

**ANTİBAKTERİYEL ve MİMİK ÖZELLİKTE
NANOBİYOKONJUGAT
GELİŞTİRİLMESİ**

Bahar Tuba FINDIK

Yüksek Lisans Tezi
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bölümü
Ocak 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bahar Tuba FINDIK'ın "**Antibakteriyel ve mimik özellikte nanobiyokonjugat geliştirilmesi**" başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 25.12.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. RIDVAN SAY
Üye	:Yard. Doç. Dr. NALAN YILMAZ SARIÖZLÜ
Üye	: Yard. Doç. Dr. AYÇA ATILIR ÖZCAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTİBAKTERİYEL ve MİMİK ÖZELLİKTE NANOBIYOKONJUGAT GELİŞTİRİLMESİ

Bahar Tuba FINDIK

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji

Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY

2009, 61 sayfa

S.aureus hafif deri enfeksiyonlarından, endokard iltihabı, septisemi, toksik şok sendromu gibi hayati öneme sahip pek çok hastalığa neden olan çok yaygın rastlanan insan ve hayvan patojenidir. *S. aureus* enfeksiyonlarda kullanılan kemoterapötiklere hızla direnç kazanmaktadır. Özellikle lizozime, metisiline ve glikopeptitlere direnç kazanması mevcut antibiyotiklerle tedavi sorunları yaşanmasına neden olduğundan yeni nesil antibiyotikler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmaktadır.

S. aureus'un hastalık oluşturma yeteneği sahip olduğu virulans faktörlerine bağlıdır. En önemli virulans faktörleri stafilokokların konak dokularında kolonize olmasını sağlayan yüzey proteinleridir. Protein A immunoglobulinleri yanlış oryantasyonda bağlayarak enfeksiyon boyunca bakteri yüzeyini çevreleyip, bakterinin kamufule olmasını sağlayan yüzey proteinidir.

Bu çalışmada, protein A blokasyonuna yönelik fotosensitif Mikroemülsiyon Tekniği ile Polimerik nano IgG ler sentezlenmiş ve biyokonjugasyon yöntemi ile lizozim için polimerik nano IgG'ler üzerinde yeni bağlanma bölgeleri geliştirilmiştir. Sentez işlemlerinde floresan özelliğe sahip kimyasallar kullanıldığından aktivite testleri floresans spektrofotometrisi ile yapılmıştır. Sentezlenen nanobiyokonjugatların in vitro ortamda aktivitesi tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *S.aureus*, Protein A, Polimerik Nano IgG

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DEVELOPMENT OF NANOBIOCONJUGATE HAVING ANTIBACTERIAL AND MIMIC PROPERTIES

Bahar Tuba FINDIK

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Program

Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ridvan SAY

2009, 61 pages

S. aureus is a common human and animal pathogen which can cause a wide variety of infections from relatively minor skin infections to life-threatening systemic illnesses such as endocarditis, sepsis, toxic shock syndromes. *S. aureus* becomes swiftly resistant to chemotherapeutic which are used in infections. Researches on some new antibiotic options are becoming more intense because treatment of infections with antibiotics has become increasingly difficult owing to the widespread occurrence of strains that are resistant to multiple antibiotics, known as *meticillin*, *lysozyme*, *glycopeptide*.

It's ability to cause diseases depends on it's virulence factor. The most important virulence factors are surface proteins that promote adhesion to host tissue. Protein A is a surface protein that interacts with IgG to coat the surface of the cell with IgG molecules during the infection that are in the incorrect orientation to provide camouflage on bacteria.

In this study, polymeric nano IgG has been synthesied with photosensitive micro emulsion technique devoted to protein A blocation and developed some binding parts on nano IgG for *lysozyme* with bioconjugation method. Due to using fluorescence feature chemical, the activity tests have carried out by fluorescence spectrophotometer. The activity of nanobioconjugates have been determined in vitro.

Key Words: *S. aureus*, Protein A, Polymeric Nano IgG

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince ilgisi ve yardımlarıyla her zaman yanımda olan, bana fikirleriyle yol gösteren Sayın Prof.Dr. Rıdvan SAY'a,

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan ve deneysel çalışmalarım esnasında her türlü konuda bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Sayın Araş. Gör. Rasime DEMİREL'e,

Çalışmalarım süresince desteği ve yardımlarını eksik etmeyen Sayın Doç.Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Çalışmam boyunca yardım ve destekleriyle katkıda bulunan arkadaşlarım Suzan YAZAR, Sibel BÜYÜKTİRYAKI, Güner SAKA, Şenay ARIKAN, Özlem BİÇEN ve Rüstem KEÇİLİ'ye,

Tez çalışmam süresince destekleriyle hep yanımda olan Sentetik Reseptörler Araştırma Grubu (SYNREG) Üyeleri'nden Sayın Yard. Doç. Sibel EMİR DİLTEMİZ ve Sayın Yard. Doç. Ayça ATILIR ÖZCAN'a,

Uzakta olmalarına rağmen maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Ailem'e,

Ve üniversite ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen manevi annem Ayfer YAZAR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Bahar Tuba FINDIK

Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bakteriyel Patojenlik.....	3
1.1.1. Endotoksin.....	3
1.1.2. Ekzotoksin.....	5
1.2. Staphylococcus aureus.....	6
1.2.1. S. aureus'un Epidemiyoloji.....	10
1.2.2. S.aureus'un Salgıladığı Enterotoksinler.....	11
1.2.3. S. aureus' un neden olduğu hastalıklar.....	12
1.3. S. aureus' un Virulans ve Patojeniteleri.....	15
1.3.1. Hücre duvarı.....	16
1.3.2. Kapsül.....	16
1.3.3. Yüzey Proteinleri.....	17
1.3.3.1. Stafilokokal Protein A.....	18
1.4. Antimikrobiyal peptitlere Direnç.....	22
1.4.1. Lizozime Direnç.....	22
1.5. Fagositoz.....	24
1.6. Immunoglobulin Yapısı.....	24
1.7. Nanobiyokonjugasyon.....	27
1.7.1. Antikor Modifikasyonu ve Konjugasyonu.....	29
1.7.2. Biyokonjugasyon Ajanları.....	31
1.7.2.1. EDC.....	31

1.7.2.2. NHS.....	33
1.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopu.....	36
1.9. Akış Sitometrisi.....	36
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
2.1. Materyal.....	39
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	39
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Nanobiyokonjugatların Sentezi.....	40
2.2.1.1. Fotosensitif Mikroemülsiyon Tekniği ile Polimerik Nano IgG'nin Sentezi.....	40
2.2.1.2 Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim Sentezi.....	40
2.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	41
2.2.2.1. Boyut Analizi.....	41
2.2.2.2. Zeta Potansiyel Analizi.....	41
2.2.3. İn Vitro Çalışmalar.....	41
2.2.3.1. Bakteri Suşu.....	41
2.2.3.2. Besi yerleri.....	42
2.2.3.3. Bakteri süspansiyonlarının Hazırlanması.....	42
2.2.3.4. Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi.....	43
2.2.3.5. Canlı Hücre Sayımı.....	43
2.2.4. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopu Hazırlık Aşaması.....	44
2.2.4.1 Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması.....	44
2.2.5. Biyouyumluluk Testi.....	45
2.2.5.1. Hücre Kültürü.....	45
2.2.5.2. Polimerik Nano IgG konjuge lizozim'in Sağlıklı Hücelere Etkisi.....	45
2.2.5.3. Akış Sitometrisi.....	45
3 BULGULAR.....	46
3.1. Floresan Ölçüm Sonuçları.....	46

3.1.1. Polimerik Nano IgG ve Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim Kompleksinin analiz Sonuçları.....	46
3.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	47
3.2.1. Boyut Analizi.....	47
3.2.2. Zeta Potansiyel Analizi.....	49
3.3. İn Vitro Deneyle.....	49
3.4. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopu Görüntüleri.....	51
3.5. Biyoyumluluk Testi Sonuçları.....	53
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Bakteri Şekilleri.....	2
1.2. Gram negatif bakterilerin hücre membranı.....	4
1.3. Gram negatif bakterilerde endotoksin yapısı.....	4
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.5. Stafilokokal enfeksiyonuna örnek.....	8
1.6. <i>S.aureus</i> enfeksiyonuna örnek.....	12
1.7. Endokard İltihabı.....	13
1.8. Peptidoglikan tabakası tekrarlayan altbirimleri.....	16
1.9. <i>S. aureus</i> 'un yapısı.....	18
1.10. Protein A'nın şematik gösterimi.....	19
1.11. Protein A ve IgG etkileşim mekanizmasının şematik gösterimi.....	19
1.12. Protein A'nın IgG'yi Fab bölgesinden bağlamasının şematik gösterimi....	20
1.13. Protein A'nın IgM molekülünü bloklamasının şematik gösterimi.....	20
1.14. <i>Staphylococcus aureus</i> opsonofagositozisten kaçınma mekanizması.....	21
1.15. Lizozim'in yapısı.....	23
1.16. IgG'in yapısı.....	26
1.17. IgG'nin yapısı.....	26
1.18. EDC'nin molekül yapısı.....	32
1.19. EDC reaksiyonu.....	33
1.20. Kimyasal modifikasyon reaktifleri NHS ve Sulfo-NHS'nin yapısı.....	34
1.21. EDC ve NHS reaksiyonu.....	35
1.22. Hücrelerde erken ve geç apopitoz.....	38
1.23. Akış sitometrisinde hücrelerin işaretlenmesi.....	38
2.1. Bakteri süspansiyonlarının Hazırlanması.....	42
2.2. Yüzeye yayma yöntemiyle sayım.....	43
3.1. Polimerik Nano IgG ve polimerik Nano IgG konjuge lizozim kompleksinin karşılaştırılması.....	47
3.2. Polimerik Nano IgG boyut analizi.....	48
3.3. Polimerik Nano IgG konjuge-lizozim boyut analiz.....	48
3.4. Zeta potansiyel çalışmaları.....	49

3.5.	<i>S.aureus</i> kültürleri.....	51
3.6.	<i>S.aureus</i> kontrol grubu lazer taramalı konfokal mikroskobu görüntüsü...	52
3.7.	800 µl polimerik Nano IgG konjuge lizozim ilave edilmiş <i>S.aureus</i> süspansiyonu lazer taramalı konfokal mikroskobu görüntüsü.....	52
3.8.	Kontrol hücresi ve polimerik nano IgG konjuge lizozimin akış sitometrisi sonuçları.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Endotoksinin biyolojik aktiviteleri.	5
1.2. Staphylococcus aureus'un bağışıklık sistemini bertaraf etmesini sağlayan faktörlerinin yüzdesel gösterimi.....	15
3.1. Polimerik Nano IgG ve polimerik Nano IgG konjuge lizozim aktivite tayini sonuçları.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

EDC: Etil-3-[3-dimetilaminoproril]karbodiimid hidroklorid

IgG: İmmünglobülin G

SpA: *Staphylococcus aureus* yüzey proteini Protein A

Sulfo-NHS: *N*-hidroksisulfosüksinimid

3T3: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı

1.GİRİŞ

Staphylococcus aureus tehlikeli toplum ve hastane hastalıklarıyla ilişkili yaygın olarak rastlanan bir patojendir. Halk sağlığının ana problemi olarak kabul edilmektedir. Soyulmuş deri sendromu, gastroenterit, toksik şok sendromu (TSS), cilt enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, endokardit, barsak enfeksiyonu, menenjit, eklem romatizması, yara iltihaplarına ve önemli ölçüde gıda zehirlenmelerine neden olur. Diğer taraftan *S. aureus* suşlarının birçoğu doku toksinlerinin dışında yüksek toksisiteli ve barsaklarda etkili olan enterotoksinleri oluşturarak intoksikasyonlara da neden olmaktadır. Etkilerini bağışıklık sistemimizi sahip olduğu yüzey proteinleri ile bloke ederek ve çeşitli toksinler salgılayarak göstermektedir. Bağışıklık sistemi üzerinde ki en büyük yüzey proteini olan protein A ile gerçekleştirmektedir. Protein A her biri immünglobulin G (IgG)' yi bağlama yeteneğine sahip 5 altbirimden oluşan bir duvar çapa proteinidir. Protein A- IgG bağlanma mekanizması IgG aktivitesini bloklayacak şekilde IgG'nin Fc bölgesinden gerçekleşmektedir. Bu şekilde enfeksiyon boyunca bağışıklık sisteminin etkileri *S.aureus* tarafından engellenmiş olmaktadır.

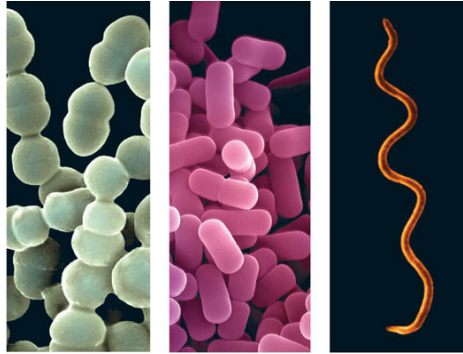
S. aureus enfeksiyon tedavisinde kullanılan kemoterapötiklere hızla direnç kazanmaktadır. Özellikle lizozime, metisiline ve glikopeptidlere direnç kazanması mevcut antibiyotiklerle tedavi sorunları yaşanmasına neden olduğundan yeni nesil antibiyotikler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Pek çok enfeksiyon tedavisinde kullanılan doğal bir antibiyotik olan lizozim, hücre duvarı peptidoglikan tabakasında ki N-asetil muramik asit ve N-asetilglukozamin arasında ki glikozidik bağı parçalayarak bakteri üzerinde etki gösteren bir muramidazdır. Bu işlem sonucunda hücre lizize uğrar. *S. aureus* lizozime direnç göstermesinin altında yatan biyokimyasal neden ise membrana bağlı O-asetiltransferaz'ın muramik asidin C6 hidroksil grubunu modifiye etmesine dayanmaktadır. Bu modifikasyon sonucunda lizozim membrana bağlanamaz ve aktivite gösteremez.

Biz bu çalışmamızda ise literatürde ilk kez *S. aureus* etkilerini çok yönlü engellemeye yönelik antibakteriyel ve mimik özellikte nanobiyokonjugatlar sentezlemeyi hedefledik. Bu çalışmada biyokonjugasyonu yapılacak ana biyolojik

madde doğal bir başka biyolojik maddeyle konjuge edilerek önceden sahip olduğu niteliklere bir yenisini daha katarak çok fonksiyonlu yapılar elde edilmiştir. Polimerik nano IgG fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyonu tekniği ile sentezlenmiş ve daha sonra bu sentezlenen nanobiyo madde aynı yöntemle lizozim biyokonjugasyonu yapılarak fotosensitif nanobiyokonjugatlar elde edilmiştir. Sentezlenen polimerik nano IgG ler ile *S. aureus*'un hücre membranında bulunan protein A'yı bloklaması hedeflenmiş ve aynı zamanda lizozim için yeni bir bağlanma bölgesi oluşturularak *S.aureus* tarafından direnç oluşturulması bertaraf edilmiştir. Sentezlenen nanobiyokonjugatların in vitro ortamda aktivitesi incelenmiştir.

1.1 BAKTERİYEL PATOJENLİK

Bakteriler tek hücreli mikroorganizmalardır. Prokaryot organizmalar olduklarından dolayı zarla çevrili organelleri yoktur. Boyutları birkaç mikrometre uzunluğundadır. Işık mikroskopunda incelendiklerinde çubuk, yuvarlak, spiral ve virgül şeklinde gözükmektedirler.



Şekil 1.1. Bakteri şekilleri (Anonim 1)

Vücudumuzun iç kısmında ve dış yüzeyinde milyonlarca bakteri bulunmaktadır. İnsan vücudunda bulunan bakteri sayısı insan hücre sayısının on katı kadardır (Cynthia ve ark. 2005).

Bakteriler derimizi kaplarlar, bağırsaklarımızda yaşarlar ve özel bölgelerimizi işgal ederler. Bazı bakteriler metabolizmaya yardımcı olurken, bazıları potansiyel tehlike oluştururlar. Yararlı bakteriler mide ve intestinal

sistemde mikrobiyal dengeyi sağlayarak sindirime katkıda bulunurken, zararlı bakteriler ise vücudumuzda enfeksiyona neden olurlar.

Bakteriyel enfeksiyon zararlı bakterilerin vücuda girişiyle ya da mevcut dengenin dışına çıkmasıyla oluşmaktadır. Binlerce çeşit bakteri olmasına karşın sadece birkaç türü insanlarda hastalığa neden olmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre tarihte bakteriyel enfeksiyonlar diğer hastalıklardan daha çok insan ölümüne neden olmaktadır (Holmner ve ark. 2007). Tüberküloz patojenik bakterilerin neden olduğu en ölümcül hastalıklardan biridir. Patojenik bakteriler genellikle kronik diare gibi bağırsak problemlerine yol açarlar. Vücudumuzun pek çok kısmında enfeksiyon oluşturabilme yetenekleri vardır. Bazı enfeksiyon türleri ölümcül iken bazıları ise enfeksiyonun başarısına göre farklı şiddetlerde gerçekleşir. Gelişmekte olan ülkelerde en büyük sorun tedavi edilebilir enfeksiyonların yayılmasını önlemekte yeterli ilaç ve tıbbi müdahalenin bulunmamasıdır.

Bakteri patojenliğinin derecesi virülans faktörleri ile ifade edilir. Dolayısıyla, bir patojenin virülansı onun konakta hastalık oluşturmak için sahip olduğu genetik ve biyokimyasal özelliklerinin toplamıdır.

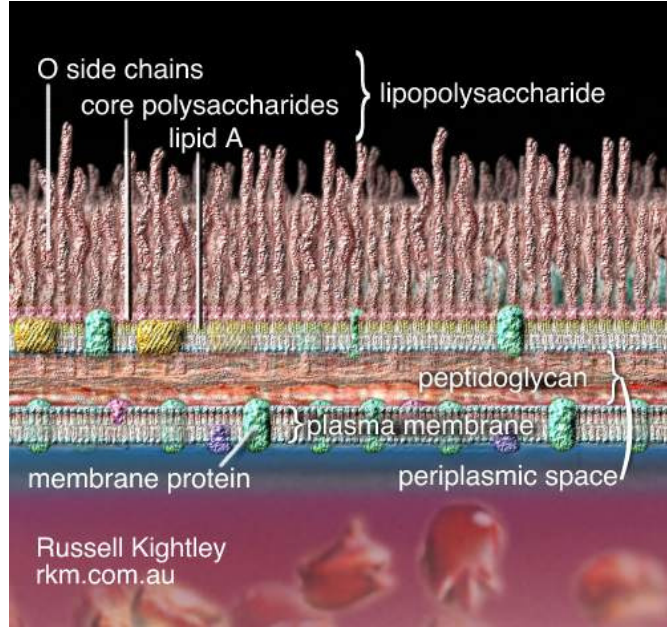
Bakteriyel patojenliğin mekanizmasının temelinde 2 ana özellik vardır.

1. Vücuda giren herhangi bir mikrobun dokulara yayılma yeteneği (Ekstraselüler maddeler üreterek istilayı kolaylaştırırlar ve bu sayede konakçının savunma mekanizmasını atlatırlar.)
2. Toksin üretebilme yetenekleri: Bakteriler endotoksin ve ekzotoksin olmak üzere 2 tür toksin üretirler.

1.1.1. Endotoksin

Diğer hücreler gibi bakteri hücreleride mikrobiyal hücre bütünlüğünü ve şeklini koruyacak şekilde hücre membranına sahiptirler. *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia psittacis*, ve *Legionella pneumophila* gibi insan patojeni içeren gram negatif bakteriler de tek tabakalı ve asimetric olarak organize olmuş liposakkarit (LPS) yapısında ki membranlara sahiptirler.

Bir bakteri hücresi $4.9 \mu\text{m}^2$ bir alanda yaklaşık olarak 3.5×10^6 LPS molekülü içermektedir.



Şekil 1.2. Gram negatif bakterilerin hücre membranı (Anonim 2)

Yüzyıl öncesine kadar LPS potensiyel bakteriyel toksin olarak tanımlanmaktaydı. Bugün LPS'in pek çok gram negatif toksik enfeksiyonun ana faktörü olduğu bilinmektedir. Bakteri ölümü ya da hücre duvarı yıkımı sonucu salgılanırlar (Rietschel ve ark. 1994).

Endotoksinin konak üzerine biyolojik etkisi letal olabilir. Toksikite, lipit molekülü (lipid A) ile ilişkilidir. İmmünojenik özelliği ise polisakkarit molekülü ile ilişkilidir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı antijenleri (O antijenleri), LPS bileşikleridir.



Şekil 1.3. Gram negatif bakterilerde endotoksin yapısı

Tüm endotoksinlerin biyolojik aktiviteleri esas olarak aynıdır. Ancak bazı endotoksinlerin etkinliği daha fazladır.

Çizelge 1.1. Endotoksinlerin biyolojik aktiviteleri

Pirojen özellik	Shwartzman reaksiyonu
Lökopeni, lökositoz	Prostaglandin sentezinin indüksiyonu
Kompleman aktivasyonu	Limulus lizatın jelatinasyonu
Kan basıncının değişimi	İnfeksiyona karşı özgül olmayan direncin indüksiyonu
Hageman faktör aktivasyonu	Endotoksin toleransının indüksiyonu
Trombosit aktivasyonu	Adjuvan aktivitesi
Plazminojen aktivatörünün indüksiyonu	Lenfositlerde mitojenik aktivite
Kemik iliğinde nekroz	Makrofaj aktivasyonu
Farelerde hipotermi	Interferon sentezinin indüksiyonu
Farelerde letal toksisite	Tümör nekroz faktör sentezinin indüksiyonu

1.1.2. Ekzotoksin

Ekzotoksinler, bakteri hücrelerinden salgılanan protein yapısında toksinlerdir. Tüm toksik maddeler içinde, zehir etkisi en fazla olanlarıdır. Yüksek molekül ağırlıklı ekzotoksin proteinleri ısıya duyarlı iken, düşük molekül ağırlıklı olanlar ısı ile bozulmazlar. Çoğunlukla gram pozitif bakteriler tarafından salgılanmakla birlikte nadir olarak gram negatif bakteriler tarafından da salgılanırlar. Endotoksinlerin sistemik etkilerine karşın, ekzotoksinlerin etki yeri daha lokaldir ve özgül hücre tipleri veya reseptörleri ile sınırlıdır. Ekzotoksinler konak hücrede oluşturduğu biyolojik etkilerine göre; nörotoksinler, sitotoksinler, enterotoksinler olarak adlandırılırlar.

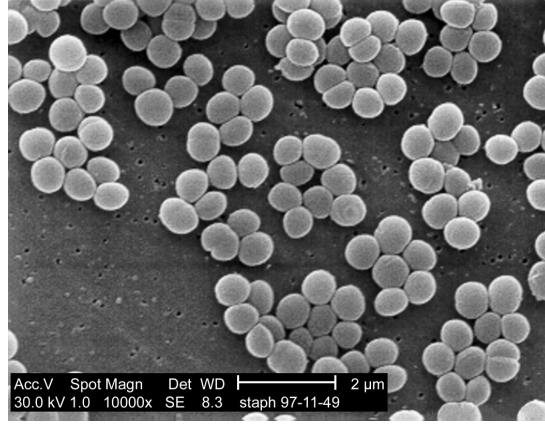
Nörotoksinler: *Clostridium* türleri tarafından üretilirler. Sinir uçlarını (sinapsları) yani akson dendrit arası bağlantıları bloke eder. Böylelikle kalp ve solunum sisteminin durmasına neden olurlar.

Sitotoksinler: Difteri toksini *Corynebacterium diphtheriae* tarafından salgılanan bir toksindir. Konak hücre özgülüğü ve toksik bulguları vardır. Birçok hücrede protein sentezini inhibe eder.

Enterotoksin: Enterotoksinler bağırsaklarda özel aktivitesi olan ekzotoksinlerin alt sınıfıdır. Ekzotoksinler büyüyen bakteriler tarafından hızlıca salgılanırlar ve böylece bakterinin kültüre edildiği hücre ortamında karakteristik şekilde bulunurlar. Geleneksel olarak ısıya duyarlı oldukları varsayılır. Stafilokokal enterotoksinler ise istisna oluşturmaktadır. Antijenik ve kimyasal özelliklerine göre protein yapısındadırlar. *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, ve *Clostridium perfringens* enterotoksin üreten bakterilerin başında gelmektedir. Bakteriyel enterotoksinlerin neden olduğu hastalıklara en klasik örnek stafilokokal gıda zehirlenmeleridir. Klinik sendromlar ile stafilokokal enterotoksinler arasındaki ilişki geçmişte kaydedilmiştir (Binder ve ark. 1970).

1.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, Micrococcaceae ailesinde yer alan katalaz pozitif Gram pozitif koklardır (Chomnawang 2008, Sandel 2002, Batı Kutlu 2006). Tekli, ikili, dördü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluştururlar. *S. aureus* hem aerop hem de anaerop ortamda ürer(Batı Kutlu 2006).



Şekil 1.4. *Staphylococcus aureus* (Anonim 3)

S. aureus'a ait koloniler geniş (6-8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı şeffaf görünümündedir. Üç yönde ve birbirine yapışık olarak çoğalarak, üzüm salkımına benzer kümeler oluşturular. Bazı kökenlerinde belirgin ve polisakkarit yapısında bir kapsül ya da bir mukus katmanı olur. Hücre çeperleri özel yapıda olup, peptidoglikan, teikoik asit ve türe özgü presipitinojen protein birimlerini içerir (Gülbandılar. 2006).

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagülaz deneyi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir (Batı Kutlu 2006).

Gram-pozitif, küresel, fakültatif anaerobik / aerobik Stafilokokal türlerinden 33'ün genelde katalaz pozitif olduğu bilinmektedir. Türe ve kültür koşullarına bağlı olarak hücre büyüklüğü 0.5 ile 1.5 μm arasında değişmektedir. *Staphylococcus aureus* *Staphylococci*, arasında en önemli fırsatçı patojen olarak kabul edilir(Sandel 2004). *Staphylococcus aureus* tehlikeli toplum ve hastane hastalıklarıyla ilişkili yaygın olarak rastlanan bir patojendir. Halk sağlığının ana problemi olarak kabul edilmektedir (Pereira ve ark. 2009).

İnsanda en sık hastalığa neden olan türlerdendir. Doğada en çok tozda, toprakta, hayvanların deri, mukoza dokularında ve insanların deri, burun boşluğu ve lezyonlarında bulunurlar (Reinoso ve ark. 2004). Doğa koşullarına dayanıklıdır (Gülbandılar. 2006).

S. aureus insanlarda ve hayvanlar da pek çok bulaşıcı hastalıkla ilişkilendirilmektedir. İnsanlarda hastane enfeksiyonlarına neden olan en önemli patojendir. Arjantin gibi pek çok ülkede günlük süt ürünlerinden kaynaklı en pahalı hastalıktır (Bogni ve ark 1988).

Pek çok toksik sendroma neden olan *Staphylococcus* cinsi bakteriler ilk olarak 1880’de Ogston tarafından adlandırılmışlardır (Newsom S.W.B. 2008). 1884 yılında ise Rosenbach *Staphylococcus* türlerini tanımlamıştır.

S. aureus için insanlar doğal rezervuarlardır. Sağlıklı yetişkinlerin yaklaşık % 10-20 sürekli taşıyıcıdır. Fiziksel temasla insandan insana kolaylıkla geçerler. *S. aureus* enfeksiyonlarında nazal kolonizasyon en önemli rezervuardır. *S. aureus* en fazla burun ve boğaz boşluğunu örten mukoz dokuda yer alır. Deride, en çok da ellerde, kollarda ve yüzde bulunur (Kloos. 1999). Kolonizasyon hızı diyabet, hemodiyaliz ve AIDS hastaları; ilaç kullanıcıları ve dermatolojik koşullarda artar. İnsan ve hayvanların dışkılarında, apseli yaralarda, sivilce ve çıbanlarda yoğun olarak bulunmaktadır.



Şekil 1.5. Stafilokokal enfeksiyonuna örnek (Anonim 4)

S. aureus popülasyonununun % 20’i genellikle burnun ön kısmında ki nemli epitelyum tabakasında kolonize olur ve diğer % 60 lık kısmıyla da ilişki halinde bulunmaktadır (Peacock. 2001). Organizma apse, isilik gibi deri enfeksiyonlarına ya da mikroplu romatizma, kalp iç zarı iltihabı gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir.

Hastanelerde ve toplu mekanlarda kolonizasyon bulaşıcı hastalıklar için risk faktörü oluşturmaktadır. Cerrahi müdahaleye maruz kalmış hastalarda enfeksiyon kapma risk faktörü artmaktadır.

Deri, yumuşak doku, solunum sistemi, kemik, eklem ve endovasküler sistemde enfeksiyona neden olurlar. Pek çok *S. aureus* türü antibakteriyel ajanlara karşı direnç oluşturacak yeteneğe sahiptir. *S. aureus* enfeksiyonlarında β -lactam antibiyotikleriyle müdahale yapılmaktadır. β -lactam bileşiklerinden methicillin, oxacillin, nafcillin, cloxacillin, and dicloxacillin direnç gösterdiği kaydedilmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları vücudun pek çok bölgesinde (cerrahi yaralar, yanıklar, göz, cilt ve kan) geniş semptomlara neden olabilir. Enfeksiyonlar genellikle enfeksiyon bölgesinde hassasiyet, kızarıklık ve şişme olarak başlar ve muhtemelen ciddi hastalıklara dönüşümü ile son bulmaktadır. *S. aureus* aynı zamanda aminoglycosides, macrolides, chloramphenicol, tetracycline, and fluoroquinolones içeren antimikrobiyal ajanlara karşı da direnç kazanmıştır (Chomnawang. 2008).

S. aureus enfeksiyonuna karşı ana savunma bağışıklık sisteminin temel elemanı olan nötrofiller tarafından gerçekleştirilir. *S. aureus* nötrofil savunmasını aşacak pek çok yeteneğe sahiptir. *S. aureus* türlerinin hastalık oluşturma etkinlikleri sahip oldukları virulans faktörlerine bağlıdır. Virulans faktörleri konakçı hücredeki dokuların işgalini sağlarlar (Sandel. ve ark. 2002). Enfeksiyon esnasında antikor seviyeleri vücudu korumak için oldukça düşük seviyede kalırlar ve ikinci bir enfeksiyon söz konusu olduğunda T ve B hücrelerinin cevap oluşturması olanaksızlaşır (Foster. 2005).

S. aureus klinik önemi büyük ölçüde her alanda bulunmasından kaynaklanmaktadır. *S. aureus* geniş bir yaşam alanına sahiptirler ve normal insan mikroflorasının parçasıdırlar.

S. aureus kommensal olmasına karşın, uygun koşullar altında pek çok fırsatçı türü ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Belirli koşullar sağlandığında aşağıdaki pek çok ciddi enfeksiyona neden olabilmektedir:

- deri hasarları (yanık, tıbbi müdahale);
- vücuda yabancı maddelerin varlığı (dikiş ipliği, e.g. sutures, damar içi yöntemler, protezler)

- virütik enfeksiyon
- kronik hastalıklar (kalp hastalıkları, alkolizm)

1.2.1. *S. aureus*'un Epidemiyoloji

S. aureus enfeksiyonlarının doğal seyri özetlenecek olursa; pekçok yenidoğan, çocuk ve yetişkinler *S. aureus* ile kolonize olurlar ve bu mikroorganizmayı tercihen nazofarenkslerinde, bazen cilt ve giysilerinde, daha nadiren vajinalarında ya da istisnai olarak rektum veya perineal bölgelerinde barındırırlar. Bu bölgelerdeki *S. aureus* cilt veya mukoz membranlardaki herhangi bir bölgeyi veya kişiden kişiye transfer yoluyla, aerosol yolla veya direk kontakt yoluyla diğer konakları kontamine ederler. Mukoz membranlar ve cilt, lokal doku invazyonuna karşı çok etkili bir mekanik bariyer oluştururlar. Bu bariyer travma ya da cerrahi ile bozulursa, *S. aureus* alttaki dokuya girebilir ve nekrotik doku, fibrin ve çok sayıda canlı ve ölü polimorfonükleer lökositten oluşan lokal bir abses lezyonuna yol açabilir. Herhangi bir zamanda çoğalan bakteriler lokal fagositik mekanizmaları aşabilir ve lenfatik kanallara ve kan dolaşımına girebilirler. Bunu izleyen stafilokokal bakteriyemi korkutucu bir komplikasyondur ve metastatik enfeksiyonlara ve hastanın ölümüne yol açabilir. Doğumdan kısa bir süre sonra çoğu yenidoğan çevredeki yakın insanlar aracılığıyla *S. aureus* ile kolonize olur. Kolonizasyon bölgeleri; umbilikal kordon, perineal alan, cilt ve bazen de gastrointestinal sistemdir. *S. aureus* ayrıca giysileri ve çarşafı da kontamine edebilir ve bu yolla atmosferi daha fazla kontamine etmek üzere saçılırlar. Yaşamın daha ileri yıllarında nazal bölgede kolonize olurlar. Çocukların ve yetişkinlerin %25 kadarı taşıyıcı olurlar. Herhangi bir zamanda yetişkinlerdeki nazal taşıyıcılık oranının, mevsimsel ve lokal epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak, %20 ile %40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Yaklaşık olarak nüfusun %20'si sürekli olarak, %60'ı ise geçici olarak *S. aureus* ile kolonize olur, %20'si ise hiç kolonize olmaz. Kadın popülasyonda toksik şok sendromu insidansı nedeniyle erişkin premenopozal kadınlarda vajinal taşıyıcılık oranları araştırılmıştır. Bildirilen değerler menstrüel dönemde artış göstermekle beraber %10'a yakındır. Rektal ve perineal taşıyıcılıklar da tanımlanmıştır. Bazı gruplar *S.*

aureus ile kolonize olmaya eğilimlidir. Örneğin doktorlar %50, hemşireler %70 ve hastane koğuş görevlileri %90 sıklıkla olmak üzere, %33 olan genel popülasyon taşıyıcılık oranlarına göre, daha yüksek nazofarengal taşıyıcılık oranlarına sahiptirler. İnsülin kullanan diabetik hastalar, kronik hemodiyaliz hastaları, çeşitli dermatolojik bozuklukları olan hastalar, yasadışı intravenöz ilaç kullanıcıları ve HIV pozitif hastalar genel popülasyona göre daha yüksek taşıyıcılık oranlarına sahiptir. Taşıyıcılar nazal bölgeden organizmayı ciltlerine transfer ederler. Travma organizma için giriş kapısı oluşturur, bunu lokal ve bazen jeneralize enfeksiyon izler. Bu örnekte organizma endojen orijinlidir, başka vakalarda hastane personeli veya bir aile üyesinden geçebilir.

1.2.2. *S.aureus*'un Salgıladığı Enterotoksinler

Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilkoklar tarafından oluşturulurlar(Batı Kutlu 2006).

S. aureus'un salgıladığı enteretoksinler A, B, C, D, E, F ve G olarak sınıflandırılmaktadır. SEB, SEC, SEG, SEH ve SEI toksinlerini kodlayan genler kromozomda lokalize olmuşlardır. Bu toksik genlerin % 49–85 nükleotid sekansı homoloji gösterir. SEA ve SED kodlayan genler bakteriyofaj vektörleri ve plazmidlerle ilişkilidir (Gilligan. 2000).

Staphylococcus aureus enterotoksin A (SEA) gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. SEA kuvvetli bir gastrointestinal toksindir. 100 ng' ı zehirlenme bulgularına neden olmak için yeterlidir (Rasooly. 1997). B ise hastane enfeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Vücut ağırlığının her kilogramı başına düşen pikogram aralığında staphylococcal Enterotoxin B (SEB) için % 50 letal doz tahmin edilebilmektedir. *S. aureus* çok kolay bir şekilde geniş ölçeklerde kültüre edilebilmektedir bundan dolayı potensiyel biyolojik silah olarak biyoterörizmde kullanılmasından korkulmaktadır (Gilligan K. 2000).

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1): Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-1 grubundan 29 ve 52 tiplerindedir. Bu özgül toksini salgılayan *S.aureus* suşlarının hastane kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Batı Kutlu 2006).

1.2.3. *S. aureus*' un Neden Olduğu Hastalıklar

S. aureus çok yönlü insan ve hayvan patojenidir ve hafif deri enfeksiyonlarından zatüre, septisemi gibi şiddetli pek çok hastalığa neden olmaktadır (Lowy 1998). *S. aureus* insan meme iltihabı ile ilişkili en genel patojendir (Bannerman. ve ark. 2004).



Şekil 1.6. *S.aureus* enfeksiyonuna örnek (Anonim 5)

Hastalık yapıcı etkisine rağmen *S. aureus* sağlıklı insanların yaklaşık olarak % 20–30 burun çevresinde bulunmaktadır ve burun mukozasındaki floranın % 60 oluşturmaktadır. *S. aureus* deri üzerinde ve geviş getiren hayvan rezervuarlarınınin mukozalarında bulunur ve günlük üretilen besinlere kontamine olarak besin zehirlenmesine neden olmaktadır (Normanno. ve ark. 2006). Stafilokokal bakteremi % 11-43 ölüm oranına sahiptir ve bu değer 15 yıldır değişmemektedir. Bakteremiye meticiline dirençli stafilokokal türler neden olmaktadır.

Endokard İltihabı



Şekil 1.7. Endokard iltihabı (Anonim 6)

Kalp iç zarı iltihabı vakaların % 25-35'i *S. aureus* kaynaklıdır 81,87. İntravenöz ilaç kullanıcılarında, yaşlı hastalarda, kalp protezi kullanan hastalarda gözükmemektedir. Tüm gruplarda ilk belirtiler yüksek ateş, halsizliktir. Tanısının konulması oldukça zordur.

Metastatik Enfeksiyon

S. aureus kemikler, eklemler böbrekler ve akciğerlere yayılmaya eğilimlidir. Tekrarlayan enfeksiyonlar için bu bölgeler iltahaplanmanın toplandığı odak bölgelerdir. Tedavi uygulanmasına rağmen sürekli yüksek ateşi olan hastalar iltahaplanma açısından değerlendirilmelidir (Lowy. 1998).

Sepsis

Sepsis için risk faktörleri; ilerlemiş yaş grupları, immunosupresyon, kemoterapi ve istilacı prosedürlerdir. Stafilokokal sepsiste gözlenen hipertansiyon, yüksek ateş ve taşikardi gram negatif sepsis ile karıştırılmaktadır. *S. aureus* sepsise neden olan en yaygın gram pozitif patojendir. İlerlemiş sepsis vakalarında multiorgan fonksiyon bozukluğu, damar içi pıhtılaşma, laktik asidoz ve ölümlerle karşılaşmaktadır (Bone. 1994).

Toksik Şok Sendromu

Toksik Şok Sendromuna *S. aureus* salgıladığı toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) neden olmaktadır. Hayatı tehdit edebilecek boyutlara ulaşabilecek ciddi bir enfeksiyondur. Bir çeşit kan zehirlenmesi olarak kabul edilebilir. TSS vakalarının %75'inde etken toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) iken %25 vakada ise stafilokokkal enterotoksin B (SEB) etken faktördür.

TSS sistemik yani vücudun birden fazla sistemini etkileyen ancak bulaşıcı olmayan bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkışında 4 aşama vardır.

1. TSS toksini üretebilen bir *S.aureus* bakterisinin insanda çoğalması ya da enfeksiyon olması
2. Toksin üretimi
3. Toksinin emilimi
4. İntoksikasyon (zehirlenme)

TSS riski gençlerde yaşlılara göre daha fazladır. Büyük yanıklar, cilt enfeksiyonları hatta böcek sokmaları sonrasında bile TSS ortaya çıkabilir. Bu hastalık sağlıklı kişilerde saldırının şiddeti ile karakterize edilir. Tanı yüksek ateş, deride meydana gelen kızarıklıklar, hipertansiyon, baş dönmesi, kas ağrıları, dikkat kaybı ve çoklu organ bozuklukları gibi klinik bulgulara dayanır. Toksik şok sendromu enfeksiyondan daha çok belirli bölgede kolonizasyonla gelişir.

Stafilokokal Besin Zehirlenmesi

Staphylococcus aureus önemli bir gıda patojenidir. Son on yıldır dünyada *Staphylococcal* gıda zehirlenmeleri gıda kaynaklı hastalıkların 3 nedeni olarak rapor edilmiştir. Amerika'da her yıl stafilokokal gıda zehirlenme vakası sayısı 185,000, ve Avrupa'da 1993 ve 1998 yılları arasında ki gıda zehirlenmelerinin % 5.1'inin *S. aureus* kaynaklıdır.

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri 20 ng ile 1 µg Stafilokokal enterotoksin ile kontamine olmuş gıdanın sindirilmesiyle oluşmaktadır. Stafilokokal gıda zehirlenmeleri semptomları kontamine olmuş gıda yenilmesinden birkaç saat (1-6 sa) içerisinde meydana gelmektedirler (Normanno. ve ark. 2007)

1.3. *S.aureus*'un Virulans ve Patojeniteleri

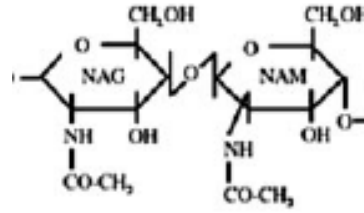
S. aureus virülansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilokokların virülansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir. Sahip olduğu virülans faktörleri sayesinde konak hücrede doku hasarına neden olur, kanda proteinlere bağlanarak immün yanıtın baskılanması sağlanır ve demir alımını düzenler. Pek çok tür polisakkarit bir kapsül sentezler. Organizma proteaz, hyaluronidaz, lipaz ve nükleaz gibi ekstraselüler enzimler salgılar (*Foster 2005, Dinges ve ark 2000*).

Çizelge 1.2. *Staphylococcus aureus*'un bağışıklık sistemini bertaraf etmesini sağlayan faktörlerinin yüzdesel gösterimi

Staphylococcus aureus'un bağışıklık sistemini bertaraf etmesini sağlayan faktörleri		
	Kısaltma	% Dağılım
Protein A	Spa	90/94
Serotip 5 ve serotip 8 Polisakkarit Kapsül	Cps	Serotip 5 16-26 Serotip 8 55-66
Stafilokinaz	Sak	67
Ekstraselüler fibrinojen bağlayan protein	EfB	60/68
Enterotoksin A	Sea	17-32
Enterotoksin B	Seb	7-9
Enterotoksin C	Sec	11-10
Enterotoksin D	Sed	5-10
Enterotoksin G	Seg	55-64
Enterotoksin H	Seh	10-15
Toksik Şok Sendrom Toksini	TSST-1	25-30

1.3.1. Hücre duvarı:

Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi stafilokokların da hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır (Batı Kutlu 2006, Lowy 1998). Peptidoglikan tabaka 1,4-β- bağlı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit altbirimleri içermektedir.



Şekil 1.8. Peptidoglikan tabakası tekrarlayan altbirimleri

Peptidoglikan zincirleri N-asetilmuramik aside bağlı tetrapeptid zincirleri ve *S.aureus* için spesifik pentaglisin köprüleri ile çapraz bağlıdır. Bu tabaka insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir. Yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden interlökin-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit stafilokokların hücre duvarında da yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar. Stafilokokal türlerin peptidoglikan yapısında ki farklılıklar yaygın olarak görülen damar içi pıhtılaşmaya neden olma kapasitesine katkıda bulunur (Lowy 1998, Strominger ve ark 1959).

1.3.2. Kapsül

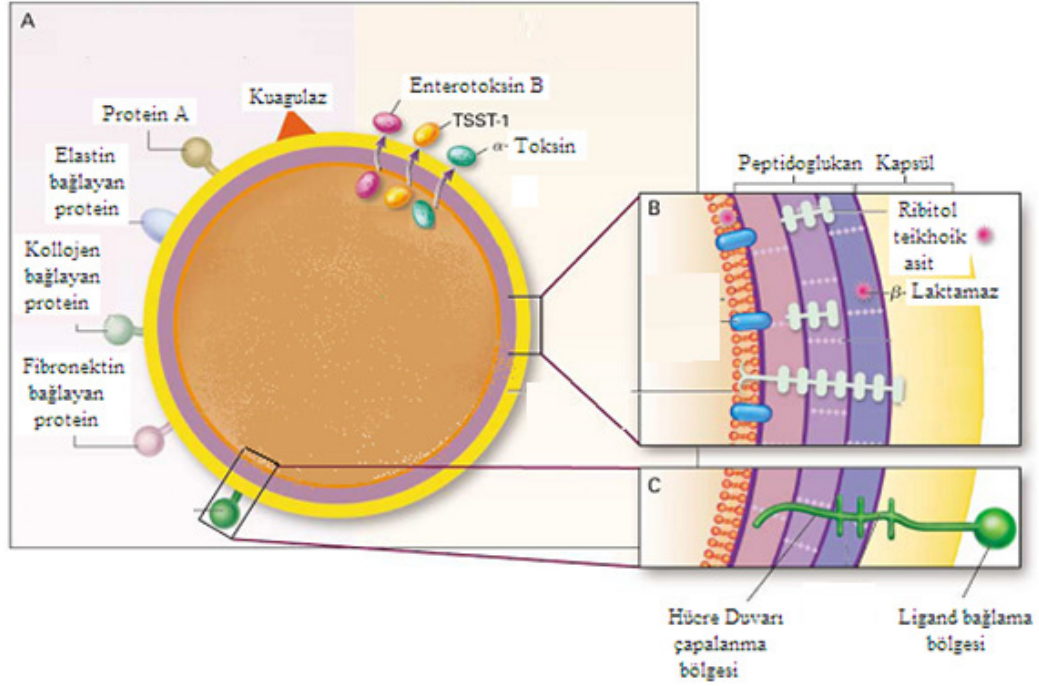
Pek çok *S. aureus*'un klinik izolatları incelendiğinde ince mikrokapsül tabakaya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu tabaka serotip 5, serotip 8 ve ya serotip 336 kapsül polisakkarit içermektedir. Tip 5 ve tip 8 kapsüller hayvan infeksiyon

modellerinde virülans faktörün artışıyla ilişkilendirilmiştir. İn vitro fagositoz denemeleri kapsül varlığının normal serum opsonin varlığında fagositoz sürecinde nötrofiller tarafından hücre alınımını zayıflattığı anlaşılmıştır (Lowy 1998, *Foster 2005*). Yani Bu ekzopolisakkarid bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine ve özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini sağlar.

1.3.3. Yüzey proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve “clumping” faktör, kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokokal yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (Lowy 1998).

Pek çok stafilokokal yüzey proteinleri yapısal ortak özelliklere sahiptir. N terminal bölgesinde salgılayıcı sinyal sekansı ve tüm karboksil terminalinde sitoplazma içine uzanan pozitif yüklü amino asitler, bir hidrofobik membran ve bir hücre duvarı çapa bölgesi bulunmaktadır. Bakteri hücresinin yüzeyinde yer alan N terminalde ki ligand bağlama bölgesi bu proteinlerden bazılarının adhezin gibi fonksiyon göstermesine olanak sağlar.



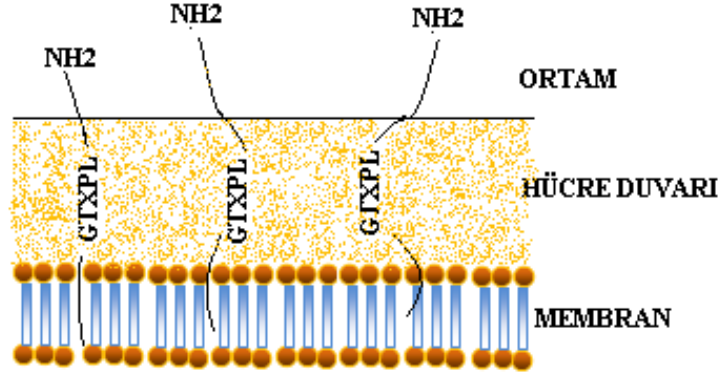
Şekil 1.9. *S. aureus*'un yapısı

S. aureus konağın hücre dışı matriks (ECM) komponentlerine kolonizasyonu “Adhesiv matriks molekülleri olarak bilinen mikrobiyal yüzey komponentleri”(MSCRAMM) ile gerçekleştirirler (Yarlı 2005). *S. aureus* türleri spesifik adhezyon ve yüzey proteinleri ekspre ederler. Bakteriye yüzey proteinleri konağın plazma proteinlerine ya da hücre dışı matriks bileşenlerine kolonizasyonu sağlar (Sinha 1999).

1.3.3.1. Stafilokokal Protein A (Spa)

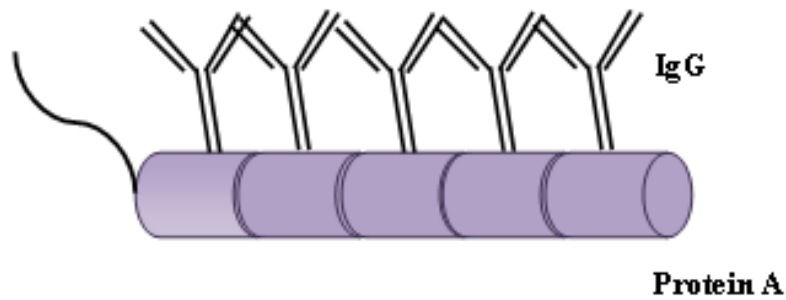
Protein A 42 kDA'luk bir duvar çapa proteinidir. Anti opsonik bir moleküldür. *S. aureus*' un hücre duvarının yaklaşık % 7 sini Protein A oluşturmaktadır. Tüm patojenik suşların % 95'i protein A içermektedir. En önemli fonksiyonu fagositoza direnç oluşturmaktır. Normal kan serumunda bulunan ve bakteriler üzerine tesir ederek bunları fagositoza hazırlayan opsoninden kurtulmak için sahip olduğu yetenek enfeksiyonun başarısı için önemli bir faktördür. Bu yetenek protein A'nın B lenfositlerdeki yüzey IgG ve IgA ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesinden kaynaklanmaktadır. Her protein A 4 ya da 5 IgG

bağlanma bölgesine sahiptir (A, B, C, D ve E) (fab binding) ve her organizmada yaklaşık 80,000 bağlama bölgesi bulunmaktadır (Foster 2005, Greenberg ve ark.1990). Bu protein bakteri hücre yüzeyine LPXTG motifi ile bağlanan tipik bir Adhesiv matriks molekülleri olarak bilinen mikrobiyal yüzey komponentlerin (MSCRAMMs) dendir (Lee ve ark. 2001).



Şekil 1.10. Protein A'nın şematik gösterimi

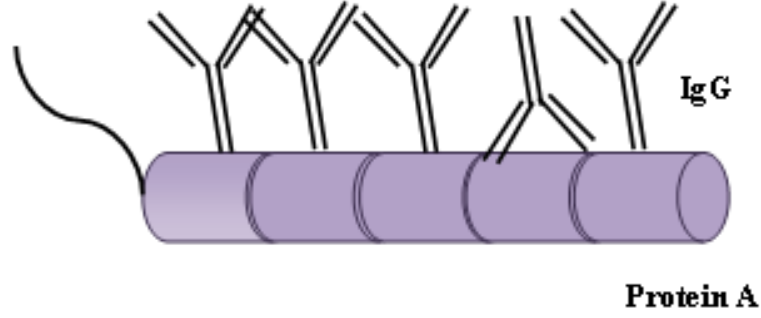
SpA'nın bağlanma aktivitesi bakteri hücreninin IgG ile kamufule edilmesinin verimini etkiler. Böylece nötrofil üzerinde etkileşmeyen Fc reseptörleri kalmayacağından fagositoz engellenmiş olur (Atkins ve ark. 2008).



Şekil 1.11. Protein A ve IgG etkileşim mekanizmasının şematik gösterimi

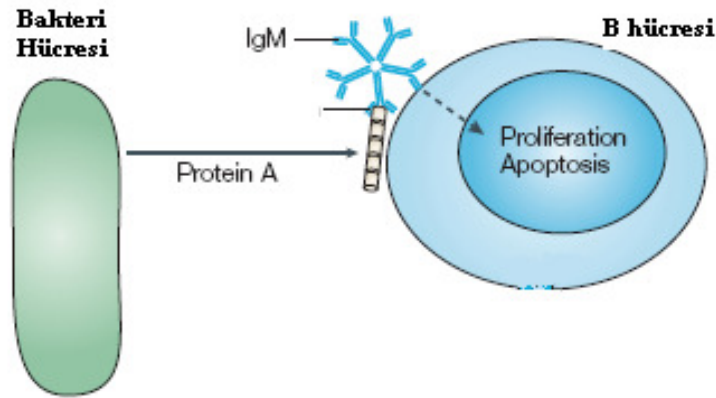
Fakat SpA'nın IgG'lerin Fab bölgesiyle etkileşime girdiği bazı durumlarda kaydedilmiştir. Fakat yapılan araştırmalar sonucunda tüm alt

birimlerin Fab bölgesiyle etkileşime geçemediği ispatlanmıştır. Yakın zamanda, D alt biriminin Fab bölgesiyle etkileşime geçebildiği kaydedilmiştir (Jansson ve ark. 1998).



Şekil 1.12. Protein A'nın IgG'yi Fab bölgesinden bağlamasının şematik gösterimi

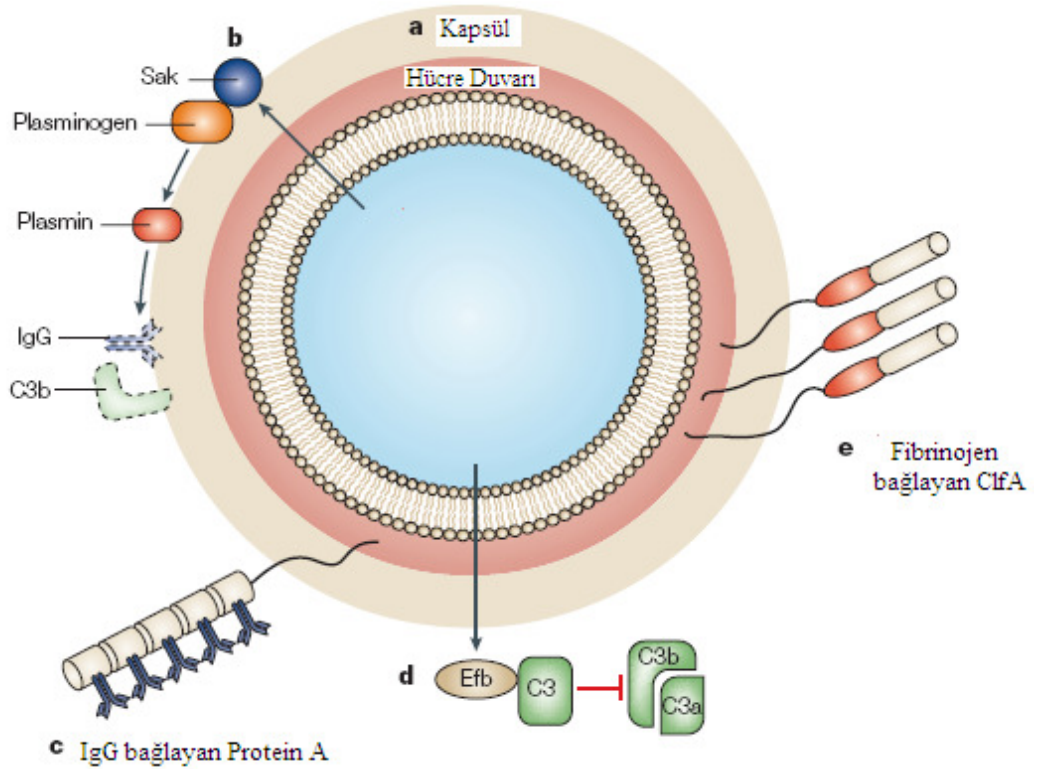
Immunoglobülin G nin Fc bölgesini bağlama yeteneğinin yanında SpA'nın alt birimlerinin pek çok IgM, IgA, IgG, ve IgE moleküllerinin Fab bölgeleriyle etkileşime geçebildiği kaydedilmiştir. Fab bölgesine bağlanabilme yeteneği, SpA'nın B hücre süperantijeni gibi davranmasına neden olur bu da proliferasyonu indükler ve daha sonraki B hücre deposunun boşalmasına neden olur (Atkins 1998).



Şekil 1.13. Protein A'nın IgM molekülünü bloklamasının şematik gösterimi

IgG nin Fc bölgesi ile kompleks oluşturan protein A IgG bağlanma bölgesinin X ray yapısı çözülmüştür. Protein A ve IgG arasında ki etkileşimin sonucu olarak hücre yüzeyi IgG molekülleri ile kaplanır ki bu etkileşim nötrofil Fc reseptörleri tarafından tanınmasını engelleyecek şekilde hatalı bir oryantasyonda gerçekleşir.

Şekil 1.14' te görüldüğü gibi bu, protein A'nın antifagositozik etkisini ve *S. aureus* enfeksiyonunun patogenezindeki rolünü açıklar. İn vitro çalışmalarda Protein A' dan yoksun mutant *S. aureus*'un nötrofiller tarafından daha etkili bir şekilde fagositoza uğratıldığı ve bir çok hayvan enfeksiyonun modelinde virulansının azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 1.14. *Staphylococcus aureus* opsonofagositozisten kaçınma mekanizması

- Polisakkarit kapsül: antikor ve nötrofillerin bakteri yüzeyine bağlanmasını sağlayan bölgedir.
- Ekstraselüler stafilokinaz (Sak): hücre bağlantılı plazminojeni aktive eder ve IgG inaktivasyonunda görev alır.
- Protein A: 5 tane immunoglobulin G (IgG) Fc bağlanma domaini bulunmaktadır.
- fibrinogen-bağlayan protein (Efb): C3 faktör komponent'lerini

bağlar ve bakteri hücre yüzeyindeki aktivitesini bloklar. (e) Clumping factor A (ClfA), fibrinojenin γ -zincirine bağlanır (Foster 2005).

1.4. Antimikrobiyal peptidlere Direnç

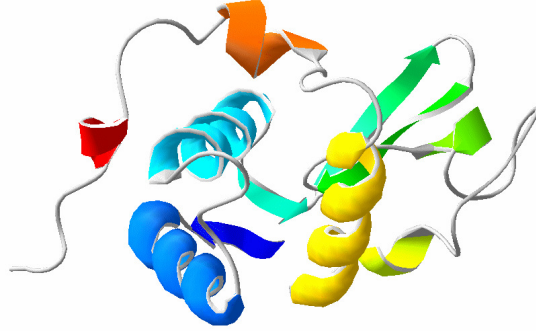
Staf türlerinin pek çok antibiyotiğe direnç kazanması enfeksiyonun tedavisini zorlaştırmaktadır. 1960 başında klinik uygulamalarda Oxacillin ve meticillin kullanılmaktaydı fakat sadece birkaç yıl içerisinde bazı *S. aureus* türleri bu antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Bu türlere metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılmıştır. Bu türler *mecA* geni taşımaktadır. Bu gen tometicin ve oxacilline direnç kazanmasını sağlamaktadır. Avrupa ve Amerika'da izole edilen *S. aureus* türlerinin yaklaşık olarak % 50'inin metisiline direnç gösterdiği saptanmıştır. MRSA neden olduğu enfeksiyonlar sonucu artan ölüm oranları, MRSA'ı halk sağlığı açısından önemli kılmıştır (Blanco, M.G. 2009). MRSA türlerinin vankomisine de direnç kazandığı kayıtlara geçmiştir (Hiramatsu. 2001, Weigel. 2003).

Belki de mikroorganizmanın en dikkate değer virulans faktörü gıda zehirlenmelerine ve toksik şok sendroma (TSST-1), neden olan ve konakçının bağışıklık sistemini zayıflatan ısıya dayanıklı enterotoksinleridir. Diğer yandan pek çok *S. aureus* enfeksiyonu birçok virulans faktörün toplam etkisiyle oluşmaktadır (Pereira ve ark. 2009)

1.4.1. Lizozime Direnç

Lizozim bakteriyel enfeksiyona karşı konakçı savunmasını oluşturan önemli bir bakterisid proteindir. Hücre duvarı peptidoglikan tabakasında ki N-asetil muramik asit ve N-asetilglukozamin arasında ki glikozidik bağı parçalayan bir muramidazdır. Bu işlem sonucunda hücre lizize uğrar. Enzim pek çok vücut sıvısında bulunmaktadır ve enfeksiyon boyunca proinflatuar sinyaller ile fagositik hücrelerde ekspresyon seviyesinde artmalar gözlemlenir. *S. aureus* lizozime direnç göstermesinin altında yatan biyokimyasal neden ise membrana bağlı O-asetiltransferaz'ın muramik asidin C6 hidroksil grubunu modifiye

etmesine dayanmaktadır. *O*-asetiltransferaz da ki bir mutant lizozime duyarlı hale gelir (Foster 2005).



Şekil 1.15. Lizozim'in yapısı

İnsan savunma sistemi bakterileri yok etmek için birçok farklı faktör kullanır, bunlar reaktif oksijen bileşikleri, bakteriolitik enzimler (lizozim ve fosfolipaz A2), tamamlayıcı sistem ve antimikrobial peptitlerdir. Önemli ve yaygın olarak kullanılan bir savunma enzimi olan lizozim nötrofiller, monositler, makrofajlar ve epitelyal hücrelerin hem fagositik hem de salgı granüllerinin bileşenidir. *Staphylococcus aureus* gibi patojenik bakteriler organizmanın akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olmasını olanaklı kılan çeşitli virulan (zehirli, öldürücü) faktörler salgırlar, sentezlerler. Konakta kolonize olan bakteriler adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sisteminin üstesinden gelebilmek için mekanizmalar geliştirmiş olmalıdır.

Son zamanlarda görüldüğü gibi, *S. aureus* tamamiyle lizozime karşı dayanıklılık gösterir. Bu direnç için başlıca mekanizma peptidoglikanın (PG) C-6 konumundaki N-asetil muramik asidin (NAM) O asetillenmesi yoluyla modifikasyonudur. Bununla birlikte, *S. aureus* daki NAM'ın C-6 konumu aynı zamanda fosfoester bağlı duvar teikoik asit (WTA) taşır ve buradaki sorun WTA'nın da lizozime karşı direnç göstermede katkıda bulunup bulunmadığıdır. Sonuçlar, WTA ve PG çapraz bağ derecesi gerçekten lizozimin hidrolitik aktivitesine karşı direnç göstermesinde katkıda bulunduğunu göstermektedir (Bera ve ark. 2007).

1.5. FAGOSİTOZ

Memeli hücreleride, fagositozun en önemli görevi bozulmuş ve ölü hücreleri ya da istilacı patojenleri yok etmektir. Polimorfonükleer lökosit olarakta adlandırılan nötrofiller ve makrofajlar fagositoz elamanlarını oluşturmaktadır (Brown E. J. 1996).

Organizmanın patojenlerden korunmasında en etkili savunma mekanizmasını makrofajlar oluşturmaktadır. Makrofajlar hücre migrasyonu ve patojenlerin fagositozu için özel kapasiteli immun hücrelerdir (Harrison R. E.2002).

Kan monositleri, doku makrofajları, nötrofiller gibi güçlü fagositler, mikroorganizmaları fagosite ederek onları öldüren hücrelerdir. Fc yüzey reseptörleri taşırlar ve lizozomal granüllere sahiptirler. Direkt sitotoksik etkilerini apoptoz aracılığı ile yaptığı sanılmaktadır.

Mikroorganizmaları tanıma yeteneğine sahip anahtar hücreler lenfositlerdir.

Lenfositlerin iki tipi vardır.

1. T- hücreleri: timus'da gelişir
2. B- hücreleri: kemik iliğinde gelişir

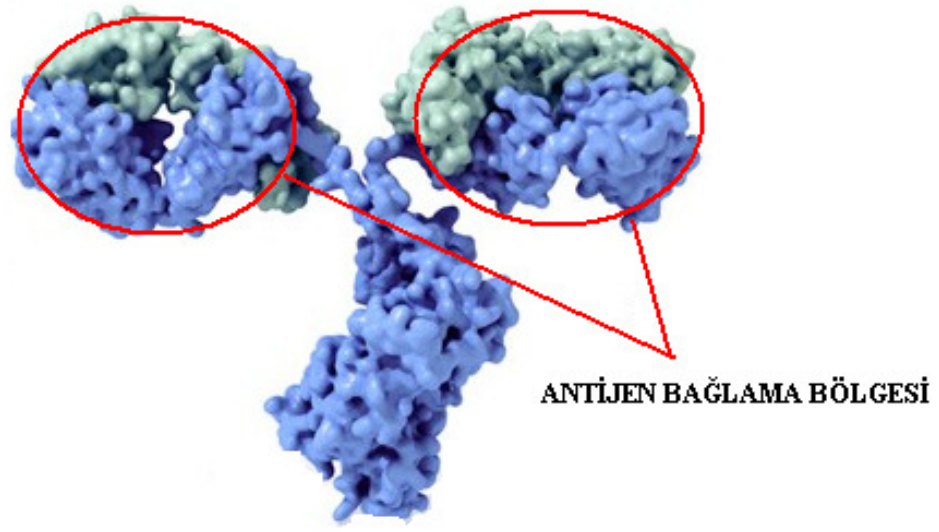
B- hücreleri enfeksiyona yanıtta sentezlediği antikorları kullanır. Antikorlar solübüldür ve ekstraselüler mikroorganizmaları etkilemek için dokulara difüze olabilirler.

1.6. İMMÜNGLOBULİN G'nin YAPISI

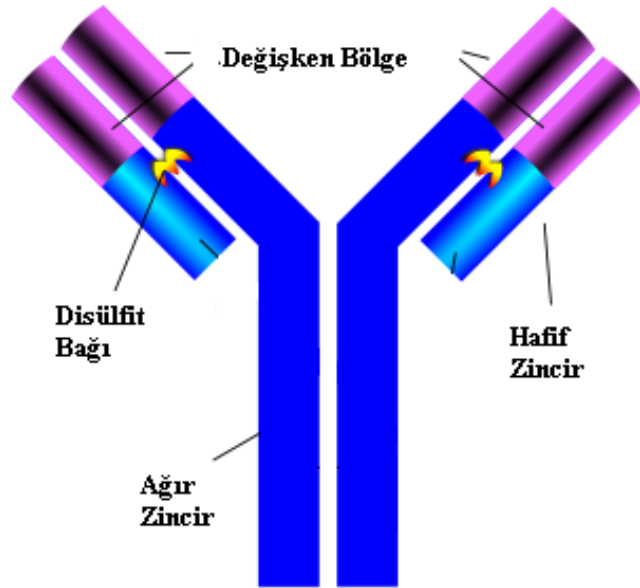
İmmünglobülin G, 2 ağır ve 2 hafif zincirden oluşan monomerik immünglobülinidir. Her IgG 2 antijen bağlama bölgesine sahiptir. En çok var olan immünglobülinidir ve kan ve doku sıvılarında bulunmaktadır. Plazma B hücreleri tarafından üretilirler. IgG, normal insan serumundaki immünglobulinlerin % 75'ini oluşturur. IgG molekülü Y harfi şeklinde, monomer yapıda ve 150.000 molekül ağırlığındadır. IgG antikorları 150 kDa boyutundadır ve 4 peptid zincirinden

oluşmaktadır. 50 kDa' luk eş ağır zincir ve 25 kDa' luk eş hafif zincirden oluşmaktadır. Erişkinde 100 ml. serumda 1000 mgr IgG bulunur. IgG molekülünde bulunan 2 tane Fab parçasına iki antijen bağlanabilir. Bu nedenle IgG iki değerlidir. IgG'nin kan ve dokulardaki yoğunluğu eşittir. IgG plasenta yoluyla anneden fetüse geçebilen tek Ig'dir. Hamileliğin 3. ve 4. ayında IgG'ler anneden bebeğe geçmeye başlar ve bu geçiş doğuma kadar giderek artan oranlarda devam eder. Yeni doğan bir bebeğin kanında anneden geçen IgG'ler dolaşır. Böylece intrauterin hayatta anneden bebeğe geçen IgG sınıfı özgül antikorlar doğumdan sonraki ilk aylarda bebeği, annenin dirençli olduğu çeşitli infeksiyonlara karşı korumuş olur. Bebeğin kendi IgG sentezi ise doğumdan itibaren başlar ve 2 yaşında erişkin düzeye ulaşır. 40 yaşından sonra IgG düzeyinin tekrar azalmaya başladığı görülür. Kanda bulunan IgG, transüstasyon (sızma) ile external sıvılara da geçebilir. Annelerin ilk emzirdiği süt olan kolostrumda serumdan sızan IgG'ler vardır ve bebeğin bağırsak mukozasından geçerek, yenidoğan bebeğin bağışıklığını güçlendirirler.

IgG moleküllerinde antijenik ve menteşe gölgesinde iki ağır zincir arasındaki disülfid bağının sayısı açısından farklılık gösteren dört alt grup saptanmıştır. IgG1'de 2, IgG2'de 4, IgG3'de 15 ve IgG4'te 2 disülfid bağı bulunur. Tüm IgG'lerin %65'i IgG1'dir. IgG2 %23'ünü, IgG3 %8'ini, IgG4 ise %4'ünü oluşturur. IgG, klasik yoldan komplemanı aktive eden iki Ig'den biridir (diğeri IgM). IgG uzun ömürlü bir antikor olup, özellikle segonder (=ikincil) bağışık yanıtta çok yüksek miktarlara ulaşır. Birçok hücrede (özellikle fagositik hücrelerde) IgG'yi Fc kısmından bağlayan yüzey reseptör bulunur ve IgG opsonizasyonla fagositozu çok güçlendirirler.



Şekil 1.16. IgG'in yapısı (Anonim 7)



Şekil 1.17. IgG'nin yapısı (Anonim 8)

1.7. Nanobiyokonjugasyon

Biyokonjugasyon, iki biyomolekülün kovalent bağlarla birbirine bağlanması işlemidir. Biyokonjugasyon işlemi sonunda oluşan yapı biyokonjugat adını alır.

Yaygın olarak bilinen biyokonjugasyon çeşitlerine örnek olarak biotin veya bir floresan boyanın bir proteine bağlanarak oluşturduğu konjugasyon, ya da bir antibadının bir enzimle konjugasyonundaki gibi protein-protein konjugasyonları sıralanabilir. Bunlara göre daha az yaygın olarak biyokonjugasyon işleminde oligosakkaritler, nükleik asitler, sentetik polimerler ve karbon nano tüpler de kullanılabilir.

Bu şekilde hazırlanan disiplinler arası bir çalışmanın amacı biyokonjugasyonu yapılacak ana biyolojik madde sentetik ya da doğal bir başka biyolojik maddeyle konjuge edilerek önceden sahip olduğu niteliklere bir yenisini daha katarak çok fonksiyonlu yapılar elde etmektir. Biyokonjugasyon işleminden sonra elde edilen biyokonjugat, hem ana biyolojik maddenin özelliklerini taşıyacak hem de konjugasyonu yapıldığı bir diğer proteinin ya da sentetik polimerin özelliklerini taşıyacak ve dolayısıyla nitelik ve kullanım alanı açısından özellikleri geliştirilmiş bir yapıda olacaktır.

Elde edilen biyokonjugatlar konjugasyonun meydana geldiği koşullara bağlı olarak mikrometre ve nanometre gibi farklı skalalarda sentezlenebilirler. Biyolojik uygulamalarda kullanılan parçacıkların türleri çok çeşitlidir. Çoğunlukla, bunlar doğada gözenekli olmayan ve küresel şekildedir. Bununla birlikte, nanoteknolojide malzeme biliminin gelişimi, küresel, amorf ya da agregre olmuş (bir araya gelmiş) parçacıkların yanında çubuk, tüp, küp, üçgen ve koni benzeri ayrıntılı geometrik şekillerdeki partikül türleri ve neredeyse sınırsız şekil ve büyüklükteki bileşimlerin elde edilmesini sağlar. Buna ek olarak, çeşitli uygulamalarda biyokonjugasyon yapıları (iskeleleri) olarak kullanılan büyük ölçüde sentetik yapılar şeklinde tanımlanan nanometre aralığındaki fullerenler (örneğin buckyball), karbon nanotüpler ve dendrimerleri içeren yeni simetrik organik yapılar gelişmektedir. Partiküllerin kimyasal bileşimi bunların şekli gibi değişebilir. Ticari partiküller polimerler ya da kopolimerler, metaller ve yarı

iletkenler, süperparamanyetik kompozitler, biyoparçalanır yapılar ve sentetik dendrimerler ve dendronlardan oluşabilmektedir. Genellikle, bir parçacığın hem kompozisyonunun ve hem de şeklinin birleşimi belirli bir amaç için uygunluğunu yönetir. Örneğin, süperparamanyetik demir oksiti içeren kompozit partiküller sıklıkla küçük ölçekli afinite ayrımları için kullanılır, özellikle hücre ayrımları için akış sitometri analizi ya da floresans aktiflenmiş hücre ayırma (FACS) takip eder. Çekirdek-kabuk yarıiletken partiküller, aksine, kuantum nokta nanopartikülü için temeldir, ki bunlar yoğun bir şekilde reaktifleri floresan algılamasını sağlar. Polimerler örneğin organik boyalar ya da floresans moleküller kendi çekirdeklerinde diğer moleküllerin gömülmesi için şişebilen matriks sağlar. Bunun gibi floresans ya da boyalı lateks parçacıkları süspansiyon dizileri kullanılmasıyla çoklu algılama sistemlerinde kullanışlıdır. Belirli bir renk ya da emisyon dalga boyu ve yoğunluğunun partikül alt populasyonları süspansiyon analizinde ölçülen hedefin türünü tanımlamada kullanılabilir. Bu tür analizde, antikolar ya da antijenler boya partikülleri ile bağlanır ve örnek çözeltisi membran içerisinde taşınan test şeridine uygulanır. Polimerik partiküller farklı sayıdaki monomer ya da kopolimer kombinasyonlarından oluşabilmektedir. Biraz daha yaygın olanlardan bazıları şunlardır; polistiren (geleneksel “lateks” partikülleri), poli(stiren/divinilbenzen) kopolimerleri, poli(stiren/akrilat) kopolimerleri, polimetilmetakrilat (PMMA), poli(hidroksietil metakrilat) (pHEMA), poli(viniltoluen), poli(stiren/bütadien) kopolimerleri ve poli(stiren/viniltoluen) kopolimerleri. Buna ek olarak, fonksiyonel monomerlerin polimerizasyon reaksiyon kombinasyonlarının karıştırılmasıyla, partikül yüzeyinde afinite ligandlarının daha sonra bağlanması için reaktif ya da fonksiyonel gruplar oluşturabilirsiniz. İstisnasız biyoygulamalarda partiküllerin kullanımı yüzeylerine afinite yakalama ligandlarının pasif adsorpsiyon ya da kovalent bağlanmayla bağlanmasını gerektirir. Afinite ligandının bunun gibi partiküllere bağlanması kompleks örnek karışımlarında seçici olarak biyolojik hedefe bağlanabilmesini sağlar.

Afinite partikül kompleksleri böylece protein ya da diğer biyomolekülleri ayırmak ve izole etmede ya da hücrelerde, doku kesitleri, lysatlar ya da kompleks

biyolojik örneklerde bu hedeflerin varlığını spesifik olarak tayin etmede kullanılabilir. kullanılabilmektedir.

Nanopartiküllere ya da mikropartiküllere afinite ligandlarının bağlanması için kullanılan reaksiyonlar moleküllerin biyokonjugasyonu veya yüzeylere ya da kromatografik desteklere ligandların immobilizasyonu için kullanılan reaksiyonlarla temel olarak aynıdır. Ancak partikül boyutu reaksiyonun nasıl oluşacağına ve oluşan reaksiyonun kinetiklerinde önemli bir faktör olabilir. Partikül türleri düşük nanometre çapından mikron boyutuna kadar değişebileceğinden, partiküllerin çözeltide nasıl davranacağı, reaktif grupların veya fonksiyonel grupların yoğunluğu reaksiyonları çok farklı yönde etkileyebilmektedir.

1.7.1. Antikor Modifikasyonu ve Konjugasyonu

Bir antikorun bir başka proteine ya da moleküle bağlanma yeteneği, fen bilimleri araştırmaları, teşhis ve tedavisindeki birçok uygulama için oldukça önemlidir. Antikor konjugatları kanser ve diğer hastalıklar için hedeflenmiş tedavi ile ilişkili en önemli biyolojik ajanlar haline gelmiştir. Tümör hücreleri üzerinde tanımlanmış düzinelerce işaret vardır. Bu işaretler için hedefli tedaviye yönelik monoklonal antikorlar geliştirilmiştir (Carter *et al.*, 2004). In vivo da kanser hücrelerini bulmaları ve yok etmeleri için antikor konjugatlarının hazırlanması yeni ilaç geliştirme araştırmalarında en önde gelen stratejilerden biridir (McCarron *et al.*, 2005). Çoğu durumda, ilaçların bölgeye özgü gönderimi, normal hücreleri etkilemeden hastalıklı hücreleri hedefleyebilen tanımlanmış monoklonal antikor konjugatlarının başarılı bir şekilde geliştirilmesini gerektirmektedir. Nispeten ucuz, spesifik monoklonal ve poliklonal antikorların bulunabilmesi, yüksek affinite de neredeyse her olası analitle etkileşebilen reaktif sistemlerin tasarımını mümkün kılmıştır. Saflaştırılmış immüoglobulinlerin özgülüğü, immünojenik reaktifler oluşturmak için güçlü araçlar sağlamaktadır. Bu özgün antikorlar bir dizi konjugasyon ve modifikasyon tekniği kullanarak karmaşık yapılara kolayca hedefleme için modifiye edilebilirler Örneğin, enzimle,

floresan bir bileşik yada biotin ile işaretli bir antikor molekülü etiketi sayesinde ölçülüp görüntülenebilir dedekte edilebilir bir kompleks oluşturur.

Antikor moleküllerinin benzersiz yapısal özellikleri, modifikasyon ve konjugasyon düzeni için birçok seçenek sunar (Roitt, 1977; Goding, 1986; Harlow and Lane, 1988a, b, c). Konjugat oluşumunu etkilemek üzere kullanılan kimyasal yapı, mümkün olan en iyi antijen bağlama aktivitesi oluşturacak şekilde seçilmelidir.

En temel immunglobulin G molekülü, kovalent olmayan etkileşimler yanında birçok disülfid bağ ile bir arada tutulan iki hafif ve iki ağır zincirden oluşmaktadır. Hafif zincirler ağır zincirlere sırası ile C L ve C H 1 bölgelerinde disülfid bağları ile bağlıdır. Ağır zincirler eklem bölgesinde birbirilerine disülfid bağları ile bağlıdır. Her immunglobulin molekülünün ağır zincirleri özdeştir. İmmuglobulinin sınıfına bağlı olarak bu alt ünitelerin molekül ağırlığı 50.000 ile 75.000 arasında değişmektedir. Aynı şekilde antikorun iki hafif zinciri de özdeştir ve molekül ağırlıkları 25.000 kadardır. Tüm IgG moleküllerinin 4 üniteye karşılık tam molekül ağırlığı 150.000-160.000 aralığındadır.

Antikorlarda iki tip hafif zincir bulunabilmektedir. Bir antikor molekülü ya lamda yada kapa tipte hafif zincirler taşıyabilmektedir, her iki tip bir arada aynı molekülde bulunamamaktadır. Immunglobulin'n sınıfı, atikorun ağır zincir çeşidine bağlı olarak belirlenmektedir. Tek bir antikor sadece tek bir çeşit ağır zincire sahip olabilmektedir. Bu yüzden, her biri ağır zincir tipine bağlı olarak belirlenen başlıca 5 sınıf antikor molekülü bulunmaktadır. Bunlar IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD dir. Bu antikor sınıflarından üçü olan IgG, IgE, ve IgD, iki hafif ve iki ağır zincir taşıyan temel Ig monomerik yapısından oluşmaktadır. İmmunglobulin moleküllerinin ağır zincirleri de tipik olarak CH 2 bölgesinin Fc parçası alanında glikozillenmiştir, ancak bunun yanı sıra antijen bağlanma bölgelerinin yakınında karbonhidrat da içerebilirler.

Her temel Ig-tipi monomerik yapının iki antijen bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler Y yapısının uçlarındaki çok değişken ağır-hafif zincirlerin birbirine yakın olduğu N-terminal de oluşturulmaktadır. Bu alt ünite çiftlerinin benzersiz tersiyer yapısı komplementer antijen molekülü ile etkileşim için gerekli konformasyonu meydana getirmektedir. Immunglobulin molekülü üzerindeki

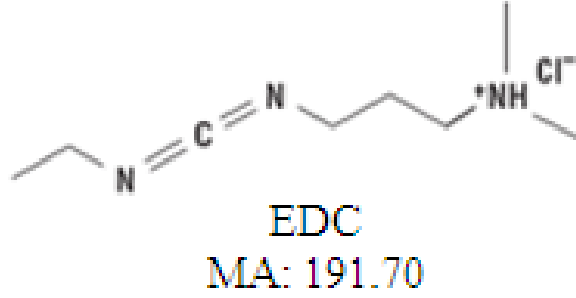
antijenle etkileşim noktaları, hafif ve ağır zincirli birçok non sequential amino asitler çevreleyen non kovalent güçler gerektirmektedir. Bir başka deyişle bağlanma bölgesi, tam olarak her bir zincir üzerindeki lineer aminoasit sekansı tarafından değil de bu grupların üç boyutlu düzlemde benzersiz oryantasyonu ile oluşturulmaktadır. Bu nedenle antijen bağlanma bölgesi, yapısal tamamlayıcılığın yanında her etkileşim bölgesinde oluşturulan van der Waals, iyonik, hidrofobik ve hidrojen bağı kuvvetlerine de bağlı olarak belirli antijen molekülüne affinite göstermektedir.

Antikor molekülleri modifikasyon ve ya konjugasyon için uygun birkaç fonksiyonel gruba sahiptirler. Çapraz bağlayıcı ajanlar lizin ϵ amino ve N-terminal α -amin grubunu hedeflemek için kullanılabilir. Karboksilat grupları da C terminal ucundaki aspartik asit ve glutamik asit kalıntıları için kullanılabilir. Her amin ve karboksilat grupları pek çok proteinde olduğu gibi antikorlarda da uygun olmalarına rağmen, immünglobülünlerin 3 boyutlu yapısı içindeki dağılımı aynı biçimde olmaktadır. Bu nedenden dolayı, konjugasyon prosedürlerinde bu uygun gruplar antikor moleküllerinin tüm parçalarıyla rastgele çapraz bağlanabilirler. Bu nedenle konjugasyon prosedürü oldukça dikkatli seçilmelidir(Hermanson 2008).

1.7.2 Biyokonjugasyon Ajanları

1.7.2.1. EDC

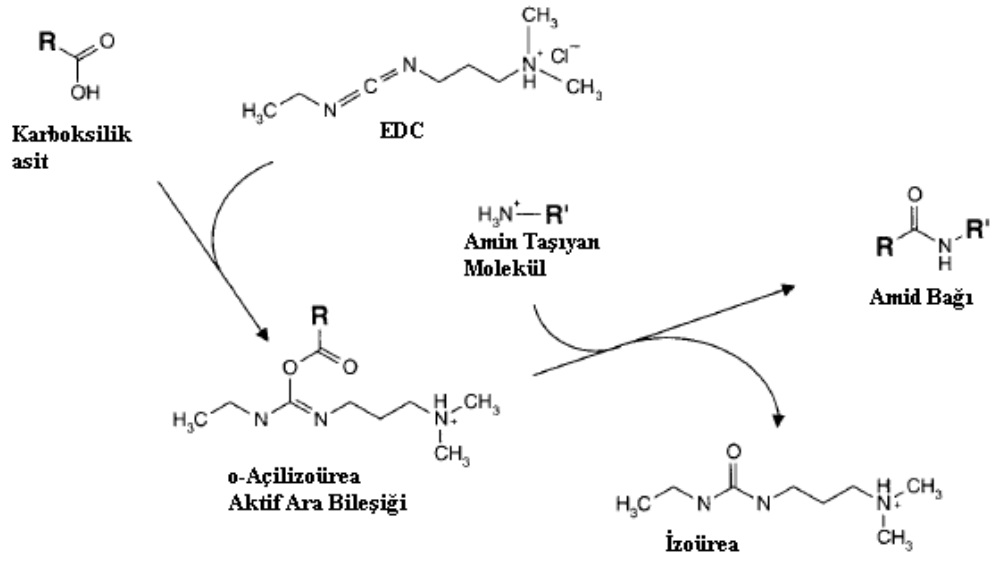
Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorid (EDC veya EDAC), karboksilat ve amin içeren biyolojik maddelerin konjugasyonu için en popüler karbodiimididir. En çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajandır. EDC biyokonjugasyon ajanı, peptit ve proteinlerdeki amin gruplarına karboksil konjuge etmek için, karboksilleri amin-reaktif Sulfo-NHS esterlerine dönüştürmek için, çapraz bağlı proteinlere karboksil kaplı yüzey oluşturmak için, amin-reaktif Sulfo-NHS esterleri ile aktive edilmiş nanopartiküller oluşturmak için, taşıyıcı proteinlere çeşitli molekülleri bağlamak için, DNA'yı 5' fosfat ucundan işaretlemek için kullanılmaktadır.



Şekil 1.18. EDC'nin molekül yapısı

Parçacık ve yüzey konjugasyon prosedürlerinde NHS (*N*-hidroksisülfosuksinimid) veya sulfo-NHS biyokonjugat ajanı ile birlikte kullanılmaktadır. EDC herhangi bir organik çözücüye ihtiyaç olmadan reaksiyon ortamına eklenebilen suda çözünebilir bir ajandır. Her iki ajanın kendisi ve çapraz bağlama reaksiyonlarının sonucunda oluşan ürünler diyaliz ya da jel filtrasyon yöntemi ile kolayca ortamdaki uzaklaştırılırlar.

Pek çok kimyasal konjugat EDC kullanılarak bir amin ve diğer karboksilat grubu temin edecek şekilde oluşturulabilmektedir. *N*-substitute karbodiimid, karboksilik asit ile etkileşerek ara ürün olan yüksek reaktif *o*-açilizoürea oluşur. Bu aktif türler daha sonra bir nükleofil ile amid bağı oluşturacak şekilde reaksiyona girebilirler. Diğer nükleofiller de tekimeye girebilir. Sülfidril grubu aktif türlere saldırabilir ve tiyol esterleri oluşur fakat bu yapı bir amin ile bağ oluşturacak kadar stabil değildir. Ek olarak, oksijen atomları saldırgan su molekülünde olduğu gibi nucleophile olarak davranabilir. Sulu çözeltilerde baskın yarışmalı reaksiyon suyun hidrolizidir, aktif edilen ester aramaddesini böler, izoürea oluşturur ve karboksil grubunun rejenere eder.

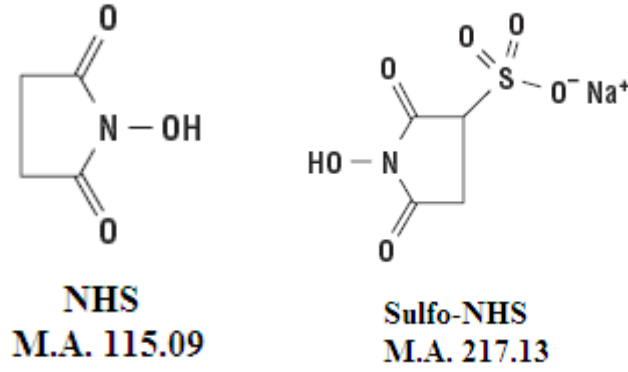


Şekil 1.19. EDC reaksiyonu

Şekil 1.19.'da görüldüğü gibi EDC, karboksil grubu içeren molekül ile tepkimeye girer ve *o*-açilizourea aktif arabileşiği ürün olarak oluşur. Aracı molekül sulu ortamda hidrolize duyarlı olduğundan kısa ömürlü olsa da , amid bağı taşıyan molekül ile reaksiyona girerek stabil amin bağı oluşturur.

1.7.2.2. NHS ve Sulfo-NHS

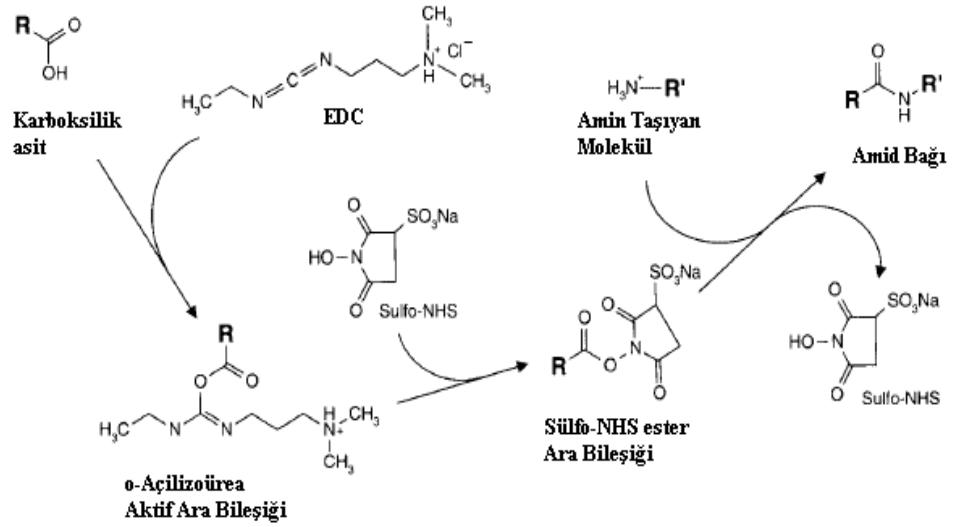
Sulfo-NHS (*N*-hidroksisulfosüksinimid) ve onun yüksüz analogu NHS (*N*-hidroksisüksinimid), biyokonjugasyon ve çapraz bağlamanın çeşitli uygulamaları için karboksil gruplarını amin-reaktif Sulfo-NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılan kimyasal modifikasyon reaktifleridir (Şekil 1.22). Sulfo-NHS'nin, bir karboksil içeren molekül ve karbodiimid EDC gibi bir dehidrasyon ajanı ile karıştırılarak rahatlıkla türevleri sentezlenebilir. Metodun temeli amin-reaktif floresan boyalar, biyotine afinite gösteren kuyruklar gibi çok çeşitli protein işaretli reaktifler üretmektir.



Şekil 1.20. Kimyasal modifikasyon reaktifleri NHS ve Sulfo-NHS'nin yapısı

Suda çözünebilir karbodiimid EDC, karboksilat gruplarıyla suda çözünebilir bileşikler, NHS (sulfo-NHS) kullanılarak aktif ester fonksiyonelliği oluşturmak için kullanılabilir. Sulfo-NHS esterler hedef moleküllerdeki aminlerle hızla eşleşen hidrofilik reaktif gruplardır. Nispeten suda çözünemeyen ve daha önce organik çözeltide eritilmesi gereken sülfonatlanmamış NHS esterlerine göre, sulfo NHS esterleri suda çözünebilir, daha uzun ömürlüdür ve suda fazla hızlı hidroliz olmazlar. Bununla birlikte, karbonil grubuna saldırabilen amin nükleofillerin varlığıyla sulfo-NHS grupları, kararlı amide bağlantıları oluşturmak üzere seri bir şekilde ayrılırlar. Benzer esterlerle sülfidril ve hidroksil gruplarında reaksiyona girerler ancak bu tarz reaksiyonların ürünleri, tiyolesterler ve esterler amid bağlara göre daha kararsızdır. EDC reaksiyonlarına sulfo-NHS eklemenin avantajı saldıran aminle reaksiyona giren ara maddelerin çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmaktır. EDC bir karboksilat grubuyla gruptan ayrılan aktif ester oluşturmak için reaksiyona girer. Maalesef bu reaktif yapı saniyelerle ölçülen oran sabitiyle aminlerle reaksiyona girmek için çok yavaş kalır ve sulu çözeltilerde hidroliz olabilir. Hedef amin hidroliz olmadan önce aktif karboksilatı bulamazsa istenen eşleşme gerçekleşemez. Bu, özellikle hedef molekül suya göre daha az konsantre bir durumdaysa problem teşkil eder, tıpkı protein moleküllerinde olduğu gibi. Ek olarak bir karboksilat bulunduran bileşik, *o*-açilizoürea ara reaktif esterden anhidrit oluşturabiliyorsa amid bağı formasyonunun ürünü artar. Benzer bir yaklaşımla EDC aktif-ester yapısıyla, sulfo-NHS üzerindeki hidroksil grubunun reaksiyonundan sulfo-NHS ester aramaddesi oluşturmak amid bağ formasyonunun ürünü önemli derecede

arttırır. Genellikle, eklenen sulfo-NHS nin konantrasyonu, hedef moleküle göre çok daha fazla olduğu için reaksiyon tercihen daha verimli olan sulfo-NHS ester aramaddesi yoluyla devam eder. Bununla birlikte bu iki adımlık reaksiyonun son ürünü yalnız EDC kullanılarak elde edilenle özdeştir: aktif edilen karboksilat kararlı amide bağlantı vermek için bir aminle reaksiyona girer.



Şekil 1.21. EDC ve NHS reaksiyonu

Şekil 1. 21.'de görüldüğü gibi EDC, karboksil grubu içeren molekül ile tepkimeye girer ve *o*-açilizoürea aktif arabileşiği ürün olarak oluşur. Aracı molekül sulu ortamda hidrolize duyarlı olduğundan kısa ömürlü olsada , amid bağı taşıyan molekül ile reaksiyona girerek stabil amin bağı oluşturur. Ayrıca Sulfo-NHS amin-reaktif aracıyı amin-reaktif Sulfo-NHS esterine dönüştürerek stabilize eder, bu EDC aracılı konjugasyon işleminin etkinliğini artırır [DeSilva, 2003; Grabarek ve Gergely, 1990]. Amin-reaktif Sulfo-NHS ester, bir protein üzerindeki karboksil grubunun değişmeden kalmasına olanak sağlayacak iki basamaklı çapraz bağlama işlemi için yeterli stabillige sahiptir.

1.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu

Lazer taramalı konfokal mikroskop (LTKM), günümüzde cisimleri üç boyutlu olarak izlemesinde kullanılan en önemli cihazdır. LTKM, fluoresan mikroskop esaslarına benzer şekilde çalışan bir mikroskop olup, burada aydınlatma kaynağı olarak pankromatik görünür ışık kaynağı yerine monokromatik karakterdeki lazer ışınları kullanılmaktadır.

LTKM 'ta, objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. X-Y yansıtma mekanizması ile bu ışın, tarama ışınına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla fluoresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Optik kesit alma XY düzleminde veya XZ, YZ dikey düzlemlerinde gerçekleştirilebilir ve gerçek üç boyutlu veri setleri toplanabilir. Fokal düzlemlerden elde edilen optik kesit katmanları tekrar üst üste yapılandırılarak üç boyutlu görüntü üretilir (Sagdıç, O. 2008).

Biz bu çalışmada akridin turuncusu boyası kullanarak mikroorganizmaların florokromatik boyanmasını sağladık. Akridin turuncusu, bakterilerin nükleik asitlerine ve diğer hücrelerine bağlanarak UV ışığı altında, canlı hücrelerin turuncu renkte gözlenmesini sağlamaktadır.

1.9. Akış Sitometrisi

Flow sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

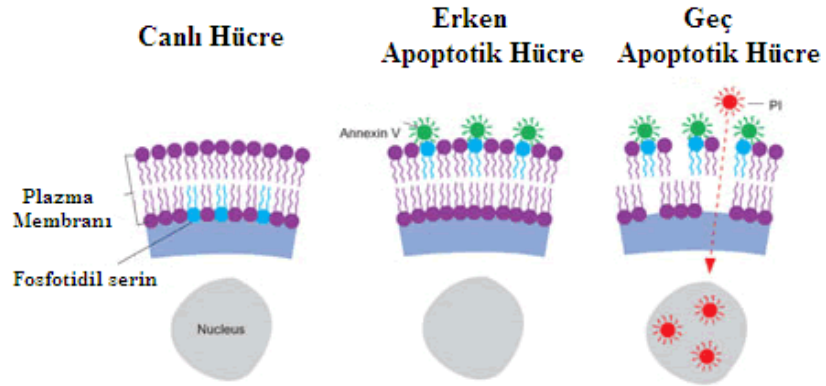
Flow Sitometrinin Çalışma Prensipleri

Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayınlanan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır. Histogram, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur. Ölçüm sırasında hücreler canlı veya sabit olmalıdır, ayrıca sıvı içinde hücreler tek tek askıda olmalıdır. Hücreleri içeren süspansiyon sürekli bir akışla lazer ışını içinden geçmelidir. Her bir hücre lazer ışığının bir kısmını saptırır ve aynı zamanda lazer tarafından uyarıldıklarından yani ekstra enerji yüklenmiş olduğundan, floresan ışığı yayarlar (Dalva G.)

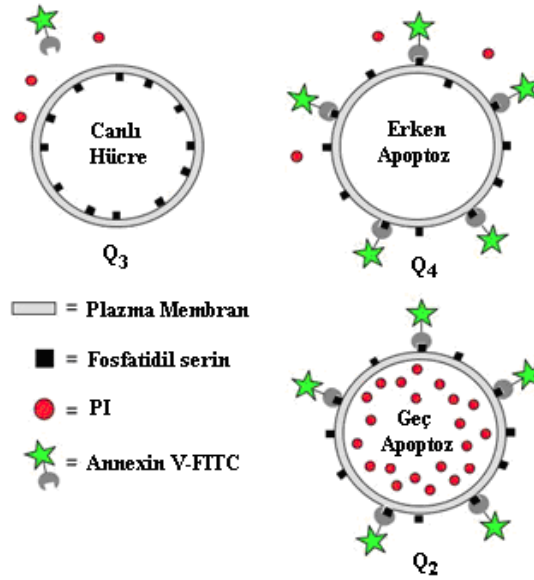
Normal hücrelerde, fosfolipidlerin (PS) bölgeleri sitoplazmik membranın iç kısmında bulunurlar. Apoptoz sürecinde, PS bölgeleri yer değiştirir ve dış membrana yönelir. Annexin-V, PS bölgelerine bağlanan spesifik bir proteindir ve apoptoz hücrelerini ayırt etmek için kullanılır. Propidium iyodür [PI] ise geç apoptoz (nekroz) olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir boyadır. Aşağıdaki Şekil 1.19’te fosfolipidlerin hücrenin sitoplazmik iç membranında olduğu görülmektedir. Hücre erken apoptoz gittiğinde fosfolipidlerin bölgeleri hücrenin dış kısmına geçmekte ve Annexin-V proteini tarafından tanınmaktadır. En sağdaki şekilde ise hücreler geç apoptoz gittiğinde (nekroza) yani iyice zarar gördüklerinde PI boyası hücre içine girebilmekte ve nekrotik hücreleri bu şekilde işaretlemektedir. Bu çalışmada kullanılan kit Annexin-V –PI kitidir. Yani nekrotik ve apoptotik hücreleri belirlenmektedir.

Annexin V apoptoz hücrelerinde ortaya çıkan fosfolipidlerin yapısına bağlanabilme özelliği gösteren bir proteindir. FITC (floresanizosiyanat) ise Annexin V proteine bağlı olan ve apoptoz uğrayan hücreleri akış sitometrisindeki lazer yardımıyla sayılmasını sağlayan floresan özellikte bir boyadır. PI (propidyumiyodür) ise dış koşullar nedeniyle parçalanmış hücreleri boyayan bir boyadır. Hücre kültüründe apoptoz uğrayan hücrelere Annexin V-FITC boyası boyayıp hücre popülasyonundaki erken apoptoz uğrayan hücrelerin değerini verir (Q₄), nekroza uğramış hücreleri PI boyası boyar ve nekrotik hücre

sayısını verir (Q_1), Annexin V-FITC ve PI boyaları birlikte bağlanırlarsa hücrelerin apoptoza ve sonra nekroza uğradığı gösteren geç apoptoz değerini verir (Q_2), her iki boyanın da bağlanmadığı hücreler ise sağlıklı hücre sayısını (Q_3) vermektedir (Yazar, S. 2009).



Şekil 1.22. Hücrelerde erken ve geç apoptoz



Şekil 1.23. Akış sitometrisinde hücrelerin işaretlenmesi

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Poli(vinil alkol) (PVAL; molekül ağırlığı: 100.000, % 98 hidrolize olabilen) Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) Fluka A. G. (Buchs, İsviçre) firmasından sağlanarak kullanılmadan önce hidrokinon varlığında düşük basınçta damıtılmış ve kullanıncaya kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich firmasından sağlanmıştır. Deneyleerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Polimerik Nano IgG ve polimerik nano IgG konjuge Lizozim kompleksi boyut ve zeta potansiyeli analizleri için Malvern Zeta Sizer Nano-ZS cihazı kullanılmıştır. Cary Eclipse marka floresan spektrofotometre cihazı; çeşitli konjugasyonlar sonucu MATyr-Ru(bipy)₂-MATrp monomeri ile floresan özellik kazanan partiküllerdeki floresan değişimi belirlemek için, sentezlenen nanobiyokonjugat ile bakteri hücrelerinin etkileşimi sonucu hücre miktarının saptanması amacıyla Shimadzu 1601 model spektrofotometre cihazı, nanobiyokonjugatlarla etkileşim sonucunda canlı hücre yoğunluğunu görüntülemek amacı ile FT5 Leica Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu ve BD FACS Aria Akış Sitometrisi ise sentezlenen polimerik nano IgG konjuge lizozim'in sağlıklı embriyonik fare fibroblast hücre hattı (3T3) ile inkübe edilerek sağlıklı hücreler üzerindeki toksik etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

Tüm sentez işlemleri steril ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Kimyasal malzemelerin sterilizasyonu filtrasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0,4 µm por boyutuna sahip membran filtreler kullanılmıştır.

2.2.1. Nanobiyokonjugatların Sentezi

2.2.1.1. Fotosensitif Mikroemülsiyon Tekniği ile Polimerik nano IgG'nin Sentezi

Polimerik nano IgG fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Mikroemülsiyon sistemi 1.1 gram polivinil alkolün (PVA) 100 ml distile su içinde dispersiyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde 1000 ppm nano IgG solüsyonu hazırlanmıştır. 25 µl MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi 1000 ppm 500 µl IgG solüsyonu içine ilave edilmiş ve karışım 4 saat karıştırılmıştır. IgG-MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi PVA dispersiyon ortamının içine aktarılmıştır. Başlatıcı solüsyon olarak amonyum persülfat (APS) çözeltisi hazırlanmıştır. 0.02 gram APS 45 ml distile su içinde çözdürülmüş ve bu çözeltiden 25 ml alınarak reaksiyon ortamının içine eklenmiş ve ortam 48 saat manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot ortamında karıştırılmıştır. 48 saat sonunda sentezlenen nanopartiküller reaksiyon ortamından 12000 rpm hızda ve 10 dakika süre ile santrifüjlenerek ayrılmıştır. Fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 3 kez yıkama yapılarak reaksiyona girmeyen materyaller uzaklaştırılmıştır. MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi sayesinde floresan özellik kazanan polimerik nano IgG'nin floresan spektrumunu ölçülmüştür.

2.2.1.2. Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim Sentezi

1 µl pH:7,4 fosfat tamponunda dispers edilmiş 15 mg polimerik Nano IgG üzerine 250 µl 0.1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ile 250 µl 0.4 M 1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda karışıma 500 µl MATyr-Ru/bipyrr₂-MATrp ilave edilerek 24 saat karışım manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. 24 saat sonunda 100 ppm Lizozim çözeltisi 100 µl APS eşliğinde karışıma ilave edilmiş 24 saat karışım manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. 24 saat sonunda karışım 12000 rpm hızda 10 dakika süre ile santrifüjlenerek konjuge olmayan lizozim molekülleri uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonunda pellet 3 kere fosfat tamponu (pH:7.4) ile santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Polimerik nano IgG konjuge lizozim kompleksi floresan spektrofotometresinde incelenmiştir.

2.2.2. Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.2.1. Boyut Analizi

Polimerik nano IgG ve polimerik nano IgG konjuge lizozim'in boyut analizi Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.2.2. Zeta Potansiyel Analizi

Polimerik nano IgG ve polimerik nano IgG konjuge lizozim' in zeta potansiyel analizi Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.3. İn vitro Çalışmalar

2.2.3.1. Bakteri Suşu

Çalışmamızda kullanılan *Staphylococcus aureus* NRRL-B-767 izolatu Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

2.2.3.2.Besi yerleri

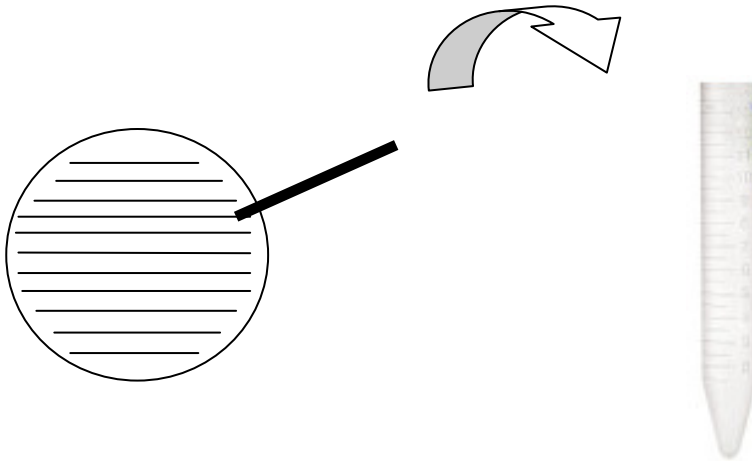
Nutrient Agar: Toz halindeki nutrient agardan 15 gr tartılarak üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş, çözüldürülerek 121 °C’ de 15 dk otoklavda streil edilmiştir.

Nutrient Broth: Toz halindeki nutrient brothtan 8 gr tartılarak üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiş, çözüldürülerek 121 °C’ de 15 dk otoklavda steri edilmiştir.

2.2.3.3.Bakteri süspansiyonlarının Hazırlanması

-85°C’de % 15’lik gliserol ortamında muhafaza edilen *Staphylococcus aureus* aktifleştirilmek amacıyla nutrient agara ekilerek 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

24 saatlik taze kültürden steril kürdan yardımıyla *S.aureus* hücreleri kazınarak 11 mg tartılmıştır. Üzerine 11 ml nutrient broth ilave edilerek vortekslenmiştir. Sonuçta 1mg/ml’lik hücre stoğu elde edilmiştir.



Şekil 2.1. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanması

2.2.3.4. Antibakteriyel Etkinliğinin İncelenmesi

1 mg/ml hücre olan 1.5 ml'lik nutrient broth içeren steril cam tüplere değişik oranlarda madde ekimi yapılmıştır. Kontaminasyon olasılığını bertaraf etmek için pozitif kontrol ve negatif kontrol tüpleri hazırlanmıştır. Maddeden gelebilecek kontaminatları tespit edebilmek için ise nutrient broth içersine 400 µl'lik ekim yapılmıştır. Bakteri süspansiyonu 24 saat boyunca 37°C' de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda canlı sayımı için her tüpten 1ml örnek alınarak uygun seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltilmiş örneklerden 100 µl örnek alınarak canlı hücre sayımı için ayrılmıştır. Kalan 500 µl örnek spektrofotometrik tayinlerde kullanılmıştır.

2.2.3.4.1.Canlı Hücre Sayımı

Yüzeye Yayma Yöntemiyle Kültürel Sayım'da izlenecek yollar

- 1) Yaklaşık 50°C deki erimiş steril agarlı besi yeri aseptik koşullarda steril petri kutularına 15-20 ml miktarlarında dökülmüştür.
- 2) İncelenecek dilüsyondan 0,1 ml alınmış ve kuru agar yüzeyine aktarılmış, drigalski özesi ile tüm petri yüzeyine yayılmıştır.
- 3) Ekim yapılan petri kutuları 10-15 dk bekletilmiş ve daha sonra inkübisyona alınmıştır. Bekletmenin amacı, besi yerinin inokulumü absorblamasının sağlanmasıdır.



Şekil 2.2. Yüzeye yayma yöntemiyle sayım

Total canlı bakteri sayımı tüm tüplerden dilüsyondan sonra 100'er µl örnek alınarak nutrient agarlı petrilere yayma plak yöntemi ile ekim yapılarak yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek oluşan koloniler sayılmıştır. Aşağıdaki formüle göre koloni oluşturan birim sayısı hesaplanmıştır.

$$\text{Koloni oluşturan birim (cfu/ml)} : \frac{\text{Koloni sayısı} \times \text{seyreltme faktörü}}{\text{Dilüsyon tüpünden petri kutusuna aktarılan hacim}}$$

$$\text{Seyreltme faktörü: } \frac{1}{\text{Seyreltme oranı}}$$

Optik yoğunluk tayini

Optik yoğunluk tayinin için 500 µl örnek alınarak pH:7.4 2.5 ml fosfat tamponuna ilave edildi ve 540 nm'de ölçümler gerçekleştirildi. İn vitro denemeleri 3 kez tekrarlanmıştır.

2.2.4 Lazer taramalı konfokal mikroskobu Hazırlık Aşaması

2.2.4.1 Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması

Bu çalışmada *S.aureus* kontrol hücreleri ve 800 µl polimerik nano IgG konjge lizozim ile etkileştirilerek 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiş hücre süspansiyonu akridin turuncusu boyası ile muamele edilerek lazer taramalı konfokal mikroskobunda canlı hücrelerin görüntülenmesi sağlanmıştır.

Bu amaçla temiz lam üzerine 30 µl *S.aureus* hücre süspansiyonundan ilave edilerek açık havada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan hücre süspansiyonu 1 – 2 dk boyunca %100'lük metanol ile muamele edilerek kimyasal fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fazla metanol boşaltılarak kurumaya bırakılmıştır. Lam üzeri

2 dk boyunca akridin turuncusu boyasıyla kaplanmış ve daha sonra musluk suyuyla iyice çalkalanarak, kurumaya bırakılmıştır.

2.2.5 Biyoyumluluk Testi

2.2.5.1 Hücre Kültürü

Bu çalışmada sağlıklı embriyonik fare fibroblast hücre hattı (3T3) kullanılmıştır. 3T3 hücreleri, % 10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin/streptomisin antibiyotiklerini içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) hücre kültürü ortamda 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde steril hücre kültürü test kaplarında 37°C 've % 5 CO_2 içeren inkübatörlerde yetiştirilmiştir.

2.2.5.2 Polimerik nano IgG konjuge lizozim' in Sağlıklı Hücrelere Etkisi

Bu çalışmada, polimerik nano IgG konjuge lizozim' in hücre kültüründe sağlıklı embriyonik fare fibroblastı hücre hattı üzerindeki toksik etkisi incelenmiştir. Polimerik nano IgG konjuge lizozim 'den 0,05 gram alınarak 1 ml DMSO içinde dispers edilmiş ve karışımdan 25 μl alınarak 1×10^6 hücre/ml 3T3 hücre hattının olduğu hücre kültürü test kabına aktarılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. DMSO 'nun hücrelere etkisini incelemek için 25 μl DMSO kullanılarak DMSO kontrolü ve normal kontrol hücreleri oluşturulmuştur. Akış sitometrisinde normal kontrol hücrelerinin canlılık oranı belirlenmiş daha sonra sadece DMSO' nun hücrelere etkisi ve son olarak polimerik nano IgG konjuge lizozim' in 3T3 hücrelerine etkisi incelenmiştir.

2.2.5.3 Akış Sitometrisi

3T3 hücrelerindeki apoptoz ve nekroz değerleri Annexin V-FITC/PI kiti (BD Company, USA) kullanılarak akış sitometrisi cihazında (FACS Aria, BD

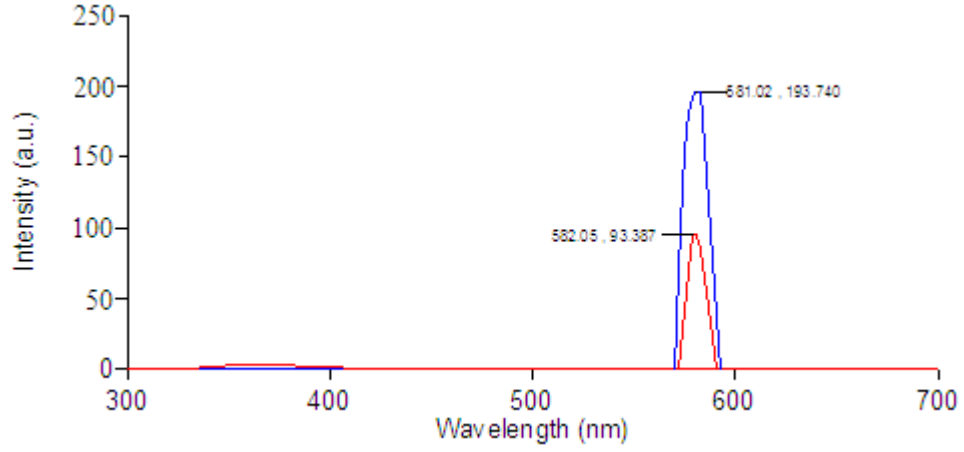
Corporation, USA) belirlenmiştir. Hücreler 1200 rpm hızda 5 dk santrifüjlenerek toplanmış ve sonra soğuk fosfat tamponu (pH: 7.4) ile iki kere yıkanıp santrifüjlenerek hücre kültürü ortamının kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücre pelletleri 100 ml bağlanma tamponu (kitte mevcut bulunmaktadır) ile süspanse hale getirilmiştir. 100 ml hücre süspansiyonu (5×10^4 hücre/ml) akış sitometrisi tüplerinin içine alınmış üzerlerine 5µl Annexin V- FITC boyası ve 5µl propidyum iyodid (PI) boyası ilave edilmiş ve 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Sonra 400 µl bağlanma tamponu her örneğe ilave edilmiş ve akış sitometrisinde Diva yazılımında ikili boyama analizine göre okutulmuştur. Bu boyamaya göre hücreler dört gruba ayrılmaktadır. Apoptoza uğramış hücrelerde fosfotidilserin yapısı ortaya çıkmakta ve Annexin V-FITC hücreleri tarafından boyanmaktadır. Nekroza uğramış hücreleri PI boyası boyamakta ve canlı hücreler boyanmayan kalmaktadır. Boyanmamış hücreler canlı hücrelerdir (Q₃), Annexin V ile boyanmış PI ile boyanmamış hücreler erken apoptoza uğramış hücrelerdir (Q₄), geç apoptoza uğramış hücreler hem Annexin V hem de PI ile boyanmış hücrelerdir (Q₂), sadece PI ile boyanmış hücreler ise nekroza uğramış hücrelerdir (Q₁).

3. BULGULAR

3.1 Floresans Ölçüm Sonuçları

3.1.1 Polimerik Nano IgG ve Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim Kompleksinin Ölçüm Sonuçları

Polimerik Nano IgG konjuge lizozim kompleksi MATyr-Ru(bipy₂-MATrp ile hazırlandığı için floresan özellik kazanmıştır. Floresan spektrofotometresinde polimerik Nano IgG çözeltisinin en yüksek floresan şiddeti ve buna bağlı olarak dalga boyu belirlenmiştir (Şekil 3.1 kırmızı pik). Polimerik Nano IgG çözeltisinin Lizozim ile konjugasyonu floresan spektroskopisinde aynı dalga boyunda ölçülmüş ve şiddetindeki değişiklik belirlenmiştir (Şekil 3.1 mavi pik).



Şekil 3.1. Polimerik Nano IgG ve polimerik Nano Igg konjuge Lizozim kompleksinin karşılaştırılması

Polimerik Nano IgG çözeltisi 290 nm’de uyarılmıştır ve emisyon değeri 582.05 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 93,367 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.1 kırmızı pik). Polimerik Nano IgG çözeltisi ile lizozim konjugasyonu 290 nm’de uyarılmıştır ve emisyon değeri 581,02 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddetinde ise artma gözlenmiş ve 193,740 olarak ölçülmüştür.

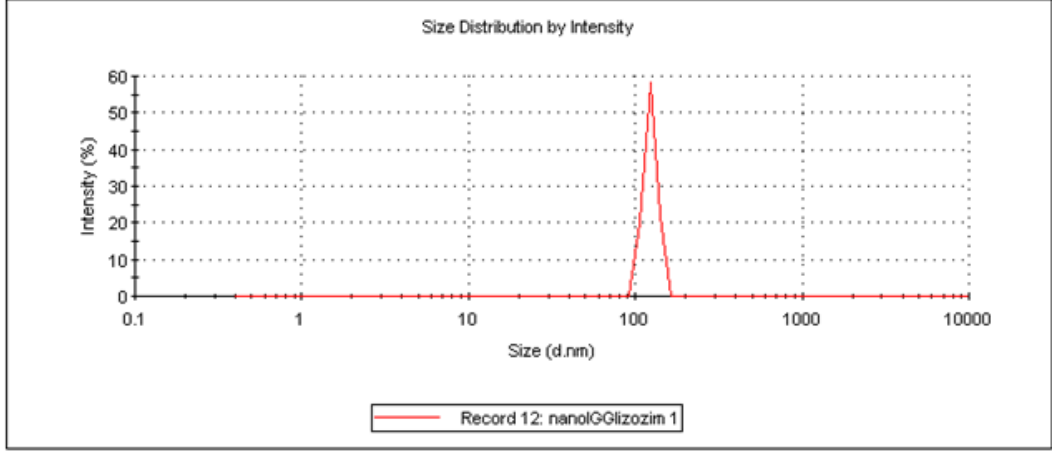
3.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1 Boyut Analizi

3.2.1.1 Polimerik Nano IgG Boyut Analizi

Polimerik Nano IgG’nin çapı 123.3 nm olarak Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Peak 1:	123,3	100,0	11,70
Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Peak 3:	0,000	0,0	0,000

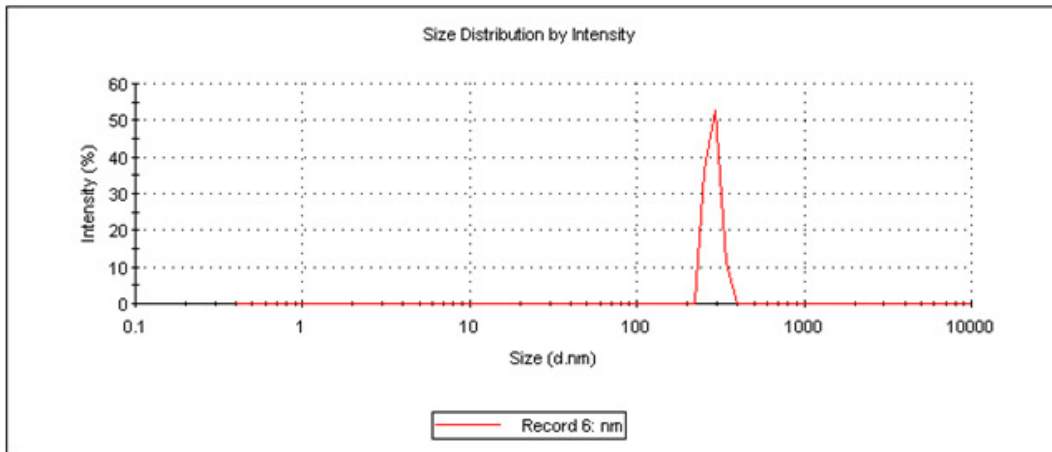


Şekil 3.2. Polimerik nano IgG boyut analizi

3.2.1.2 Polimerik Nano IgG Konjuge-Lizozim Boyut Analizi

Polimerik Nano IgG konjuge lizozim'in çapı 285,8 nm olarak Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.


	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Peak 1:	285,8	100,0	27,20
Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Peak 3:	0,000	0,0	0,000



Şekil 3.3. Polimerik Nano IgG konjuge lizozim boyut analizi

3.2.2 Zeta Potansiyel Çalışmaları

Poimerik nano IgG'nin zeta potansiyeli -22.1 mV ve polimerik nano IgG konjuge lizozim'in zeta potansiyeli ise -13.1 olarak Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.



Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	ZP mV	Mob µcm²/Vs	Cond mS/cm
-	Zeta	nl 1	04 Ağustos 2009 Salı 15:14:25	25,0	-13,1	-1,023	11,0
-	Zeta	nm 3	04 Ağustos 2009 Salı 15:27:28	25,0	-22,1	-1,732	11,6

Şekil 3.4. Zeta potansiyel çalışmaları

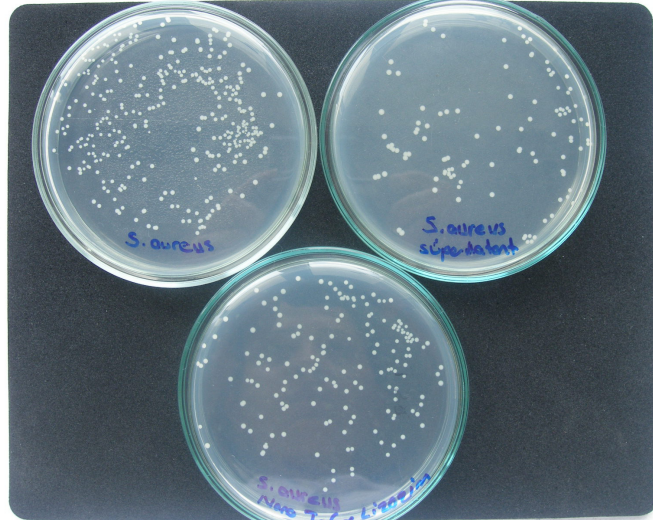
3.3. İn Vitro Deneyler

Polimerik Nano IgG konjuge lizozim kompleksinin *S.aureus* kültürleriyle 24 saat etkileşimi sonucu bulunan sonuçlar, ortalama değer olarak aşağıda çizelge 3.1' de verilmiştir. Ölüm oranları doğru orantı yöntemi ile hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. Polimerik Nano IgG ve polimerik Nano IgG konjuge lizozim aktivite tayini sonuçları (Üç kez tekrar edilmiştir)

	CFU/ml (Ort)	Abs(540 nm)	Ölüm Oranı
Kontrol	160 x10 ⁷	0,789	-----
400 µl Polimerik Nano IgG	154,5x10 ⁷	0,722	% 3,7
100 µl Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim	151 x10 ⁷	0,500	% 5,6
200 µl Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim	138 x10 ⁷	0,436	% 13,7
400 µl Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim	100 x10 ⁷	0,416	% 37,5
800 µl Polimerik Nano IgG Konjuge Lizozim	89,8 x10 ⁷	0,368	% 43.8

İn vitro analizler sonucunda polimerik nano IgG konjuge lizozim nanobiyokonjugatının antibakteriyel özelliğe sahip olduğu, artan konsantrasyonlarında yüzde bakteri ölüm oranında arttığı ispatlanmıştır.

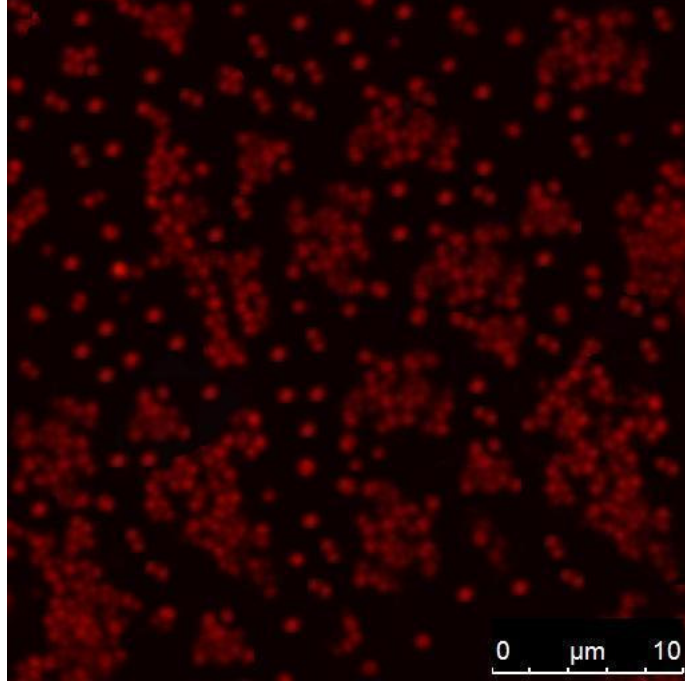


Şekil 3.5. *S.aureus* kültürleri

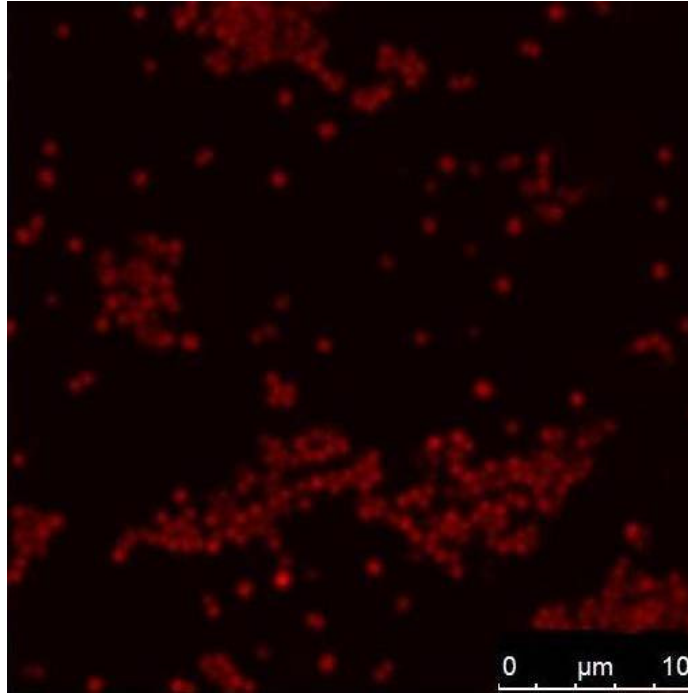
Şekil 3.5 'te *S.aureus* kültürleri gözlenmektedir. Sol üstteki şekil 10^6 seyreltme faktörüne sahip orijinal *S.aureus* kültür örneğidir. Altta ki şekil ise 400 µl polimerik nano IgG konjuge lizozim nanobiyokonjugatı eklenerek 24 saat inkübe edilmiş 10^5 seyrelme faktörüne sahip *S.aureus* kültür örneğidir. Şekilde de görüldüğü gibi madde etkileşimi sonucunda orijinal kültüre göre koloni sayısında azalma gözlenmiştir.

3.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu Görüntüleri

Akridin turuncusu ile muamele edilen *S.aureus* kontrol hücreleri ve 800 µl polimerik nano IgG konjuge lizozim ile etkileştirilerek 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiş hücre süspansiyonundaki canlı hücrelerin görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.6: *S. aureus* Kontrol Grubu Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu Görüntüsü

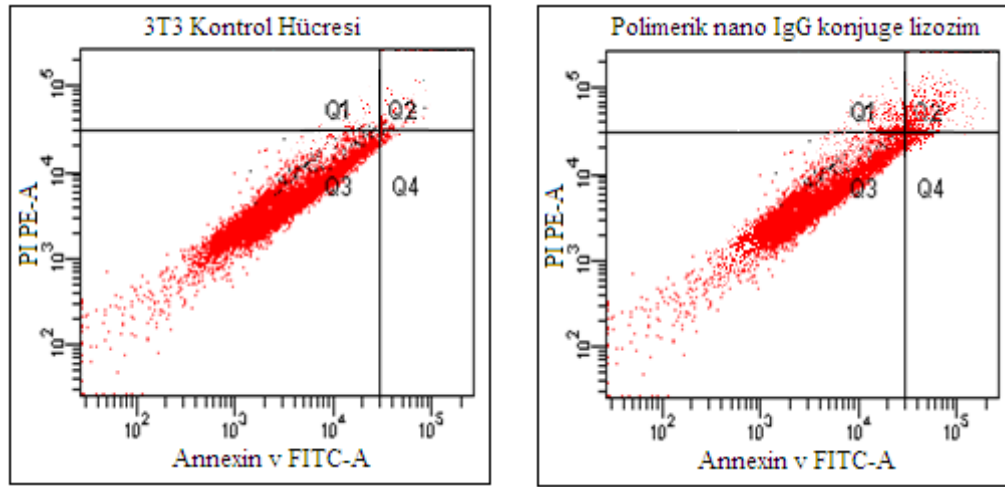


Şekil 3.7 800 µl polimerik nano IgG konjuge lizozim ilave edilmiş *S.aureus* süspansiyonu Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobu Görüntüsü

3.5. Biyoyumluluk Analizi

Akış Sitometrisi Sonuçları

Aşağıdaki Şekil 3.8.(a) kontrol hücrelerini göstermekte ve canlı hücre oranı Q_3 % 97.8' dir. Polimerik nano IgG konjuge lizozim'in hücre kültüründeki etkisi ise Şekil (b)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8. a) Kontrol hücresi ve b) polimerik nano IgG konjuge lizozimin akış sitometrisi sonuçları

Şekil 3.8.'de görüldüğü gibi ilk şekil kontrol hücresinin akış sitometri sonuçları canlı hücre oranı (Q_3 : % 97.8). İkinci şekil ise polimerik nano IgG konjuge lizozimin akış sitometri sonuçları nekrotik hücre oranı (Q_1 : % 2.0, geç apoptoz oranı (Q_2 : % 2.2), canlı hücre oranı (Q_3 : % 92.1) ve erken apoptoz oranı (Q_4 : % 3.7).

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada insan ve hayvanlar üzerinde yüksek patojenite gösteren *S.aureus'un* enfeksiyon oluşturma mekanizmasında görev alan yüzey proteinlerinden en önemlisi olan protein A'nın polimerik Nano IgG'lerle bloklanması ve doğal antibiyotik olan lizozim enzimine gösterdiği direncin yapılan biyokonjugasyon işlemi ile bertaraf edilmesi hedeflenmiştir.

Polimerik Nano IgG sentezi fotosensitif mikroemülsiyon tekniği ile gerçekleştirilmiş ve sentez aşamasında kullanılan MATyr-Ru(bipyridin)₂-MATrp sayesinde sentezlenen yapılara floresans özellik kazandırılmıştır. Bu sayede floresan spektrofotometresi analizleri gerçekleştirilmiştir. Biyokonjugasyon işlemi sonucu floresan spektrofotometresi sonuçlarında görülen artmalar bize lizozim biyokonjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. 14 kDa'luk bir molekül olan lizozimin yapıya bağlanmasına aracılık eden MATyr-Ru(bipyridin)₂-MATrp nedeniyle polimerik nano IgG daha stabil bir hale gelerek floresans emisyon şiddeti artmaktadır.

Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda sentezlenen Nano IgG'lerin boyutlarının homojen ve 123,3 nm olduğu tespit edilmiştir. Polimerik nano IgG'lere lizozim biyokonjugasyonu sonucunda yapılan boyut analizinde ise polimerik nano IgG konjuge lizozim biyokonjugatının boyutlarının homojen ve 285,8 nm olduğu tespit edilmiştir. Böylece sentezlenen biyolojik numunelerin nano boyutta polimerize edilebildiği ispatlanmıştır.

Yapılan tüm çalışmalar pH: 7.4 fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilmiştir. Bu pH'ta polimerik Nano IgG'nin zeta potansiyeli - 22.1 mV olarak tespit edilmiştir. Lizozim'in izoelektrik noktası 11.2' dir ve bu değer altındaki tüm pH değerlerinde lizozim katyonik özellik gösterir. Yani lizozim pH:7,4'te pozitif yüklüdür. Polimerik Nano IgG konjuge lizozim'in zeta potansiyeli ölçüldüğünde yeni değer - 13.1 mV olduğu kaydedilmiştir. Bu düşüş biyokonjugasyonu yapılan lizozimin pozitif yük yoğunluğundan kaynaklanmaktadır ve polimerik Nano IgG'ye lizozim biyokonjugasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Polimerik Nano IgG konjuge lizozim'in aktivitesi in vitro ortamda test edilmiştir. Polimerik Nano IgG'nin katalitik aktivite gösterip göstermediğini tayin edebilmek için bakteri süspansiyonuna ilave edilmiştir. İn vitro denemeler sonucunda Polimerik Nano IgG'nin de % 5'in altında öldürme oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu etkinin protein A'nın sahip olduğu 5 IgG bağlama altbirimlerinden D altbiriminin IgG Fab bölgesiyle etkileşebilmesi ve bu şekilde IgG katalitik aktivite gösterebilmesidir. Bu da sentez işlemleri sırasında IgG'in aktif uçlarının kapanmadığının göstergesidir. Polimerik Nano IgG konjuge lizozim sentezlerinde *S.aureus* süspansiyonlarında etkili olduğu analiz sonuçlarında gözlenmiştir. Bakteri süspansiyonuna artan konsantrasyonlarında nanobiyokonjugat ilavesinde yüzde ölüm oranında artış gözlenmiş ve bu değer 800 µl'ye gelindiğinde % 43.8'e ulaştığı gözlenmiştir. Lazer taramalı konfokal mikroskopunda yapılan çalışmalar sonucu elde edilen görüntülerde de kontrol hücresi ve polimerik nano IgG konjuge lizozim ilave edilmiş hücre süspansiyonu arasındaki hücre yoğunluğu farkı gözlenmektedir.

Polimerik nano IgG konjuge lizozim biyoyumluluk testi akış sitometrisinde gerçekleştirilmiş ve polimerik nano IgG konjuge lizozim ile muamele edilen sağlıklı embriyonik fare fibroblastı hücre hattının canlı hücre oranı % 92.1 olarak elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda polimerik nano IgG konjuge lizozim'in bakteri üzerinde öldürücü etkisi gözlenirken sağlıklı fare hücrelerinde toksik etki göstermediği saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda polimerik Nano IgG konjuge lizozim sentezinin *S.aureus* üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ispatlanmıştır. Sağlıklı hücrelerde toksik etki göstermemesi sayesinde ileriki aşamalarda *S.aureus* enfeksiyonlarında kullanılabilceğini göstermektedir.

Literatürde ilk kez sentezlenen bu nanobiyokonjugatlar pek çok avantaj sunmaktadır. Oda sıcaklığında ve gün ışığında gerçekleşen mikroemülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen nanobiyokonjugatların sahip oldukları uzun depo kararlılıkları ve çok az miktarlarının göstermiş olduğu yüksek aktivite onları ucuz kılmaktadır.

Floresans özelliğe sahip bu nanobiyokonjugatlar *S.aureus* tayinine yönelik sensör geliştirilmesinde kullanılabilirler. Bu şekilde

oluşturulacak sensörler kolonizasyon riskinin yüksek olduğu hastane gibi toplu mekanlarda ve/ve ya besin maddelerindeki *S.aureus* varlığını kısa sürede tayin edebilecek düzeyde olacaktır. Yapıya konjuge edilen lizozim sayesinde de hem tayin hem tedavi işlemleri eş zamanlı yapılabilecektir.

KAYNAKLAR

- Anonim 1, <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/proceuc/c8.27x3.bact.shapes.jpg>
- Anonim 2, <http://www.rkm.com.au/CELL/Bacteria/bacterialimages/Gram-negative-wall-500.jpg>
- Anonim 3, <http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/76356>
- Anonim 4, <http://www.sports-wash.com/mrsa.htm>
- Anonim 5, <http://www.health-res.com/resistant-staphylococcus-aureus-infection>
- Anonim 6, <http://www.saglikhastalik.com/kalp-ve-damar-hastaliklari/>
- Anonim 7, <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/igg>
- Anonim 8, http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Protein_function/Antibodyres
- Aderem, A., Underhill, D.M. (1999) "Heterogeneity In Macrophage Phagocytosis", *Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, **5**, 195-213
- Atkins, K.L. ve ark. (2008) "*S. aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation", *Molecular Immunology*, **45**, 1600–1611
- Bannerman, D.D., Paape, M.J., Lee, J.W., Zhao, X., Hope, J.C., Rainard, P (2004), "*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Elicit Differential Innate Immune Responses following Intramammary Infection", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **11**, 463-472
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Kulauzovic, E., Weidenmaier, C., Peschel, A., Götz, F. (2007), "Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*", *Journal of Bacteriology*, **189**, 280–283
- Bone, RC.(1994), " Gram-positive organisms and sepsis", *Arch Intern Med*, **154**, 26-34.
- Batı Kutlu, S. (2006), " Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci Ve E -Test İle Vankomisin Mıç Değerlerinin Araştırılması", T.C. Sağlık Bakanlığı, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği

- Binder, H.J., Powell, D.W. (1970), "Bacterial Enterotoxins and Diarrhea", *The American Journal Of Clinical Nutrition*, **23**, 1582-1587
- Brown, E.J, Steinberg, T.H. (1996), "Phagocytosis", *Biomembranes*, **4**, 33-63.
- Chomnawang, M.T., Surassmo, S., Wongsariya, K., Bunyapraphatsara, N. (2009) "Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Fitoterapia*, **80**, 102–104
- Dalva, K., Gülbaş, Z., "Akım Sitometri Uygulamaları", Türk Hematoloji Derneği
- Dinges, M.M. Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000), "Exotoxins of *Staphylococcus aureus*", *Clinical Microbiology*, **13**, 16–34
- Foster, T.J. (2001), "*Staphylococcus aureus*", *Academic Press*, **39**, 839-888
- Foster, T.J. (2005), "Immune Evasion By Staphylococci", *Nature Publishing Group*, **3**, 948-958
- Gilligan, K., Shipley, M., Stiles, B., Hadfield, T. L., Ibrahim M.S. (2000), "Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B genes by PCR-ELISA", *Molecular and Cellular Probes*, **14**, 71–78
- Greenberg, D.P. Bayer, A.S., Turner, D., Ward, J.I. (1990), "Antibody Responses to Protein A in Patients with *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Endocarditis", *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 458-462
- Guzmán-Blanco, M. ve ark. (2009), "Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America", *International Journal of Antimicrobial Agents*, **34**, 304–308
- Gülbandılar, A. (2006), "Kaynaklardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Karakterizasyonu", Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
- Harrison, R.E., Grinstein, S. (2002), "Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton", *Biochem. Cell Biol.*, **80**, 509–515
- Hermanson, G.T.(2008), "Bioconjugate Techniques", Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA
- Hiramatsu, K. (2001), "Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance", *Lancet Infect. Dis.* **1**, 147–155
- Holmner, A., Askarieh, G., Ökvist, M., Krengell, U. (2007) "Blood Group Antigen Recognition by *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin", *J. Mol. Biol.*, **371**, 754–764

- Jansson, B., Uhleèn, M., Nygren, P.A.(1998), “ All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding”, *Immunology and Medical Microbiology*, **20**, 69-78
- Kloos, W., Banner, T. (1999), “Staphylococcus and Micrococcus”. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, & R. H. Tenover (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (7th ed., pp. 264–271). Washington, DC: ASM Press.
- Lee, V.T., Schneewind, O. (2001), “Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections “, *Genes Dev.*, **15**, 1725-1752
- Lowy, D.F. (1998), “*Staphylococcus Aureus* Infections”, *The New England Journal of Medicine*, **339**, 520-532
- Munson, S.H., Tremaine, M.T., Betley, M.J., Welch, R.A. (1998), “Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from *Staphylococcus aureus*”. *Infection and Immunity*, **66**, 3337–3348
- Newsom, S.W.B. (2008), “Ogston’s coccus”, *Journal of Hospital Infection*, **70**, 369-372
- Normanno, G. ve ark. (2007), “Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products”, *International Journal of Food Microbiology*, **115**, 290–296
- Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. (2009), “Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal”, *Food Microbiology*, **26**, 278–28
- Rasooly, L., Rose, L.N., Shah, D.B., Rasooly, A. (1997), “In Vitro Assay of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A Activity in Food”, *Applied And Environmental Microbiology*, **63**, 2361–2365
- Reinosoa, E., Betteraa, S., Frigerioa, C., DiRenzob, M., Calzolaria, A., Bognia, C. (2004), “RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts”, *Microbiological Research*, **159**, 245–255
- Rietschel, E.T. ve ark.(1994), “Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function”, *Preclinical Research*, **8**, 217-225

- Sagdıç, O., Öztürk, İ., Yapar, N., Yetim, H. (2008), “Konfokal Mikroskop ve Gıda Mühendisliği Uygulamalarında Kullanımı”, Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum
- Sandel, M.K., McKillip, J.L. (2004), “Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches”, *Food Control* **15**, 5–10
- Sears, L.C. (2005), “ A dynamic partnership: Celebrating our gut flora”, *Anaerobe*, **11**, 247- 251
- Sinha, B., Francoise, P.P., NüBe, O. (1999) “Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha_5\beta_1$ ”, *Cellular Microbiology*, **1**, 101-117
- Strominger, J.L., Park, J.T., Thompson, R.E. (1960), “Composition of the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*: Its Relation to the Mechanism of Action of Penicillin”, *The Journal of Biological Chemistry*, **234**, 3263-3268
- T.C.Millî Eğitim Bakanlığı Megep (Mesleki Eğitim Ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi), Gıda Teknolojisi Koloni Sayımı, Ankara 2007
- Temiz, A.(1996), “ Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri”, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara
- Weigel, L. M. (2003), “Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*”, *Science*, **302**, 1569–1571
- Wu, A.J., Kusuma, C., Mond, J.J, Kokai-Kun, J.F. (2003), “Lysostaphin Disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms on Artificial Surfaces”, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **47**, 3407–3414
- Yarlı, İ. (2005), “ *Staphylococcus Aureus* suşlarında çeşitli virulans faktörlerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Yazar, S. (2009), “Romatoid Artrit Hastalığının Proinflamatuvar Sitokini Olan TNF α 'ya yönelik Nanoteranostik Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir

Zhang, L., Jacobson, K., Vasi, J., Lindberg, M., Frykberg, L. (1998), "A second IgG-binding protein in *Staphylococcus aureus*", *Microbiology*, **144**, 985-991