antikorlar

Antikorlar glikoproteinlerin immünoglobülin (Ig) süpergen familyasındandırlar [Banada ve Bhunia, 2008]. Antikorlar hümoral immünite veya antikora bağımlı immüniteden sorumlu olup glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Antikorlar binlerce farklı antijeni tanıyabilecek biçimde farklılık göstermektedirler. Bu farklılıklar oldukça çeşitli genlerin bir araya gelmesi sayesinde oluşur. Bir kişinin kanında bulunan antikorlar bir karışımdır ve çeşitli antijenlerin çeşitli determinant gruplarına karşı oluşmuşlardır. Antikorların her biri belirli B hücre klonları tarafından oluşturulmuştur. Antikorların saf bir biçimde elde edilmesi çalışmalarında plazma hücresi tümörü olan "Multiple myeloma" olgularından yararlanılmıştır. Tek



tip plazma hücresinden sentezlenen antikor molekülleri aynı yani “monoklonal” olmaktadır. Monoklonal antikorlar sayesinde ve X ışın kristallografi yöntemiyle antikorlar üç boyutlu yapılarıyla ayrıntılı olarak incelenebilmişlerdir [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].



Şekil 2.3. Bir antikor molekülünün yapısı

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi antikor molekülü 4 polipeptitten oluşmaktadır. Bu polipeptitlerden ikisi kısa, ikisi ise uzundur. Kısa aminoasit zinciri 25.000 mol ağırlığında olup bütün immünoglobulin sınıf ve alt sınıflarında aynıdır. Her sınıf ve alt sınıfta farklıdır. Bu hafif (L) ve ağır (V) zincirler birbirleriyle kovalent ve non-kovalent kuvvetlerle bağlanmışlardır. Bir antikor molekülünde ağır zincirlerin ikisine de aynı tip hafif zincir bağlanır. Hafif zincir iki bölgeden oluşur. Bir amino uç kısmı ki bu bölge aminoasit sıralamasında antikordan antikora göre çok değişimler gösterir. Bu bölgeye “değişken bölge” (Variable Light Chain) VL denir. Diğer karboksi ucu ise fazla değişiklik göstermez ve bu bölgeye “değişmez bölge” (Constant Light Chain) CL denir. Tipik bir antikor molekülü göz önüne alındığında hafif zincirleri 212 amino asitten oluşur, aşağı yukarı yarısı 105 aminoasit VL kısmını oluşturur. Hafif zincir içinde birisi değişken olan diğeri ise sabit kısmında olmak üzere iki adet ilmik bulunur. Bu ilmik aminoasit zincirinin kıvrılıp disülfid

bağıyla etkileşmesi ile oluşur. Hafif zincirde iki disülfid bağı vardır, birisi değişken diğeri sabit kısmındaki oluşumda rol oynar. Ağır zincirler birbirleriyle, hafif zincirler de ağır zincirlere disülfid bağlarıyla bağlanır [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994]. Hafif ve ağır zincirlerdeki bu iki değişken bölge, antijenin (Ag) tanınmasını ve bağlanmasını sağlar. Bu bölgedeki aminoasit dizisi çok değişkendir, bu sayede antikorlar çok sayıda hedef molekülünü tanıma gücüne sahip olurlar. Antikorların değişik sınıfları vardır: IgA, IgG, IgM, IgE ve IgD. Pratik nedenlerle immün analiz uygulamaları için bazı sınıflar dengelilikleri, bağlanma güçleri, ve düşük çapraz reaksiyonları nedeniyle çok tercih edilirler. Antikorların kompleks bir karışımda bile özel antijenik bölgelere (epitope) yüksek güçle bağlanması ve tanınması, antijenlerin kalitatif ve kantitatif ölçümü için kullanılır [Banada ve Bhunia, 2008].

Bir immün analiz yönteminin başarıyla tasarlanması; uygun antikorun üretilmesine, seçilmesi zorunlu olup poliklonal antikor veya monoklonal antikor seçimine, bispesifik, veya füzyon proteinlerine ve göreceli maliyete bağlı olarak değişecektir [Liddell, 2005]. Kullanılacak antikor tipi (PAb veya MAAb) özgün uygulamaya bağlıdır. Mümkünse monoklonal antikorlar tercih edilmelidir. Ancak, bunların üretiminin yüksek maliyetli olması, poliklonal antikorları hala daha cazip yapmaktadır. Hedefe özel yüksek başarıya sahip antikor üretilmesi için küçük peptidler veya polipeptidler gibi antijenik moleküllerin immünojen olarak seçilmesi ve kullanılma stratejisinin uygunluğu önemlidir [Banada ve Bhunia, 2008].

#### *Antikorların fonksiyonları*

Antikorun temel fonksiyonu antijenle bağlanmasıdır. Eğer toksinle bağlanırsa nötralize eder, virüsle bağlanırsa virüsün hücreye girmesini önler. Biyolojik moleküller, şekerler, lipidler, hormonlar, kompleks karbonhidratlar, fosfolipidler, nükleik asitler, proteinler kendilerine özgül antikorlarıyla birleşen antijenlerdir. Halbuki bu moleküllerden sadece makromoleküller lenfositleri aktive ederek, immün yanıtı neden olabilirler böyle maddelere “immünojen” denir. Küçük moleküllerin immün yanıtı çıkartabilmesi için büyük bir moleküle bağlanmaları

gerekir. Burada küçük moleküle “haptten” denilmektedir. Makromoleküle ise taşıyıcı denir ve çoğunlukla yabancı bir proteindir. Haptten taşıyıcı kompleksi bir immünojen gibi etki yapar. Bu makromoleküller genelde bir antikor bağlanma yerinden büyüktür. Antijenle bağlanma antikorun “Fab” adını verdiğimiz kısmıyla olur. Antikorların antijen bağlama yerindeki 3 boyutlu yapıyı aminoasit sıralanmaları tayin eder. Antikor molekülünün hafif ve ağır polipeptit zincirlerinin değişken bölgelerinin aminoasit sıralanmaları incelendiğinde bazı bölgelerin aminoasit farklılığının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bölgeler 30, 50 ve 95. aminoasit bölgeleridir. Bu bölgelere “hipervariable bölgeler” denmiştir. Bu bölgelerin antijen bağlanmasında önemli yerler olduğu düşünülmektedir. Ağır ve hafif zincirlerin değişken kısımları karşılıklı olarak öyle yerleşirler ki, bu bölgeler antijene özgül üç boyutlu boşluğu oluştururlar [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].

#### *Poliklonal antikorlar*

Poliklonal antikorların esası, bir antijene bağışıklık sisteminin cevabı birden çok B-hücrelerinin hepsi antijen üzerindeki özel bir epitopu hedefleyecek şekilde aktif hale getirilmesine dayalıdır. Seçicilikleri ve hedefledikleri epitoplar bakımından çok sayıda antikorun üretilmesi nedeniyle bunlara poliklonal antikorlar denir [www.randoxlifesciences.com]. Bir poliklonal antikor preperatında çeşitli sınıf ve alt sınıflardan antikor karışımları bulunabilir ve birden çok antijeni ya da aynı antijenin üzerinde bulunan birden çok epitopu tanıyabilirler. Aksine bir monoklonal antikor sadece bir antijen üzerindeki özel bir epitopu tanır. Poliklonal antikorlar bakterileri tanılamak için üretilirler ve bir antijeni karakterize etmek için çeşitli epitoplarla etkileşebilme yetenekleri nedeniyle ilk immünolojistler ve mikrobiyolojistlerce çok kullanılmışlardır. Çoğu ticari yöntemlerde poliklonal antikorlar kullanılır ve analiz formatı kümeleşme (aglutinasyon), çökelme veya enzim-bağlı immünosorbent yöntemi (ELISA) kullanılır. Poliklonal antikorlar monoklonal antikorlardan hedef molekülleri yakalama ve konsantre etme bakımından daha üstündür ve immünomanyetik veya immünoküre bazlı yakalama için kullanılırlar [Nolan ve ark., 2005].

Üretim amacıyla bu antikorlar ilgilenilen antikor ile bağışıklanmış hayvanların kan serumundan uyarılmış B-lenfositlerin ürettiği geniş çeşitlilikte o antijene özel immünoglobulinin saflaştırılması ile elde edilir. Amaç yüksek kalitede ve yüksek yakalama gücünde antikorların üretilmesidir. Günümüzde poliklonal antikorlar biyolojinin birçok alanında araştırma amaçlı kullanılmaktadır. Bu amaçların bazıları histokimya, ELISA, hastalık teşhisi, immune turbidimetrik yöntemler, Western Blot'lar ve biyoçip teknolojisidir. Poliklonal antikorlar sandiviç yöntemlerde ikinci aşama antijen algılayıcıları olarak çok uygundurlar. Sıklıkla poliklonal antikorlar at turpu peroksidaz veya alkalin fosfataz gibi raporlayıcı moleküllerle etiketlenir böylece antikorların varlığı ışık veya renk değişiklikleri ile algılanabilir [www.randoxlifesciences.com].

#### *Monoklonal antikorlar*

Normal antikor sentezleyen B-hücresiyle, miyeloma hücresinin füzyonu sonucunda, bilinen özgüllükte devamlı antikor sentezleyebilen hibrid hücrelerden oluşan bir hücre kültürü elde edilmiştir. Bu hücrelerin sentezlendiği antikorlar “Monoklonal antikorlar” olarak adlandırılırlar [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].

Monoklonal antikorlar bir tek B-lenfositin özel bir epitopa karşı ürettiği antikorlardır. B-hücreleri bağışıklanmış hayvanların dalağında ve lenf düğümlerinden kolayca izole edilebilirler. Ancak bu hücreler sadece kısıtlı bir sayıda üreyebilirler, buna 'Hayflick limit' denir. Bu nedenle B-hücreleri doğrudan kültür edilemezler. Bir antikoru araştırma ya da endüstride kullanılabilmesi için büyük miktarlarda kolayca üretilebilmesi gerekir. Ancak Hayflick limit nedeniyle B-hücreleri için bu mümkün değildir.

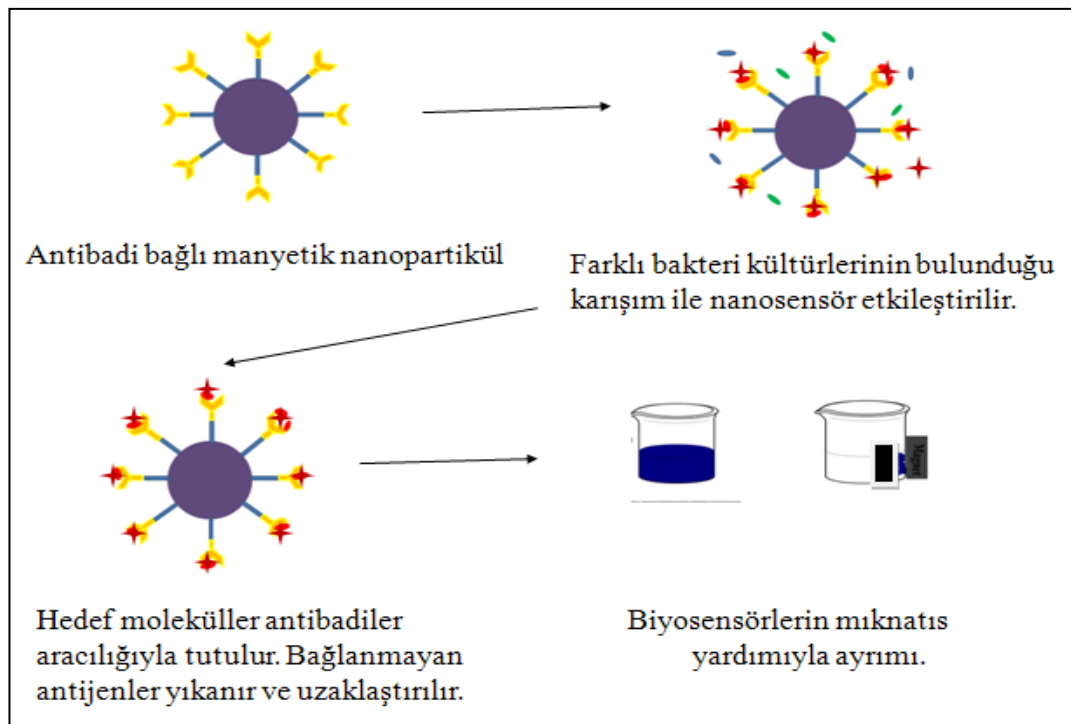
1975 yılında ölümsüz heteromiyeloma hücreleri ile lenfositler birleştirilmiş ve genetik materyalleri karıştırılmıştır. Üretilen bu hücre tipine hibridoma denir ve sonsuz miktarda antikor üretebilir. Ancak sadece bir B-hücresinin ürettiği tek bir antikor bu yöntemle elde edilecektir ve buna monoklonal antikor denir. Bu teknoloji

ile bilim adamları karmaşık bir antikoru ayrıştırabilir ve saf olarak hücre klonlama yöntemi ile üretebilirler. Bu klon sıvı nitrojen içinde istendiği kadar saklanabilir ve bu sayede gerek duyulduğunda canlı ortamda büyük miktarlarda üretilebilir [[www.randoxlifesciences.com](http://www.randoxlifesciences.com)].

Monoklonal antikolar, belirli hücre tipinin yüzey fenotipik işaretini ayırt etmede, immüno-diagnoste, tümörün tanı ve tedavisinde, hücre yüzey molekülleri ve salgılanan moleküllerin fonksiyonel analizinde kullanılabilir [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994]. Monoklonal antikolar saflaştırmada kullanılmak üzere modifiye edilebilirler. Bu amaçla özel bir antijene monoklonal antikolar bağlanarak örnekteki diğer maddeler yıkanarak atılabilir. Kanser tedavisi için monoklonal antikoların çok büyük potansiyelleri vardır çünkü radyoaktif ajanlarla veya diğer bileşiklerle bağlanarak vücuda verilebilir ve sadece kanser hücrelerini hedef alırlar. Monoklonal antikor terapisi organ veya doku nakil reddini azaltır ve hastanın yabancı protein tanıma sistemi ile etkileşerek otoimmün hastalıkların etkilerini azaltır [[www.wisegeek.com](http://www.wisegeek.com)].

Monoklonal antikolar birçok hedefe karşı üretilebilir. Hassasiyet ve başka antijenlerle reaksiyon düzeyleri gibi çeşitli parametrelere göre antikolar seçilebilir ve böylece istenen özellikleri gösteren herhangi bir hücre hattı tanımlanabilir. Monoklonal antikolar bir grup molekülle çapraz reaksiyon yapacak şekilde üretilebilirler [[www.randoxlifesciences.com](http://www.randoxlifesciences.com)]. Hedefe özel antikolar *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Staphylococci*, *Pseudomonas* gibi bakterilerin hücrelerinin veya toksinlerinin tanımlanması için geliştirilebilirler [Banada ve Bhunia, 2008]. Antikolarla kaplanan paramanyetik kürecikler bakteriyal hücrelerin kompleks çevre örneklerinden algılanmasında ve konsantrasyonunda kullanılmaktadır. Paramanyetik kürecikler ancak bir manyetik alan içinde manyetik özellik kazanır ve bu manyetik alan kaldırıldığında manyetizmalarını kaybederler. Bu özellik sayesinde sıvı süspansiyon içinde manyetik kürecikler hedef antijenlerle serbestçe etkileşebilecek ancak birbirlerine manyetik güçle çekilmeyeceklerdir.

İmmünomanyetik ayırma (IMS) ile yiyecek süspansiyonu içeren matrislerden mikroorganizmaların %10-70'i yakalanabildiği için sıklıkla yiyecek süspansiyonlarının bakteri sayısını arttırmak için ön zenginleştirme veya seçme işlemi gereklidir. Yakalanan mikroplar daha sonra besleyici/seçici agar tabakalara yerleştirilerek PZR, immün analiz metotları, flov sitometri ve kemilüminisans uygulanır [Feng, 2001].



Şekil 2.4. Hedefe yönelik hazırlanmış bir immünosensörle bakteri tanılama ve IMS ayırma yöntemi

Şekil 2.4'te hedef antijen konsantrasyonu ve yakalama için immunomanyetik ayırma yöntemi gösterilmiştir. Manyetik kürelere bakteri kültürleride eklenerek spesifik antikorlar ile konjuge edilmiş. Manyetik alan içerisinde paramanyetik küreler alınmış ve bağlanmayan antijenler yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılmıştır [Banada ve Bhunia, 2008].

### *Nanosensörler için antikor seçimi*

Hem poliklonal hemde monoklonal antikorların avantajları olup farklı uygulama alanları onları kullanışlı yapar. Sensörlere kazandırılmak istenen özelliklere göre bu iki antikordan birisi tercih edilebilir.

#### Poliklonal Antikorlar ;

Çok sayıda PAb, MAb'lara göre, daha çabuk ve ucuz bir şekilde üretilebilir. Seçici olmayıp herhangi bir antijen üzerindeki birden çok epitopu tanıyabilirler. Bu yeteneğin birçok avantajı vardır:

- Antikor birden çok epitopa bağlanacağı için daha güçlü sinyal üretir.
- MAb'lara göre antijen değişikliklerine daha az duyarlıdır.
- Antijen doğası bilinmediğinde de kullanılabilir.
- Birden çok epitop hedeflediği için daha güvenilir algılama sağlar [www.randoxlifesciences.com].

#### Monoklonal Antikorlar;

- Hibridomalar ölümsüz bir hücre hattıyla sınırsız miktarda antikor üretimine izin verir.
- Üretilen her seri birbirinin tıpkısı olacak ve sadece bir epitopa özel tanıma yaparak klinik testlerde ve terapi uygulamalarında standartlaşma sağlayacaktır.
- MAb'ların yüksek seçiciliği arka plan gürültüsünü ve çapraz reaksiyonları azaltarak tekrarlanabilen sonuçlar üretecek ve yakalama saflaştırmasını garantileyecektir [www.randoxlifesciences.com].

### Antijen-antikor etkileşimi

Antijen-antikor birleşmesi özgül bir reaksiyon olup antijen ve antikordan birisi biliniyor ise diğeri belirlenebilir.

- Antijen–antikor birleşmesi kimyasal bir reaksiyondur. Bu birleşmede kovalent olmayan bağlar rol oynar. Bu bağlar kuvvetli değildir.
- Antijen-antikor reaksiyonu özgül bir reaksiyondur. Örneğin *S. typhimurium*’ a karşı oluşan antikor en uygun olarak bu mikroorganizma ile birleşir.
- Antijen-antikor reaksiyonu geriye dönüşebilen bir reaksiyondur.
- Antijen-antikor birleşmesinde uygun oranlar kuralı geçerlidir. Antijen ve antikor uygun oranlarda karıştırıldıklarında en hızlı ve en fazla birleşme meydana gelir.

Antijen ve antikor birleşmesinde elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, van der Waals ve hidrofobik moleküllerin oluşturduğu kuvvetler gibi bazı kuvvetler önemli rol oynamaktadır [Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994].

Antijen molekülünde molekülün tümü, antikorla özgül birleşmeden sorumlu değildir. Molekül antikorla sadece belirli bölgeleri aracılığıyla bağlantı kurar. Antikora özgül bağlantıyı sağlayan bu noktaların her birine “antijenik determinant” veya “epitop” denilmektedir. Bir antijendeki epitop sayısı, molekülün kompleksitesine ve büyüklüğüne bağlıdır. Makromolekül yüzeyinde yer alan epitopların hepsi birlikte o antijenin özgüllüğünü oluştururlar. Ancak bu yapıların hepsi immünolojik değildir. Proteinlerin bazı bölgeleri, kendilerine karşı doğrudan immün cevap oluşan bölgelerdir. Bir antijene karşı oluşan antikorlar onun epitoplarına yönelirler. Bir epitopa karşı oluşan antikorlar, bu epitopa sahip iki farklı molekülü tanıyabilirler. Buna karşılık bir antijende birden fazla epitop bulunduğu için, farklı epitoplara karşı oluşmuş farklı antikorlar aynı antijeni tanıyabilir [Kılıçturgay, 1997].

## **2.6. Nanosensörlerle Patojen Algılanmasını Test Etmek Amaçlı Kullanılan Yöntemler**

Hassas manyetik immüno analiz yöntemlerin taşıdığı çok büyük bir avantaj ihtiyaç duyulan örnek ve ajanların hacmidir. Bu özellikle sahada ve mümkünse taşınabilir



bir cihaz içinde hızlı bir patojen testi yapılması gereken durumlar için faydalıdır. Taşınabilir teknolojilerin halen bulunmasına rağmen düşük maliyetli, hassas, elde taşınabilen cihazlarla biyolojik hedeflerin kantitatif algılanmasında hala zorluklar bulunmaktadır. Yakın zamanda çip üstünde analiz, nanomanyetik partiküller ve kuantum noktaları biyo-algılama için kullanan biyosensörler başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun anlamı biyolojik hedeflerin hızlı algılanmasının, gelecekte uygulanabilecek yüksek hassaslıkta immün tanımayla birlikte yüksek etkinlikte immünomanyetik ayırım kullanan taşınabilir bir cihaz geliştirilebilir olmasıdır. Sonuç olarak, immünomanyetik patojen algılama teknolojileri özel üretilmiş nanomanyetik partikülleri ve minimal ajan hacimlerini kullanan hızlı ve hassas bir algılama sistemi aracılığıyla maliyet düşürücü bir yol göstermektedir. Bu sistem birden fazla patojenin test edilmesi için ayarlanabilmekte ve bu nedenle tıbbi teşhis ve çevre koruması gibi diğer alanlarda da kullanılabilen bir platform oluşturmaktadır [Haik ve ark., 2008]. Patojen algılanması için geliştirilen partiküller hedef organizma ile etkileştirildikten sonra istenilen spesifik seçilimin test edilebilmesi amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

### **2.6.1. Biyoanaliz çalışmalarında teşhis edilecek örneğin hazırlanması**

Teşhis süreçlerinde özellikle kantitatif ölçümlere göre uygun bir örnek almak zor bir adımdır. Her bir tanılama yönteminin ihtiyaçlarına göre örnek hazırlanması prosedürün önemli bir kısmıdır ve bu nedenle son algılama örneğine doğru özelleştirilmelidir. Yinede göz önüne alınması gereken bazı temel gereksinimler vardır. Mikrobiyolojik incelemelerde kullanılması planlanan örnek hazırlama süreçlerinin tanınabilecek hedeflerin sayısını artırırken engelleyici ya da hedefle karıştırılabilecek maddelerin sayısını azaltmalıdır. Ayrıca, örnek hazırlanmasının kısa sürede yapılabilmesi için hızlı tanımlama yöntemlerinin kullanılmasındaki avantajları kaybetmemek gereklidir [Kretzer ve ark., 2008].

Büyük miktarlarda, örneğin yüksek hacimli, analizlerle işlenmesinin sağlamak için işlenecek örnek boyutu küçültülmelidir. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu),

ELISA, biyoçipler, ya da biyosensör-bazlı yöntemler mikro-ölçek formatında uygulanırlar. Bu nedenle örnek yoğunlaştırılması ihtiyacı açıktır. Filtreleme ya da santrifüj gibi fiziksel yöntemlerin yanısıra manyetik partikül bazlı ayırıştırma geniş şekilde uygulanarak son 20 yıl içinde çeşitli zorlu problemlerin çözülmesini sağlamıştır. Yeni yüksek seçicilikte bağlanma sağlayan mesaj moleküllerinin geliştirilmesi sayesinde hücrelerin manyetik partikül temelli ayırıştırılması hedef hücrelerin etkin bir şekilde ayırıştırılarak konsantre edilmesini ve örnek matrisinden karışabilecek maddelerin çıkarılmasını sağlayabilen umut verici bir yöntemdir. Yeni, hızlı, etkin algılama yöntemlerinden en iyi şekilde yararlanmak için bu yöntemler, örnek hazırlanmasından başlayan ve bu adımdan çok büyük ölçüde etkilenen tam bir akış şemasının parçası olarak kullanılmalıdır [Kretzer ve ark., 2008].

### **2.6.2. İmmün analiz yöntemleri**

İmmün analiz tekniği antijen ve antikor arasındaki etkileşime ve bu etkileşimi algılamak ya da ölçmek için ihtiyaç duyulan teknolojiye dayanır. Çok çeşitli immün analiz yöntemleri vardır ve bu teknikler toksikoloji ve patojen algılanması alanlarında dahil geniş olarak kullanılmaktadır [Yousef, 2008]. İmmün analiz yöntemleri genellikle proteinlerin antijen-antikor etkileşimi ile istenilenin varlığının ölçülmesinde kullanılırlar. Algılama sinyali radyoaktif, kolorimetrik veya floresan olabilir. İmmün analiz metodlarının hassasiyeti ve seçiciliği kullanılan antikorla ilişkilidir. Antijen-antikor reaksiyonları, yani bir hücresel komponent bazlı teknoloji, özel mikroorganizmaları veya hücresel komponentleri algılamak için kullanılabilir. Bu tür sistemler patojen algılanması için yararlıdır ve tanımlama için de kullanılabilir. Bazı durumlarda sistemler algılanan hücrelerin canlı olup olmadığını ayırt edemeyebilir [Pharmeuropa 2004]. ELISA gibi çeşitli patojen algılama kitleri patojen türüne bağlı olarak bulunmaktadır [Banada ve Bhunia, 2008].

Çeşitli karmaşıklık düzeylerindeki serolojik analizler, bakteri tanınması için sıklıkla kullanılan testlerdir. Antijen-antikor reaksiyonları bağlanma, çöktürme, renk değişimi (ELISA gibi), veya immunofloresans şeklinde algılanırlar.

Otomatikleştirilmiş immün analiz metotları izole edilmiş bakterileri tanımlamak için ticari olarak satışa sunulmuş araçlardır [Yousef, 2008]. Krieg 2005'e göre bu testler hızlı ve güvenilir bakteri tanımlanması için iyi bir yoldur.

#### Radyoimmün analiz (RIA) yöntemi

Bu yöntemde bir gama-radyoaktif izotop (İyodin veya tirozin) antijene etiketlenmiş ve antikor ile karıştırılmıştır. Karışıma daha sonra daha yüksek konsantrasyonlarda etiketlenmemiş antijenler eklenmiştir. Antikor ile etiketlenmemiş antijene bağlanmayı tercih eder ve yeri değişen etiketlenmiş antijenin radyoaktif sinyali ölçülerek bağlanma eğrisi çizilir. Bu yöntem çok hassas ve bakteri hücreleri veya toksinleri için çok seçicidir ancak radyoizotopların maliyeti ve yüksek riskleri yaygın kullanımını engellemektedir. Son zamanlarda bu yöntemin yerine kolorimetrik ve floresan bazlı enzim immün analiz (EIA) yöntemi bu yöntemin yerini almıştır [Banada ve Bhunia, 2008].

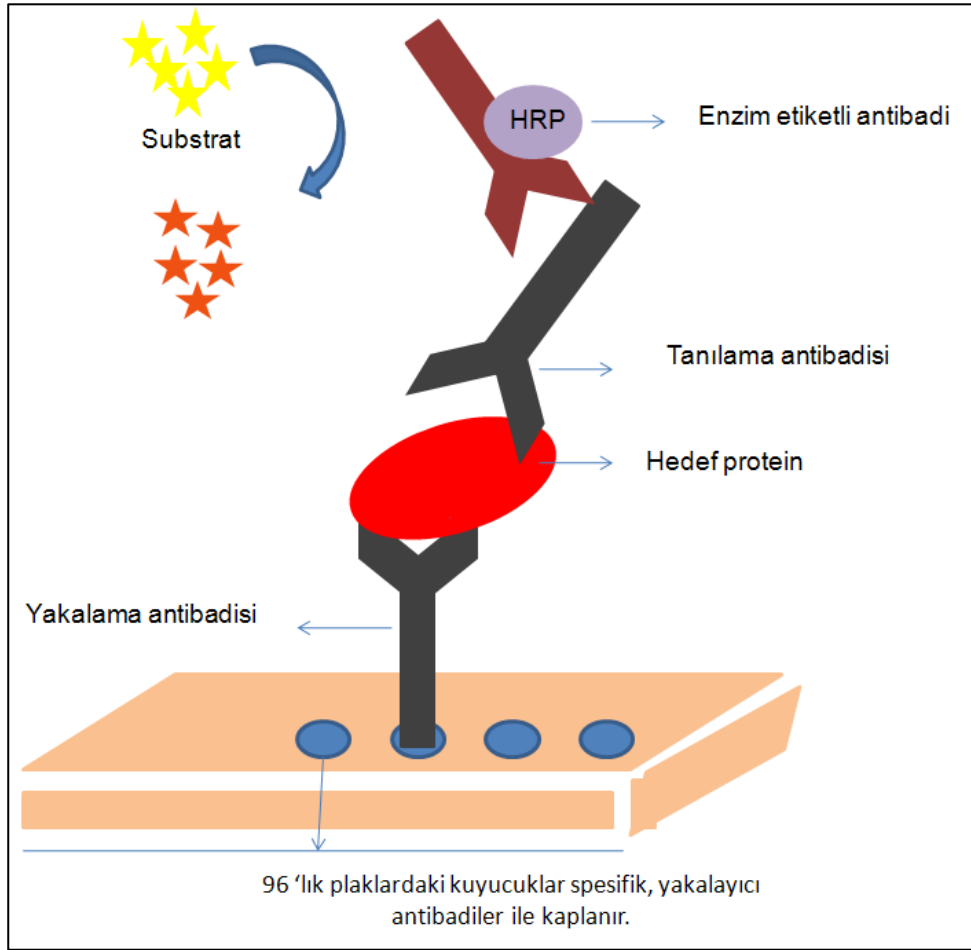
#### Enzim immün analiz (EIA) metotları

Bunların arasında enzim-bağlı immünosorbent analiz (ELISA) en güvenilir kantitatif algılama metotudur. ELISA hızlı bir immünokimyasal yöntem olup, antijen-antikor reaksiyonu kromojenik veya floresan sinyal üreten bir enzim tarafından katalize edilmektedir [Banada ve Bhunia, 2008]. ELISA ve enzim bağlı floresan immün yöntemler hedeflenen bakteriyal patojenin antijenlerini algılamak için uyarlanabilen immünolojik tekniklerdir. Bu nedenle patojen algılama yöntemlerinde bu teknikler kullanışlı gözlem ya da tanıma araçlarıdır [Yousef, 2008].

ELISA hücresel komponent bazlı bir teknolojidir. Bu teknoloji özel mikroorganizmaları ya da hücresel komponentleri algılamak için bir antijen-antikor reaksiyonunu kullanır. Klinik uygulamalarda uzun yıllar kullanılmıştır [Moldenhauer ve Yvon, 2005]. Analiz süreleri bakteriler için 24-52 saati ve mikrobiyal toksinler için 4-24 saati bulmaktadır. Algılamayı garantilemek için çoğu

immünolojik testte  $10^4$  hücre/mL bulunması gerektirdiğinden zenginleştirme yapılması gerekebilir [Newby ve Johnson, 2003]. ELISA mikrobiyologlar arasında yiyecek, su ve çevresel veya klinik örneklerde hassas ve kantitatif olarak bakterilerin veya toksinlerinin algılanmasında popüler olarak kullanılır [Yeh ve ark., 2002; Gracias ve McKillip, 2004; Haggerty ve ark., 2005].

ELISA antijenin veya antikorun katı yüzey üzerine yerleştirilmesine göre farklı şekillerde uygulanır ; 1. Yarışmalı ELISA, 2. Dolaylı ELISA, 3. Sandviç ELISA. Bakteri tayininde mikroplaklar önce bir yakalama antikoru ile kaplanır ve sonra antijen eklenir. Reaksiyon bir kerede etiketli tanıma veya izleyici antikor ile geliştirilir ya da iki adımlı olarak ek bir ikincil antikor konjügesi kullanılır [Banada ve Bhunia, 2008]. ELISA endosporlar, kapsüller, ya da endospor oluşturan bakterilerin hücre duvarları komponentlerini algılamak için kullanılabilir. ELISA testlerinde birkaç adım olup, bağlanmamış bileşikler atmak için yıkamayı da içerir. Bu basamaklar Şekil 2.5'te verilmiştir. İlk önce çoklu plağın katı yüzeyine bir antikor bağlanır. Daha sonra bütün mikroorganizmaları veya endosporları içeren bir antijen süspansiyonu test edilmek üzere antikor kaplanmış yüzeye uygulanır. Antikor antijeni yakalayıp yüzeye bağlar. Bir enzim ile bağlanmış bir antikor antijene bağlanır ve uygun bileşik eklendiğinde enzim kataliz görevi görerek onu oksitleyerek renkli ya da floresan bir bileşiği spektrofotometre gibi uygun bir cihazla algılanabilecek şekle dönüştürür. Antikor ve antijenin sandviçlenmesi için değişik varyasyonlar olup çeşitli antikorların en son enzim bağlı antikor bağlanmadan önce uygulanmasını da içerebilir. Tipik ELISA algılama limitleri endospor ve tüm hücre algılaması için  $10^4$ - $10^6$  bakteri aralığındadır [Speight ve ark., 1997; Rowe ve ark., 1999]. ELISA'nın tipik dezavantajları ise analiz çalıştırma süresi ve düşük raf ömrü olan yenilenebilir ajanlara gerek duyulmasıdır [Banada ve Bhunia, 2008].



Şekil 2.5. Tipik bir ELISA testinde uygulanan basamaklar

ELISA'nın hassaslığını ve algılama süresini iyileştiren varyasyonları geliştirilmiştir. Bakteriyal spora serin ultrasonik kaviteasyon uygulandığında 20 kat daha iyi algılama yapılmıştır [Borthwick ve ark., 2005]. Taşınabilir bir ELISA bazlı algılama cihazı lazer-indüklü floresans algılama sistemi bir tek endospor veya bakteriyi algılayabilmektedir [Song ve ark., 2005]. Hızlı ve hassas kürecik bazlı enzim etiketli bir immün analiz sistemi sporların algılanması için geliştirilmiştir [Farrell ve ark., 2005]. Floresan-difosfatın floresana enzimatik çevrimi eş zamanlı olarak 30 dk.'da lüminisans spektrometre ile  $2,6 \times 10^3$  endospor/mL limitinde ölçülmüştür [Banada ve Bhunia, 2008].

### 2.6.3. Raman spektroskopisi tekniği

Raman spektroskopisi sağlam bir mikroorganizmanın benzersiz spektral işaretlerini üretebilen bir tekniktir. On yıldan fazla süren çalışmalar bu bütün organizma işaretlerinin bakteriler, maya ve sporlar dahil patojenlerin belirlenmesinde suş düzeyinde birbirine çok benzeyen mikroorganizmalar üzerinde bile başarıyla kullanılabilđini göstermiştir. Raman mikroskopisi ve yüzeyde kuvvetlendirilmiş Raman dağılımı (SERS) gibi yeni bulunan teknikler sinyalin büyüklüğünü arttırarak tek bir hücre hassasiyetinde Raman işaretlemesi yapılabilmesini sağlamıştır. Daha yakın zamanda Raman mikroskopisi ve SERS biyomolekül yakalanması ile entegre edilerek mikro SERS denilen yeni bir mikro analiz teknolojisi üretilmiştir. Bununla patojenlerin ve toksinlerin karmaşık örneklerden, etiketsiz, örneğin ön işlemesi veya kültürü yapılmadan hızla belirlenmesi yapılabilmektedir. İşaret tanıma teknikleri ile birleştirilebilen örnek toplanması, konsantrasyonu ve işlenmesi için yaratıcı yöntemler gözden geçirilmektedir. Ayrıca bakterilerin, sporların ve toksinlerin kompleks örnekler içinde belirlenebilmesi için mikro SERS analizindeki son gelişmeler sunulmakta; canlı veya cansız mikroorganizmaların ayırt edilmesi; mikrobiyal fenotiplerin üreme koşullarının belirlenmesi yakalama biyomolekülleri için seçicilikleri/ilgileri değerlendirilebilmektedir [Grow, 2008].

Titreşim spektroskopisi (İnfrared spektroskopisi veya Raman gibi) patojenlerin algılanmasını ve tanınmasını herhangi bir ekstakt, büyütme, etiketleme veya boyama adımlarına gerek olmadan yapabilmektedir. İnfrared spektroskopisinin bakterileri tanıma potansiyeli 1950'lerin başlarında görülmüştür [Stevenson ve Bolduan, 1952; Thomas ve Greenstreet, 1954]. Bu spektral analiz problemi bilinmeyen kimyasallar için yaygın olarak kullanılan problemle temelde aynıdır. Bilinmeyen bir kimyasalın spektrumu toplanarak çok sayıda bilinen kimyasalın spektrasının bulunduğu bir referans veri tabanı ile karşılaştırılmaktadır. Her bileşik kendi özel spektrumunu veya işaretini ürettiği için bilinmeyen sadece spektral işaretini kullanarak tanınabilir. Benzer şekilde infrared spektroskopisi bütün bir bakteriyi analiz etmek için kullanıldığında elde edilen "bütün-organizma işareti" tanıma yapmak için bilinen

bakterilerin işaret veri tabanı üzerinde kullanılabilir [Grow, 2008]. Ancak bakteriyal işaret hücrenin bileşiminde bulunan bütün kimyasalların bütünleşik spektrasından oluştuğu için bakteri tanınması daha zordur. Hücre bileşenlerinin çok olması nedeniyle spektral aralığın içinde dağılmış birbiri üstüne binmiş spektral bantlar görülmekte ve spektra sinyalleri yerine geniş ve kompleks konturlar göstermektedir. Bu ise kaynağı bilinmeyen bir işaretin büyük referans veri tabanları ile karşılaştırılmasını daha da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle doku tanıma algoritmaları geliştirilene kadar bakteri tanınması konusunda çok az ilerleme sağlanmıştır. Arama algoritmaları, küme analizi ve çok değişkenli istatistiklerin kullanılarak bilinmeyen organizmaların işareti referans 1 veri tabanındaki bilinen organizmaların infrared spektroskopisi işaretleri ile karşılaştırılmakta ve bakterilerin tür ve suş düzeyinde yüksek doğrulukla tanınması yapılabilmektedir [Helm ve ark., 1991; Naumann ve ark., 1991; Holt ve ark., 1995]. Klinik örnekler gibi kompleks ortamlarda bakteri tanınması yapabilmek için örnek konur ve mikro koloniler standart koşullarda üretilir ve toplanan işaret referans veri tabanında aranır. İnfrared işaretleme o kadar hassastır ki biyokemotipleme, plazmit veya lipopolisakkarit doku analizinden, multilokus enzim elektroforez, dış zar veya bütün hücre protein doku analizinden daha faydalı bir şekilde epidemiyoloji uygulamalarında suşların tanınmasında kullanılabilir [Seltmann ve ark., 1994].

#### **2.6.4. Floresan tanılama yöntemi**

Sensörlerde floresan görüntüleme ile bakteri immobilizasyon tespiti, hem patojenlere karşı tanıma spesifikliğinin hemde sensörlerin kantitatif yanıtlarının doğrulanmasına olanak sağlar [Boujday ve ark., 2008].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada kullanılan nanopartiküller

Çalışmalarda kullanılan manyetik özelliğe sahip olan küre, çubuk ve küp formundaki Fe-Au nanopartiküller ve bunların immünoensör modifikasyon işlemleri için ara basamak olan partiküllerin avidin kaplanması Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Uğur Tamer ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

*L. monocytogenes* tanılamaya yönelik sentezlenmiş olan immünoensör modelinde avidin bağlı nanopartiküller kullanılmıştır. Manyetik Fe-Au yapısındaki küre nanopartiküllerin yüzeyindeki karbonil grupları aktif hale getirilmiş daha sonra 0,5 mg/mL'lik avidin tamponu içerisinde bu partiküller 30 dk. boyunca bekletilerek avidin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Avidin bağlı küre yüzeylere biyotinli *L. monocytogenes*'e spesifik antikorun bağlanması ise avidin-biotin afinitesi üzerinden gerçekleştirilmiştir. 0,1 mg/mL biotin işaretli antikorun fosfat tamponu (PBS) ile hazırlanmış çözeltisi içine avidin bağlı küre partiküllerin bırakılması ve 30 dk. etkileştirilmesiyle sensör modeli elde edilmiştir. Bu sensör modeli üzerinde spesifik olmayan bağlanmaların engellenebilmesi için açığta kalan karbonil grupları % 10'luk etanol amin çözeltisi ile kapatılmıştır.

Ayrıca küre formundaki antikor bağlı nanopartiküller Raman çalışması için hazırlanan 5,5'- ditiyobis (DTNB) bağlı çubuk formundaki antikorlu altın nanopartiküller ile immünoensör modeli için modifiye edilerek araştırmalarda kullanılmıştır.



### 3.1.2. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bu çalışma kapsamında 3 tür mikroorganizmanın saf kültürleri kullanılmıştır. Tüm bakterilerle yapılan çalışmalarda, bakterilerin saflıkları Gram boyama sonrası ışık mikroskopunda morfolojik inceleme ve çizgi ekimle koloni morfolojilerine göre yapılmıştır. Ticari olarak elde edilmiş *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşlarının yanı sıra Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu suşları içerisinde bulunan, *Salmonella typhimurium* BAST01 suşu da çalışmalarda kullanılmıştır.

### 3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

#### Nutrient Sıvı Besi Yeri

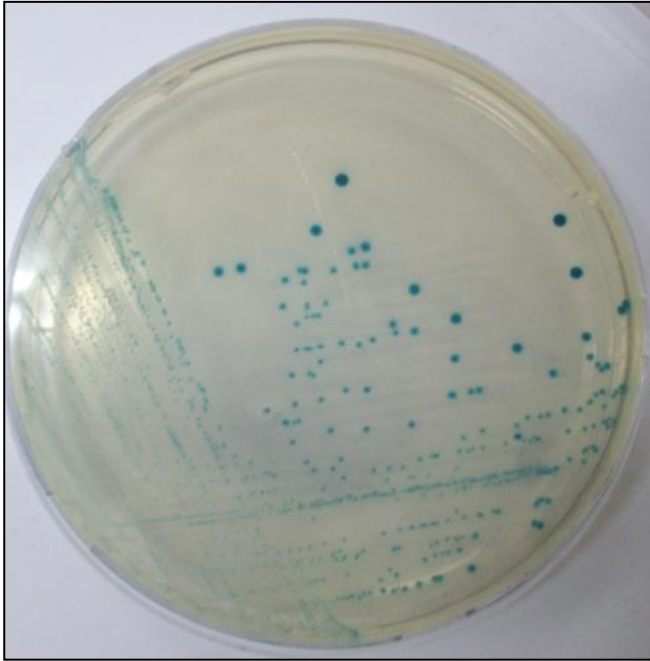
Çalışmalarda kullanılan *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* bakterilerini geliştirmek için genel bir besi yeri olan Nutrient sıvı besi yeri kullanılmıştır. Nutrient sıvı besiyeri için Çizelge 3.1’de verilen maddeler hazırlanılacak miktara göre oranlanıp tartılarak üzeri istenilen miktarda distile su ile tamamlanmıştır. Besi yeri pH’ ı  $7,5 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için ise besiyerine bunlara ilaveten % 1,5 oranında agar (Merck) eklenerek otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ ’de 15 dk. steril edilmiştir.

Çizelge 3.1. Nutrient sıvı besi yeri içeriği

Maddeler	Miktar (1000 mL)
<b>Pepton</b>	<b>10 g</b>
<b>Et özütü</b>	<b>10 g</b>
<b>Sodyum klorür</b>	<b>5 g</b>

### CHROMagar Listeria

CHROMagar Listeria besi yerinde *L. monocytogenes* suşları Resim 3.1'de gösterildiği gibi mavi renk koloni oluşturmaktadır. Bu besi yerinin kullanımı hem test amaçlı olarak hem de karışık kültürlerde yapılan koloni sayımlarında *L. monocytogenes* kolonilerinin kolaylıkla ayırımı sağlamıştır.



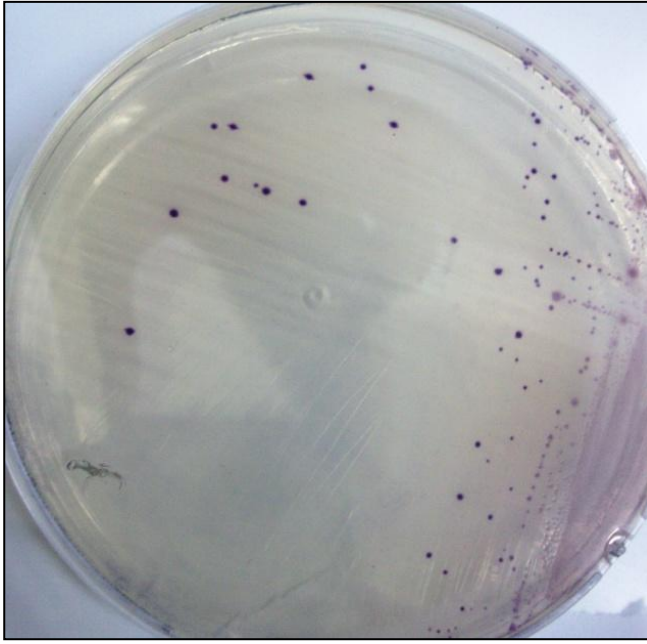
Resim 3.1. CHROMagar Listeria besi yerinde *L. monocytogenes* kolonileri

#### *Hazırlanışı:*

1000 mL'lik besi yeri için 51,5 g CHROMagar Listeria besiyeri (LM852) tozundan kullanılmaktadır. Hazırlanacak miktara göre oranlanıp tartılarak üzeri distile su ile tamamlanmıştır. Bu besi yeri pH' ı  $7,0 \pm 0,5$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra otoklavda  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk. steril edilmiştir.  $47\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' lik su banyosunda soğutulmuş ve petrilere alınmıştır.

### CHROMagar Salmonella

CHROMagar Salmonella besi yerinde *S. typhimurium* suşları Resim 3.2’de gösterildiği gibi leylak renginde koloniler oluşturmaktadır. Bu besi yerinin kullanımı hem test amaçlı olarak hem de karışık kültürlerde yapılan koloni sayımlarında *S. typhimurium* kolonilerinin kolaylıkla ayırımını sağlamıştır.



Resim 3.2. CHROMagar Salmonella besi yerinde *S. typhimurium* kolonileri

#### *Hazırlanışı:*

1000 mL’lik besi yeri için 34,9 g CHROMagar Salmonella besiyeri tozundan (SA132) tartılmaktadır. Hazırlanacak miktara göre oranlanıp tartılarak üzeri distile su ile tamamlanmıştır. Bu besi yeri pH’ı  $7,6 \pm 0,2$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Manyetik karıştırıcıda maddenin distile su içerisinde çözünmesi sağlandıktan sonra 100 °C’ye ayarlanmış su banyosunda besi yeri kaynatılmıştır. Daha sonra 45-50°C’lik su banyosunda soğutulmuş ve petrilere alınmıştır.

### 3.1.4. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Sitotoksosite çalışmalarında kullanılan sağlıklı hücre hattı (gingival fibroblast), ve antikanserojenik etkinin belirlenmesinde kullanılan kolorektal kanser hücre hattı (CCL-221), serviks kanser hücre hattı (HeLa) ve göğüs kanser hücre hattı (Mcf 7) Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezin'den (MOBAM) temin edilmiştir. Hücreler %10 fetal sığır serumunda (FBS, Gibco), % 1 penisilin/streptomisin antibiyotiği (Sigma) içeren DMEM (İnvitrogen) besi ortamında 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde geliştirilmiştir. Her üç günde bir besi ortamı değiştirilmiştir [Morita ve ark., 2002]. Kültür kaplarında % 80 yayılma gösteren hücreler Tripsin/EDTA çözeltisi ile kaldırılarak sayılmıştır. Sayılan hücreler 96 kuyulu mikropalakalara alınarak geliştirilmiştir.

### 3.1.5. Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanması

#### Fosfat Tampon Tuz (Phosphate Buffered Saline -PBS) Çözeltisi

PBS çözeltisinin hazırlanmasında 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltileri karıştırılarak pH değeri 7,4 olan tampon hazırlanmıştır. Daha sonra tampon içerisine son hacimde 8 g/L NaCl ve 0,2 g/L KCl olacak şekilde tuz ilavesi yapılarak PBS tamponu elde edilmiştir.

#### Serum Fizyolojik (SF) Çözeltisi

0,875 g NaCl tartılıp üzeri 100 mL distile su ile tamamlanmıştır. Böylece % 0,875'lik bir NaCl çözelti elde edilmiştir.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Bakterilerin aktifleştirilmesi ve gelişme ortamları

*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium* bakteri kültürleri Nutrient sıvı besi yerinde % 2 oranında aşılıdıktan sonra 37 °C'de etüvde 24 saat geliştirilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş ve ışık mikroskopunda kontrol edilmiş saf kültürler kullanılmıştır.

### 3.2.2. Nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenebilmesi için 2 farklı yöntem kullanılmıştır.

İlk yöntem tarafımızdan geliştirilmiş ve sentezlenmiş olan küre formundaki manyetik demir-altın nanopartiküllerin *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *S. typhimurium* suşlarına karşı ayrı ayrı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Her bir bakteri stoğu nutrient sıvı besi yerinde 2 kez aktiflendikten sonra çalışılmıştır. Tüm bakteri aktiflerinin yoğunlukları McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile 0,5' e (*L. monocytogenes*, ~ 10<sup>7</sup>; *S. aureus*, ~ 10<sup>10</sup>; *S. typhimurium*, ~ 10<sup>7</sup> cfu/mL) ayarlandıktan sonra daha önceden hazırlanmış olan steril, nutrient sıvı besi yerine 100 µL kadar aşılıp, bu kontrol olarak kullanılmıştır. Bir diğeri nutrient sıvı besi yerinde ise 100 µL bakteri solüsyonunun yanı sıra 100 µL'de konsantrasyonu 1 mg/mL olan nanopartikül solüsyonundan ilave edilmiştir. Tüm bu karışımlar 24 saat boyunca 37 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Seri dilüsyonlar sonrasında nutrient agara yapılan ekimlerle canlılıklar belirlenerek, sonuçlar kontrollerle karşılaştırılmıştır.

İkinci yöntemde ise, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *S. typhimurium* suşları 2 kez aktiflendikten sonra yoğunlukları ayrı ayrı McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile 0,5' e (*L. monocytogenes*, ~ 10<sup>7</sup>; *S. aureus*, ~ 10<sup>10</sup>; *S. typhimurium*, ~ 10<sup>7</sup> cfu/mL) ayarlanmıştır. Daha önceden hazırlanmış ve steril edilmiş olan içerisinde % 1,5'lük

agar bulunan 3 adet 250 mL'lik nutrient sıvı besi yerine bu bakterilerden %1 oranında aşılmıştır. Daha sonra bu karışım petrilere dökülerek donma işlemi gerçekleştirildikten sonra agarda delgeç yardımıyla kuyular açılmıştır. Bu kuyulara 1 mg/mL konsantrasyonunda ki nanopartikül solüsyonundan 25 µL ilave edilmiştir. 24 saatlik 37 °C'lik etüvde inkübasyon sonrası canlılık araştırılmıştır [Reinheimer ve ark., 1990]. Tüm antimikrobiyal çalışmaları beş paralelli ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 3.2.3. Nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi

Nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerinin belirlenebilmesi için çeşitli konsantrasyonlarda (0,1–5 mg/mL) manyetik demir-altın özelliğine sahip küre, çubuk ve küp şekillerine sahip nanopartiküller ve bu partiküllere avidin bağlandıktan sonraki modifiye küre partiküller kullanılmıştır. Partiküllerin antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürücü etki ve lipid peroksidasyon yöntemleri ile araştırılmıştır.

#### DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) giderim metodu

Nanopartiküllerin radikal süpürücü aktivitesi, Blois'in metotuna göre bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. DPPH'ın metanol solüsyonunun etkisini düşürme kapasitesine göre spektrofotometrik yöntem kullanılarak partiküllerin serbest radikal giderim kapasiteleri saptanmıştır.

Çalışma yapılacak olan nanopartiküller iyice sonike edildikten sonra ekstrakt solüsyonları, % 0,004' lük DPPH (metanol içerisinde) solüsyonuna eklenmiş ve karışım kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır. Daha sonra bu karışım oda sıcaklığında 30 dk. boyunca karanlıkta yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından bu karışım 12.500 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüj edilerek partiküllerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üst fazları 517 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-800) blank'e karşı okunmuştur

[Blois ve ark., 1958]. Örneklerin, DPPH serbest radikalini giderme oranı (% I) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% I = ( [ A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} ] / A_{\text{kontrol}} ) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  : Blank'in absorbans değeri,  $A_{\text{örnek}}$  : Test edilen örneğin absorbansını ifade etmektedir.

Çalışmalar üç kere tekrarlanmış ve doğal antioksidan özelliğindeki BHA (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol), BHT (butylated hydroxyanisole) ve  $\alpha$ - tokoferol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### Plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu

Plazma (0,4 mL; Gazi Üniversitesi Hastanesi, Kan Merkezi'nden elde edilmiştir.), 0,1 mL Fe SO<sub>4</sub> solüsyonu, (0,5 Mm), 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 Mm) ve 0,2 mL çalışılacak olan farklı nanopartikül konsantrasyonları (2 mg/mL) karıştırılıp 37 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyon solüsyonları 375  $\mu$ L trikloroasetik asit (4 %) ve 75  $\mu$ L BHT (0,5 Mm) eklenerek 5 dk. boyunca buz banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra 8000 rpm'de 15 dk. santrifüj yapıp, üst fazları çalışılmak üzere elde edilmiştir. Bu üst fazlara TBA (2-thiobarbituric acid) (0,2 mL; 0,6 %) ilave edilmiştir. Karışım iyice çalkalanarak 95 °C' lik su banyosunda 30 dk. bekletilip sonrasında soğutulmuştur. Karışımın içerisine karışımla aynı oranda 1-bütanol eklenip çalkalandıktan sonra absorbans değerleri spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-800) 532 nm'de ölçülmüştür [Martinez ve Torres, 1992]. Örneklerin, lipid peroksidasyonunu yüzde inhibe edici aktiviteleri (%I) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% I = ( [ A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} ] / A_{\text{kontrol}} ) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  : Blank'in absorbans değeri,  $A_{\text{örnek}}$  : Test edilen örneğin absorbans değerini ifade etmektedir.

### 3.2.4. Nanopartiküllerin sitotoksik ve antikanserojenik etkilerinin belirlenmesi

Partiküllerin çeşitli konsantrasyonlarda (0,005 – 0,1 mg/mL) değişik hücre hatları üzerindeki (CCL-221, He La, Mcf 7, Gingival fibroblast) etkileri ticari olarak elde edilmiş “Cayman’s WST-1 Cell Proliferation Assay Kit” (Katolog No: 10008883) ile incelenmiştir. Bu kit ile nanopartiküllerin hücrelerin gelişimi üzerindeki arttırıcı ya da engelleyici etkileri *in-vitro* olarak araştırılmıştır. 96 kuyucuklu plaklarda  $10^4$ - $10^5$  hücre/plak yoğunluğunda hücre bulunan kuyucuklara 100 µL DMEM içerisinde test edilecek nanopartikül konsantrasyonları uygulanmıştır. 24 saat boyunca  $37^{\circ}\text{C}$ 'de  $\text{CO}_2$ ' li etüvde inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerine her bir kuyucuğa 10 µL kit içerisinde bulunan maddelerle elde edilmiş WST-1 karışımı uygulanmıştır. 1 dk. kadar yatay çalkalayıcıda bekletilen plak 2 saat tekrar  $\text{CO}_2$ ' li etüvde bekletilir ve oluşan renk dağılımının homojen olması için 1 dk. yatay çalkalayıcıda bekletilen plağın 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda (Biotek-Epoch) absorbans değerleri okutulmuştur. Kontrol olarak, örnek konulmadan 100 µL DMEM ile muamele edilen kuyucukların absorbans değerleri kullanılmıştır. Uygulanan nanopartikül konsantrasyonlarının hücreler üzerindeki canlılığa olan etkileri yüzde canlılık olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  : Blank'in absorbans değeri,  $A_{\text{örnek}}$  : Test edilen örneğin absorbans değerini ifade etmektedir.

Yüzde Canlılıkları belirlenmiş olan hücrelerin yüzde ölüm oranlarında bu sonuca göre hesaplanmıştır. Yapılmış olan bu antikanserojenite ve sitotoksiste testleri beş paralelli ve iki tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Yapılan sitotoksik etki belirleme çalışmalarında kit yönteminin yanı sıra hücreler partiküller ile muamele edildikten sonra, partiküllerin hücrelerde neden olabileceği ölümlerin gözlemlenebilmesi için floresan mikroskopta canlı ve ölü hücrelerin belirlendiği bir metod kullanılmıştır. Bu metod; apoptotik, nekrotik ve canlı



hücrelerin floresan mikroskopta farklı ışınlar yaparak canlı-ölü hücrelerin kolaylıkla ayrımını sağlayabilen bir çift boyama yöntemidir. Bu metotta kit yönteminde kullanılmış olan en yüksek konsantrasyon olan 0,1 mg/mL'lik küre ve avidinli küre partikül solüsyonları, en yüksek antikanserojenik etinin görüldüğü Mcf-7 ve CCL-221 hücrelerine uygulanmışlardır. 6 kuyucuklu plaklarda  $4 \times 10^4$ – $10^6$  hücre/plak yoğunluğunda hücre bulunan kuyucuklara DMEM içerisinde konsantrasyonu ayarlanmış olan partiküllerden 500 µL uygulanmıştır. 24 saat boyunca 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılan hücreler PBS ile yıkanmış ve bu hücrelerin üzerine hazırlanmış olan boya solüsyonundan ilave edilerek 15 dk. boyunca 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Bu çalışma solüsyonu, 2 µg/mL hoechst boyası, 1 µg/mL propidyum iyodür ve 100 µg/mL DNase (RNase içermeyen) içermektedir. Kuyucuklara bu boya solüsyonundan eklenmiş ve sonrasında 15 dk. kadar 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası PBS ile hücreler yıkanarak 40X' lik objektifle floresan mikroskopta incelenmiştir. Bu yöntem de hoechst boyası ile canlı hücreler mat mavi, apoptotik hücreler parlak mavi boyanırken, propidyum iyodid ile nekrotik hücreler ise pembe boyanmaktadır [Ada ve ark., 2010].

### 3.2.5. Nanopartiküllerin genotoksik etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada genotoksik etkinin belirlenebilmesi amacıyla sağlıklı gönüllülerden alınan kandaki lenfositler izole edilerek kullanılmıştır. Bunun için gerekli olan etik rapor Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 163 karar numarası ile onaylanmış ve bu rapor ek 1'de sunulmuştur. Çalışılan her nanopartikül çeşiti için gönüllülerden (25-30 yaş aralığında, sağlıklı, alkol, sigara ve ilaç kullanmayan) erkek ve bayan bireyler seçilmiştir. Bireylerden elde edilen kan lenfositleri üzerinde değişen nanopartikül konsantrasyonlarının DNA' da hasar oluşturup oluşturmadığı test edilmiştir. Bu hasarın araştırılmasında Singh ve arkadaşları [1988] tarafından geliştirilen Komet (tek hücre jel elektroforez) tekniği kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki tüm işlemler oluşabilecek ekstra bir DNA hasarının önlenmesi amacıyla karanlıkta yapılmıştır. İçerisinde heparin bulunan steril enjektör ile sağlıklı gönüllülerden alınmış olan kan örnekleri 1:1 oranında PBS (fosfat tampon çözeltisi) ile seyreltilmiştir. PBS ilave edilmiş kan örneğine 2 mL kadar Biocoll (lenfosit ayırıcı) eklenerek 4°C'ye ayarlanmış olan santrifüjde (Sigma-2-16 KC) 2400 rpm'de 20 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında ince bir tabaka halinde üst kısımda bulunan lenfositlerin 2 mL'si alınarak lenfosit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Alınan bu 2 mL'lik sıvı buz içerisine konulmuş olan yeni steril bir tüpe aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerine 2 mL PBS ilave edilip tekrar 20 dk. 2400 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası supernatant kısmı atılmış ve dipte kalan hücreler PBS içerisinde karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiştir. İzole edilmiş olan bu lenfositler çeşitli nanopartikül konsantrasyonları ile (0,005 – 0,1 mg/mL) muamele edilerek 1 saat boyunca 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 5 dk. boyunca 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve supernatant kısmı atılmıştır. Hücrelerin 100 µL'si ile 75 µL düşük erime ısılı agar karıştırılarak daha önceden normal erime ısılı agar ile kaplanmış olan lamlara damlatılarak lamelle yayma yapılmış ve üzerleri kapatılmıştır. Preperatlar buz üzerinde bekletilerek agarın katılaşması sağlanıp agar tabakası bozulmadan agar üzerindeki lameller dikkatlice alınmıştır. Bu preperatlar daha önceden hazırlanıp, buz dolabında soğuk bir şekilde bekleyen lizis çözeltisi içerisine daldırılarak buz dolabında 1 saat kadar bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamalar, içerisinde soğuk elektroforez tamponunun bulunduğu elektroforez tankında DNA sarmal yapısının bozulması için 20 dk. bekletilmiştir. Bu işlemden sonra 25 V, 300 mA' lik akım verilerek 20 dk. boyunca elektroforez uygulanmıştır. Lamalar 15 dk. süreyle nötralizasyon tampon çözeltisinde (pH: 7,5), 4°C'de bekletilmiştir. Son olarak lamalar üzerine etidyum bromidten (20 µg/mL) 50 µL alınıp yayılarak lamel ile lamalar kapatılmıştır. Boyanmış olan preperatlar Leica DFC 425C (Germany) marka floresan mikroskopunda bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, version 4.0, UK) her bir preperatta 100 hücre değerlendirilerek DNA hasar dereceleri kontrol grupları ile karşılaştırılarak DNA' da ki yüzde kuyruk hasarı

aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [Singh ve ark., 1988]. Komet testi çalışması beş paralelli ve iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Kuyruk DNA Hasarı} = 100 \times (\text{Kuyruk DNA Yoğunluğu} / \text{Hücre DNA Yoğunluğu})$$

### 3.2.6. Nanopartiküllerin sensör için fonksiyonlandırma aşamaları

#### Avidinli nanopartiküllere biyotinli antikor bağlanması

Sentezlenmiş olan manyetik özelliğe sahip demir-altın nano küreler üzerine avidin bağlanması antikorun bağlanması için bir ara basamak oluşturmaktadır. Ticari olarak elde edilmiş *L. monocytogenes* antikorunu (Novus Biologicals-NB100-62724) biyotin bağlanmış formdadır. Nanaopartikül yüzeyinin avidin ile modifiye edilmesi sayesinde avidin-biotin etkileşimi gerçekleşir ve antikor bu etkileşim sayesinde nanoyüzeye bağlanmış olur. 0,1 mg/mL biyotin işaretli antikor ve avidin bağlı nanopartiküller PBS tamponu içerisinde 30 dk. karıştırılarak etkileştirilmiştir. Burada kullanılan manyetik nanopartiküllerin derişimi 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Biotinli antikorların avidin-biotin afinitesi üzerinden bağlanması sağlanmıştır. Bağlanmayan biyotinli antikorlar PBS ile yapılan yıkamalarla ortamdan uzaklaştırılmıştır.

#### Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi

Nanopartiküllere avidinin bağlanmasından sonra biontinli antikorun bağlanması sağlanarak bakteriyi tanıyan nanosensör çalışması sonlandırılmıştır. Bu aşamadan sonra ortamda olması muhtemel açıkta kalan karbonil gruplarının kapatılması için %10 luk (v/v) etanolamin çözeltisi kullanılmıştır. Çözelti partiküller ile karıştırıcı üzerinde bir saat boyunca etkileştirilmiştir. İşlem sonunda yüzeyler ve nanopartiküller PBS ile iki kez yıkanmıştır.

### 3.2.7. Bakterilerin nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi

Bakterilerin nanopartikül yüzeylerine sensör modifikasyonundan önce ve sonra tutunma miktarlarının belirlenmesi için çeşitli mikrobiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullanılan bakterilerin her biri iki kez aktifleştirilerek deneyde kullanılmıştır. Hem çeşitli patojen mikroorganizmaların sensör öncesi yüzeylerde tutunumunu belirlemek amacıyla hemde hedef bakteri *L. monocytogenes* için oluşturulmuş sensörün hedefe yönelik başarısının belirlenebilmesi için kontrol amaçlı diğer bakterilerin de bulunduğu karışık kültür ortamlarında denemeler yapılmıştır. Bu çalışma bizim tarafımızdan geliştirilmiş bir metot olup benzer herhangi bir çalışma literatürlerde mevcut değildir.

#### Tek bir bakteri türü için bakterilerin nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi

Bu çalışmalarda *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ve *S.aureus* türlerinin küre ve avidinli küre yüzeylerdeki ayrı ayrı tutunum başarıları ve hedef bakteri olan *L. monocytogenes*'in immüno-sensör olarak tasarlanmış spesifik antikor bağlı nano yüzeylerdeki tutunma miktarları tespit edilmiştir.

Tüm bu tutunma çalışmalarında nanopartiküllerin konsantrasyonları steril SF (serum fizyolojik - 0,875 g/100 mL) içerisinde 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteriler çalışmalar için iki kez aktifleştirilmiş ve aktif kültürleri 10,000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek iki kez SF ile yıkanmış, pellet yine SF içerisinde süspanse edilmiştir. Yıkanan kültürün yoğunluğu McFarland cihazı ile (Grant-bio, DEN1) 0,5' e (*L. monocytogenes*,  $\sim 10^7$ ; *S. aureus*,  $\sim 10^{10}$ ; *S. typhimurium*,  $\sim 10^7$  cfu/mL) ayarlanmıştır. Daha sonra bulanıklığı ayarlanmış olan SF içerisindeki bakteri kültüründen ve SF içerisinde sonike edilerek dağıtılan 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartiküllerden eşit miktarlarda bir tüpe alınarak 30 dk. boyunca karanlık ortamda, yatay çalkalayıcıda orta hızda bekletilmiştir. Daha sonra miknatıs yardımıyla nanopartiküllerin ve ona tutunmuş olan bakterilerin tüpte

kalması sağlanarak 2 kere SF'le yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece tutunmayan bakteriler ortamdaki uzaklaştırılarak sadece partikül yüzeyine tutunan bakterilerin canlılık değerleri seri dilüsyonlar yapıp cfu/mL cinsinden hesaplanmıştır. Kontrol amaçlı olarak yoğunluğu McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile 0,5' e ayarlanmış bakteri kültür solüsyonundan ve steril SF'den eşit miktarlarda alınarak seri dilüsyonlarla Nutrient Agar'a ekimler yapılmıştır. Böylece ortamda bulunan bakterilerin ne kadarının tutunduğu cfu/mL cinsinden hesaplanmıştır.

#### Yarışmalı ortamlarda bakterilerin nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi

Yarışmalı ortamlarda yüzeylerde bakterilerin tutunma oranlarını tespit edebilmek için 2 ayrı çalışma yapılmıştır. İlk çalışmada *L. monocytogenes* ile *S. typhimurium*'un aynı ortamda bulunduğu ve *L. monocytogenes* ile *S. aureus*'un aynı ortamda bulunduğu karışık kültürlerin avidin bağlı nanoyüzeylerde (yüzeyi antikor ile modifiye edilmemiş) tutunma miktarları araştırılmış; diğer bir çalışmada ise immüno-sensörün *L. monocytogenes* türünü algılama başarısının test edilebilmesi için *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'un bulunduğu karışık kültürlerin ve *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium*'un bulunduğu karışık kültürlerin immüno-sensör olarak tasarlanmış (*L. monocytogenes*'e özgü antikor ile modifiye edilmiş) yüzeylerdeki tutunma miktarları belirlenmiştir.

*L. monocytogenes* ile *S. typhimurium*'un ve *L. monocytogenes* ile *S. aureus*'un bulunduğu karışık kültürlerin avidin bağlı nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi çalışmasında kullanılacak nanopartiküllerin konsantrasyonları steril SF (serum fizyolojik-0,875 g/ 100 mL) içerisinde 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her üç bakteri suşu da çalışmalar için iki kez aktive edilmiş ve aktif kültürleri 10,000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek iki kez SF ile yıkanmış, pellet yine SF içerisinde süspanse edilmiştir. Yıkanan tüm bakterilerin yoğunluğu (Grant-bio, DEN1) McFarland cihazı ile 1' e ayarlanmıştır. Yoğunlukları ayarlanmış olan kültürlerin her birinden 1 mL alınıp karıştırılarak yeni karışık bir kültür elde

edilmiştir. Daha sonra bu karışık bakteri kültüründen 2 mL ve SF içerisinde sonike edilerek dağıtılan 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartiküllerden 2 mL çekilip steril yeni bir tüpe alınmış ve 30 dk. boyunca karanlık ortamda, yatay çalkalayıcıda orta hızda bekletilmiştir. Daha sonra mıknatıs yardımıyla nanopartiküllerin ve ona tutunmuş olan bakterilerin tüpte kalması sağlanarak 2 kere SF'le yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece tutunmayan bakteriler ortamdan uzaklaştırılarak sadece partikül yüzeyine tutunan bakterilerin canlılık değerleri, seri dilüsyonlar yapıp önceden hazırlanmış olan CHROMagar Listeria ve CHROMagar Salmonella besi yerlerine ekilip cfu/mL cinsinden hesaplanmıştır. Kontrol amaçlı olarak aynı yoğunlukta karışık bakteri kültüründen ve steril SF'den eşit miktarlarda alınarak seri dilüsyonlarla aynı besi yerlerine ekimler yapılmıştır. Böylece ortamda bulunan bakterilerin hangisinden ne kadarının tutunduğu cfu/mL cinsinden hesaplanabilmiştir. Sayım için kullanılan CHROMagar Listeria besi yerinde *L. monocytogenes* kolonileri; mavi, 3 mm' den daha küçük, düzenli koloniler oluştururken *S. typhimurium* bakterileri bu besi yerinde gelişim göstermemekte ve *S. aureus* kolonileri ise krem rengi yuvarlak bir morfoloji göstermektedir. CHROMagar Salmonella besi yerinde ise *S. typhimurium* kolonileri leylak renkli koloniler oluşturmuştur. Bu besi yerleri kullanılarak canlılık sayımı sırasında kolonilerin hangi bakterilere ait olduğu rahatlıkla saptanabilmiştir.

İmmüno-sensör başarısının test edilmesi amacıyla *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerinin aynı ortam içerisinde bulunduğu ve yine *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* bakterilerinin aynı ortamda bulunduğu rekabet ortamları yaratılarak hedef bakteri olan *L. monocytogenes*'in nano boyutlu immüno-sensör yüzeyindeki tutunma miktarı belirlenmiştir. *L. monocytogenes*'e özgü antikor bağlanmış nanosensörlerin başarı oranı bu yöntemle belirlenmiştir. Çalışmada kullanılacak nanopartikül konsantrasyonu steril SF (serum fizyolojik-0,875 g/ 100 mL) içerisinde 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her üç bakteri suşu da çalışmalar için iki kez aktifleştirilmiş ve aktif kültürleri 10.000 rpm'de 15 dk. santrifüjlenerek iki kez SF ile yıkanmış, pellet yine SF içerisinde süspanse edilmiştir. Yıkanan tüm bakterilerin yoğunluğu McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile 1' e ayarlanmıştır.

Yoğunlukları ayarlanmış olan kültürlerin her birinden 250 µL alınıp karıştırılarak yeni 500 µL'lik karışık bir kültür elde edilmiştir. Daha sonra bu karışık bakteri kültürünün 500 µL'si ve SF içerisinde sonike edilerek dağıtılan 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartikülün 500 µL'si yeni bir tüpe alınıp 30 dk. boyunca karanlık ortamda, yatay çalkalayıcıda orta hızda etkileştirilmiştir. Daha sonra miknatıs yardımıyla nanopartiküllerin ve ona tutunmuş olan bakterilerin tüpte kalması sağlanarak 2 kere SF'le yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Böylece tutunmayan bakteriler ortamdan uzaklaştırılarak sadece partikül yüzeyine tutunan bakterilerin canlılık değerleri, seri dilüsyonlar yapıp önceden hazırlanmış olan CHROMagar Listeria besi yerine aktiflenmiştir. Kontrol amaçlı olarak çalışmada kullanılan bakteri yoğunluğunun tespiti için 500 µL'lik bu karışık bakteri kültürü ve 500 µL steril SF karışımından dilisyonlarla aynı besi yerine ekimler yapılmıştır ve böylece başlangıçta ortama koymuş olduğumuz bakterilerin canlılıkları cfu/mL cinsinden hesaplanabilmiştir.

### 3.2.8. Raman çalışmaları

DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc., Laramie, WY) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel-numune tutma haznesi ve CCD dedektor ile birlikte *L. monocytogenes* tayini için kullanılmıştır. Cihaz parametreleri ise 20x objektif, 112 mW lazer gücü, 60 saniye veri toplama süresi olarak ayarlanmıştır.

#### *L. monocytogenes* bakterisiyle yapılan SERS ölçümleri

Bu çalışmada sandviç immünoanaliz yöntemi kullanılmıştır. Bu nedenle hem *L. monocytogenes*'e özgü antikor ile modifiye edilmiş küre nanosensörler hem de Raman'da SERS etiketi olarak kullanılan DTNB molekülü ile işaretlenmiş ve yine *L. monocytogenes*'e özgü antikor ile kaplanmış nanoçubuk partiküller kullanılmıştır. Bakteriler önce antikor bağlı küre formundaki nanosensörler ile etkileştirilir. Ortamdaki nanosensörlerin *L. monocytogenes*'i tanıyıp yakalaması sağlanmış olmaktadır. Ortamdaki bağlanmayan bakteriler yıkama işlemleri ile

uzaklaştırılmıştır. Ancak yakalanmış olan bu bakterilerin Raman' da tayin edilebilmesi için antikor ve DTNB bağlı çubuk formundaki altın nanopartiküllerin de ortama verilerek bu yakalanmış olan *L. monocytogenes* bakterilerine bağlanması sağlanmıştır. Bu sayede geliştirilen nanosensörün bakteriyi tutma başarısı Raman tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

0,1 mg/mL biotin işaretli antikor ve avidin bağlı nanopartiküller PBS tamponu içerisinde 30 dk. karıştırılarak etkileştirilmiştir. Burada kullanılan manyetik nanosensörlerin derişimi 0,5 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

*L. monocytogenes* bakteri kültürleri nutrient besi yerine %2 oranında aşlandıktan sonra 37°C'lik etüvde 1 gün geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Bu kültürler 5000 rpm'de 10 dk. boyunca santrifüjlenerek besi yeri ortamından uzaklaştırılmış ve serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile bakteri yoğunluğu 0,5'e ayarlandıktan sonra bu tüpten içlerinde 900 µL SF bulunan 6 adet eppendorfa dilüsyonlar yapılarak  $10^{-6}$  yoğunluğa kadar bakteri dilüsyonları elde edilmiştir. Bu dilüsyonların her biri % 50 oranında tekrar SF ile seyreltilerek 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki *L. monocytogenes*'e özgü antikor bağlı manyetik demir altın nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. Bunun için her bir bakteri dilüsyonunun 200 µL'si ile 0,5 mg/mL'lik modifiye edilmiş nanopartiküllerin 200 µL'si 30 dk. boyunca yatay çalkalayıcıda karıştırılarak bakterilerin seçici partikül yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Bağlanmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için yüzeye tutunmuş bakteriler mıknatıs yardımıyla toplanıp 2 kere PBS ile yıkanarak yine 200 µL PBS tamponuna alınmıştır. Tutunmuş olan bakteri miktarının Raman'da tayin edilebilmesi için spesifik nanopartiküllere bağlanmış olan bu bakterilerin 200 µL'si ile antikor ve DTNB bağlı çubuk formundaki altın nanopartiküllerin 200 µL'si etkileştirilmiştir. Bu çalışmada nanosensöre bağlanmış olan bakteri miktarının belirlenmesi amacıyla mL'deki canlılık sayımları için CHROMagar Listeria katı besi yerine ekimler yapılmıştır.



### Süt numunesinde SERS ölçümü ile *L. monocytogenes* tayini

Raman Spektroskopisinde, SERS ölçümü tekniği ile geliştirilen analiz yönteminin gerçek örneklerde kullanılabilirliğinin test edilmesi amacıyla marketten alınan süt örneğinde *L. monocytogenes* tayinine yönelik çalışma yapılmış ve elde edilen sonuçlar klasik sayım metotları ile karşılaştırılmıştır.

Sandviç immünanaliz yöntemi bu çalışma içinde kullanılmıştır. *L. monocytogenes* bakteri kültürleri nutrient besiyerine % 2 oranında aşıldıktan sonra 37 °C'lik etüvde 1 gün geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda iki kez aktiveleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Bu kültürler 5000 rpm'de 10 dk. boyunca santrifüjlenerek besi yeri ortamından uzaklaştırılmış ve serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile bakteri yoğunluğu 0,5'e ayarlandıktan sonra bu tüpten içlerinde 900 µL SF bulunan 6 adet eppendorfa dilüsyonlar yapılarak  $10^{-6}$  yoğunluğa kadar bakteri dilüsyonları elde edilmiştir. Bu dilüsyonların her biri % 50 oranında tekrar SF ile seyreltilerek 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki *L. monocytogenes*'e özgü antikor bağlı manyetik demir altın nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. Bunun için 200 µL'lik süt örneklerinin bulunduğu steril eppendorfların içerisine her bir bakteri dilüsyonun 200 µL'si ile 0,5 mg/mL'lik modifiye edilmiş nanopartiküllerin 200 µL'si de ilave edilerek 30 dk. boyunca yatay çalkalayıcıda karıştırılıp bakterilerin seçici partikül yüzeylerine bağlanması sağlanmıştır. Bağlanmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için yüzeye tutunmuş bakteriler mıknatıs yardımıyla toplanıp 2 kere PBS ile yıkanarak yine 200 µL PBS tamponuna alınmıştır. Tutunmuş olan bakteri miktarının Raman'da tayin edilebilmesi için spesifik nanopartiküllere bağlanmış olan bu bakterilerin 200 µL'si ile antikor ve DTNB bağlı çubuk formundaki altın nanopartiküllerin 200 µL'si etkileştirilmiştir. Bu çalışmada nanosensöre bağlanmış olan bakteri miktarının belirlenmesi amacıyla mL'deki canlılık sayımları için CHROMagar Listeria katı besiyerine ekimler yapılmıştır.

### 3.2.9. SEM ve TEM analizleri ile nano yüzeylerde bakteri bağlanma tespiti

Bu çalışmada *L. monocytogenes*'in küre, avidin modifiyeli küre ve tasarlanmış olan immüno-sensör modelindeki partikül yüzeylerine tutunumlarını SEM ve TEM'de belirlemek ve görüntülemek amaçlanmıştır. Kontrol olarak *S. aureus* türlerinin de aynı partiküller üzerindeki tutunumları görüntülenmiş ve *L.monocytogenes* ile *S. aureus*'un bulunduğu karışık kültür ortamlarıda hazırlanarak yarışmalı durumlardaki tutunumlar görüntülenmiştir. Çalışmada *L. monocytogenes*'in yanında *S. aureus* türlerinin seçilmesinin nedeni bu iki bakteri türünün farklı mikroskobik morfolojiye sahip olmalıdır. *L. monocytogenes* bakterileri basil şeklindeyken *S. aureus* türleri kok şeklindedir. Bu sayede mikroskopta elde edilmiş bakteri görüntülerinin hangi bakteriye ait oldukları kolaylıkla tespit edilebilmiştir. Farklı *L. monocytogenes* bakteri kültürleri nutrient besi yerine % 2 oranında aşlandıktan sonra 37°C'lik etüvde 1 gün geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda iki kez aktifleştirilmiş kültürler kullanılmıştır. Bu kültürler 5000 rpm'de 10 dk. boyunca santrifüjlenerek besi yeri ortamından uzaklaştırılmış ve serum fizyolojik çözeltisi ile 2 kez yıkanmıştır. McFarland cihazı (Grant-bio, DEN1) ile bakteri yoğunluğu 0,5'e ayarlandıktan sonra bu tüpten içerisinde 900 µL SF bulunan eppendorfa dilüsyon yapılarak  $10^{-1}$  yoğunluğuna ulaşılmıştır. Bu dilüsyon % 50 oranında tekrar SF ile seyreltilerek 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartiküller ile 30 dk. boyunca yatay çalkalayıcıda bekletilmiştir. Yüzeye tutunmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması için yüzeye tutunmuş bakteriler mıknatıs yardımıyla toplanıp 2 kere PBS ile yıkanarak yine PBS tamponuna alınmıştır.

Ayrıca spesifikliğin test edilebilmesi için *S. aureus* ve *L. monocytogenes*'in bulunduğu karışık kültür ortamlarında da bu analizler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise McFarlandları 1'e ayarlanmış olan *S. aureus* ve *L. monocytogenes* bakterilerinden eşit miktarda alınarak içerisinde 900 µL SF bulunan eppendorfa dilüsyon yapıp  $10^{-1}$  yoğunluğuna ulaşılmıştır. Bu dilüsyon % 50 oranında tekrar SF ile seyreltilerek 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartiküller ile 30 dk. boyunca yatay çalkalayıcıda bekletilmiştir. Yüzeye tutunmayan bakterilerin ortamdan

uzaklaştırılması için yüzeye tutunmuş bakteriler mıknatıs yardımıyla toplanıp 2 kere PBS ile yıkanarak yine PBS tamponuna alınmıştır. SEM ve TEM analizleri için bu karışımlar kullanılmıştır. Bu deney metodunda, SEM ve TEM analizleri için örneklerin hazırlanması herhangi bir çalışma referans alınmadan tarafımızdan geliştirilmiş bir metottur.

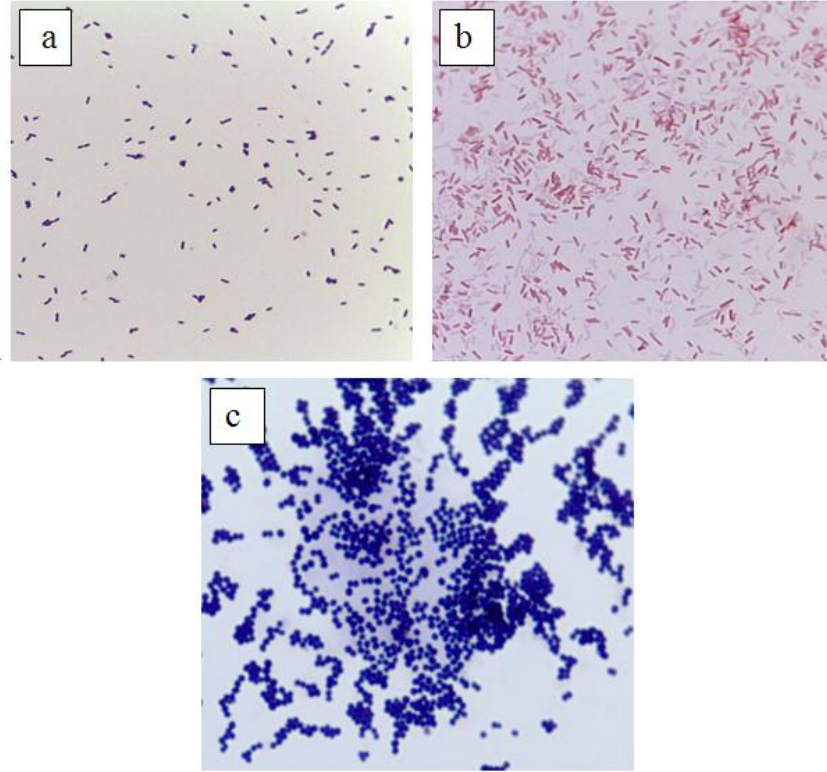
### **3.2.10. İstatistiksel analizler**

İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Pearson'un korelasyonuna göre, partiküllerin konsantrasyon artışlarıyla birlikte DPPH giderim aktiviteleri, plazma lipid peroksidasyonu, sitotoksik ve genotoksik etkilerinin arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. Çalışmalarda kullanılan farklı nanopartikül çeşitlerinin DPPH giderim aktiviteleri, plazma lipid peroksidasyonu, sitotoksik ve genotoksik aktivitelerinin değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığını belirleyebilmek için parametrik testlerden çift örnekli T testi, nonparametrik testlerden ise Wilcoxon işaret sıra testi ve Friedman testi ile kullanılmıştır. Örneklerin normal bir dağılıma sahip olup olmadığı bu analiz öncesinde tek örnekli Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Çalışılan Mikroorganizmaların Saflık Kontrolleri

Çalışmada kullanılan *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurium* bakterilerinin Gram boyamaları yapılarak, morfolojik kontrolleri yapılmış ve saflık durumlarına bakılmıştır. Mikroorganizmaların 100 X'lik objektifte çekilmiş mikroskopik görüntüleri Resim 4.1'de verilmiştir.



Resim 4.1. Çalışılmış olan patojen bakterilerin ışık mikroskopunda, 100 X'lik objektifte elde edilmiş görüntüleri (a- *L. monocytogenes* ATCC 7644; b- *S. typhimurium* BAST01; c- *S. aureus* ATCC 25923)

#### 4.2. Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Küre formundaki manyetik demir-altın nanopartiküllerin *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. typhimurium* BAST01 suşlarına karşı ayrı ayrı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenebilmesi için 3.2.2’de anlatılan yöntemler uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre nutrient sıvı besi yerinde geliştirilip, nutrient agara ayrı ayrı ekilmiş, bu üç kültürde de nanopartiküllerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları görülmüştür. İçerisinde nanopartikül bulunmayan, sadece *L. monocytogenes* bakterisi bulunan kontrollerde canlılık  $6,8 \times 10^7$  cfu/mL olarak belirlenmiştir. İçerisinde 1 mg/ml’lık konsantrasyonda nanopartiküllerin de bulunduğu tüpte ise *L. monocytogenes* canlılık sayımlarında ise  $6,5 \times 10^7$  cfu/mL olarak bulunmuştur. Aynı deneyler *S. aureus* ve *S.typhimurium* ile de yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Elde edilmiş olan bu canlılık miktarlarına baktığımızda birbirlerine çok benzer sonuçlar elde edilmiş ve ortamda bulunan nanopartiküllerin bakterilerin gelişimini etkilemediği tespit edilmiştir. Kuyu difüzyon yönteminde de benzer şekilde içerisinde bakteri bulunan donmuş katı besi yerinde kuyucuklar açılmış ve 1 mg/mL konsantrasyonundaki partiküller damlatılmış kuyuların çevresinde zon oluşumuna rastlanmamıştır.

Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin bazı bakteri türlerinde antimikrobiyal aktiviteleri

Bakteri Suşları	Kontrol Bakterilerinin Yoğunluğu (cfu/mL)	Test Bakterilerinin Yoğunluğu (cfu/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	$6,8 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$10,4 \times 10^{10}$	$9,9 \times 10^{10}$
<i>S. typhimurium</i> BAST01	$7,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$

Sonuçlara göre nanopartiküllerin herhangi bir antimikrobiyal aktivitesine rastlanmamıştır. Bu sonuç tutunma çalışmalarının güvenilir bir şekilde test edilme imkanını yaratmıştır. Çünkü tutunma sonuçlarında tutunan bakteri miktarı, agarda canlılık sayımı yöntemiyle belirlenmiştir. Eğer bu partiküller, bakteriler üzerinde öldürücü etki göstereceklerdi bakteriler öldüğü için tutunma sonucunda canlı bakteri sayıları düşük olacak, bu da nanopartiküllerin tutunma kapasitelerinin zayıf olduğu gibi yalancı negatif sonuç alınmasına neden olacaktı. Bakteri yüzeyindeki partikül tutunumlarının görüntülendiği SEM ve TEM analiz görüntülerinde partiküllerin bakteri yüzeyine tutundukları belirlenmiştir. Nanopartiküllerin antibakteriyel etkilerinin olmaması, partiküllerin bakteri hücresinin içerisine girmemeleri ile ilişkilendirilmiştir.

### 4.3. Nanopartiküllerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için, manyetik küre, çubuk ve küp şeklindeki nanopartiküller ve avidin bağlanmış küre şeklindeki nanopartiküllerin değişik konsantrasyonları (0,1–5 mg/mL) kullanılmıştır. Bu partiküllerin antioksidan aktiviteleri, DPPH giderim ve plazma lipid peroksidasyon inhibisyon yöntemleri esas alınarak tespit edilmiştir.

#### 4.3.1. Nanopartiküllerin DPPH giderim aktivitesi

Nanopartiküllerin serbest radikalleri süpürücü etkisine DPPH testi ile bakılmıştır. Ortama verilen bir çeşit radikal madde olan DPPH'nin ortama eklenen nanopartiküller tarafından süpürülmesi nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerine bağlıdır. Nanopartiküllerin yüzde DPPH giderim aktiviteleri belirlenmiş kontrol amacıyla kullanılmış sentetik antioksidanlarla (BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol) DPPH yüzde giderim aktiviteleriyle karşılaştırılmıştır.

DPPH radikali % giderim aktivitesi, tüm test edilen nanopartiküller için kendi artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak anlamlı artışlar göstermiştir. Bu da nanopartiküllerin, ortamdaki konsantrasyonlarının arttırıldığında DPPH radikalini süpürmede daha başarılı olduğunu göstermiştir. Ortama DPPH radikali verildiğinde oluşan mor rengin giderimi ile orantılı olarak antioksidan aktivite artmaktadır. Çalışmada 0,1-5 mg/mL arasında değişen 4 farklı konsantrasyon çeşitli nanopartiküller için kullanılmıştır. Bu nanopartiküller; küre, çubuk ve küp şeklindeki demir-altın nanopartiküller ile avidin bağlanmış küre nanopartiküllerdir. Nanopartikül çeşitleri arasında DPPH radikal giderim aktiviteleri en yüksekten düşüğe doğru; avidinli küre nanopartikül > küre nanopartikül > çubuk nanopartikül > küp nanopartikül olarak sıralanabilir. Burdan farklı şekillere sahip partiküllerin, farklı antioksidatif aktivitelere sahip oldukları sonucu çıkarılmıştır. Tüm bu nanopartikül çeşitleri arasında en yüksek DPPH giderim aktivitesi, avidin bağlanmış küre nanopartikülün en yüksek konsantrasyonunda 69,1 olarak tespit edilirken, küp nanopartiküllerin hiç bir konsantrasyonunda DPPH süpürücü etki bulunamamıştır.

Bu sonuçlara göre nanopartiküllere avidin bağlanarak antioksidan etkiyi arttırdığımızı söyleyebiliriz. Bu önemli bir sonuçtur çünkü immüno-sensör modeli oluşturulurken partiküllere avidin bağlanması gerekli bir ara basamaktır. Yapılacak olan bu mecburi modifikasyon ile aynı zamanda partiküllerin antioksidan aktivitesini de arttırmış oluyoruz. Denenmiş olan küp formundaki nanopartikül konsantrasyonlarının hiçbirinde antioksidan aktivite gözlenmemiştir. Test edilen nanopartiküllerin konsantrasyonları, bu konsantrasyonların DPPH giderim yüzdeleri ve sentetik antioksidanların (BHA, BHT,  $\alpha$ -Tokoferol) çeşitli konsantrasyonlarındaki antioksidan aktiviteleri Çizelge 4.2’de verilmiştir. Sentetik antioksidanlar, nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerine bakıldığı en düşük konsantrasyon olan 0,1 mg/mL’lik konsantrasyonlarda %  $92,1 \pm 0,1$  ile  $94,6 \pm 0,8$  arasında değişkenlik göstermişlerdir. Bu sonuçlara göre sentetik antioksidanların oldukça güçlü bir DPPH giderim aktivitesi olduğunu görmekteyiz. 0,1 mg/mL’lik nanopartikül konsantrasyonlarında bu giderim aktivitesi düşük bulunmuştur. Ancak nanopartikül konsantrasyonlarını arttırdığımız zaman avidinli küre nanopartiküllerin 5 mg/mL’lik konsantrasyonlarında DPPH giderim aktivitesinin %  $69,1 \pm 2,2$ ’ye kadar çıkabildiğini görmekteyiz. Konsantrasyon arttırıldığında aktivite de artmıştır. Bu da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Nanopartiküllerin sentetik antioksidanlara yakın sonuçlar verebilmesi de oldukça önemlidir.



Çizelge 4.2. Değişen konsantrasyonlarda, farklı şekillere sahip manyetik, Fe-Au nanopartiküllerin ve bazı sentetik antioksidanların % DPPH giderim aktiviteleri

Konsantrasyon (mg/mL)	Nanopartiküller (%)				Sentetik Antioksidanlar (%)		
	Küre Nanopartikül	Avidinli Küre Nanopartikül	Çubuk Nanopartikül	Küp Nanopartikül	BHA	BHT	$\alpha$ -Tokoferol
0,1	1,4 $\pm$ 0,6	8,1 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,6	b	94,6 $\pm$ 0,8	92,1 $\pm$ 0,1	93,7 $\pm$ 1,5
0,5	7,6 $\pm$ 0,4	17,4 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,8	b	96,4 $\pm$ 2,1	94,6 $\pm$ 2,2	95,9 $\pm$ 0,8
1,0	11,7 $\pm$ 1,6	25,8 $\pm$ 1,5	9,0 $\pm$ 0,1	b	98,7 $\pm$ 1,5	96,1 $\pm$ 0,4	96,9 $\pm$ 2,2
5,0	17,8 $\pm$ 2,1	69,1 $\pm$ 2,2	14,4 $\pm$ 0,1	b	99,3 $\pm$ 0,6	98,7 $\pm$ 0,6	99,8 $\pm$ 0,4

b: DPPH aktivitesi bulunmamaktadır

#### 4.3.2. Plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu

Yapılmış olan bu çalışmada kan plazmasında bulunan lipidlerin peroksidasyonu sağlanarak, bu oksidasyonun nanopartiküller tarafından inhibisyon yüzdelerinin hesaplanması amaçlanmıştır. Çalışmada küre, çubuk ve küp şekline sahip demir-altın nanopartiküller ile avidin bağlanmış küre formundaki nanopartiküllerin 0,1-5 mg/mL aralığındaki 4 farklı konsantrasyonu incelenmiştir. Tüm nanopartikül çeşitlerinde görülen ortak sonuç, konsantrasyon miktarlarına bağlı olarak lipid peroksidasyon inhibisyonunun da doğru orantı göstermesidir. Bu durum istatistiksel olarakta anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). En yüksek inhibisyon yüzdesi, avidin bağlı küre nanopartikülün 5 mg/mL'lik konsantrasyonunda görülmüştür (% 44,8). Burada test edilen nanopartiküllerin yüzde plazma lipid peroksidasyon inhibisyonları en yüksekten düşüğe doğru; avidinli küre nanopartikül > küre nanopartikül > çubuk nanopartikül > küp nanopartikül olarak sıralanabilir. Bu açıdan burada elde edilen sonuçlar DPPH giderim metoduyla da benzerlik göstermektedir. Küp formundaki nanopartikülün farklı konsantrasyon denemeleri ise en düşük inhibisyon yüzdesinin bu formda olduğunu göstermiştir. Tüm nanopartiküller ve konsantrasyonlarının yüzde plazma lipid peroksidasyon inhibisyonları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Değişen konsantrasyonlarda, farklı şekillere sahip, manyetik Fe-Au nanopartiküllerin % plazma lipid peroksidasyon giderimleri

Konsantrasyonlar (mg/mL)	Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu (%)			
	Küre Nanopartikül	Avidinli Küre Nanopartikül	Çubuk Nanopartikül	Küp Nanopartikül
0,1	7,1 ± 0,5	19,3 ± 0,1	4,4 ± 1,3	b
0,5	8,5 ± 0,5	21,9 ± 0,4	8,8 ± 1,2	b
1,0	23,0 ± 1,4	27,9 ± 1,4	22,5 ± 0,1	19,7 ± 0,6
5,0	27,0 ± 0,9	44,8 ± 1,3	28,4 ± 1,6	22,9 ± 0,9

b: Plazma lipid peroksidasyon giderimi bulunmamaktadır.

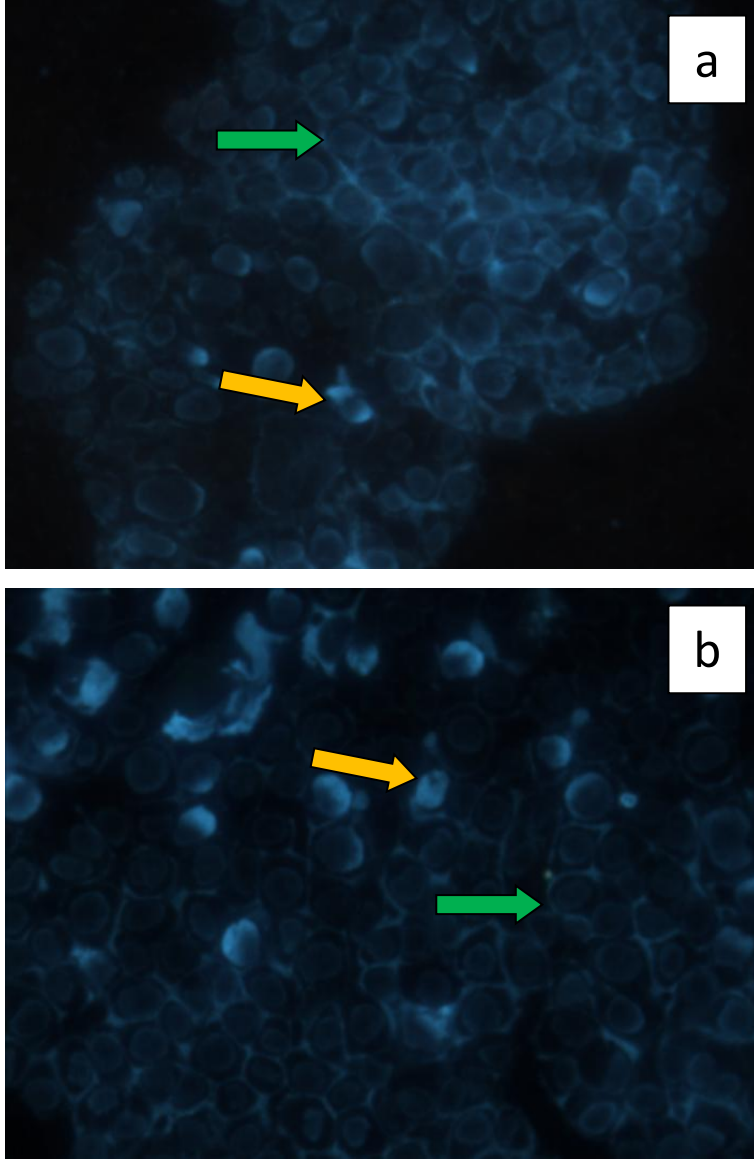
#### **4.4. Nanopartiküllerin Sitotoksik ve Antikanserojenik Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Sitotoksosite testi için sağlıklı hücre hattı olarak gingival fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır. Antikanserojenik etkinin belirlenebilmesi için ise, farklı kanserli hücre hatları (CCL-221, HeLa, Mcf 7) kullanılmıştır. Yapılmış olan antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan nanopartiküller arasından en yüksek aktiviteyi gösterdikleri için küre şeklindeki nanopartiküller ile avidin bağlanmış küre nanopartiküller sitotoksosite ve antikanserojenite testleri için seçilmiştir. Tüm hücrelerde, nanopartikül konsantrasyonlarındaki artış hücre ölüm yüzdesini de belirgin miktarda arttırmıştır. Ancak partiküllerin tüm konsantrasyonlarının kanserli hücrelere nazaran, sağlıklı hücre hattı (gingival fibroblast) üzerinde daha az öldürücü etki göstermesi bu partiküllerin kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Partiküllerin sağlıklı hücredeki, sitotoksik etkilerinin düşük olması biyoyumluluklarını arttırmaktadır. Canlı sistemlerde de çeşitli amaçlarla kullanılabilen partiküllerin biyolojik uyumlu olmaları istenilen bir özelliktir. Bu nedenle sitotoksik etkisi düşük olan partiküllerin canlı sistemlerde kullanılması avantaj sağlayacaktır. Çalışmalarımızda en düşük sitotoksik etkiyi 0,005 mg/mL konsantrasyonundaki avidinli küre nanopartikül, gingival fibroblast hücresinde göstermiştir (% 1). Test edilen partiküllerin konsantrasyonlarının artışıyla sitotoksik etkinin de arttığı belirlenmiştir. Bu da istatistiksel olarak yapılan korelasyon çalışmasıyla anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Partiküllerin kanser hücrelerinin canlılığında belirli oranlarda azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Avidinli ve avidinsiz kürede tüm kanser hücrelerinde çok büyük bir fark görülmemekle birlikte, en yüksek antikanserojenik etkiyi küre formundaki (0,1 mg/mL) nanopartikül, Mcf 7 hücre hattı üzerinde göstermiştir (% 34). Partiküllerin çeşitli konsantrasyonlarının bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik ve antikanserojenik etkileri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

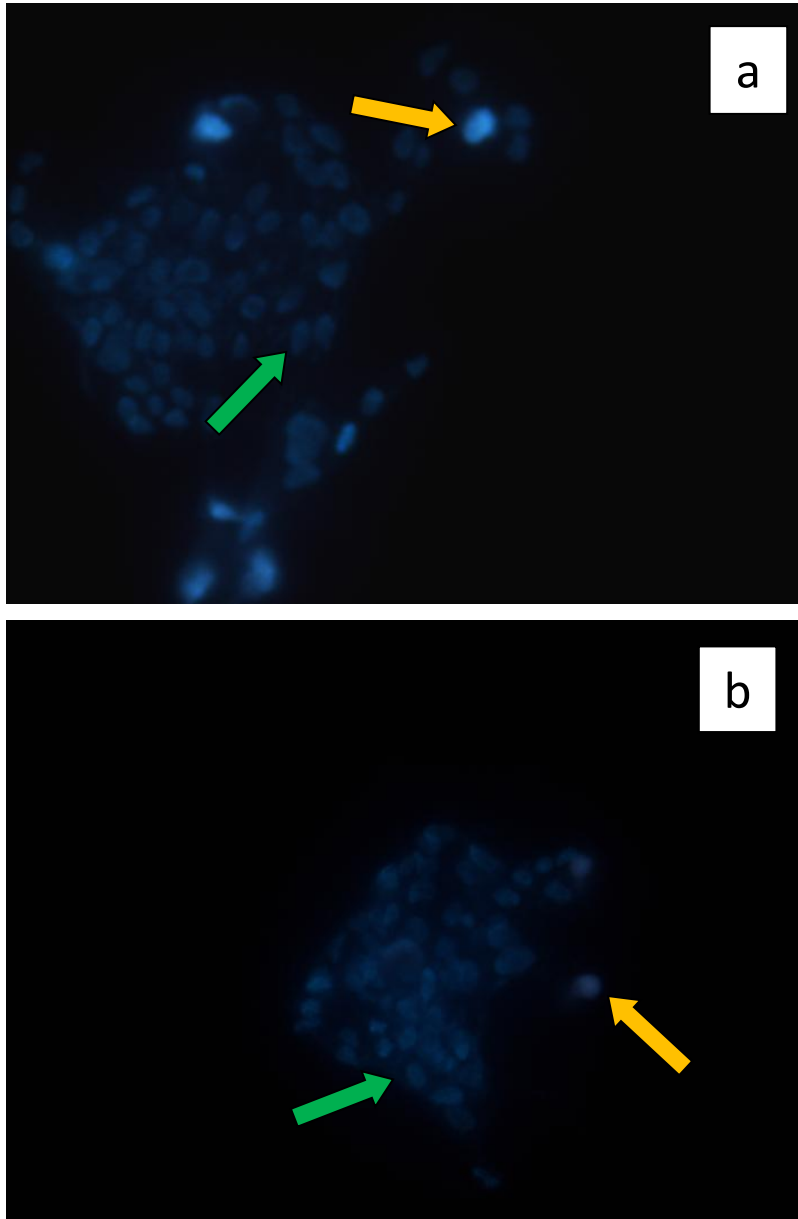
Çizelge 4.4. Değişen konsantrasyonlarda küre ve avidinli küre formundaki manyetik Fe-Au nanopartiküllerin bazı hücre hatlarında meydana getirdikleri antikanserojenik ve sitotoksik etkiler

		% Ölüm Oranları			
Test Edilen Nanopartikül Çeşitleri	Konsantrasyonlar (mg/mL)	HeLa	Mcf-7	CCL-221	Gingival Fibroblast
Küre Nanopartikül	0,005	5 ± 1	9 ± 2	3 ± 1	2 ± 0
	0,025	12 ± 1	18 ± 1	5 ± 1	5 ± 1
	0,050	19 ± 1	30 ± 2	14 ± 0	13 ± 1
	0,100	27 ± 2	34 ± 2	30 ± 1	19 ± 2
Avidinli Küre Nanopartikül	0,005	6 ± 1	7 ± 1	4 ± 0	1 ± 0
	0,025	11 ± 1	15 ± 2	11 ± 1	6 ± 1
	0,050	17 ± 2	26 ± 1	22 ± 2	10 ± 0
	0,100	24 ± 1	32 ± 2	27 ± 1	18 ± 1

Kit yöntemiyle antikanserojenik etkinin en yüksek bulunduğu iki hücre, Mcf-7 ve CCL-221 hücrelerinde 0,1 mg/mL'lik partikül konsantrasyonlarının antikanserojenik etkilerinin belirlendiği yüzde ölüm oranı % 27-34 arasında bulunmuştur. Bu hücre hatlarında, avidinli küre ve çıplak küre nanopartiküllerden kaynaklı ölü hücrelerin görüntülenmesi amacıyla canlı-ölü boyamaları yapılarak floresan mikroskopta 40X'lik objektifte resimler elde edilmiştir. CCL-221 ve Mcf-7 hücre hatlarının nanopartikül ile muamelesi sonrasında floresan boyama yapılarak, hücrelere olan etkileri floresan mikroskopta incelenmiş ve görüntüleri alınmıştır (Resim 4.2 ve 4.3).



Resim 4.2. Mcf-7 hücrelerinin nanopartiküller ile muamele edildikten sonraki floresan mikroskopta çift boyama tekniği kullanılarak 40X'lik objektifle elde edilmiş görüntüleri (Yeşil oklar; canlı hücreleri, sarı oklar ise apoptotik hücreleri göstermektedir.) a) Küre nanopartikül uygulanmış hücreler, b) Avidinli nanopartikül uygulanmış hücreler



Resim 4.3. CCL-221 hücrelerinin nanopartiküller ile muamele edildikten sonraki floresan mikroskopta çift boyama tekniği kullanılarak 40X'lik objektifle elde edilmiş görüntüleri (Yeşil oklar; canlı hücreleri, sarı oklar ise apoptotik hücreleri göstermektedir.) a) Küre nanopartikül uygulanmış hücreler, b) Avidinli nanopartikül uygulanmış hücreler

Resim 4.2 ve Resim 4.3 incelendiğinde nanopartiküllerin 0,1 mg/mL'lik konsantrasyonlarının kanser hücrelerinin bir kısmını apoptoza götürdüğünü, ancak ölü ve canlı hücrelerin oranlandığı zaman hala büyük bir kısmının canlı olduğu çekilmiş olan floresan mikroskop görüntüleriyle belirlenmiştir. Bu sonuçlar çizelge



4.3.'de verilen sonuçları doğrulamıştır. Hücrelerin nanopartiküller ile muamelesi sonrasında partiküllerin hücreleri nekroza götürmediği de saptanmıştır.

#### **4.5. Nanopartiküllerin Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi**

Nanopartiküllerin biyolojik sistemler içerisinde de güvenli kullanımının mümkün olup olmadığının araştırılması için antioksidan ve sitotoksik etkilerine bakılmış olan partiküllerin genotoksik etkilerinin belirlenmesi de oldukça önemlidir. Bu partiküllerin DNA'da herhangi bir hasara yol açıp açmadığı, hasar oluşturuyorsa miktarının belirlenmesi amacıyla izole edilmiş insan lenfositlerinde Komet testi uygulanmıştır. Çalışmada avidin bağlanmış küre ve modifiyesiz küre Fe-Au nanopartiküllerinin 0,005 ve 0,1 mg/mL arasında değişen dört konsantrasyonu seçilmiş ve bunların genotoksik etkilerinin olup olmadığı belirlenmiştir. Tek hücre jel elektroforez yönteminde DNA kırılmalarının boyutunu saptamak olasıdır. Bunu belirlemek amacıyla partiküller ile etkileştirilmiş hücrelerin elektroforez sonrası kuyruk yoğunluğuna ve kuyruk momentine bakılmıştır. Partikül konsantrasyonları steril distile su içerisinde ayarlanmıştır. Bu nedenle çözücü kontrol ve pozitif kontrolde çalışmalarda yer almaktadır. Bu çalışmanın sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Değişen konsantrasyonlarda küre ve avidinli küre formundaki manyetik Fe-Au nanopartiküllerin insan lenfosit hücrelerinde oluşturdukları genotoksik etkiler

Nanopartikül Çeşitleri	Konsantrasyon (mg/mL)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti	Kuyruk DNA Hasarı (%)
Küre Nanopartikül	0,005	30,98 ± 0,27	0,06 ± 0,01	0,35 ± 0,06
	0,025	31,03 ± 4,49	0,07 ± 0,01	0,41 ± 0,03
	0,050	30,50 ± 0,70	0,10 ± 0,03	0,54 ± 0,01
	0,100	32,03 ± 2,88	0,12 ± 0,00	0,66 ± 0,04
Avidinli Küre Nanopartikül	0,005	32,47 ± 0,12	0,06 ± 0,01	0,34 ± 0,01
	0,025	33,42 ± 2,95	0,09 ± 0,01	0,38 ± 0,01
	0,050	33,50 ± 0,24	0,15 ± 0,03	0,53 ± 0,04
	0,100	34,28 ± 2,10	0,12 ± 0,00	0,65 ± 0,01
Çözücü Kontrol	-	31,00 ± 2,83	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,02
Negatif Kontrol	-	33,38 ± 2,35	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,02
Pozitif Kontrol (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	50 mM	32,16 ± 1,73	0,35 ± 0,00	3,05 ± 0,15

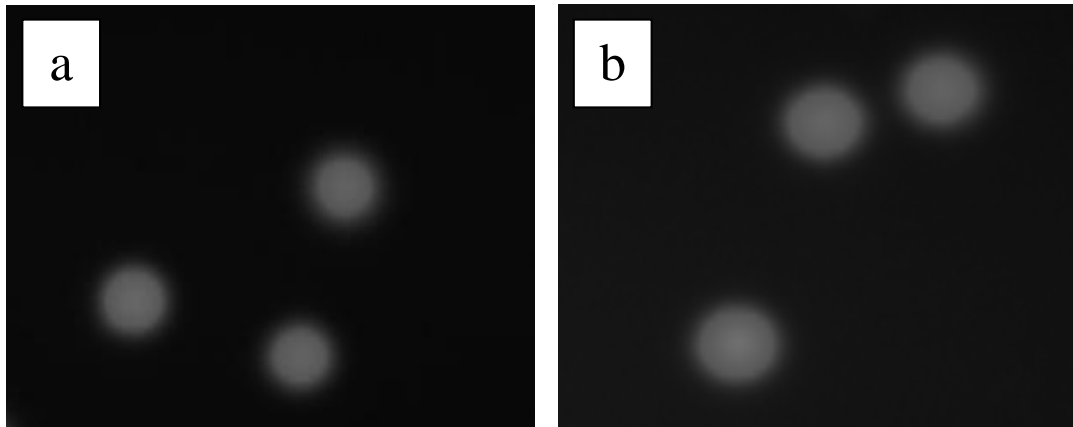
Çözücü Kontrol: Distile su ile izole edilmiş lenfosit hücrelerinin muamelesi

Negatif Kontrol: İzole edilmiş lenfosit hücreleri

Pozitif Kontrol: 50 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile izole edilmiş lenfosit hücrelerinin muamelesi

Resim 4.4'te çalışılmış olan partiküllerin izole edilmiş lenfositler üzerinde belirgin bir kuyruk oluşumuna neden olmadığı görülebilir. Kontrol amaçlı sayılan lenfosit hücreleri ve partiküllerle etkileştirilmiş lenfosit hücreleri arasında belirgin bir kuyruk uzunluğu ya da yüksek bir kuyruk yoğunluk farkının olmaması genotoksik

etkinin çok düşük olduğunu göstermekle birlikte artan konsantrasyonlarda % DNA kuyruk hasarı artışlar göstermektedir. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). Komet testi sonuçlarında, kuyruk uzunluğunun baş uzunluğuna oranı % 5,0'ın altındaysa DNA hasarının olmadığı kabul edilmektedir [Yen ve ark., 2001]. Bu nedenle partiküllerin bu sonuçlar neticesinde hiç bir genotoksik etkiye sahip olmadıkları görülmüştür. Burada kullanılan partikül çeşitleri ve konsantrasyonları sitotoksosite testinde kullanılanlarla aynıdır. Nanopartiküllerin yüksek bir genotoksik etkiye sahip olmamaları canlı sistemlerde çeşitli amaçlarla bu partiküllerin kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Partiküllerin genotoksik etkileri kontrollere karşı incelendiğinde bu konsantrasyon aralığındaki nanopartiküllerin oldukça düşük DNA hasarına neden olduğu görülmüştür. Komet testi sonucunda lenfositlerde DNA hasarı, floresan görüntüleme sistemi ile belirlenmiştir.

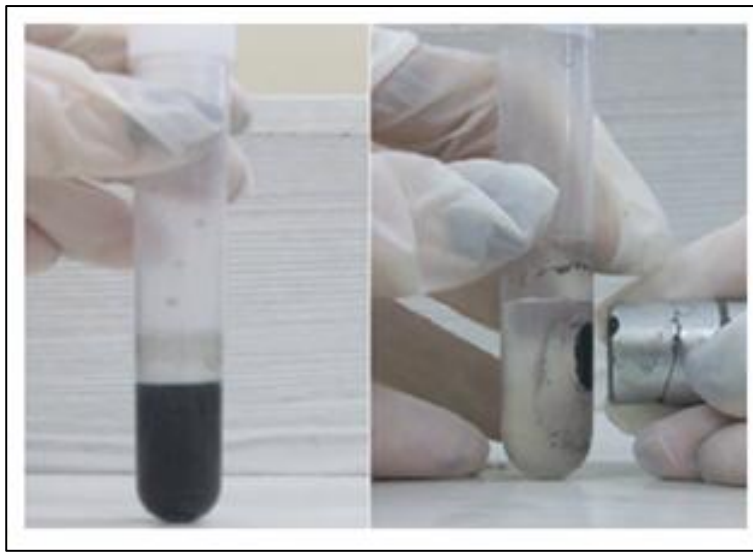


Resim 4.4. Nanopartiküllerin izole edilmiş lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği genotoksik etki. a) Nanopartikül ile etkileştirilmiş lenfosit hücrelerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü (x40); b) Negatif kontrol amaçlı kullanılmış lenfosit hücrelerinin floresan mikroskoptaki görüntüsü (x40)

#### 4.6. Bakterilerin Nano Yüzeyle Tutunma Miktarlarının Belirlenmesi

Çalışmada partiküllerin ve immüno-sensörlerin tutma kapasiteleri test edilerek, farkları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda standart olarak 0,5 mg/mL konsantrasyonundaki manyetik partiküller ortamdaki bakterilerin tutunmalarını belirlemek için kullanılmıştır. Ayrıca yüzeylede spesifik tanılamaya özgü

hazırlanmış avidin üzerine *L. monocytogenes* antikoruna bağlanmış olan partiküllerin yanı sıra modifikasyon öncesi avidin bağlı nanopartikül yüzeylerin de bakteri tutma kapasiteleri araştırılmıştır. Böylece bakterilerin tek tek ve yarışmalı olarak nanopartiküllere ve immüno-sensörlere tutunumları belirlenmiştir. Sıvı ortam içerisinde partiküller Resim 4.5'te de görülebileceği gibi mıknatıs yardımıyla tutularak manyetik partiküllere bağlanmış olan bakteriler ortamdaki izole edilerek canlılık sayımları kolaylıkla yapılabilmektedir.



Resim 4.5. Manyetik nanopartiküllerin sıvı ortamlarda mıknatıs yardımıyla ayrılması

#### **4.6.1. Tek bir bakteri türü için bakterilerin nano yüzeylere tutunma miktarlarının belirlenmesi**

Bu çalışmada 2 ayrı tutunma deneyi yapılmıştır. İlk deneyde *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ve *S. aureus* türlerinin küre ve antikor bağlamada ara basamak olan avidin bağlanmış küre nanopartiküllerin yüzeylerindeki tutunum başarıları ayrı ayrı belirlenmiştir. Çalışmada bakterilerin tutunma başarıları, başta ortama konulmuş olan bakteri yoğunluğunun cfu/mL cinsinden belirlenip yıkama sonrası yüzeyde tutunmuş olan bakteri yoğunluğu (cfu/mL cinsinden) ile karşılaştırılmasıyla test edilmiştir. Ortama verilmiş olan bakteri miktarı çalışmada kontrol olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Manyetik, Fe-Au yapısındaki küre ve avidinli küre nanopartikül yüzeylerine tek tek *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* bakterilerinin tutunma kapasiteleri

Bakteri Suşları	Testler	Küre Nanopartikül (cfu/mL)	Avidinli Nanopartikül (cfu/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$2,8 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
	t	$5,7 \times 10^6$	$7,9 \times 10^6$
<i>S. typhimurium</i> BAST01	b	$4,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
	t	$8,0 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	b	$9,6 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^{10}$
	t	$6,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$

b: Başlangıçta partiküller ile muamele edilmiş olan canlı mikroorganizma sayısı

t: Uygulama sonrası partikül yüzeylerinde tutunmuş olan canlı mikroorganizma sayısı

Çizelge 4.6'ya bakıldığında yüzeylere ortamda bulunan bakterilerin büyük bir kısmının tutunduğu belirlenmiştir. Partikülün bakteriye tutunması bakteri türünün farklılığına göre seçicilik göstermiştir. Bununla birlikte avidinli ve küre yüzeylerdeki tutunum başarılarının belirlenebilmesi için her türe özgü çalışmada kendi içinde ortama konulmuş olan bakteri miktarları eşit olduğu halde avidin bağlı küre yüzeylerde yıkama sonrası tutunmanın küre yüzeylere göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu da türlerin protein yapısındaki avidine ilgisinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Sensör tasarımında yüzeye avidin bağlanması antikorun

bağlanabilirliği açısından gereklidir. Avidinin yüzeydeki tutunma miktarını arttırması çalışmalar için pozitif bir sonuçtur. Ayrıca, bakteri türleri arasındaki tutunum miktarları karşılaştırıldığında, her bir bakterinin yüzeylere olan ilgisinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada ise hedef bakteri olan *L. monocytogenes*'in immünosensör olarak tasarlanmış spesifik antikor bağlı nano yüzeylerdeki tutunma miktarları tespit edilmiştir. Avidin bağlı nanopartiküller üzerine *L. monocytogenes*'e özgü antikor bağlanarak elde edilmiş immünosensörlerin *L. monocytogenes*' i yakalama başarısı test edilmiştir. İmmünosensör tasarımında, tanılamada hedef tür olarak *L. monocytogenes* seçilmiştir. Avidinli küre nanopartiküller avidin-biotin etkileşiminden yararlanılarak biotinli *L. monocytogenes* antikoruna ile modifiye edilmiştir. Böylece *L. monocytogenes* türünü tanılayan bir immünosensör modeli geliştirilmiştir. Bu modifikasyon işlemi ile ortamda bulunan  $4,6 \times 10^7$  cfu/mL *L. monocytogenes* bakterilerisinden  $2,1 \times 10^6$  cfu/mL'sinin yakalandığı tespit edilmiştir. Çizelge 4.7'de *L. monocytogenes* türünün immünosensör yüzeylerindeki tutunma miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.7. *L. monocytogenes* ATCC 7644 suşunun, *L. monocytogenes*'e özgü spesifik antikor bağlanarak geliştirilmiş manyetik immünosensör modelindeki tutunma miktarları

Bakteri Suşu	Testler	Tutunan Canlı Bakteri Miktarı (cfu/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$4,6 \times 10^7$
	t	$2,1 \times 10^6$

b: Başlangıçta partiküller ile muamele edilmiş olan canlı mikroorganizma sayısı

t: Uygulama sonrası partikül yüzeylerinde tutunmuş olan canlı mikroorganizma sayısı

Elde edilen sonuçlara bakıldığında *L. monocytogenes*'in immünosensör yüzeylerine olan tutunma başarısı oldukça yüksektir. Bu sonuçlar Çizelge 4.6 ile karşılaştırıldığında tutunma miktarının avidinli küre nanopartikül yüzeylere göre immünosensörlerde biraz daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, immünosensör tasarımında spesifikliğin sağlanabilmesi için avidin-biyotinli antikor etkileşimi sağlandıktan sonra açıkta kalan avidin uçlarının etanolamin ile kapatılmasıdır. Bu da bakterilerin bağlanabileceği yüzey alanını düşürmüştür. Yüzey alanının düşürüldüğü dikkate alınırsa elde edilen tutunma sonuçlarının oldukça yüksek olduğu düşünülebilir. Kapatma işlemi sayesinde ortamda bulunan diğer bakterilerin açık uçlara bağlanması engellenerek spesifiklik de artırılmıştır.

#### **4.6.2. Yarışmalı ortamlarda bakterilerin nano yüzeylerde tutunma miktarlarının belirlenmesi**

Bu çalışmada birden fazla bakteri türü kullanılarak yarışmalı ortamlarda avidinli nanopartiküller ile bakteri tutunum miktarları iki ayrı deneyle belirlenmiştir. Tasarlanmış sensör modelinde avidin bağlama işlemi gerekli bir işlem olduğu için bu çalışmalarda sadece avidinli küre nanopartiküller kullanılmış, küre nanopartiküller çalışmaya dahil edilmemiştir.

İlk deneyde aynı ortamda bulunan *L. monocytogenes* ve *S. aureus* varlığında ve gene aynı ortamda bulunan *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* varlığında karışık kültür ortamlarında, avidin bağlı nanopartikül yüzeylerde bu bakterilerin tutunma miktarları tespit edilmiştir. Deney sonucu Çizelge 4.8’de verilmiştir.



Çizelge 4.8. *L. monocytogenes* ile *S. aureus* bakterilerinin bulunduğu ve *L. monocytogenes* ile *S. typhimurium* bakterilerinin bulunduğu yarışmalı ortamlarda manyetik avidin bağlı küre yüzeylerdeki tutunma miktarları

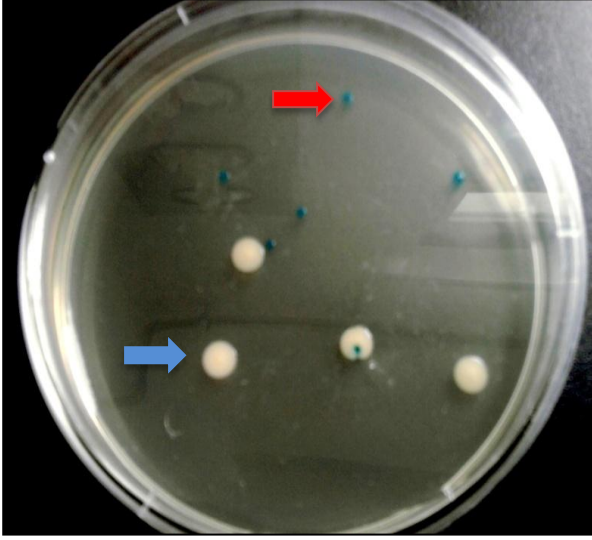
Yarışmalı Ortamdaki Bakteri Suşları	Testler	Sonuçlar (cfu/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$5,8 \times 10^7$
	t	$2,7 \times 10^7$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	b	$7,2 \times 10^{10}$
	t	$1,6 \times 10^9$
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$4,5 \times 10^7$
	t	$2,4 \times 10^7$
<i>S. typhimurium</i> BAST01	b	$4,2 \times 10^6$
	t	$2,3 \times 10^5$

b: Başlangıçta partiküller ile muamele edilmiş olan canlı mikroorganizma sayısı

t: Uygulama sonrasında partikül yüzeylerinde tutunmuş olan canlı mikroorganizma sayısı

Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre her iki yarışmalı ortamda da *L. monocytogenes* türünün *S. typhimurium* ve *S. aureus* türlerine göre yüzeydeki tutunum başarısının daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. İmmünoensör modifikasyonu öncesi avidinli yüzeylerde her bakteri türü için tutunma kapasitesinin farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Diğer bir deneyde ise, immünoensör tasarımı sonrasında yarışmalı ortamlarda nanoyüzeğe *L. monocytogenes*'in bağlanma başarısını test etmek amacıyla yapılmıştır. Karışık kültür ortamlarını hazırlamak için *L. monocytogenes*'in yanı sıra ortama *S. aureus* ve *S. typhimurium* bakterileri de verilmiştir. Karışık kültür ortamlarından birincisi  $6,8 \times 10^7$  cfu/mL yoğunluğunda *L. monocytogenes* ve  $4,0 \times 10^7$  cfu/mL yoğunluğunda *S. aureus* ile hazırlanmıştır. Bu kültür ortamı *L. monocytogenes*'i tanılamaya yönelik tasarlanmış immünoensörler ile etkileştirildikten sonra yapılan yıkama işlemleri sonrasında sensörlere tutunan *L. monocytogenes* miktarı CHROMagar Listeria besi yerinde  $2,9 \times 10^7$  cfu/mL olarak bulunmuştur. Resim 4.6.'da görüldüğü gibi bu besi yerinde bakterilerin oluşturabileceği kolonileri saptamak amacıyla denemeler yapılmış ve *L. monocytogenes* kolonileri; mavi, 3 mm'den daha küçük düzenli koloniler oluştururken, *S. aureus* kolonileri krem rengi ve daha büyük koloniler oluşturmuştur. Bu da canlılık sayımı sırasında kolonilerin birbirinden kolaylıkla ayırımını sağlamıştır.



Resim 4.6. CHROMagar Listeria besi yerinde *L. monocytogenes* ve *S. aureus* kolonileri (Kırmızı ok, *L. monocytogenes* kolonilerini; mavi ok ise *S. aureus* kolonilerini göstermektedir.)

Diğer bir karışık kültür ortamı ise  $5,4 \times 10^7$  cfu/mL yoğunluğunda *L. monocytogenes* ve  $4,9 \times 10^6$  cfu/mL yoğunluğundaki *S. typhimurium* ile hazırlanmıştır. Bu kültür ortamı *L. monocytogenes*'i tanılamaya yönelik tasarlanmış immünosensörler ile etkileştirildikten sonra yapılan yıkama işlemleri sonrasında sensörlere tutunan *L. monocytogenes* miktarı CHROMagar Listeria besi yerinde  $2,1 \times 10^7$  cfu/mL olarak bulunmuştur.

Deney sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir. Ortamda bulunan *L. monocytogenes* bakterilerinin tümünün sensöre bağlanmamış olması spesifikliğin sağlanması için etanolamin ile kapatılmış olan uçlardan kaynaklanmaktadır. Kullanılan immünosensör konsantrasyonu artırılarak ortamdaki diğer *L. monocytogenes* bakterilerinin de ayrımı sağlanabilir.

Çizelge 4.9. Yarışmalı ortamlarda *L. monocytogenes*'i tanılamaya yönelik olarak tasarlanmış olan manyetik immüno-sensör modelinde *L. monocytogenes*'in tutunma başarısı

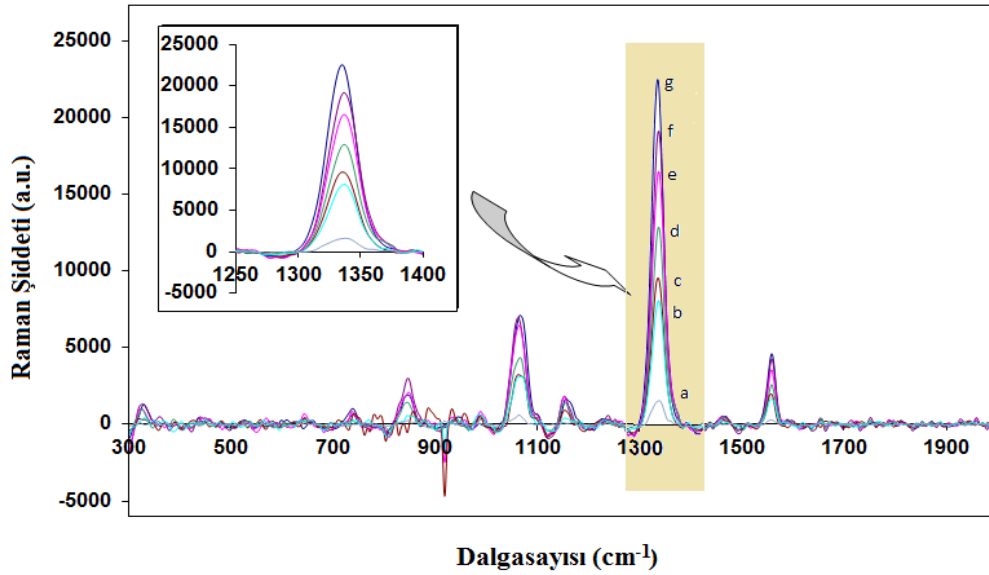
Yarışmalı Ortamda Bulunan Bakteri Suşları	Testler	(cfu/mL)
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$6,8 \times 10^7$
	t	$2,9 \times 10^7$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	t	$2,9 \times 10^7$
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	b	$5,4 \times 10^7$
	t	$2,1 \times 10^7$
<i>S. typhimurium</i> BAST01	t	$2,1 \times 10^7$

b: Başlangıçta partiküller ile muamele edilmiş olan canlı *L. monocytogenes* bakteri sayısı

t: Partikül yüzeylerinde tutunmuş olan canlı *L. monocytogenes* bakteri sayısı

#### 4.7. Raman Çalışmaları

SERS ile *L. monocytogenes* tayini için uygulanan sandviç yapısında SERS etiketi olarak DTNB molekülü kullanılmıştır. Altın nanopartiküllerden oluşturulmuş Raman etiketi kullanılarak elde edilmiş SERS spektrumları *L. monocytogenes* analizi için Şekil 4.1'de verilmiştir. *L. monocytogenes*'e ait kalibrasyon grafiği, DTNB'ye ait baskın olan  $1336 \text{ cm}^{-1}$ 'deki simetrik  $\text{NO}_2$  gerilme bandı takip edilerek artan bakteri konsantrasyonlarına karşı  $1336 \text{ cm}^{-1}$  nitro grubunun artan Raman sinyali grafiğe geçirilerek çizilmiştir.

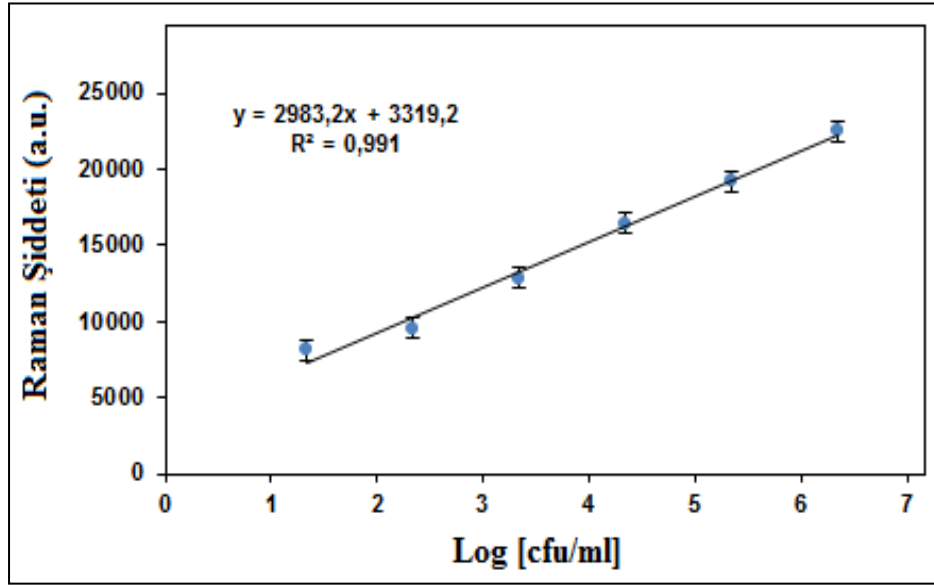


Şekil 4.1. DTNB'nin  $2,2 \times 10^1$ - $10^6$  cfu/mL *L. monocytogenes* derişimleri arasında gösterdiği simetrik NO<sub>2</sub> gerilme pikleri a) *Listeria monocytogenes* yok, b)  $2,2 \times 10^1$  cfu/mL, c)  $2,2 \times 10^2$  cfu/mL, d)  $2,2 \times 10^3$  cfu/mL, e)  $2,2 \times 10^4$  cfu/mL, f)  $2,2 \times 10^5$  cfu/mL, g)  $2,2 \times 10^6$  cfu/mL

Şekil 4.1'de nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan analizin SERS spektrumu görülmektedir. DTNB'ye spesifik olan bu spektrumda  $1336 \text{ cm}^{-1}$ 'de ki DTNB'nin nitro grubuna ait pikleri kullanılarak artan bakteri konsantrasyonuna karşı sinyalin arttığı görülmektedir.  $1336 \text{ cm}^{-1}$  de bulunan pikin seçilmesinin nedeni etiket olarak kullanılan molekülün artan bakteri konsantrasyonlarına karşı doğrusal olarak artış göstermesidir. Çalışmada bakteri kullanılmadan birincil antikorun bağlı olduğu yüzey üzerine ikincil antikorun bağlı olduğu altın nanopartiküller gönderilerek körv denemesi gerçekleştirilmiştir. Ortamda bakteri olmadığı zaman bir kısım ikincil antikorun bağlı olduğu nanopartiküller spesifik olmayan bir bağlanma göstermiş ve yıkama prosedürü sonrasında ortamdaki uzaklaşmadığı görülmüştür.

Şekil 4.2'de tasarlanmış olan immüno-sensör modeli kullanılarak, ortamda artan bakteri derişimine karşı SERS sinyalleri elde edilerek çizilmiş kalibrasyon grafiği yer almaktadır. Kalibrasyon grafiğinde her bir derişim için NO<sub>2</sub> pik şiddeti kullanılmıştır. Değişen her *L. monocytogenes* konsantrasyonuna karşılık SERS

sinyali alınmaktadır ve grafikten görüldüğü üzere  $10^1$  cfu/mL bakteri ayırt edici bir şekilde örnek içinde tayin edilebilmektedir. Kalibrasyon grafiği  $2,2 \times 10^1 - 2,2 \times 10^6$  cfu/mL bakteri konsantrasyonu aralığında doğrusal bir artış göstermektedir.



Şekil 4.2. Tasarlanmış olan nano boyutlu immünosensör modelinde *L. monocytogenes* bakterilerinin sensöre tutunma başarılarına göre, artan konsantrasyonlarda elde edilen SERS sinyalleriyle oluşturulmuş kalibrasyon grafiği ( $R^2$  değeri 0.991 olarak bulunmuştur.)

Şekil 4.2’de pik şiddetine göre çizilen kalibrasyon eğrisine bakıldığında korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,991 olarak bulunmuştur. Bu dikkate alındığında tasarlanmış olan immünosensör modelinin yüksek hassasiyette olduğu artan bakteri konsantrasyonları ile tutunma kapasitesinin de doğru orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* için gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 0,48 cfu/mL ve 1,28 cfu/mL olarak bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri kör çözelti üzerinden sırayla alınan üç ölçüm sonunda standart sapmaların ortalamaları kullanılarak bulunmuştur.

Kullanılan analiz metodunun doğruluğunun kontrolü için gerçek numune (süt) içerisinde, Raman cihazında elde edilmiş olan SERS sinyallerine göre canlı *L. monocytogenes* tayini sonuçları ile elde edilen mikrobiyolojik klasik sayma yöntemi

sonuçları karşılaştırılmıştır. Gerçek numuneler, süt içerisine *L. monocytogenes* aşılanarak hazırlanmıştır. *L. monocytogenes* için çizilmiş kalibrasyon eğrisi kullanılarak gerçek numunedeki bakteri konsantrasyonu tayin edilmiştir. Klasik sayım yöntemi ile süt numunesindeki *L. monocytogenes* sayımından elde edilen sonuçlar ve geliştirilen SERS yöntemi ile elde edilen sonuçlar izelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Tasarlanmış olan immüno-sensör modelinin süt ortamında, bakteri yakalama başarısının Raman ve klasik sayım yöntemiyle belirlenmesi ve sonuçlarının karşılaştırılması

Yöntem	Canlılık Miktarları (cfu/mL)				
<sup>a</sup> Klasik Sayım Yöntemi	$0,38 \times 10^2$	$0,40 \times 10^3$	$0,42 \times 10^4$	$0,52 \times 10^5$	$0,45 \times 10^6$
<sup>b</sup> SERS Sinyali ile Bakteri Sayım Yöntemi	$0,36 \times 10^2$	$0,39 \times 10^3$	$0,45 \times 10^4$	$0,60 \times 10^5$	$0,48 \times 10^6$
<sup>c</sup> Yüzde Geri Kazanım	% 94,7	% 97,5	% 107,1	% 115,4	% 106,7

a: Sensöre tutunmuş olan bakterileri miktarının, mikrobiyolojik sayım yöntemi ile belirlenmesi

b: Sensöre tutunmuş olan bakterileri miktarının, önceden elde edilmiş olan SERS sinyalleri ve canlılık miktarlarına göre çıkartıldığı standart kullanılarak belirlenmesi

c: a ve b yöntemlerinin karşılaştırılması

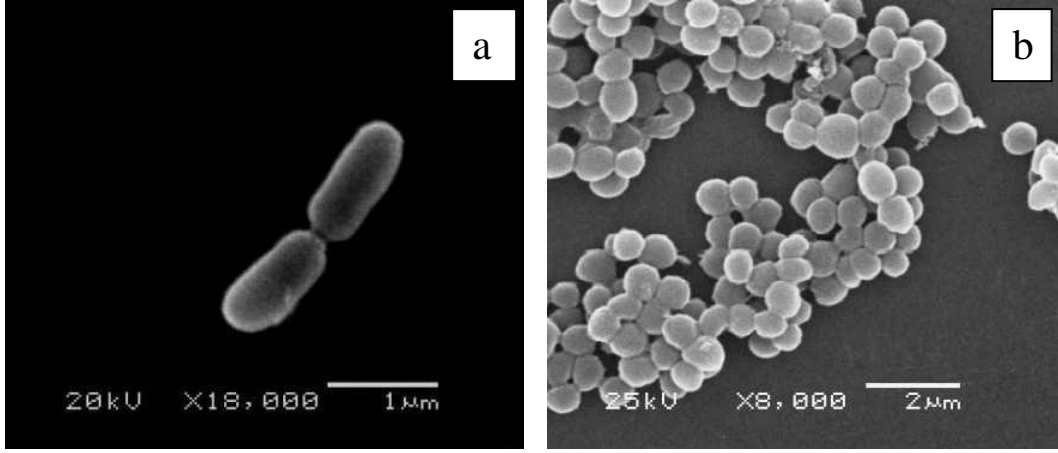


İmmünoensör modelinin, gerçek ortam (süt) içerisinde de aynı hassasiyeti yakaladığı elde edilen SERS sinyalleri ile tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre klasik yöntemle elde edilen sonuçlar ve geliştirilen yöntemle elde edilen sonuçlar arasındaki en yüksek fark 1,2 kat olarak bulunmuştur. İki yöntem arasındaki sonuçlara baktığımızda farkın oldukça düşük olması Raman spektrofotometri tekniğinin önemini arttırmaktadır. Ortamdaki organizmaların canlılıklarının belirlenmesinde mikrobiyolojik sayım yöntemi oldukça güvenilir bir teknik olmakla birlikte uzun bir ön çalışma ve zaman gerektirmektedir. Raman'da ise herhangi bir ortamda hedeflenen bakterinin tanınması ve miktarının belirlenmesi oldukça kısa sürede yapılabilmektedir.

#### **4.8. SEM ve TEM Analiz Görüntüleri**

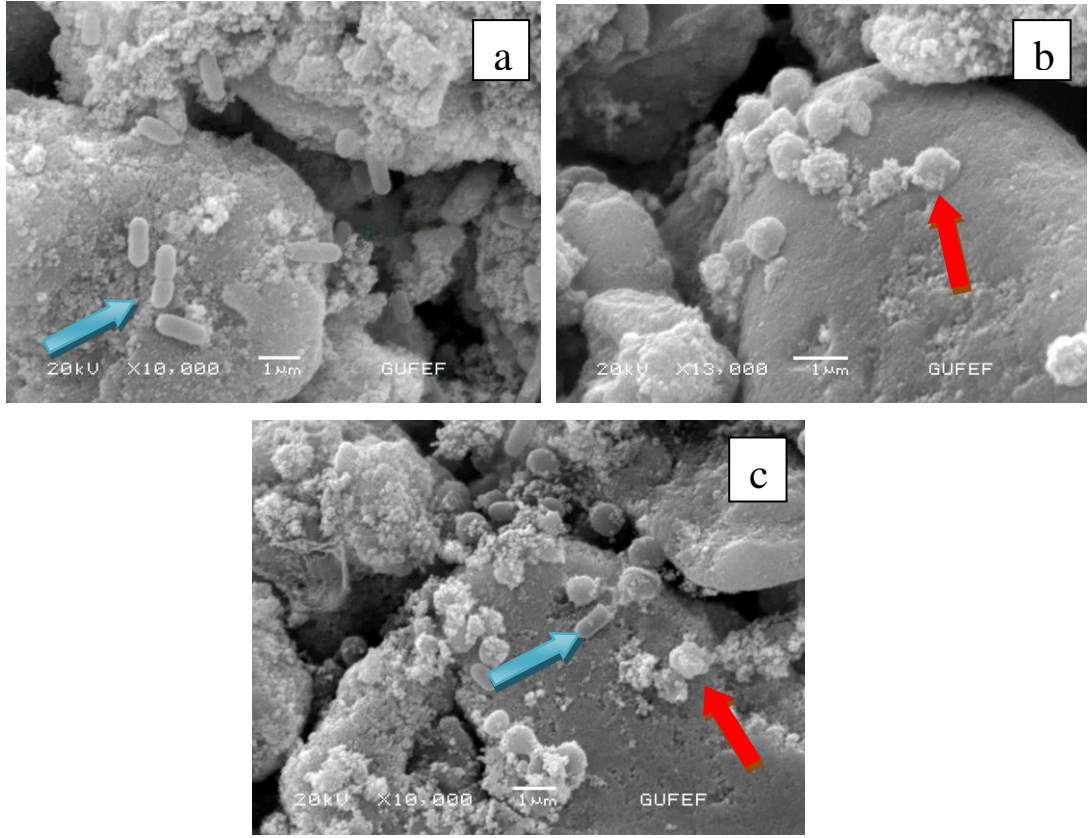
##### **4.8.1. SEM görüntüleri**

Bu çalışma, bakteri yüzeylerinde çeşitli nanopartiküllerin tutunmalarının görüntülenmesi amacıyla yapılmıştır. Ayrıca spesifikliğin test edilebilmesi için *L. monocytogenes*'in yanı sıra *S. aureus* bakterileride kontrol amaçlı kullanılmıştır. *L. monocytogenes* bakterileri basil, *S. aureus* bakterileri ise kok morfolojisine sahiptir. Yarışmalı ortamlarda bu morfolojik farklılıklar nedeniyle görüntülenen bakterilerin hangi türe ait oldukları kolaylıkla ayırt edilebilmiştir. Resim 4.7'de bu bakterilerin nanopartiküller ortamda yokken çekilmiş SEM görüntüleri mevcuttur.



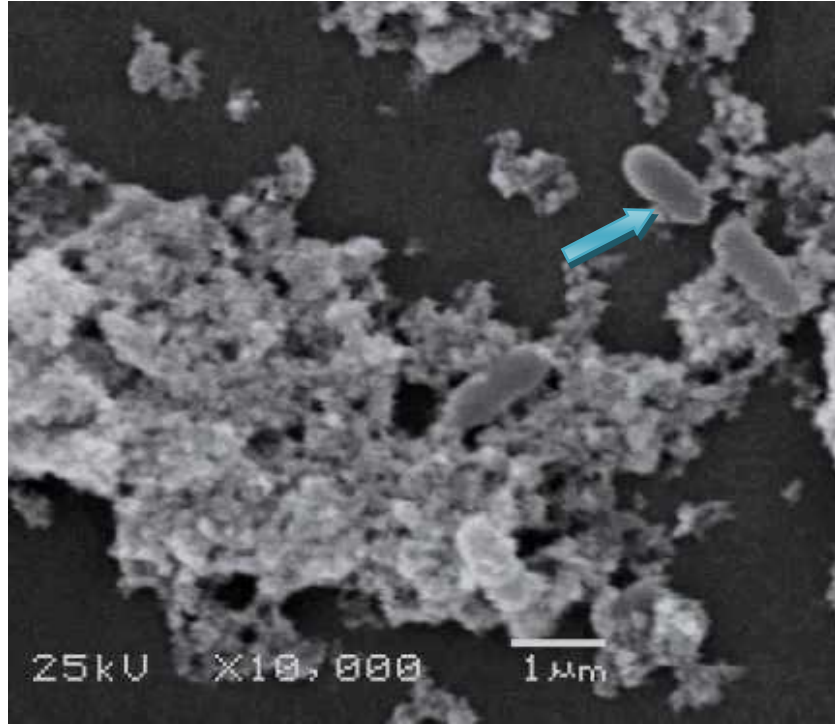
Resim 4.7. Çalışmada kullanılmış olan bakterilerin SEM görüntüleri. a) *L. monocytogenes* bakterisine ait görüntü (x18.000), b) *S. aureus* bakterisine ait SEM görüntüsü (x8.000)

Resim 4.8’de ise, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerinin yüzeylerine manyetik, Fe-Au yapısındaki küre nanopartiküllerin tutunmaları görüntülenmiştir. Bu görüntülerde manyetik Fe-Au küre nanopartiküllerin *S. aureus* türüne ait bakterilerin yüzeylerinin büyük bir kısmına tutunurken *L. monocytogenes* türüne ait bakterilerin yüzeylerinde ise oldukça az bir tutunma gösterdikleri tespit edilmiştir. Her iki bakterininde bulunduğu yarışmalı ortamda çekilmiş olan SEM görüntüleride bunu destekler niteliktedir.



Resim 4.8. Küre nanopartiküllerin, ortamda tek bir bakteri varlığında ve yarışmalı ortam oluşturulduğunda bakteriler üzerindeki tutunumlarının SEM ile çekilmiş görüntüleri a) *L. monocytogenes* bakterileri ve nanopartiküller (x10.000), b) *S. aureus* bakterileri ve nanopartiküller (x13.000), c) *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri ile oluşturulmuş yarışmalı ortam ve nanopartiküller (x10.000). (Mavi oklar, *L. monocytogenes*; kırmızı oklar, *S. aureus* bakterilerini göstermektedir.)

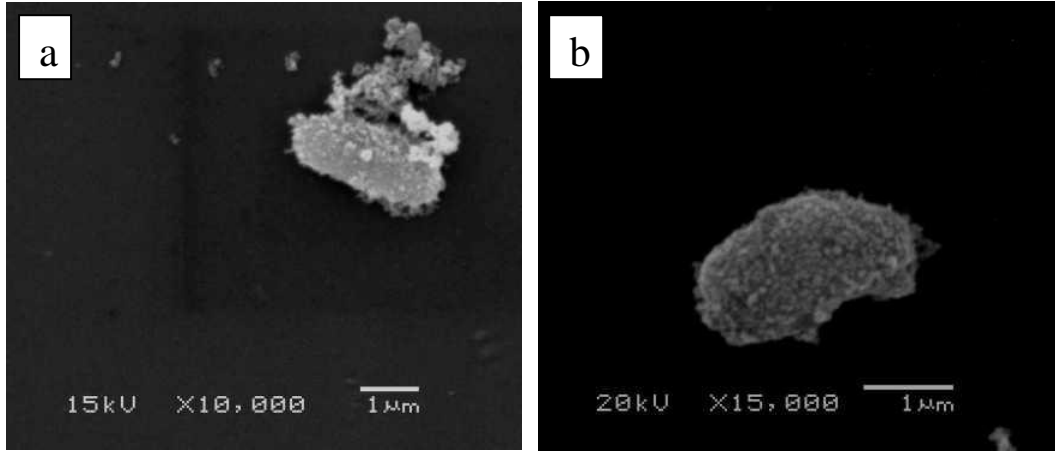
Resim 4.9'da 10.000'lik büyütmede henüz antikor ile fonksiyonlandırılmamış olan manyetik Fe-Au yapısındaki avidin bağlı küre nanopartiküllerin, *L. monocytogenes* bakteri yüzeyinde sadece belirli bölgelerde oldukça düşük bir tutunma gösterdiği SEM analizinde görülmektedir.



Resim 4.9. *L. monocytogenes* bakterisi yüzeyinde, avidinli nanopartiküllerin tutunum SEM görüntüsü (x10.000)

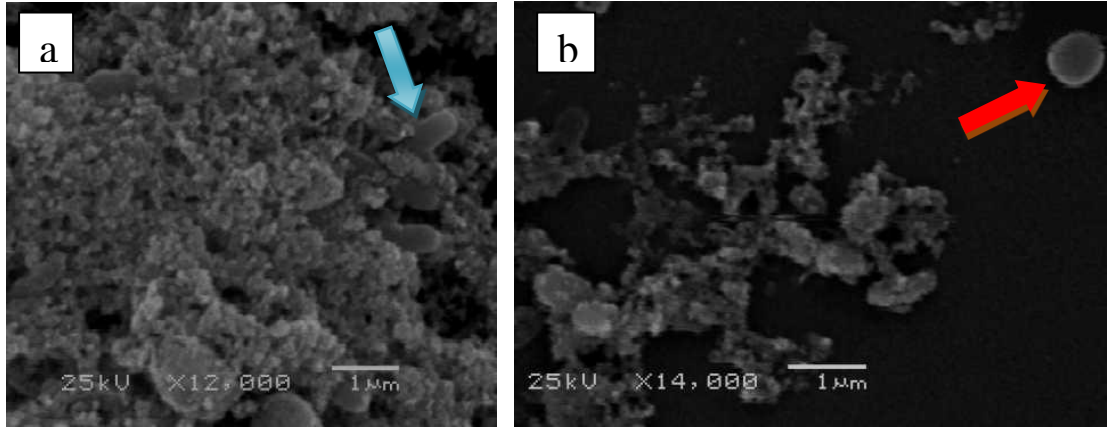
Avidinli nanopartiküllerin, *L. monocytogenes* bakterilerinin yüzeyinde bir miktar tutunma göstermelerine rağmen yine manyetik küre yüzeylerde de olduğu gibi bakteri yüzeyini kaplamadığı görülmüştür.

Resim 4.10’da ise 10.000 ve 15.000’lik büyütmelerde *L. monocytogenes* antikoruna ile spesifikleştirilmiş immüno-sensör modelinin *L. monocytogenes* bakterilerinin yüzeylerini tamamen örttüğü gözlemlenmektedir. Bakterilerin antijeni ile antikor kaplanmış nanopartiküller antijen-antikor etkileşimi nedeniyle yüzeyde yüksek bağlanma göstermişlerdir.



Resim 4.10. *L. monocytogenes* bakterisi ve immünosensörlerin SEM görüntüsü. a) x10.000 b) x15.000

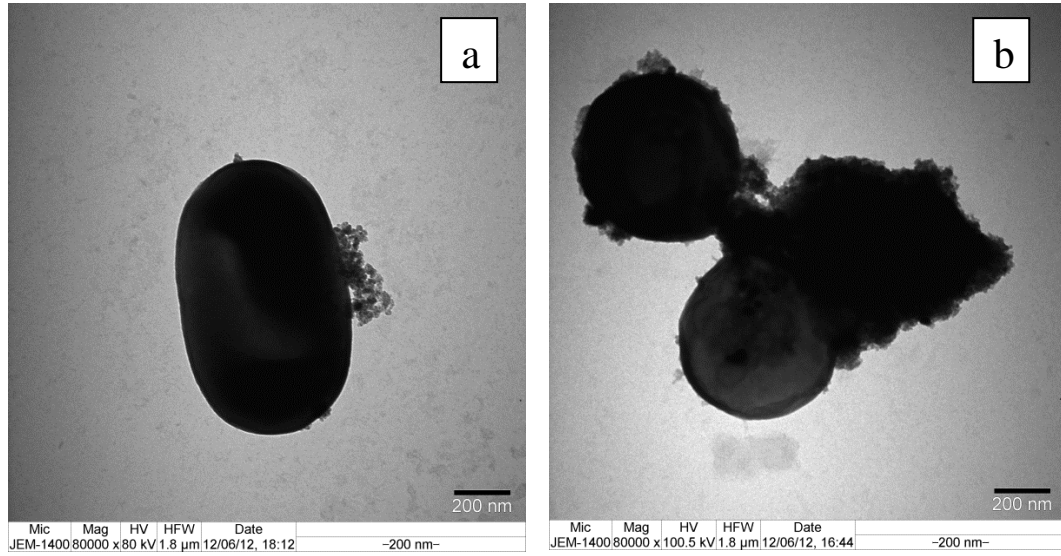
*L.monocytogenes*'in yanı sıra *S. aureus*'un da bulunduğu yarışmalı ortamda, immünosensörlerin bu bakteri yüzeylerinde gösterdikleri tutunma Resim 4.11'de mevcuttur. İmmünosensörler *L. monocytogenes* bakterisinde daha fazla yüzey kaplarken, *S. aureus* bakterisinde immünosensör tutunumunun olmadığı gözlenmektedir.



Resim 4.11. Yarışmalı ortamda immünosensörlerin bakteri yüzeylerine tutunum SEM analiz görüntüleri. a) *L.monocytogenes* bakterisi (x12,000), b) *S. aureus* bakterisi (x14,000)

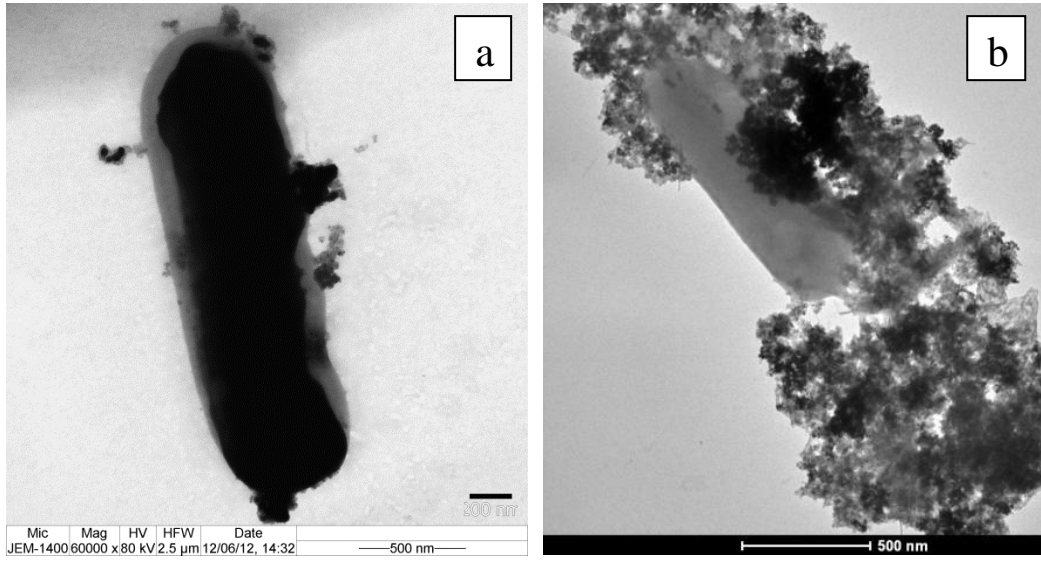
#### 4.8.2. TEM görüntüleri

*L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterilerinin yüzeylerine manyetik, Fe-Au yapısındaki küre nanopartiküllerin tutunumlarını belirlemek amacıyla TEM’de görüntüleme analizleri yapılmıştır. Resim 4.12’ de görülebileceği gibi manyetik Fe-Au küre nanopartiküller, *L. monocytogenes* türüne ait bakterilerin yüzeylerinde yok denecek kadar az bir tutunma gösterirken *S. aureus* bakterilerinde ise oldukça yoğun tutunma göstermişlerdir. Bu nedenle bu partiküllerin *S. aureus* türüne karşı daha fazla ilgi duyduklarını söyleyebiliriz.



Resim 4.12. TEM’de *L. monocytogenes* ve *S.aureus* ile muamele edilmiş olan manyetik Fe-Au yapısındaki küre nanopartiküllerin bakteri yüzeylerindeki tutunumları a) *L. monocytogenes* bakterisi ve manyetik Fe-Au nanopartiküller, b) *S. aureus* bakterisi ve manyetik Fe-Au nanopartiküller

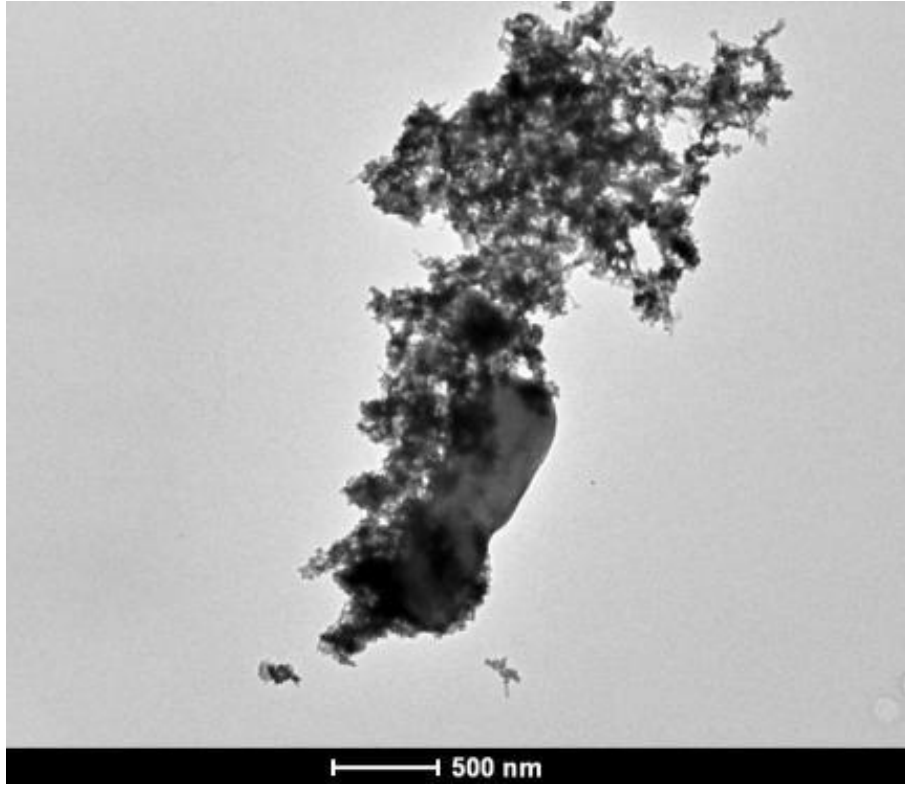
Spesifik antikor bağlanmış immünosensörlerin ve modifikasyonsuz manyetik Fe-Au küre nanopartiküllerin *L. monocytogenes* yüzeyinde yapmış olduğu tutunumlar Resim 4.13’de verilmiştir. Bu resimler karşılaştırıldığında, küre nanopartiküllerin *L. monocytogenes* bakterisi üzerinde oldukça az tutunurken, bu bakteri için geliştirilmiş immünosensörlerin bakteri yüzeyinin büyük bir kısmını kapladığı görülmüştür. Bu da immünosensörde bulunan *L. monocytogenes*’e özgü antikor ile sağlanmıştır. Böylece *L. monocytogenes* tanılmasında kullanılacak olan sensörlerin bu bakterilere ilgisinin yüksek olduğu ve nano yapıların bakteri yüzeyine tutunumlarının arttırıldığı saptanmıştır.



Resim 4.13. TEM’ de *L. monocytogenes* bakterisi yüzeyinde küre partiküllerin ve immünoensörlerin tutunmaları a) Manyetik, Fe-Au küre nanopartiküllerin *L. monocytogenes* bakterisi yüzeyindeki tutunumu, b) İmmünoensör modelinin *L. monocytogenes* bakterisi yüzeyindeki tutunumu

*L. monocytogenes* ve *S. aureus* ile hazırlanmış olan yarışmalı ortamda immünoensörün *L. monocytogenes* yüzeyine tutunumu Resim 4.14’te verildiği şekilde TEM ile görüntülenmiştir. Bu resimde immünoensörlerin bakteri yüzeyinin büyük bir kısmında tutundukları görülmektedir.





Resim 4.14. TEM’de, yarışmalı ortamda *L. monocytogenes* bakterisinde immünosensör tutunumu

## 5. TARTIŞMA

Bu tez kapsamında; son yıllarda sağlık, gıda, endüstri ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanılan nano boyutlu yapıların biyolojik aktiviteleri ve bunların immünosensör olarak patojen algılamasındaki başarıları ölçülmüştür.

Fe-Au yapısındaki manyetik nanopartiküllerin biyolojik aktivitelerini saptamak amacıyla bu partiküllerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiş, sitotoksik, antikanserojenik ve genotoksik etkileri araştırılarak kullanımda oluşabilecek avantaj ve dezavantajları belirlenmiştir. Biyolojik aktiviteleri belirlenmiş olan nanopartiküller *L. monocytogenes*'e özgü antikor ile modifiye edilerek hedef organizma için örnek bir sensör üretimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilmiş olan bu sensör modeli ile sensörün ana iskelet yapısı oluşturulmuştur. Başka bir patojen organizma tanılamak istenildiğinde, sadece hedeflenmiş olan mikroorganizmanın antikorunun bu partiküllerle kullanılması yeterlidir. Partiküllere modifiye edilecek antikor değiştirilerek istenilen organizmayı tanıyabilen başka sensör modelleri bu tasarım üzerinden kolaylıkla geliştirilebilir.

Yapmış olduğumuz antimikrobiyal aktivite çalışmalarında küre formundaki manyetik demir üzeri altın kaplı olan nanopartiküllerin *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. typhimurium* BAST01 suşlarına karşı ayrı ayrı antimikrobiyal aktiviteleri iki farklı çalışma ile belirlenmiştir. Bunun için ilk çalışmada petrilerde yapılan canlılık sayımları karşılaştırmaları sonucunda, ortamda bulunan partiküllerin bakteri canlılığını olumsuz etkilemediği ortaya çıkmıştır. Diğer çalışmada ise % 1 oranında agarlı besi yerine aşılınmış olan bakteriler petriye alınıp kuyucuklar açılmış ve bu kuyucuklara 1 mg/mL konsantrasyonundaki nanopartikül solüsyonları eklenmiştir. 24 saat sonunda kuyuların çevresi incelendiğinde herhangi bir zon oluşumu görülmemiştir. Biradar ve arkadaşları [2012], benzer bir şekilde agarda kuyu yöntemiyle çeşitli antibiyotiklerle kombin edilmiş altın nanopartiküllerin *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aereginasa* ve *E. coli* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır.

Bu çalışmada nutrient agar içerisine bakteri solüsyonları süspansiyon olarak petri kaplarında kuyucuklar açılmış ve bu kuyucuklara 0,25 ve 100 µL arasında, antibiyotik içeren 5 farklı nanopartikül miktarı uygulanmıştır. 24 saat boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılan petrilerde zon oluşumları görülmüş ve hesaplanmıştır. Ancak antibiyotiksiz altın nanopartiküllerin test bakterilerine karşı antibakteriyal etkiye sahip olmadıkları belirtilmiştir. Buna göre tek başına altın nanopartiküllerin herhangi bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını, ancak çeşitli antibiyotiklerle kombinlenerek bu partiküllere kullanım alanına göre istenilen antimikrobiyal özelliğin kazandırılabilceği söylenebilir. Partiküllerin genel olarak tek başına antimikrobiyal özellikleri bulunmamaktadır. Ancak partiküller oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Örneğin nano-ilaca yönelik ya da ortamdaki herhangi bir organizmanın inhibisyonuna yönelik bir özellik kazandırılmak istenirse bazı modifikasyonlar yapılarak bu antimikrobiyal özellikler nanopartiküllere kazandırılabilir.

Nanopartiküller ile yapılmış olan diğer antimikrobiyal çalışmalar incelendiğinde gümüş nanopartiküllerin yüksek miktarda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülebilir. Gümüş iyonunun ve tuzlarının antimikrobiyal aktivitelerinin olduğu bilinmektedir. Ancak gümüş nanopartiküllerin mikroorganizmalara olan antimikrobiyal mekanizması henüz tam anlamıyla açıklık kazanmamıştır. Kim ve arkadaşları [2007], tarafından yapılmış olan bir çalışmada gümüş nanopartiküllerin maya, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*’ a karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada Muller Hinton agar petrileri kullanılmış ve gümüş nanopartiküllerin çeşitli konsantrasyonları sıvı sistem içerisine ilave edilmiştir. Sonuç olarak düşük gümüş nanopartikül konsantrasyonlarının *E.coli* ve maya canlı miktarlarında azalmaya neden olurken *S. aureus* üzerindeki büyüme engelleyici etkisinin ise oldukça düşük olduğu saptanmıştır. Bunun sonucunda nanopartiküllerin yapılarındaki iyonların değişik bakteri türlerinde farklı antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Bu tez kapsamında nanopartiküllerin antioksidan aktiviteleri DPPH giderim aktivitesi ve plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu gibi *in-vitro* testler ile değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar serbest radikallerin yaşlanma ve tümör oluşumundan yüksek miktarda sorumlu olduklarını göstermektedir. Bir teoriye göre hücre içindeki serbest radikal reaksiyonları, nükleik asitler ve proteinler gibi ana moleküllerin çapraz bağlanmasına yol açarak fonksiyonel hasarlara neden olmaktadır [Harman, 1956]. Nanopartiküllerin antioksidan etkilerinin belirlenmesi de bu serbest radikallerin vücut içerisinde önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Tez kapsamında yapılan DPPH çalışmasında, 0,1 ve 5 mg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda manyetik Fe-Au özelliğindeki küre, çubuk ve küp şekillerine sahip nanopartiküller ile avidin bağlı küre nanopartiküllerin antioksidan özellikleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılmış olan tüm partikül çeşitlerinin kendi içerisinde artan konsantrasyonlarına bakıldığında % DPPH süpürücü etkilerinde arttığını görebiliriz. Küre formundaki partiküllerin daha yüksek DPPH giderim aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra avidin bağlanmış küre nanopartikülün en yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle protein yapısındaki avidinin antioksidan aktivitesini arttırdığını söyleyebiliriz. 5 mg/mL konsantrasyonundaki avidin modifiyeli küre partikül %  $69,1 \pm 2,2$  gibi oldukça yüksek bir oranda DPPH süpürücü aktivite göstermiştir. Ayrıca çubuk nanopartiküllerin küre formundaki partiküllere göre daha düşük antioksidan aktivite göstermeleri, küp partiküllerin ise hiç bir DPPH giderim aktivitesi göstermemesi dikkat çekicidir. Bu aktivite farklılığı partiküllerin değişik sentez basamaklarına sahip olmalarından ya da sentez sırasında kullanılan farklı kimyasallardan kaynaklanabilir. Literatürlerde diğer çeşitli nanopartiküllerin DPPH giderim aktiviteleri benzer yollarla araştırılmıştır. Ancak değişik şekillere sahip olan partiküllerin (çubuk, küp vb.) DPPH giderim aktivitelerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Saikia ve arkadaşları [2010], yapmış oldukları çalışmada DPPH (1,1'-diphenylpicryl-hydrazyle) giderim yöntemini kullanarak belirli sürelerde yapay bir serbest radikal olan DPPH'a karşı nikel oksit nanopartiküllerinin serbest

radikalleri süpürücü etkilerine bakmışlardır. 100 mg toz nikel oksit nanopartikül ve DPPH reaktifi karıştırılarak reaksiyonu başlatmışlar ve santrifüj sonrası üst fazı spektrofotometrik yöntemle değerlendirmişlerdir. 30. dk'da % 50 oranında olan süpürücü etkinin 60. dakikada % 90' a kadar çıkabildiğini göstermişlerdir. Çalışmada partiküllerin bu aktivitesi standart yöntemde belirtildiği üzere 30. dakikada incelenmiştir ve bu süre sonunda avidin bağlı küre nanopartiküllerin 5 mg/mL'lik konsantrasyonuyla % 69,1 gibi önemli bir DPPH süpürücü etki tespit edilmiştir. İnkübasyon süresi arttırıldığında test edilen nanopartiküllerin DPPH giderim aktivitelerinin arttırılabileceğini söyleyebiliriz.

DPPH yönteminin yanısıra nanopartiküllerin antioksidan aktivitelerini test etmek amacıyla kullanılan bir diğer *in-vitro* yöntem ise nanopartiküllerin plazma lipid peroksidasyon inhibisyonlarının belirlenmesidir. Yağların yükseltgenmesi sonucu lipid yapılarının bozulması lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Peroksidasyonun nedeni lipidlerin bileşiminde bulunan doymamış moleküllerin oksijenle yükseltgenmesidir. Antioksidan özelliğindeki maddeler peroksidasyon derecesini azaltabilir. Yaptığımız çalışmada nanopartiküllerin % plazma lipid peroksidasyon inhibisyonları araştırılmıştır. Avidin bağlı küre nanopartikülün en yüksek konsantrasyonu olan 5 mg/mL'lik partikül, en yüksek (% 44,8 ± 1,3) aktiviteyi gösterirken; küp formundaki 0,1 ve 0,5 mg/mL'lik konsantrasyonlarda ise hiç bir antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır. Schaffazick ve arkadaşları (2005) yaptıkları bir çalışmada değişik dozlarda melatonin içeren nanoküre ve nanokapsüllerin, lipid peroksidasyonunu önleyici etkilerini benzer bir yöntemle belirlemişlerdir. İçerdiği değişen melatonin konsantrasyonlarıyla bağlantılı olarak bu nanopartiküllerin, lipid peroksidasyonunu % 8 ve % 51 arasında önleyebileceği sonucuna varmışlardır. Ancak bu çalışmada nanoküre ve nanokapsüller 200 ve 400 mM'lık konsantrasyonlarda melatonin içermektedir ve melatonin lipid peroksidasyonunu engelleyici bir etkisi bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında partiküllerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmış olan her iki yöntemin sonuçları birbirlerini destekleyici niteliktedir.

Bu sonuçlara göre, nanopartikül konsantrasyonlarının artırılması ve nanopartiküllerin avidin ile modifikasyonunun antioksidan aktivitesini arttırdığı görülmüştür. Çubuk ve küp şeklindeki partiküllerin daha düşük antioksidan aktivite göstermeleri nedeniyle küre formundaki partiküller ön plana çıkmış ve daha sonraki çalışmalarda da bu nedenle sadece küre ve avidin modifiyeli küre partiküllerin biyolojik aktivitelerine bakılmıştır.

Antioksidan aktivitelerinin yüksek bulunduğu küre ve avidin bağlı küre partiküllerin sitotoksik etkileri sağlıklı gingival fibroblast hücre hattında ve antikanserojenik etkileri ise kanserli CCL-221, HeLa, Mcf-7 hücre hatlarında araştırılmıştır. Sitotoksikite testleri için bu partiküllerin 0,005 ve 0,1 mg/mL arasında değişen 4 farklı konsantrasyonu “Cayman’s WST 1 Cell Proliferation Assay Kit” ile çalışılmıştır. Partikül konsantrasyonlarının artırılması ile hücrelerde sitotoksik etkide artmıştır. Ancak kanser hücrelerinde denenmiş olan antikanserojenik etkide konsantrasyon artışıyla paralellik göstermiştir. Bu noktada kullanılacak olan partikülün kullanım alanına da bağlı olarak uygun konsantrasyonun belirlenmesi oldukça önemlidir. Kullanım için seçilmiş olan partikül dozu minimum sitotoksik etkiyi gösterirken aynı dozda partikül belirli bir antikanserojenik etkiyede sahip olabilir. Nano partiküllerin canlı sistemlerde nano ilaç ve bazı hastalıkları tanılayıcı ajanlar olarak kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Partiküllerin biyo-uyumlu olması canlı sistemlerde kullanımı açısından en önemli faktördür. Bu nedenle sitotoksikite çalışmaları partiküllerin kullanım alanlarını ve dozlarını belirleyen önemli testler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda konsantrasyon artışının, antioksidatif etkiyi arttırırken, hücrelerdeki canlılık oranlarını da düşürdüğü görülmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajlarının ayrıntılı olarak göz önünde bulundurulması gerekir. Kanserli ve sağlıklı hücre hatları üzerindeki canlılık oranları incelendiği zaman sağlıklı hücre hattı gingival fibroblast hücrelerindeki canlılık oranlarının aynı dozlardaki kanser hücrelerinin canlılık oranlarına göre daha yüksek olması dikkat çekicidir. Bu da pozitif bir sonuçtur. En yüksek konsantrasyon olan 0,1 mg/mL’lik avidin bağlı nanopartikül konsantrasyonunda

ölüm oranı HeLa hücresinde % 24, Mcf-7 hücresinde % 32, CCL-221 hücresinde % 27 oranındayken sağlıklı gingival fibroblast hücresinde ölüm oranı % 18'dir. Küre nanopartiküllerin sitotoksosite sonuçlarında bu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Kanserli hücre hatlarında partiküllerin daha yüksek antikanserojenik etkiye sahip olmaları, partiküllerin ileride çeşitli ilaç modifikasyonlarıyla kanserli hücrelerde kullanımında avantaj sağlayabilir.

Nano boyutlu materyallerle yapılmış olan diğer çalışmalara bakıldığında *in-vitro* koşullarda hücre canlılığını ya da ölümünü belirlemek üzere genellikle kullanılan yöntemler; hücreyle örnekler belirli bir süre çoklu plaklarda etkileştirildikten sonra hücrelerin 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) ya da tripan mavisi ile boyanmasıdır. Boyama sadece ölü ya da canlı hücreleri hedef aldığı için kuyucuklardaki renk yoğunluğu farkı ile hücredeki canlılık ya da ölüm oranları diğer çalışmalarda belirlenebilmektedir. Ancak bu boyalar hücrelerle muamele edilmiş olan partikülleride boyayıp yıkama sonrası uzaklaştırılmazlarsa yalancı pozitif sonuç verebilirler. Çalışmalarımızda kullanılan partiküllerin sitotoksik etkilerinin daha hassas olarak belirlenebilmesi amacıyla kit yöntemi tercih edilmiştir. Mevcut literatürlerde bu kit ile çalışılmış nanopartikül sitotoksosite çalışmalarına rastlanmamıştır. Daha çok MTT ve trypan mavisi ile boyama yöntemlerinin kullanıldığı görülmüştür. 2008 yılında yapılmış olan bir çalışmada *Bacillus* türlerinin Çin hamster ovaryum (CHO) hücre hattında meydana getirdikleri toksik etkiyi WST-1 bazlı ve standart MTT bazlı sitotoksosite testlerini kullanarak araştırmışlar ve iki yöntem arasındaki farklılıkları ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre WST-1 sitotoksosite testi, MTT bazlı sitotoksosite testine göre daha güvenilir ve tekrarlanabilir bulunmuştur. Her iki yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında toksinlerin tanınmasında WST-1 kit yönteminin, MTT sitotoksosite belirleme yöntemine benzer ya da daha hassas sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır [Ngamwongsatit ve ark., 2008]. Bu nedenle bu tez kapsamında partiküllerin oluşturabileceği sitotoksik etkilerin daha hassas ve güvenilir olarak belirlenebilmesi için WST-1 kit yöntemi kullanılmıştır.

AshaRani ve arkadaşları [2009] yapmış oldukları bir çalışmada, gümüş nanopartiküllerin değişik konsantrasyonlarının, insan hücrelerindeki sitotoksik aktivitelerini lüminisans ve floresan tabanlı hassas analiz yöntemleriyle belirlemişlerdir. Çalışmada sağlıklı insan akciğer fibroblast (IMR-90) ve kanserli glioblastoma (U251) hücre hatları kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik çalışmalar sonucunda sitotoksik etkinin konsantrasyon ve zaman farkından etkilendiği belirtilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonucunda her iki hücrede de canlılık oranlarının diğer 24 ve 48 saatlik çalışmalara göre daha düşük olduğu çalışmada saptanmıştır. Tez kapsamında bizim çalışmalarımızda 24 saatlik inkübasyon sonrası canlılık oranları hesaplanmıştır. Bu literatürde bulunan 24 saatlik inkübasyon sonrası canlılık oranlarıyla çalışmamızı karşılaştırdığımızda bu çalışmada 0,1'lik konsantrasyonun, sağlıklı IMR-90 hücre hattında oluşturduğu ölüm oranı % 30'lardayken, çalışmalarımızda kullanılan Fe-Au manyetik nanopartikülün aynı konsantrasyonda sağlıklı gingival fibroblast hücresindeki sitotoksik etkisi % 18 olarak hesaplanmıştır. Bu fark çalışılan hücre hatlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği gibi Fe-Au nanopartiküllerin, gümüş partiküllere oranla daha az sitotoksik etki göstermesinden de kaynaklanabilir.

Nanopartiküllerin vücut içi kullanımlarında yaratabileceği dezavantajların saptanabilmesi için sitotoksisite testinin yanı sıra, oluşabilecek DNA hasarlarını da incelemek amacıyla Komet testi kullanılarak genotoksisite araştırmaları yapılmıştır. Karşılaştırmanın yapılabilmesi amacıyla sitotoksisitede kullanılan konsantrasyonlar ile bu çalışma konsantrasyonları aynı tutulmuştur. Ancak en yüksek konsantrasyonda bile yüksek bir % DNA hasarına rastlanmamıştır. Negatif ve çözücü kontrollere bakıldığında oluşan DNA hasarı farkının çok az olması bu partiküllerin bu konsantrasyonlarda hiç bir genotoksik etkiye sahip olmadıklarını göstermektedir. 0,1 mg/mL'lik en yüksek konsantrasyonda bile % DNA hasarı, her iki partikül çeşitinde de yaklaşık % 0,65 olarak belirlenmiştir. Komet testi sonuçlarında, kuyruk uzunluğunun baş uzunluğuna oranı % 5,0'ın altındaysa DNA hasarının olmadığı; % 5,1 ile % 20 arasındaysa düşük DNA hasarı; % 20,1 ile % 40 arasındaysa orta dereceli DNA hasarı; % 40,1 ile % 95,0 arasında ise yüksek



DNA hasarı olduğu ve % 95,1'den fazla ise DNA'nın tamamen hasar gördüğü kabul edilmektedir [Yen ve ark., 2001]. Bu gruplamaya göre bizim elde etmiş olduğumuz en yüksek % DNA hasarı gösteren küre nanopartiküllerin 0,1'lik konsantrasyonlarında kuyruk uzunluğunun baş uzunluğuna oranı 0,47 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla test etmiş olduğumuz partiküllerin ve konsantrasyonlarının genotoksik etkiye sahip olmadıklarını söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, bu partiküllerin biyoyumluluklarının yüksek olduğunun önemli bir kanıtıdır. Biyoyumlu partiküller nanoilaca yönelik çalışmalarda ya da hastalıkların tanılanabilmesi için oluşturulacak sistemlerde kullanılabilirler ve genotoksik etkilerinin olmaması da bu nedenle oldukça önemli bir sonuçtur. Barnes ve arkadaşları [2008] benzer şekilde Komet protokolünü kullanarak 4 ve 40 µg/mL'lik konsantrasyonlarda silika nanopartiküllerin genotoksik etkilerinin bulunmadığını göstermişlerdir.

Biyolojik aktivasyonları araştırılmış olan bu partiküller daha sonra immünosensör tasarımı için kullanılmıştır. Avidin bağlı Fe-Au manyetik nanopartiküller, biyotin etiketli özel antikor ile avidin-biyotin etkileşimi sayesinde hedefe spesifik antikor ile kaplanmıştır. Bu sayede hedef patojen ortamda kolaylıkla tanılanıp, seçilerek partiküllerin manyetik özelliği sayesinde ortamdaki uzaklaştırılabilmiştir. Çalışmada hedef patojen olarak *L. monocytogenes* bakterisi seçilmiştir. Bu nedenle nanopartiküller bu bakteriye özgü spesifik antikorla kaplanmıştır. Ancak bu immünosensör tasarımını henüz gerçekleştirmeden önce küre ve avidin bağlı küre yüzeylerde *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* bakterilerinin tutunma kapasiteleri immünosensör tasarımı sonrası sonuçlarla karşılaştırılabilmek için belirlenmiştir. Tüm bakteriler için hem avidinli küre hem de küre yüzeylerde ayrı ayrı tutunumlar hesaplanmıştır. Her üç bakteri de avidinli küre yüzeylere daha fazla tutunum göstermiştir. Bunun nedenini avidinin protein yapısında bir bileşik olup, bakterilerin avidine daha yüksek ilgi duyması olarak açıklayabiliriz. Ancak yüzeylerdeki tutunum miktarlarını birbirleriyle karşılaştırdığımızda her bakteri türünün yüzeylere olan ilgisinin değişik olduğu tespit edilmiştir. Sensör öncesi tutunum sonuçlarına göre en çok yüzeyde

tutunumu *L. monocytogenes* türü göstermiştir.  $2,8 \times 10^7$  cfu/mL bakteriden küre yüzeylerde  $5,7 \times 10^6$  cfu/mL; avidin bağlı küre yüzeylerde  $7,9 \times 10^6$  cfu/mL bakteri tutunmuştur. Bu da bize şunu göstermektedir; partiküller bakteri yüzeylerine tutunmada seçim göstermektedir. Bunun nedeni her bir bakteri türünün farklı yüzey özelliklerine sahip olmasıdır. Tutunmanın bu çalışma kapsamında önemli bir özellik olduğunu ancak nanopartiküllerin tıbbi nanomateryal olarak kullanımında ise dezavantaj oluşturacağı düşünülmektedir.

İmmüno sensör tasarımı için avidinli yüzey üzerine *L. monocytogenes*'e özgü antikor bağlanmış ve açıkta kalan uçlar etanolamin ile kapatılmıştır. Kapatma işlemi önemlidir çünkü partiküllerin açık yüzeylerinde önceden de test edildiği üzere birçok bakteri tutunum gösterebilir. Bu da spesifikliğin düşmesine neden olabilir. Sensör modeli oluşturulduktan sonra immüno sensörün *L. monocytogenes*'i yakalama başarısı incelenmiştir. Sensöre  $4,6 \times 10^7$  cfu/mL *L. monocytogenes* bakterisinden  $2,1 \times 10^6$ 'sının tutunduğu tespit edilmiştir. Antikor kaplanmamış avidin bağlı küreyle bu sonuç karşılaştırıldığında sensör sonrası daha az bakteri tespit edilmiş gibi görünse de bu açık uçların kapatılarak spesifikliğin artırılmasından kaynaklanmaktadır. Ortamda hedef bakteri dışında başka bakteri türleride mevcut olabilir. Hazırlanan sensörün başarısı yarışmalı ortamlar oluşturularak incelenmiştir. Karışık kültür ortamını hazırlamak için *L. monocytogenes* ve *S. aureus* bakterileri ile *L. monocytogenes* ve *S. typhimurium* bakterilerinin bulunduğu iki ayrı ortam hazırlanmıştır. Sensör bu ortamlarda *L. monocytogenes*'e oldukça yüksek bağlanma göstermiştir.

Gerçek ortamda *L. monocytogenes* bakteri yoğunluğu, Raman spektrometri tekniği kullanılarak *L. monocytogenes* tanılamaya yönelik geliştirilen manyetik immüno sensörler ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar klasik bir yöntem olan mikrobiyolojik canlılık sayım yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen bu yöntem bakteri yoğunluğunun belirlenmesinde klasik yöntemlere göre daha hızlı sonuçlar vermektedir. Sahada yapılması gereken hızlı ve basit tanılama için Raman spektroskopi kullanılması daha avantajlıdır. Klasik yöntem baz alınarak %

geri kazanım hesaplandığında sonuçlar % 94,7 - 115,4 aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar bize klasik yöntem ve geliştirilen yöntem arasında tutarlılık olduğunu göstermiştir. Bazı konsantrasyonlarda sonuçların % 100'den fazla çıkmasının nedeni spesifik olmayan bağlanmalardır. 2011 yılında Güven ve arkadaşları benzer bir teknik kullanarak *E. coli* tayinini gerçekleştirmişlerdir. Yapılmış olan bu çalışmada klasik sayma yöntemi ile Raman yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonrasında her iki yöntemde benzer sonuçlar elde edilmiştir [Güven ve ark., 2011]. Klasik sayım yöntemlerinde deneyin hazırlık aşaması ve sonuçların elde edilmesi günler alabilirken, Raman yönteminde eş zamanlı sonuçlar alınabilmektedir. Bu da geliştirilen yöntemi avantajlı kılmaktadır.

Yapılmış olan SEM ve TEM analiz görüntüleri ile nanopartiküllerin modifikasyonlu ve modifikasyonsuz hallerinin farklı bakteri yüzeylerine olan ilgilerinin ve tutunumlarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Manyetik Fe-Au nanopartiküllerin bakteri yüzeylerindeki tutunumları bakteri türlerine göre değişiklik göstermiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde bu partiküllerin *S. aureus* bakteri yüzeylerinin büyük bir kısmını kaplarken, *L. monocytogenes* bakterilerine neredeyse hiçbir tutunma göstermemiştir. Bu partikül yüzeyleri üzerine avidin bağlandıktan sonra yapılmış olan tutunma çalışmalarında da partiküllerin *L. monocytogenes* bakterileri üzerindeki tutunumlarında belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. Ancak *L. monocytogenes* türünü tanılamaya yönelik geliştirilmiş olan antikor bağlı immünosensör modelindeki tutunmaya baktığımızda *L. monocytogenes* bakterilerinin yüzeylerinde çok yoğun tutunmalar meydana gelmiştir. Aynı zamanda antikor partiküllere bağlandıktan sonra partiküller *S. aureus*'a olan yoğun ilgilerini kaybederek bu bakteriye neredeyse hiç bir bağlanma göstermemişlerdir. Bu sonuçlara göre *L. monocytogenes* türünü tanılamaya yönelik geliştirilmiş nanosensör modeli, oldukça yüksek bir bağlanma başarısı göstermiş ve spesifikliğin de çok yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilmiş olan TEM görüntüleri de bu sonuçları destekler niteliktedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar son yıllarda oldukça geniş kullanım alanı bulunan nano boyutlu malzemelerin avantajlarının ve dezavantajlarının belirlenebilmesinde oldukça önemlidir. Nano partiküller görüntüleme, sensör tasarımında kullanılabildiği gibi ileride vücut içi sistemlerde ilaçla modifiye edilerek tedavide ya da vücut içi hastalıkların teşhisinde ve farklı ortamlarda çeşitli amaçlara yönelik patojen algılama esaslı sensörlerin tasarımlarında da kullanılabilir. Bu nedenle bu partiküllerin biyolojik sistemler içerisindeki etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir. Tez kapsamında kullanılmış olan manyetik, Fe-Au nanopartiküller ile yapılmış olan biyouyumluluk belirleme çalışmaları, kullanım alanına göre seçilecek olan başka tip nanopartiküllerde ya da malzemelerde de kolaylıkla uygulanabilir yöntemlerdir. Eğer canlı organizmalara, nano-ilaca yönelik ya da görüntülemeye yönelik modifiye nanopartiküllerin verilmesi amacıyla çalışmalar yapıyorsa toksisite testleri ile bu materyallerin vücut içerisinde genotoksik ya da sitotoksik etkilerinin araştırılması önerilir. Çünkü kullanılan materyalin toksik etkisi yüksekse vücut içi sistemlerde organizma üzerinde yarardan çok ciddi zararlara sebebiyet verebilir. Bu olası zararların tespit edilebilmesi amacıyla biyolojik sistemlerde kullanılması hedeflenen nanopartiküllerin biyolojik uyumluluklarının belirlenmesi partiküllerin farklı kullanım alanları ve güvenilirliği açısından önemlidir. Çalışılan manyetik, Fe-Au partiküllerin biyouyumluluk testleri sonucunda sitotoksik etkilerinin düşük olduğu, bir miktar anti kanserojenik etkiye sahip oldukları ve genotoksik etkilerinin neredeyse hiç olmadığı belirlenmiştir. Bu yönüyle partiküllerin denenen konsantrasyonlarda biyo uyumlu olması nedeni ile canlı sistemlere zarar vermeden kullanımı mümkün olabilir. Ayrıca, partiküllerin antioksidan etkilerinin de bulunduğu yapılan testlerle belirlenmiştir. Bu da partiküllerin vücut içi sistemlerde kullanımında, ayrı bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Ancak partiküllerin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılması düşünülüyor ise toksik etkilerinin kullanılacak olan konsantrasyonlarda tekrar belirlenmesi önerilmektedir. Çünkü artan konsantrasyonlarda toksik etkilerinin de arttığı çalışmalarda belirlenmiştir. Ayrıca, nanomalzemelerin, yapay organ, implant gibi

vücut içerisinde kullanılacak materyaller olduğu da düşünüldüğünde, mikroorganizmalara karşı tutunum testlerinin yapılması hayati önem taşımaktadır. Çünkü kullanılan yüzey malzemesi, sistem içerisindeki patojen türlerin gelişimi ve malzeme üzerine tutunumu için uygun olabilir. Bu durumda materyaller, kullanılan canlılar için büyük bir tehdit oluşturabilir. Bu nedenle ayrıntılı çalışmalara gerek duyulmaktadır. Biyouyumluluk çalışmalarının yanısıra değişik patojen mikroorganizmalarla yapılmış olan tutunum çalışmalarında, partiküllerin farklı mikroorganizmalara karşı değişik tutunma eğilimleri gösterdiği ortaya çıkmıştır. Bu tip malzemelerde materyallerin ortamda bulunabilecek farklı mikroorganizmaları tutma özelliklerinin bilinmesi gereklidir. Biyolojik açıdan kısmi karakterizasyonu yapılmış bu nanopartiküllerin sensör harici farklı amaçla biyoteknolojik olarak kullanımı da mümkün olabilecektir.

Çalışmada biyouyumlulukları test edilmiş nanopartiküller ile karışık kültür ortamlarında spesifik bir bakteriyi tanıyabilen bir sensör modeli geliştirilmiştir. Sensör modelinin *L. monocytogenes*'i tanılama başarısı, çeşitli parametrelerle araştırılmış ve oldukça yüksek bulunmuştur. Tasarlanan sensör ile *L. monocytogenes* bakterisinin doğal bir ortam olan süt içerisinde de rahatlıkla tespit edilebildiği görülmüştür. *L. monocytogenes* türü insan ve hayvanlarda hastalığa neden olan en önemli gıda kaynaklı patojenler arasındadır. Bu tür özellikle süt ve süt ürünlerinde, etlerde, deniz ürünlerinde ve bazı sebzelerde bulunabilmektedir. Bu besinlerin tüketilmesi yoluyla da gıda zehirenmelerine yol açmaktadır. Bu yönüyle sensör üretimi ve kullanımıyla gıda kaynaklı zehirlenmelerin önüne geçilebilecektir. Tez kapsamında tasarlanan immünosensör modelinin son basamağındaki antikor bağlama işleminde seçilen antikor tipi hedef bakteriye göre değiştirilerek, aynı basamaklarla her türlü ortamda ayrımı istenilen herhangi bir bakteri türünü tanıyabilecek nitelikte tekrar tasarlanabilir. Yani bu model esas alınarak gıda patojeni ve kontaminant olabilecek bakteriler için de ayırıcı immünosensör oluşturmak mümkün olabilecektir. Bu çalışmanın daha sonra yapılacak olan diğer sensör tasarımlarına da ışık tutacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Ada, K., Turk, M., Oguztuzun, S., Kilic, M., Demirel, M., Tandogan, N., Ersayar, E. and Latif, O., "Cytotoxicity and apoptotic effects of nickel oxide nanoparticles in cultured HeLa cells" *Folia Histochem. Cyto.*, 48 (4): 524-529 (2010).

Allos, B. M., Moore, M.R., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V., "Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21<sup>st</sup> century: The foodnet perspective", *Clin. Infect. Dis.*, 38 (3): 115-120 (2004).

Alocilja, E. and Tahir, Z. M., "Label-free microbial biosensors using molecular nanowire transducers", Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 377-406 (2008).

Arbiol, J., Peir, F., Cornet, A., Morante, J. R., Perez-Omil, J. A. and Calvino, J. J., "Computer image HRTEM simulation of catalytic nanoclusters on semiconductor gas sensor materials supports", *Mater. Sci. & Eng. B.*, 91-92: 534-536 (2002).

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. and Diker, K. S., "Özel Mikrobiyoloji", *Medisan Yayınevi*, Ankara 362 (1999).

Asefa, T., Duncan, C. T. and Krishna, K. S., "Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors", *Analyst*, 134: 1980-1990 (2009).

AshaRani, P. V., Mun, G. L. K., Hande, M. P. and Valiyaveetil, S., "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells", *J. Am. Chem. Soc.*, 3 (2): 279-290 (2009).

Banada, P. P. and Bhunia, A. K., "Antibodies and immunoassays for detection of bacterial pathogens detection", Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 567-602 (2008).

Barnes, C. A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A., Palus, J., Les'niak, A., Salvati, A., Hanrahan, J. P., Jong, W. H., Dziubaltowska, E., Stepnik, M., Rydzyn'ski, K., Stepnik, M., Rydzn'ski, K., Mckerr, G., Lynch, I., Dawson, K. A. and Howard, C. V., "Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity", *Nano Lett.*, 8 (9): 3069-3074 (2008).

Bennett, R. W., "Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assaybased methodology", *J. Food. Protect.*, 68 (6): 1264-1270 (2005).

- Berry, C. C. and Mater, J., "Possible exploitation of magnetic nanoparticle–cell interaction for biomedical applications", *J. Mater. Chem.*, 15: 543–547 (2005).
- Beuchat, L. R., "*Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables", *Food Control*, 7 (4-5): 223-228 (1996).
- Bhunia, A. K., "Detection of significant bacterial pathogens and toxins of interest in homeland security", *J. Homel. Secur. Emerg.*, 1: 109-149 (2006).
- Biju, V., Itoh, T., Anas, A., Sujith, A. and Ishikawa, M., "Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications", *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (7): 2469–2495 (2008).
- Biradar, D., Lingappa, K. and Dayanand, A., "Antibacterial activity of nano goldparticles synthesized by *Bacillus sps.*", *J. Ecobiotech.*, 4 (1): 43-45 (2012).
- Blois, M. S., "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical", *Nature*, 181 (4617): 1199–1200 (1958).
- Borthwick, K. A. J., Love, T. E., McDonnell, M. B. and Coakley, W. T., "Improvement of immunodetection of bacterial spore antigen by ultrasonic cavitation", *Anal. Chem.*, 77 (22): 7242–7245 (2005).
- Boujday, S., Briandet, R., Salmain, M., Herry, J. M., Marnet, P. G., Gautier, M., and Pradier, C. M., "Detection of pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria by gold based immunosensors", *Microchim. Acta.*, 163 (3-4): 203-209 (2008).
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F.J., Tauxe, R. and Swaminathan, "Salmonella nomenclature", *J. Clin. Microbiol.*, 38 (7): 2465-2467 (2000).
- Brett, M. M., "Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits", *J. Appl. Microbiol.*, 84: 110-118 (1998).
- Cassadevall, A. and Pirofski, L., "Host-pathogen interaction: the attributes of virulence", *J. Infect. Dis.*, 184 (3): 337–344 (2001).
- Cerruti, M. G., Sauthier, M., Leonard, D., Liu, D., Duscher, G., Feldheim, D. L. and Franzen, S., "Gold and silica-coated gold nanoparticles as thermographic labels for DNA detection", *Anal. Chem.*, 78 (10): 3282–3288 (2006).
- Charlton, B. R., Kinde, H. and Jensen, L. H., "Environmental survey for *Listeria* species in California milk processing plants", *J. Food Protect.*, 53: 198-201 (1990).
- Chen, X. C., Deng, Y. L., Lin, Y., Pang, D. W., Qing, H., Qu, F. and Xie, H. Y., "Quantum dot-labeled aptamer nanoprobe specifically targeting glioma cells", *Nanotechnology*, 19 (23): 1–6 (2008).

- Cheng, V. C. C., Yew, W. W. and Yuen, K. Y., “Molecular diagnostics in tuberculosis”, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 24 (11): 711–720 (2005).
- Choi, J. D. and Choi, G. M., “Electrical and CO gas sensing properties of layered ZnO–CuO sensor”, *Sensor Actuat. B-Chem.*, 69 (1-2): 120–126 (2000).
- Colognato, R., Bonelli, A., Ponti, J., Farina, M., Bergamaschi, E., Sabbioni, E. and Migliore, L., “Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes *in-vitro*”, *Mutagenesis*, 23 (5): 377–382 (2008).
- Debarnot, D. N. and Epailard, F. P., “Polyaniline as a new sensitive layer for gas sensors”, *Anal. Chim. Acta.*, 475 (1-2): 1–15 (2003).
- Delibato, E., Bancone, M., Volpe, G., De Medici, D., Moscone, D. and Palleschi, G., “Development and comparative evaluation of different screening methods for detection of *Staphylococcus aureus*”, *Anal. Lett.*, 38 (10): 1569-1586 (2005).
- Dudak, F.C. and Boyaci, I. H., “Enumeration of immunomagnetically captured *Escherichia coli* in water samples using quantum dot-labeled antibodies”, *J. Rapid Meth. Aut. Mic.*, 16 (2): 122-131 (2008).
- Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L. and Mirkin, C. A., “Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles”, *Science*, 277 (5329): 1078–1081 (1997).
- El-Nehir, S. and Karakaya, S., “Bazı bitkisel gıdaların antioksidan aktivitelerinin saptanması”, *3. Gıda Mühendisliği Kongresi, TMMOB Gıda Mühendisliği Odası*, 253-266 (2003).
- Erades, L., Grandjean, D., Nayral, C., Soulantica, K., Chaudret, B., Menini, P., Parret, F. and Maisonnat, A., “Organometallic approach for platinum and palladium doping of tin and tin oxide nanoparticles: structural characterisation and gas sensor investigations”, *New J. Chem.*, 30 (7): 1026–1035 (2006).
- Farber, J. M. and Peterkin, P. I. “*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen” *Microbiol. Rev.*, 55(3): 476-511 (1991).
- Farrell, S., Halsall, H. B. and Heineman, W. R., “Immunoassay for *B-globigii* spores as a model for detecting B-anthraxis spores in finished water”, *Analyst*, 130 (4): 489–497 (2005).
- Feng, P., “Rapid methods for detecting foodborne pathogens”, *Bact. Anal. Manual*, 1: 1-29 (2001).



Forzani, E. S., Li, X. and Tao, N., “Hybrid amperometric and conductometric chemical sensor based on conducting polymer nanojunctions”, *Anal. Chem.*, 79 (14): 5217–5224 (2007).

Geddes, A. M. and Ellis, C. J., “Infection in immunocompromised patients”, *Q. J. Med.* 55(1): 5–14 (1985).

Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L. and Mirkin, C. A., “Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease”, *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102 (7): 2273–2276 (2004).

Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E. and Valk, H., “Surveillance of human listeriosis in France”, *Euro Surveillance*, 11: 79–81 (2006).

Goto, Y., Matsuno, R., Konno, T., Takai, M. and Ishihara, K., “Artificial cell membrane-covered nanoparticles embedding quantum dots as stable and highly sensitive fluorescence bioimaging probes”, *Biomacromolecules*, 9 (11): 3252–3257 (2008).

Gracias, K. S. and McKillip, J. L. “A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food”, *Can. J. Microbiol.*, 50 (11): 883–890 (2004).

Green, M., “Semiconductor quantum dots as biological imaging agents”, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 43 (32): 4129–4131 (2004).

Grow, A. E., “Label-free fingerprinting of pathogens by Raman spectroscopy techniques”, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 525-564 (2008).

Gu H., Xu K., Xu C. and Xu B., “Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Protein Separation and Pathogen Detection” *Chem. Commun.*, 9: 941-949 (2006).

Gudbjonsdottir, B., Suihiko, M. L., Gustavson, P., Thorkelssons, G., Salo, S. and Sjoberg, A. M., “The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries” *Food Microbiol.* 21(2): 217-225 (2004).

Gülmezoğlu, E. ve Ergüven, S., (3), “İmmünoloji”, *Hacettepe-Taş Kitapçılık*, Ankara, 3-74 (1994).

Gürmen, S. and Ebin, B., “Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri-1”, *TMMOB Metalurji Dergisi*, 150: 31-38 (2008).

Güven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U. and Boyacı, I. H., “SERS based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for *Escherichia coli* enumeration” *Analyst*, 136 (4): 740-748 (2011).

Haggerty, T. D., Perry, S., Sanchez, L., Perez-Perez, G. and Parsonnet, J., “Significance of transiently positive enzymelinked immunosorbent assay results in detection of helicobacter pylori in stool samples from children”, *J. Clin. Microbiol.* 43 (5): 2220–2223 (2005).

Haik, Y., Sawafta, R., Ciubotaru, I., Qablan, A., Tan, E. L., and Ong, K.G., “Magnetic techniques for rapid detection of pathogens”, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 415-458 (2008).

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., “Free Radicals in Biology and Medicine 4th ed.”, *Oxford University Press*, 84-96 (2006).

Hanks, C. T., Wataha, J. C. and Sun, Z., “*In-vitro* models of biocompatibility: A Review”, *Dent. Mater.*, 12 (3): 186-193 (1996).

Harman, D., “Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry”, *J. Gerontol.*, 11 (3): 298-300 (1956).

Hayat, M.A., “Colloidal gold, principles, methods and applications, 1 st edition”, *Academic Press*, London, 1-3 (1989).

Hays, P. S., Feeley, J. C., Graves, L. M., Ajello, G. W. and Fleming, D. W., “Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk”, *Appl. Environ. Microb.*, 51: 438-440 (1986).

Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. and Naumann, D., “Classification and identification of bacteria by Fourier transform infrared spectroscopy”, *J. Gen. Microbiol.* 137 (1): 69–79 (1991).

Helrich, K., “Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15 th ed.”, *Assoc. Anal. Chem. Inc.*, Gaithersburg, 449-450 (1990).

Hibi, K., Mitsubayashi, K., Fukuda, H., Ushio, H., Hayashi, T., Ren, H. and Endo, H., “Rapid direct determination using combined separation by prepared immunomagnetic and flow cytometry of flavobacterium psychrophilum”, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (9-10): 1916-1919 (2007).

Hnaiein, M., Hassen, W. M., Abdelghani, A., Fournier-Wirth, C., Coste, J., Bessueille, F., Leonard, D. and Jaffezeic-Renault, N. A., “A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for *E. coli* detection” *Electrochem. Commun.*, 10 (8): 1152-1154 (2008).

Hobson, N. S., Tothill, I. and Turner, A. P., “Microbial detection”, *Biosens. Bioelectron*, 11(5): 455-477 (1996).

Holt, C., Hirst, D., Sutherland, A. and MacDonald, F., “Discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variate analysis”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1): 377–378 (1995).

Hughes, D., Dailianis, A. and Hill, L., “An immunoassay method for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in cosmetics, pharmaceutical products, and raw materials”, *J. AOAC. Int.*, 82 (5): 1171-1174 (1999).

ISO 7405, “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials.”, *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland (1997).

ISO 10993, “Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: *In-vitro* methods.”, *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland (1999).

Internet: “<http://www.food-info.net/tr/bact/limon.htm>”, (2011).

Internet: “<http://www.food-info.net/tr/bact/staur.htm>”, (2011).

Internet: “<http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/942122061.pdf>”, (2010).

Internet: “<http://www.randoxlifesciences.com/Article/ViewArticle>”, (2011).

Internet: “<http://www.wisegeek.com/related/?kw=Monoclonal+Antibody>”, (2011).

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. and Wilkins, E., “Biosensors for the detection of pathogenic bacteria”, *Biosens. Bioelectron*, 14: 599-624 (1999).

Jacobsen, N. R., Pojana, G., White, P., Moller, P., Cohn, C. A., Korsholm, K. S., Vogel, U., Marcomini, A., Loft, S. and Wallin, H., “Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by single-walled carbon nanotubes and C60 fullerenes in the FE1-Muta Mouse lung epithelial cells”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 476–487 (2008).

Kamloth, K. P., “Chemical gas sensors based on organic semiconductor polypyrrole”, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32 (2): 121–140 (2002).

Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Moller, L., “Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes”, *Chem. Res. Toxicol.*, 21 (9): 1726–1732 (2008).

Kılıçturgay, K., “İmmünoloji”, *Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri*, Bursa, 67-70 (1997).

Kıralan, M., Ercoşkun, H. and Işıksal, S. “Gıda antioksidanları ve etki mekanizmaları”, *Akademik Gıda*, 7: 5-14 (2004).

Kim, Y. J., Yang, Y. S., Ha, S. C., Cho, S. M., Kim, Y. S., Kim, H. Y., Yang, H. and Kim, Y. T., “Mixed-ligand nanoparticles of chlorobenzenemethanethiol and n-octanethiol as chemical sensors”, *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 106 (1): 189–198 (2005).

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H. and Cho, M. H., “Antimicrobial effects of silver nanoparticles”, *Nanomed-Nanotechnol., Biology and Medicine*, 3 (1): 95-101 (2007).

Kisin, E. R., Murray, A. R., Keane, M. J., Shi, X. C., Berry, D.S., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W. E., Kagan, V. E. and Shvedova, A. A., “Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells”, *J. Toxicol. Env. Heal. A.*, 70 (24): 2071–2079 (2007).

Klabunde, K. J., Stark, J., Koper, J., Mohs, C., Park, D. G., Decker, S., Jiang, Y., Lagadic, I. and Zhang, D., “Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry”, *J. Phys. Chem.*, 100 (30): 12142-12153 (1996).

Kretzer, J. W., Biebl, M. and Miller, S., “Sample preparation: An essential prerequisite for high-quality bacteria detection”, *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 15-30 (2008).

Krieg, N. R., “Identification of prokaryotes”, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, 2 : 33–38 (2005).

Krogfelt, K. A., “Bacterial adhesion genetics, biogenesis, and its role in pathogenesis of afribrial adhesins of *Escherichia coli*”, *Rev. Infect. Dis.*, 13 (4): 721–735 (1991).

Labadie, J. and Desnier, I., “Selection of cell wall antigens for the rapid detection of bacteria by immunological methods”, *J. Appl. Bacteriol.*, 72(3): 220-226 (1992).

Lacava, L. M., Lacava, Z. G., Silva, M. F., Silva, O., Chaves, S. B., Azevedo, R. B., Pelegrini, F., Gansau, C., Buske, N., Sabolovic, D. and Morais, P. C., “Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice”, *Biophys. J.*, 80 (5): 2483-2486 (2001).

Li, L., Fan, M., Brown, R. C., Leeuwen, J. V., Wang, J., Wang, W., Song, Y. and Zhang, P., "Synthesis, properties, and environmental applications of nanoscale Iron-based materials: A Review", *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 36: 405– 431 (2006).

Liddell, E., "Antibodies, The Immunoassay Handbook 3 rd ed.", *Elsevier*, New York, 144-161 (2005).

Love, T. E. and Jones, B., "Introduction to pathogenic bacteria", Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 3-12 (2008).

Luo, P. G. and Stutzenberger, F. J., "Nanotechnology in the detection and control of microorganisms", *Adv. Appl. Microbiol.*, 63: 145-181 (2008).

Ma, N., Yang, J., Stewart, K. M. and Kelley, S. O., "DNA-passivated CdS nanocrystals: luminescence, bioimaging, and toxicity profiles", *Langmuir*, 23 (26): 12783–12787 (2007).

Marquis, J. B., Love, S. A., Braun, K. L. and Haynes, C. L., "Analytical methods to assess nanoparticle toxicity", *Analyst*, 134: 425-439 (2009).

Martinez, M. A. R. and Torres, A. R., "Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging", *Mech. Ageing Dev.*, 66 (2): 213-222 (1992).

McKillip, J. L. and Drake, M., "Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food", *J. Food. Prot.*, 67 (4): 823-832 (2004).

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., Mccaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V., "Food-related illness and death in the United States", *Emerg. Infect. Dis.*, 5(5): 607–625 (1999).

Milbury, P. E. and Richer, A. C., "Understanding the antioxidant controversy: scrutinizing the fountain of youth", *Praeger Publishers*, 31-79 (2007).

Mock, M. and Fouet, A., "Anthrax", *Ann. Rev. Microbiol.*, 55 (1): 647–671 (2001).

Mohanraj, V. J. and Chen, Y., "Nanoparticles-A Review", *Trop. J. Pharm. Res.*, 5 (1): 561-573 (2006).

Moldenhauer, J. and Yvon, P., "Environmental monitoring using Scan RDI Polym'air, Environmental Monitoring: A Comprehensive Handbook" *PDA/DHI*, 249–260 (2005).

Morita, M., Tanji, Y., Mizoguchi, K., Akitsu, T., Kijima, N. and Unno, H., "Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes" *FEMS Microbiol. Lett.*, 211 (1): 77–83 (2002).

Mroz, P., Pawlak, A., Satti, M., Lee, H., Wharton, T., Gali, H., Sarna, T. and Hamblin, M. R., "Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism", *Free Radical Bio. Med.*, 43 (5): 711–719 (2007).

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S. and Pfaller, M. A., "Medical Microbiology, 4th ed.", *Mosby*, St Louis, 202 (2002).

Naja, G., Bouvrette, P., Hrapovic, S. and Luong, J. H. T., "Raman-based detection of bacteria using silver nanoparticles conjugated with antibodies", *Analyst*, 132: 679-686 (2007).

Nam, J. M., Stoeva, S. I. and Mirkin, C. A., "Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity", *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (19): 5932–5933 (2004).

Newby, P. J. and Johnson, B., "Overview of alternative rapid microbiological technologies", *Interpharm/CRC*, Washington, 41–60 (2003).

Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. and Bhunia, A. K., "WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line", *J. Microbiol. Meth.*, 73 (3): 211-215 (2008).

Niranjan, R. S., Chaudhary, V.A., Mulla, I.S. and Vijayamohan K., "A novel hydrogen sulfide room temperature sensor based on copper nanocluster functionalized tin oxide thin films", *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 85 (1-2): 26–32 (2002).

Nolan, J. K., Marshall, P. and Mine, Y., "Advances in the value of egg and egg components for human health" *J. Agric. Food Chem.*, 53 (22): 8421–8431 (2005).

Naumann, D., Helm, D. and Labischinski, H., "Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy", *Nature*, 351: 81–82 (1991).

Ozdoğan, N., "HPLC-DAD isolation of antioxidant compounds in *Aesculus hippocastanum* bark extract and cytotoxic effects on HL-60 cells", Yüksek Lisans Tezi, *ODTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-13, 2007.

Patel, P.D., "Overview of affinity biosensors in food analysis", *J. AOAC.*, 89 (3) :805-818 (2006).

Pharmeuropha, "Alternative methods for control of microbiological quality", 16 (4): 555-565 (2004).

Portakal, O., "Bioassays and nanoparticles", *Turk. J. Biochem.*, 33(1): 35-38 (2008).

Ponce-de-Leon, S., "The needs of developing countries and the resources required", *J. Hosp. Infect.*, 18: 376–381 (1991).

Potyralo, R. A., Ding, Z., Butts, M. D., Genovese, S. E. and Deng, T., "Selective Chemical Sensing Using Structurally Colored Core-Shell Colloidal Crystal Films", *IEEE. Sens. J.*, 8 (6): 815-822 (2008).

Prencipe, G., Tabakman, S. M., Welsher, K., Liu, Z., Goodwin, A. P., Zhang, L., Henry, J. and Dai, H., "PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation", *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (13): 4783–4787 (2009).

Qin, W. J. and Yung, L. Y. L., "Nanoparticle-based detection and quantification of DNA with single nucleotide polymorphism (SNP) discrimination selectivity", *Nucleic Acids Res.*, 35 (17): 7698 (2007).

Reinheimer, J. A., Demkow, M.R. and Condioti, M. C., "Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures", *Aust J. Dairy Technol.*, 45 (1): 5-9 (1990).

Rhoades, J. R., Duffy, G. and Koutsoumanis, K., "Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review", *Food Microbiol.*, 26 (4): 357–376 (2009).

Roche, S. M., Kerouanton, A., Minet, J., Le Monnier, A., Brisabois, A. and Velge, P., "Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments", *Int. J. Food Microbiol.*, 130 (2): 151–155 (2009).

Rocourt, J. and Cossart, P., "*Listeria monocytogenes*", *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, 337-352 (1997).

Rowe, C. A., Tender, L. M., Feldstein, M. J., Joel, P. G., Stephanie, B., Scruggs, S. B., MacCraith, B. D., Cras, J. J. and Ligler, F. S. "Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes", *Anal. Chem.*, 71 (17): 3846–3852 (1999).

Saikia, J. P., Paul, S., Konwar, B. K. and Samdarshi, S. K., "Nickel oxide nanoparticles: A novel antioxidant", *Colloid. Surface. B.*, 78 (1): 146-148 (2010).

Sandhy, S., Chen, W. and Mulchandina, A., "Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* from fresh produce and water", *Anal. Chim. Acta*, 614 (2): 208-212 (2008).

Sanvicens, N., Pastells, C., Pascual, N. and Marco, M.P., "Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria", *Trac-Trend. Anal. Chem.*, 28 (11): 1243-1252 (2009).

Sato, K., Hosokawa, K. and Maeda, M., "Non-cross-linking gold nanoparticle aggregation as a detection method for single-base substitutions", *Nucleic Acids Res.*, 33 (1): e4 (2005).

Scandalios, J. G. "Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defences." *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38 (7): 995-1014 (2005).

Schaffazick, S. R., Pohlmann, A. R., Cordova, C. A. S., Creczynski, T. B. and Guterres, S. S., "Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation", *Int. J. Pharmaceut.*, 289 (1-2): 209-213 (2005).

Schmalz, G., "Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials", *Clin. Oral Investig.*, 1 (4): 154-162 (1997).

Schultes, G., Schmidt, M., Truar, M., Goettel, D., Freitag-Weber, O. and Werner, U., "Co-deposition of silver nanoclusters and sputtered alumina for sensor devices", *Thin Solid Films*, 515 (20-21): 7790-7797 (2007).

Seltmann, G., Voigt, W. and Beer, W., "Application of physico-chemical typing methods for the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains of phage type 25/17", *Epidemiol. Infect.*, 113 (3): 411-424 (1994).

Shi, Y. L. and Asefa, T., "Tailored core-shell-shell nanostructures: sandwiching gold nanoparticles between silica cores and tunable silica shells", *Langmuir*, 23 (18): 9455-9462 (2007).

Shimizu, K., Chinzei, I., Nishiyama, H., Kakimoto, S., Sugaya, S., Yokoi, H. and Satsuma, A., "Hydrogen sensor based on WO<sub>3</sub> subnano-clusters and Pt co-loaded on ZrO<sub>2</sub>", *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 134 (2): 618-624 (2008).

Si, S., Li, C., Wang, X., Peng, Q. and Li, Y., "Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/ZnO core-shell nanorods for gas sensors", *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 119 (1): 52-56 (2006).

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175(1): 184 -191 (1988).



Smith, H., “Microbial surfaces in relation to pathogenicity”, *Bacteriol. Rev.*, 41 (2): 475-500 (1977).

Smith, D.C. and Williams, D. F., “Biocompatibility of dental materials: Biocompatibility of preventive dental materials and bonding agents”, Florida, *CRC Press*, Florida, (2001).

Socol, G., Axente, E., Ristoscu, C., Sima, F., Popescu, A., Stefan, N. and Mihailescua, I. N., “Enhanced gas sensing of Au nanocluster-doped or -coated zinc oxide thin films”, *J. Appl. Phys.*, 102 (8): 083103 (1–6) (2007).

Song, J. M., Culha, M., Kasili, P. A., Guy, D. G. and Tuan V. D., “A compact CMOS biochip immunosensor towards the detection of a single bacteria”, *Biosens. Bioelectron.*, 20 (11): 2203–2209 (2005).

Speight, S. E., Hallis, B. A., Bennett, A. M., and Benbough, J. E., “Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of airborne microorganisms used in biotechnology”, *J. Aerosol Sci.*, 28 (3): 483–492 (1997).

Stevenson, H. J. R. and Bolduan, O. E., “Infrared spectrophotometry as a means for identification of bacteria”, *Science*, 116 (3005): 111–113 (1952).

Sun, S. and Zeng, H., “Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles”, *J. Am. Chem. Soc.*, 124(28): 8204-8205 (2002).

Sun, Y., Mayers, B. T. and Xia, Y., “Template-engaged replacement reaction: a one step approach to the large scale synthesis of metal nanostructures with hollow interiors”, *Nano Lett.*, 2 (5): 481-485 (2002).

Taylor, C. M. and Roberts, I. S., “Capsular Polysaccharides and their Role in Virulence”, *Concepts in Bacterial Virulence*, 12: 55–66 (2005).

Temur, E., “Bakteri tayini için nanopartikül tabanlı sensör geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, (2010).

Temur, E., Boyacı, İ. H., Tamer, U., Ünsal, H., Aydoğan, N., “A highly sensitive detection platform based on surface – enhanced Raman scattering for *Escherichia coli* enumeration”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397: 1595 – 1604 (2010).

Thomas, L. C. and Greenstreet, J. E. S., “The identification of micro-organisms by infrared spectrophotometry”, *Spectrochim. Acta*, 6 (4): 302–319 (1954).

Topçu, A. V., Söyletir, G. and Doğanay, M., “İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi”, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 165 (2002).

Tunçel, A., “Sabit protetik restorasyonlarda kullanılan farklı fiberle güçlendirilmiş kompozit yapıların yüzey sertliği, yüzey pürüzlülüğü ve sitotoksitelerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Sivas, (2005).

Tuomanen, E. and Weiss, A., “Characterisation of two adhesins of Bordatella pertussis for human ciliated respiratoryepithelial cells”, **J. Infect. Dis.**, 152 (1): 118–125 (1985).

Turan, E., “Sarı ulak tarsus zeytini ve siyah çaydan elde edilen fenolik ekstraktların antioksidan etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, (2005).

Varshney, M., Yang, L., Su, X. L., and Li, Y., “Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef”, **J. Food Prot.** 68(9): 1804–1811 (2005).

Watson, D. W. and Brandly, C. A., “Virulence and pathogenicity”, **Annu. Rev. Microbiol.**, 3: 195–220 (1949).

Wood, W. B. and Davis, B. D., “Host-parasite relations in bacterial infections”, **Microbiology**, 551–571 (1980).

Xing, S., Zhao, C., Jing, S., Wu, Y. and Wang, Z., “Morphology and gas-sensing behavior of in situ polymerized nanostructured polyaniline films”, **Eur. Polym. J.**, 42 (10): 2730–2735 (2006).

Yang, H. H., Zhang, W. M., Chen, X. L., Zhuang, Z. X., Xu, J. G. and Wang, X. R., “Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations”, **Anal. Chem.**, 76 (5): 1316-1321 (2004).

Yang, H., Qu, L., Wimbrow, A. N., Jiang, X., and Sun, Y., “Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR”, **Int. J. Food Microbiol.**, 118(2): 132-138 (2007).

Yavuz, M. and Korukluoglu, M., “The Importance of Listeria monocytogenesis in foods and its effect on human health”, **Journal of Agricultural Faculty of Uludag university**, 24 (1): 1-10 (2010).

Yeh, K. S., Tsai, C. E., Chen, S. P. and Liao, C. W., “Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples”, **J. Food Prot.**, 65 (10): 1656–1659 (2002).

Yen, G. C., Chen, H. Y. and Peng, H. H., “Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants”, **Food Chem. Toxicol.**, 39 (11): 1045-1053 (2001).

Yoon, T. J., Yu, K. N., Kim, E., Kim, J. S., Kim, B. G., Yun, S. H., Sohn, B. H., Cho, M. H., Lee, J. K. and Park, S. B., “Specific targeting, cell sorting, and bioimaging with smart magnetic silica core-shell nanomaterials”, *Small*, 2 (2): 209–215 (2006).

Yousef, A. E., “Detection of bacterial pathogens in different matrices: Current practices and challenges”, Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems, 1 st ed., Mohammed Zourob, Souna Elwary, Anthony Turner, *Springer Science*, New York, 31-48 (2008).

Yuan, J., Guoa, W., Yinb, J. and Wang, E., “Glutathione-capped CdTe quantum dots for the sensitive detection of glucose”, *Talanta*, 77 (5): 1858–1863 (2009).

Zaman, M. B., Baral, T. N., Zhang, J., Whitfield, D. and Yu, K., “Single-Domain Antibody Functionalized CdSe/ZnS Quantum Dots for Cellular Imaging of Cancer Cells”, *J. Phys. Chem. C*, 113 (2): 496–499 (2009).

Zeng, Y., Zhang, T., Yang, H., Qiao, L., Qi, Q., Cao, F., Zhang, Y. and Wang, R., “Preparation of Cu-CZn/ZnO core-shell nanocomposite by wire electrical explosion and precipitation process in aqueous solution and CO sensing properties”, *Appl. Surf. Sci.*, 255 (7): 4045–4049 (2009).

Zheng, W. and He, L., “Particle stability in polymer-assisted reverse colorimetric DNA assays”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (4): 1305–1313 (2009).

**EKLER**

## EK-1 Gazi Üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu


**GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŐİMSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU  
DEğERLENDİRME FORMU**

DEğERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi GiriŐimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dekanlık Binası 06500 BeŐevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

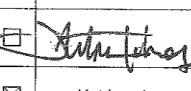

BAŐVURU BİLGİLERİ	ARAŐTIRMANIN AÇIK ADI	Nanopartiküllerin Genotoksik Etkilerinin Araştırılması		
	SORUMLU ARAŐTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Belma AŐım		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
	DİğER	<input type="checkbox"/>	<b>Bireysel Araştırma Projesi</b>	
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŐİMSEL <input checked="" type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŐİMSEL OLMAYAN 5.İttere ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar	

DEğERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEğERLENDİRİLEN DİğER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		<input checked="" type="checkbox"/>	
	SİGORTA		<input type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 163	Toplantı tarihi: 25.04.2012
	Üniversitemiz Fen Fakóltesinde Prof.Dr.Belma AŐım'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künnyede kayıtlı baŐvuru bilgileri verilen, <i>Bireysel Araştırma Projesi</i> olan klinik araştırma baŐvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaŐım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına G.Ü.T.F. GiriŐimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki-Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğuna dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmî Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmî Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŐKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOğLU						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOğLU BAŐKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŐ BAŐKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

EK-1 (Devam) Gazi Üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu değerlendirme formu

Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Öznür L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOğLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Emine ŐEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* :Araştırma ile ilişki  
\*\* :Toplantıda Bulunma

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YEĞENOĞLU, Hande  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 18.11.1987, Ankara  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0 (505) 420 08 88  
e-mail : [handeyegenoglu@mynet.com](mailto:handeyegenoglu@mynet.com)

### Eğitim Derece

Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Ankara Cumhuriyet Lisesi	2005

### Yabancı Dil İngilizce

### Yayınlar

1. "Comparison of Antioxidant Capacities of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer by Using Different *In-Vitro* Methods" ,Journal of Medicinal Foods, Hande YEGENOGLU, Feyza OKE, Belma ASLIM, 14(5), 2011, 512-516.

