

# TEKNOFEST

## HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

### PROJE DETAY RAPORU

#### FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

GOLDPYLORI

PROJE ADI

Pozitif Yüklü Antosiyenin@Altın

Nanopartiküllerin(Anth@AuNP) *Helicobacter pylori*' nin Hızlı  
Tanısında Sistemik Kullanımı

BAŞVURU ID

44170

KATEGORİ

Fikir Kategorisi Üniversite ve Üzeri Seviyesi

## İçindekiler

|   |    |
|---|----|
| 1. Proje Özeti (Proje Tanımı).....  | 3  |
| 2. Problem/Sorun: .....   | 3  |
| 3. Çözüm .....  | 4  |
| 4. Yöntem .....   | 6  |
| 4.1. Kırmızı Lahana ( <i>Brassica oleracea</i> L. ssp. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> ) Ekstrelerinin Hazırlanması:..... | 6  |
| 4.2. Kırmızı Lahana Ekstresinde Toplam Antosiyaninin Belirlenmesi:.....   | 7  |
| 4.3. Antosiyaninin Kaplı Au NP'lerin (Anth@Au NP) Sentezi ve Karakterizasyonu:.....                                       | 7  |
| 4.4. <i>H. pylori</i> 'nin Kültüre Edilmesi:.....   | 8  |
| 4.5. Antosiyanin Temelli Au NP İçerikli Hızlı ve Hassas Üreaz Test Solüsyonunun Hazırlanması:.....                        | 9  |
| 4.6. Antosiyanin Temelli Au NP İçerikli Hızlı ve Hassas Üreaz Testinin Standardizasyonu                                   | 9  |
| 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü .....  | 9  |
| 6. Uygulanabilirlik .....   | 10 |
| 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması.....   | 10 |
| 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar): .....   | 12 |
| 9. Riskler .....  | 12 |
| 10. Kaynaklar .....   | 13 |

**TEKNOFEST**  
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

## 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Önerilen projede pozitif yüklü ve son derece stabil altın nanopartiküller üretilerek birden fazla mekanizma ile insan midesinde kolonize olan ve mide kanseri patogeneziye yol açan *Helicobacter pylori* tespitinde kullanılmıştır. Günümüzde *H. pylori* tanısında birçok farklı tanı testi kullanılmaktadır. Ancak ülkemizde *H. pylori* tanı testleri ithal edilerek temin edilmektedir. Bu testler ekonomik anlamda ciddi bir yük oluşturmakta ve getirdiği ekonomik yükten dolayı kısıtlamalar uygulanmaktadır. Bu nedenle hızlı, hassas yenilikçi tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda daha önce araştırma ekibimizin başarı ile sentezlediği antosiyanince zengin kırmızı lahana ekstresinden stabil, koloidal ve pozitif yüklü altın nanopartiküller (Anth@Au NPler) üretilerek *H. pylori*'nin varlığı tespit edilmiştir. *H. pylori* tarafından salgılanan üreaz enzimi reaksiyon ortamındaki üreyi hidroliz ederek NH<sub>3</sub> açığa çıkarmakta ve ortamın pH'ı alkali olmaktadır. Anth@Au NP'lerin alkali ortamda pozitif yük yoğunluğu azalmaktadır. Yük yoğunluğundaki bu azalma koloidal haldeki Au NP'lerin agregasyona uğramasına ve fiziksel özelliklerinin değişmesine yol açmaktadır. Bu değişimler neticesinde pozitif yüklü Anth@Au NP'lerin kolorimetrik, spektrofotometrik, zeta potansiyel ve etkin çap açısından cevapları sistematik olarak incelenerek *H. pylori*'nin hızlı ve hassas tespiti sağlanmıştır.

## 2. Problem/Sorun:

Üreaz enzim aktivitesine sahip bir bakteri olan *H. pylori* insan midesinde kolonize olan ve mide kanseri patogeneziye yol açan önemli bir mikroorganizmadır. *H. pylori* sadece ülkemizde değil tüm dünyada nüfusun yarısını enfekte eden bir patojendir. Yapılan seroprevalans araştırmalarında bu patojenin neredeyse tüm yaş gruplarını etkilediği ortaya çıkmıştır (Kamboj, Cotter ve Oxentenko, 2017). Bu mikroorganizmanın anneden bebeğe geçtiği (Zhang, Arnold ve Müller, 2020), 30 yaşın altındaki insanların %30'u ve 55 yaş üstündeki insanların %60'dan fazlasının bu mikroorganizma ile enfekte olduğu görülmektedir (Kamboj ve ark., 2017).

*H. pylori* mide mukozasına yerleşerek salgıladığı üreaz enziminin neden olduğu reaksiyon sonucu açığa çıkan amonyak (NH<sub>3</sub>) ile midenin asidik ortamını bozarak ideal üreme ortamı hazırlar. *H. pylori* mukoza ile bağlantılı olan lenfoid doku (MALT) lenfoması, mide ve duodenum ülseri, gastrik kanserin ortaya çıkmasına ve ilerlemesine sebep olmaktadır. Dolayısıyla, bu mikroorganizmanın erken ve hassas tespiti ve uygun tedavisinin yapılması ile yukarıda belirtilen hastalıkların ilerlemesinin önüne geçilebilir ve iyileşmesine dahi katkı sağlanabilir. Görüldüğü üzere çok ciddi sağlık sorunlarına sebep olan ve insanların yarısından fazlasını etkileyen bu mikroorganizmanın doğru ve hassas bir şekilde tespit edilmesi önem arz etmektedir.

Günümüzde *H. pylori* tanısı koymak amacı ile birçok invaziv (genel itibari ile endoskopik görünüm, biyopsi ve histoloji testleri) ve noninvaziv (invaziv olmayan) tanı testleri kullanılmaktadır. İnvaziv teknikler yüksek doğruluk oranı ile sonuç verse de özel ve pahalı cihazlar, uzman personel gerektirmesi bu tekniklerin en önemli ve temel dezavantajlarıdır. İnvaziv olmayan tanı testlerinde ise serolojik testler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve üre nefes testi örnek verilebilir (Wang ve ark., 2015). Fakat klinikte yaygın olarak kullanılan

testler reaksiyon ortamı pH'ının değişimini temel alan testlerdir. Genel olarak, reaksiyon ortamında reaktif olarak bulunan üre, *H. pylori*'nin salgıladığı üreaz enzimi ile hidroliz edilerek ortama NH<sub>3</sub> salınımını sağlar ve ortamın pH değeri artarak ortamda bulunan pH indikatörlerinin rengi değişerek bakterinin varlığı tespit edilmiş olur (Patel ve ark., 2014). Ancak klinikte kullanılan bu testler de bir takım dezavantajlar barındırmaktadır. Numunedeki bakteri yoğunluğu (konsantrasyonu) göz önüne alınarak sonuç değerlendirme süresi dikkate alınmadığı takdirde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkarabilmekte, tanı testlerinin üretim yöntemleri ve içeriği (indikatör ve tampon içeriği) testin performansını etkileyebilmektedir. Numunedeki bakteri konsantrasyonu testin doğruluk ve hassasiyet parametrelerini etkileyen en önemli faktördür. Ne yazık ki mevcut indikatör bazlı testlerin pozitif sonuç vermek için bakteri sayısı sınırı en az 10<sup>5</sup> mikroorganizma olmasını gerektirmektedir. pH indikatörlerinde gözle görülebilir renk değişiminin meydana gelmesi için belirtildiği gibi minimum 10<sup>5</sup> mikroorganizma varlığı gerekmekte ve üretilen amonyak ancak renk değişimi oluşturabilmektedir. Ancak Au NP'ler (altın nanopartiküller) ortamda meydana gelen hafif pH değişiminde bile agregasyon meydana getirebilmektedir. Ayrıca mide biyopsisi kullanıldığında, H<sub>2</sub>-reseptör antagonisti, proton pompa inhibitörü (PPI), antibiyotik kullanımı ve mide kanaması gibi faktörler bu testlerin doğruluğunu ciddi anlamda etkilemektedir (Talebi Bezmin Abadi, 2018).

Son zamanlarda, pH indikatörü kullanımı yerine, eşsiz yüzey plazmon rezonans özelliklerinden dolayı Au NP'lerin entegre olduğu tanı testleri hızlı ve hassas biyo-algılama ya da biyo-teşhis amacıyla kullanılmaktadır. Au NP'lerin kısa sürede üretilmesi, kararlı yapıya sahip olmaları, kolay yüzey modifikasyonu ve özgün optik özelliklerinden dolayı birçok biyoanalitik ve biyomedikal uygulamada kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2010; Saha ve ark., 2012; Schofield ve ark., 2006; Shimada ve ark., 2007; Thaxton ve ark., 2006).

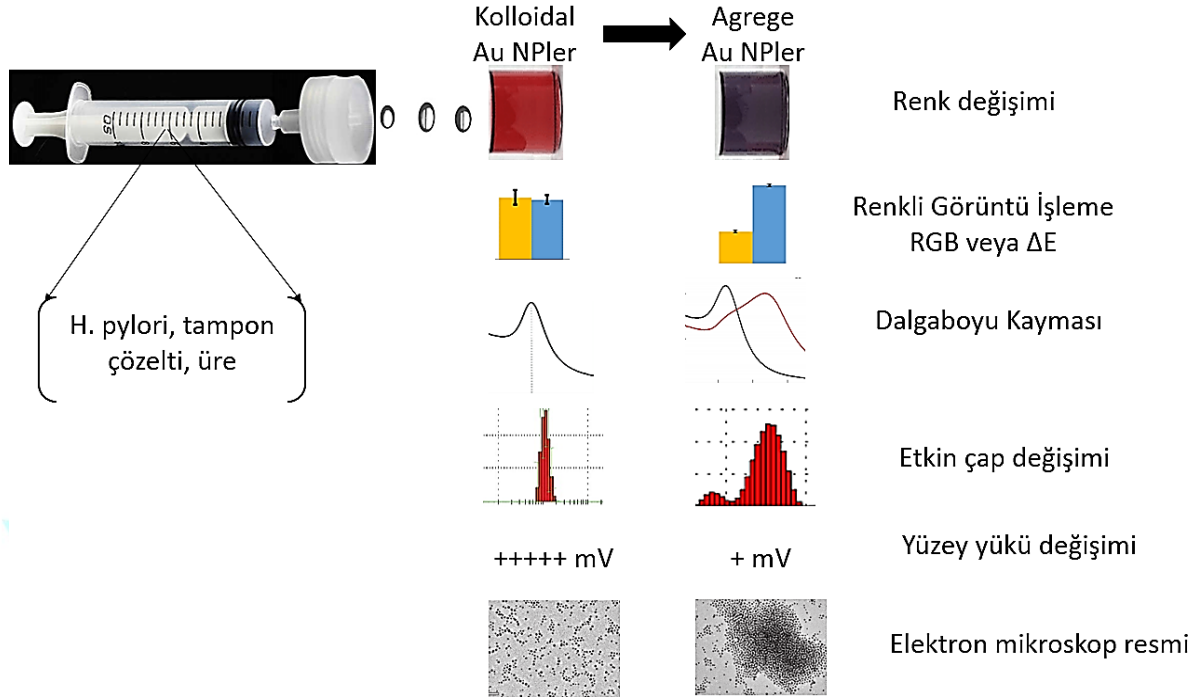
Önerilen projede ise yüksek tuz konsantrasyonunda dahi stabil ve pozitif yüklü Au NP'lerin üretilerek farklı cevap mekanizmaları ile *H. pylori* tespitinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda daha önce araştırma ekibimizin başarı ile sentezlediği antosiyanince zengin kırmızı lahana (*Brassica oleracea L. ssp. capitata f. rubra*) ekstrelerinden stabil, koloidal ve pozitif yüklü Au NP'ler (Anth@Au NP'ler) üretilerek (Unal ve ark., 2020) *H. pylori*'nin varlığı tespit edilecektir.

### 3. Çözüm

Çalışmada mevcut tanı testlerinin maliyet, içerik, zaman ve hassasiyet sorunlardan yola çıkarak *H. pylori*'nin doğal, ucuz, güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanması için antosiyanince zengin kırmızı lahana ekstrelerinden stabil, koloidal ve pozitif yüklü altın nanopartiküller (Anth@Au NP'ler) üretilerek *H. pylori*'nin varlığı tespit edilmiştir. Proje kapsamında *in vitro* ortamda pozitif yüklü Anth@Au NP'lerin *H. pylori*'nin varlığını tespiti sistematik olarak birçok metod ile gösterilmiştir.

*H. pylori* tarafından salgılanan üreaz enzimi reaksiyon ortamında bulunan üre moleküllerini hidroliz ederek NH<sub>3</sub> açığa çıkmasını sağlamıştır. Bu reaksiyon sonucunda ortamın pH değeri artarak alkali duruma gelmiştir. Sentezlenen pozitif yüklü Anth@Au NP'lerin alkali ortamda pozitif yük yoğunluğu azalmaktadır. Yük yoğunluğundaki azalmaya bağlı olarak Au NP'ler arasında agregasyon yani kümeleşmeler görülmüş ve koloidal pozisyonundaki Au NP'ler

agregasyon formuna geçerek fiziksel özellikleri değişmiştir. Bu agregasyon bakteri tespitinin en önemli göstergesi olmakla birlikte agregasyona bağlı olarak kolorimetrik, spektrofotometrik, etkin çap ve zeta potansiyel ölçümlerinde değişiklik olmakta ve birçok açıdan bakterinin tespiti sağlanmaktadır. Şekil 1’de Au NP’lerin *H. pylori* tespitinde verdiği sistematik cevaplar gösterilmiştir.

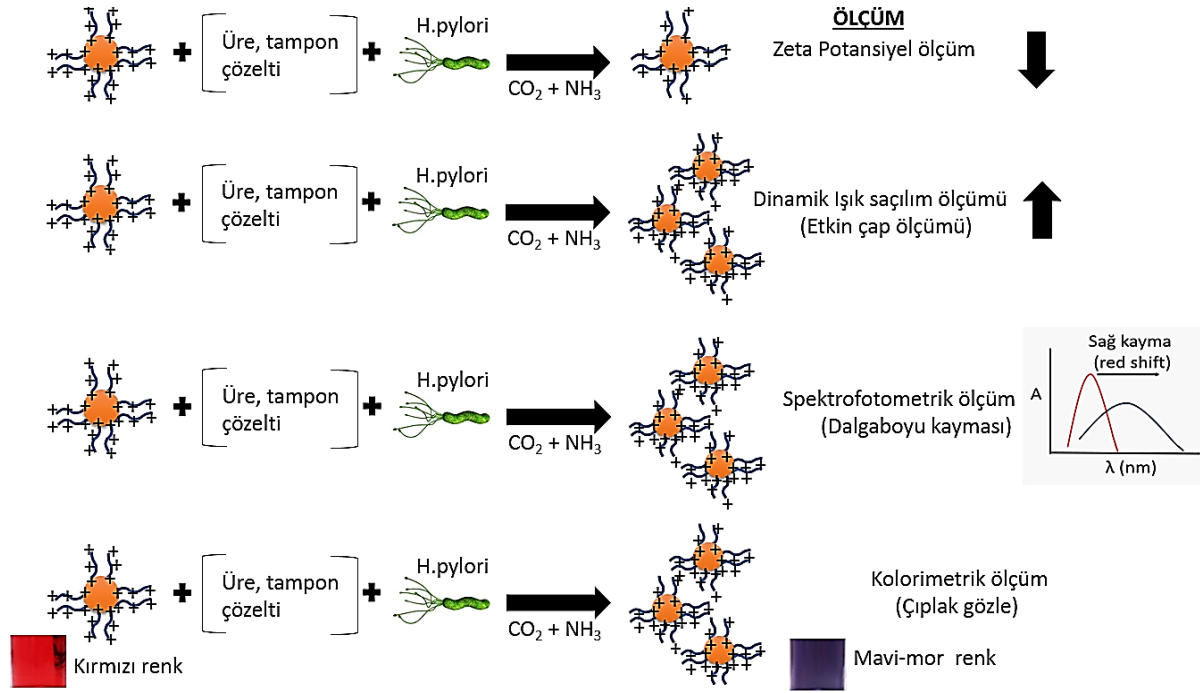


**Şekil 1.** Au NP’lerin *H. pylori* Tespitinde Verdiği Sistematik Cevaplar

Genel itibari ile küresel şekilde ve 20 nm boyutunda olan kolloidal Au NP çözeltileri karakteristik olarak kırmızı şarap rengindedir ve 525 nm’de keskin bir absorbands noktası verir. Fakat Au NP’ler çözelti içerisinde herhangi bir sebepten dolayı agregasyona uğrarsa kırmızı şarap rengi mor/maviye ve 525 nm’deki absorbands noktası ise 575 nm ve daha yüksek dalga boylarına kayar (Demirbas ve ark., 2019). Şekil 1’ de gösterildiği gibi deney ortamına eklediğimiz *H. pylori* kırmızı şarap renkli kolloidal Au NP’lerin agregé hale geçerek mor/mavi renkli bir hale gelmesine neden olmuştur. Au NP’ler, lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) sayesinde bu renk değişimi ile *H. pylori* tanısında kolorimetrik bir sensör olarak kullanılabilir.

Au NP bulunan çözeltilerin renk değişimi çıplak gözle izlenirken, çözelti rengi, tonu veya renk yoğunluğundaki farklılaşmalar Renkli Görüntü İşleme (Color Image Processing) yöntemi ile Kırmızı Yeşil Mavi/ Red Green Blue (RGB) analizi ve CIE76 algoritmasına göre Delta-E ( $\Delta E$ ) parametresi hesaplanacak ve kantitatif analiz yapılacaktır.

Ayrıca, Au NP’lerin fiziksel özelliklerindeki değişimler zeta potansiyel, etkin çap ve spektrofotometrik cevapları açısından da incelenmiştir. Şekil 2’de pozitif yüklü Anth@Au NP’lerin *H. pylori*’nin varlığının tespitinde verdiği potansiyel mekanistik cevaplar gösterilmiştir.



**Şekil 2.** Pozitif Yüklü Anth@Au NP'lerin *H. pylori*'nin Varlığının Tespitinde Verdiği Zeta Potansiyel, Etkin Çap, Spektrofotometrik ve Kolorimetrik Cevaplar

*H. pylori* ile karşılaşan Au NP'lerin pozitif yük oranlarındaki azalmaya bağlı olarak zeta potansiyellerinde düşüş yaşanmış ve dinamik ışık saçılım ölçümlerinde artış gözlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen sonuçlarda bakıldığında dalga boyunda artış meydana geldiği, red shift gerçekleştiği açıkça gözlenmiştir. Alınan tüm cevaplar Anth@Au NP'lerle *H. pylori* varlığı tespitinin yapılabileceğini doğrular niteliktedir.

## 4. Yöntem

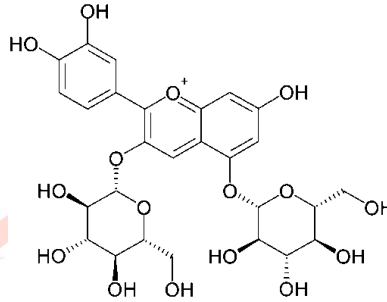
### 4.1. Kırmızı Lahana (*Brassica oleracea* L. ssp. *capitata* f. *rubra*) Ekstrelerinin Hazırlanması:

Ekstre hazırlamada gerek daha önce nano malzemeler üretimi için gerekse pH indikatörü olarak uygulanan ve uyguladığımız protokol takip edilmiştir (Celik ve ark., 2020). Genel itibarı ile, lokal marketten alınan kırmızı lahana temizlenerek küçük parçalara ayrılır ve belli ağırlıktaki parçalanmış kırmızı lahana üzerine belli ağırlıkta deiyonize su eklenerek 5 dakika boyunca kaynatılır. Daha sonra soğumaya bırakılan karışım filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstre antosiyanin tayini ve Au NP sentezi için  $+4$  °C'de saklanır.

**Not:** Kullanılan kırmızı lahana ve su miktarı elde edilmesi istenen kütleli yüzde olarak (%a/a) ekstrenin ya da antosiyaninin oranına göre değişir. Örneğin 100 gr kırmızı lahana parçaları üzerine 100 gr deiyonize su eklenerek elde edilen 100 mL süzüntü kütleli yüzde olarak (%100 a/a)'lük olarak kullanılabilir ve bu ekstre çözeltisi stok çözelti olarak kullanılabilir. Bazı çalışmalarımızda 10 gr kırmızı lahana parçaları üzerine 90 gr deiyonize su eklenerek % 10 a/a ekstre hazırlanmıştır.

#### 4. 2. Kırmızı Lahana Ekstresinde Toplam Antosiyaninin Belirlenmesi:

Giusti ve Wrolstad'a göre kırmızı lahana ekstresindeki toplam antosiyanin miktarı belirlenecektir (Arapitsas ve ark., 2008). Kırmızı lahana ekstresindeki başlıca antosiyaninler siyanidin 3-O-diglukosid-5-O-glukozitin grupları olarak bilinmektedir ve bu gruplar başta altın iyonu olmak üzere birçok metal iyonları ile antosiyanin-metal kompleksleri oluşturur (Bayer ve ark., 1960; McDougall ve ark., 2007; Estévez ve ark., 2011). Siyanidin 3-O-diglukosid-5-O-glukozitin gruplarının yapısı aşağıda Şekil 3' de verilmiştir.



Şekil 3. Siyanidin 3-O-diglukosid-5-O-glukozitin Moleküler Yapısı

#### 4. 3. Antosiyaninin Kaplı Au NP'lerin (Anth@Au NP) Sentezi ve Karakterizasyonu:

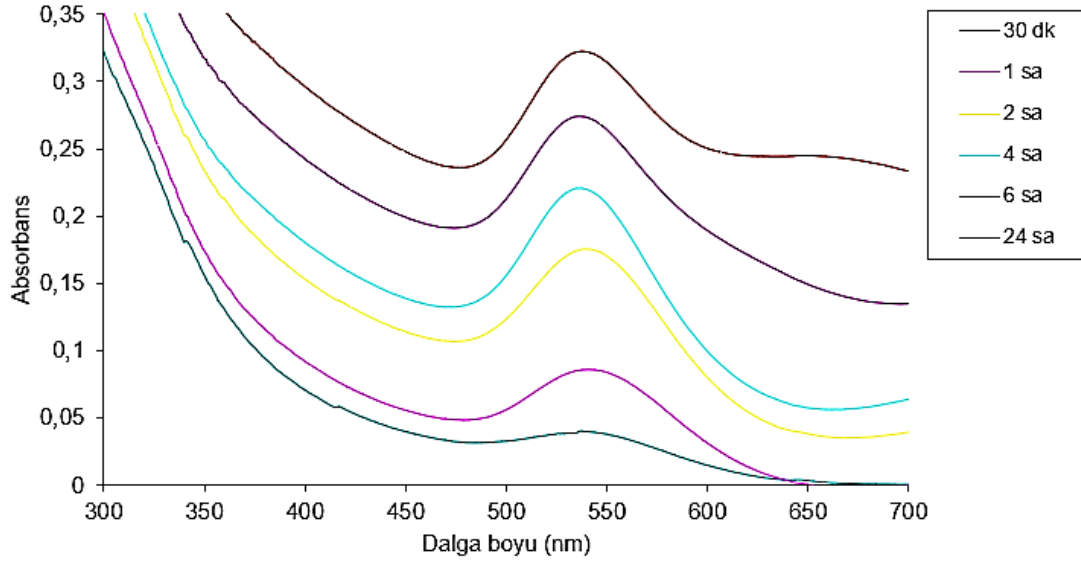
Antosiyaninlerin indirgenme ve stabilize ajanı olarak kullanıldığı, Au NP'ler sentezi için araştırma grubumuzun daha önce yayınladığı makalelerdeki prosedür takip edilecektir (Unal ve ark., 2020).

Kısaca Au NP sentez prosedüründe 1 mM Au<sup>+3</sup> ((HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O) çözeltisi ile %5 (a/a) antosiyanin içeren kırmızı lahana ekstre çözeltisi bir manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 6 sa boyunca karanlık ortamda 250 rpm'de karıştırılır. Sentez tamamlandıktan sonra karışım 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek hem rekasyonun sonlanması/durdurulması sağlanmış olur hem de ortamda fazla miktarda bulunan reaktifler (kırmızı lahana ekstresi ve Au<sup>+3</sup> iyonları) uzaklaştırılır. Elde edilen Au NP' ler karakterizasyon ve bakteri uygulaması için +4 °C'de sulu çözelti içerisinde saklanır.

Au NP'lerin karakterizasyonu için:

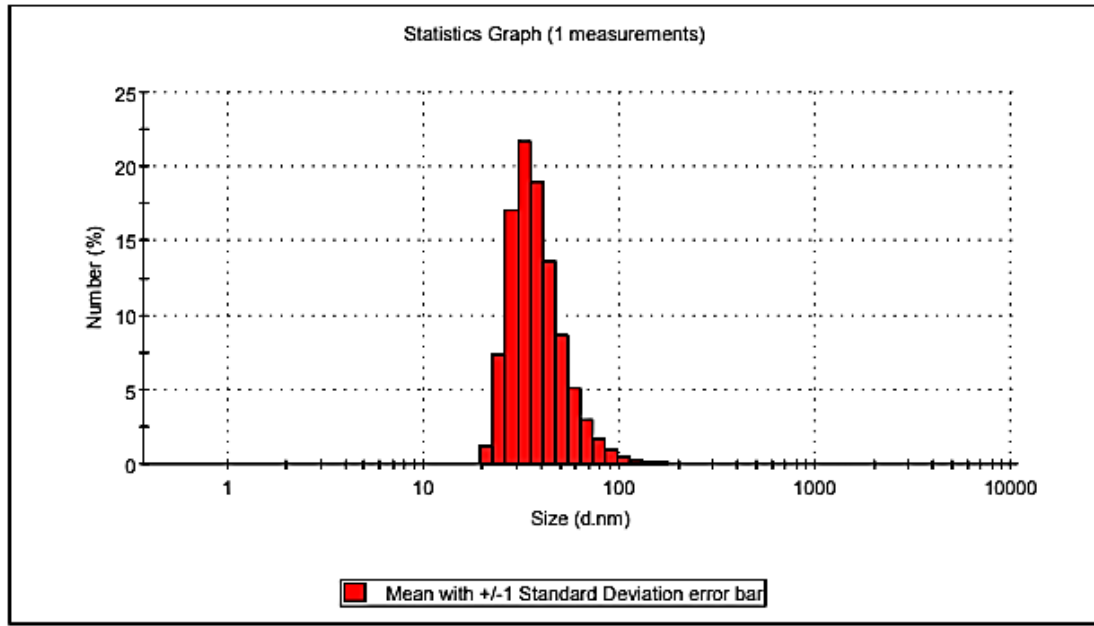
- Au NP'lerin morfolojisi (şekil ve boyutu) STEM ile belirlenmiştir.
- Au NP'lerin Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) özelliğinden dolayı karakteristik absorpsiyon piki UV-Vis spektrofotometre ile analiz edilmiştir.
- Au NP'lerin antosiyanin ligand içeren etkin çapı Dinamik ışık saçılma (DLS) tekniği ile belirlenmiştir.
- Au NP'lerin pozitif yüzey yükü ve yük şiddeti zeta potansiyel (ZT) tekniği ile belirlenmiştir.

Şekil 4'de antosiyanin-Au<sup>+3</sup> kompleksinin zamana bağlı oluşumu incelenmiş ve UV-Vis spektrofotometrede sırayla 30 dk, 1 sa, 2 sa, 4 sa, 6 sa ve 24 sa olmak üzere elde edilen pikleri gösterilmiştir.



Şekil 4. Antosiyenin-Au<sup>+3</sup> kompleksinin zamana bağlı sentezinde verdiği absorbans değerleri

Elde edilen sonuca göre 6 saatlik inkübasyon süresinin AuNP oluşumu için yeterli olduğu görülmüş ve örnek olarak boyutunun 40 nm civarında olduğu DLS sonucu da Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Antosiyenin-Au<sup>+3</sup> kompleksinin boyut dağılımı

#### 4. 4. H. pylori' nin Kültüre Edilmesi:

Proje kapsamında üreaz pozitif *H. pylori* ATCC 49503 ve üreaz negatif *H. pylori* ATCC 51111 suşları ticari olarak sağlanacaktır. Ticari suşlar %5 koyun kanı içeren triptik soy ağara içinde kültür edilecek ve anaerobik ortam oluşturmak için belirlenen anaerob sistemler ve anaerob jar'dan faydalanılacaktır. Kültür işlemi 37°C'de ve 3 ila 7 gün inkübasyon süresinde tamamlanacaktır.



#### 4. 5. Antosiyanin Temelli Au NP İçerikli Hızlı ve Hassas Üreaz Test Solüsyonunun Hazırlanması:

Antosiyanin kaplı pozitif yüklü Au NP'lerin ve ticari olarak sağlanacak olan sitrat kaplı negatif Au NP'lerin *H. pylori* tespitinde kullanılması için gerekli deney ortamı sağlanacaktır. Anth@Au NP'ler ile sitrat kaplı negatif Au NP'lerin *H. pylori* tespitinde karşılaştırılması sağlanacaktır. İlk basamak olarak hazırlanan fosfat tampon çözeltileri otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilecektir. Ayrıca taze olarak hazırlanan üre, EDTA ve sodyum azit çözeltileri 0,45 µm gözenek açıklığına sahip steril filtreden süzülerek çözeltilerin sterilizasyonu sağlanacaktır.

#### 4. 6. Antosiyanin Temelli Au NP İçerikli Hızlı ve Hassas Üreaz Testinin Standardizasyonu

Bakteri konsantrasyonu, tampon ve üre miktarı açısından test ortamı standardize edilecektir. Şırıngada belirli süre inkübasyondan sonra 0,45 µm gözenek açıklığına sahip steril filtreden süzülecek ve süzüntü Anth@Au NP'ler bulunan ortama eklenerek verilen yanıtlar değerlendirilecektir.

### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Önerilen proje fikri ilk olarak ülkemizde üretimi yapılacak bir tanı testi olduğu için testin içeriğindeki bitkiler ülkemizde yetişen bitkiler olması sebebiyle ulusal anlamda dışa bağımlılığı azaltacak bir yeniliktir. Proje fikrimiz ile günümüzde *H. pylori* tanısı için klinikte yaygın olarak kullanılan testlerde; numunedeki bakteri yoğunluğu, tanı testlerinin üretim yöntemleri ve içeriği nedeniyle ortaya çıkan yanlış negatif sonuçların önüne geçilmektedir. Bununla birlikte *H. pylori* tanısında kullanılan invaziv tekniklerin aksine özel ve pahalı cihazlar, uzman personel gerektirmemektedir.

Pozitif yüklü Anth@Au NP'lerin yüksek tuz konsantrasyonuna karşı oldukça kararlı ve kolloidal yapıda olduğu araştırma ekibimiz tarafından rapor edilmiştir. Bu bağlamda Turek metodu ile üretilen ve ticari olarak bulunan sitrat kaplı negatif yüklü Au NP'ler ancak 20 mM tuz konsantrasyonunda kolloidal formda kalırken, Anth@Au NP'lerin 400 mM tuz içeren çözeltilerde dahi kararlı olduğu ve kolloidal formunu koruduğu gösterilmiştir. Bu sayede *H. pylori* tespitinde kullanılan tamponun tuz konsantrasyonu Anth@Au NP'lerin kullanımı ile bir risk oluşturmayacaktır. Ayrıca pozitif yüklü Anth@Au NP'lerin *H. pylori* varlığının tespiti sistematik olarak dört farklı cevap ile (zeta potansiyel, etkin çap, spektrofotometrik ve kolorimetrik analiz) incelenebilecektir.

Au NP'lerin üretiminin tamamen doğal, Türkiye'de yaygın olarak yetişen, kolay ulaşılabilir ve düşük maliyetli kırmızı lahanadan kaynaklı olmasıyla oldukça ekonomik ve pratik bir tanı testi hazırlanmıştır. Daha doğal bir içeriğe sahip olması çıkarılan atıklar sonucu oluşan çevresel kirliliği de en aza indirilecektir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda önerilen proje kapsamında bitkisel bir kaynaktan sentezlenen pozitif yüklü Au NP'ler ilk kez *H. pylori* tespitinde tanı testi olarak kullanılacaktır. Bu anlamda projenin ara çıktıları göz önüne alınarak patent hakkı elde etme olasılığı vardır. Bitkilerden elde edilen ekstraktların kullanılması, ekonomik olması, moleküler



|   |   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 4 | H. pylori suşlarının kültür edilmesi, test ortamının hazırlanması, Au NP'ler ile tespitinin yapılması |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 5 | Au NP sensör sisteminin optimize edilmesi   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

**Tablo 1. İş-zaman Planı**

Proje fikrinin geldiği aşamada Anth@Au NP'ler üretilmiş olup bakteri varlığında test ortamının standardizasyonu üzerine çalışılmaktadır. Projede kullanılacak malzemelerin listesi ve miktarları Tablo 2'de sunulmuştur. Alınan proformalarla yaklaşık 40.000 TL'lik bütçenin yeterli olduğu öngörülmüştür. Bu malzemelerin kısmen araştırma laboratuvarında bulunması durumunda bütçe daha da aşağıya çekilmektedir. Harcamaların büyük kısmı proje başlangıcında gerekli olduğu görülüp temin edilmiştir.

| Malzeme   | Miktar    | Tutar   | Malzeme                               | Miktar          | Tutar      |
|---|-----------|---------|---------------------------------------|-----------------|------------|
| Mueller-Hinton Agar   | 500 gr    | 1048 TL | Cam tüp (16x100 mm)                   | 310 adet        | 620 TL     |
| Mueller-Hinton Broth  | 500 gr    | 1048 TL | Cam huni (150 mm)                     | 10 adet         | 2104 TL    |
| Tryptic Soy Broth<br>Casein-Peptone<br>Soymeat-Peptone Broth  | 500 gr    | 355 TL  | Petri Kabı                            | 500 adet/paket  | 1360 TL    |
| Tryptic Soy Agar<br>Casein-Peptone<br>Soymeat-Peptone Agar    | 500 gr    | 458 TL  | Eküvyon                               | 1000 adet/paket | 474 TL     |
| Agar-Agar Granulated,<br>Purified and Free From<br>Inhibitors | 1 kg      | 405 TL  | Steril öze                            | 20 adet/paket   | 477 TL     |
| Pipet ucu (0,5-10 µl)   | 1000 adet | 325 TL  | Steril hücre kültür plağı<br>(48'lik) | 10 adet/paket   | 790 TL     |
| Pipet ucu (100-1000 µl)                                       | 500 adet  | 145 TL  | Steril hücre kültür plağı<br>(96'lik) | 10 adet/paket   | 872 TL     |
| Pipet ucu (0-5000µl)  | 250 adet  | 620 TL  | Spektrofotometre Küveti               | 100 adet        | 495 TL     |
| Beher (50 ml)   | 10 adet   | 70 TL   | Manyetik balık                        | 10 adet         | 579 TL     |
| Beher (100ml)   | 10 adet   | 80 TL   | Çelik mikro spatül (150 Mm)           | 10 adet         | 454 TL     |
| Erlen (100 ml)  | 10 adet   | 150 TL  | Kurutma standı                        | 1 adet          | 158 TL     |
| Erlen (250 ml)  | 10 adet   | 250 TL  | Citrate-Au NPs                        |                 | 10619,4 TL |
| Erlen (500 ml)  | 5 adet    | 150 TL  |                                       |                 |            |

**Tablo 2. Malzeme listesi**

## 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):

Projede insan midesinde kolonize olan ve mide kanseri patogenezi yol açan *H. pylori* tanısında kullanılmak üzere geliştirilen Anth@Au NP'ler tanı testi haline getirilip proje fikrinin ürüne dönüştürülmesi halinde hastanelerde rahatlıkla kullanılacak hassas ve hızlı sonuç veren bir tanı testi olacaktır.

*H. pylori* sadece ülkemizde değil tüm dünyada nüfusun yarısını enfekte etmekte, yapılan seroprevalans araştırmalarında neredeyse tüm yaş gruplarını etkilediği gözlenmektedir. Yapılan araştırmalarda 30 yaşın altındaki insanların %30'u ve 55 yaş üstündeki insanların %60'dan fazlasının bu mikroorganizma ile enfekte olduğu görülmektedir (Kamboj ve ark., 2017). Bu bağlamda proje fikrinin ürüne dönüştürülmesi halinde ülkemizde ve dünyada geniş bir hedef kitleye hitap edebilecektir. Kısaca hedef kitlemiz *H. pylori* ile bağlantılı mide kanseri, lenfoid doku (MALT) lenfoması, mide ve duodenum ülseri gibi rahatsızlıkları yaşayan bireyler ve hastalara tanı koyma aşamasında hizmet verecek olan doktorlar ve sağlık çalışanlarıdır.

## 9. Riskler

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (B Planı) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla Tablo 3'teki Risk Yönetimi Tablosu'nda ifade edilmiştir.

|   | En Önemli Riskler   | Risk Yönetimi (B Planı)   |
|---|---|---|
| 1 | Kaynatma yöntemiyle hazırlanan kırmızı lahana ekstresinden elde edilen total antosiyanin miktarı hedeflenen verime ulaşmayabilir. | Sıklıkla tercih edilen diğer yöntem olan Mikrodalga yöntemi kullanılarak kısa sürece ekstre elde etme yöntemi uygulanabilir.  |
| 2 | <i>H. pylori</i> suşlarının kültür edilmesi diğer bakterilere göre tekrarlılık açısından nispeten zordur.                         | Araştırma ekibimiz daha önce mikroaerofilik ortamda <i>H. pylori</i> üretimini gerçekleştirmiş olsa da, <i>H. pylori</i> kültür edilmesinde muhtemel problem oluşması durumunda iki kriter uygulanacaktır:<br>1-Tüm olası deneysel hatalar (kontaminasyon, vs., veya kullanılan malzemelerin uygunluğu vs., personel hataları) gözden geçirilerek deney tekrarlanacak.<br>2-Daha fazla yeni <i>H. pylori</i> suşları temin edilecektir. |

**Tablo 3.** Risk Yönetim Tablosu

“Kaynatma yöntemiyle hazırlanan kırmızı lahana ekstresinden elde edilen total antosiyanin miktarı hedeflenen verime ulaşmayabilir.” riskinin olasılığı düşüktür fakat projeye etkisi orta derecededir. Bu nedenle Tablo 4'teki Olasılık ve Etki Matrisi' ne göre düşük risk olarak değerlendirilebilir. Bu durumda risk  $1 \times 5 = 5$  düşük risk olarak tanımlanabilir.

“*H. pylori* suşlarının kültür edilmesi diğer bakterilere göre tekrarlılık açısından nispeten zordur.” riskinin olasılığı düşüktür fakat projeye etkisi orta derecededir. Tablo 4’teki Olasılık ve Etki Matrisi’ ne göre düşük risk olarak değerlendirilebilir. Bu durumda risk  $1 \times 5 = 5$  düşük risk olarak tanımlanabilir. Bahsedilen risklerle karşılaşıldığı durumlarda B planını uygulamaya geçilecektir. Risk yönetim tablomuzdan da anlaşıldığı gibi tolere edilemez bir riskimiz bulunmamaktadır.

|                         |   |          |                |             |                 |      |
|-------------------------|---|----------|----------------|-------------|-----------------|------|
|                         |   | Olasılık |                |             |                 |      |
| Yüksek<br>Orta<br>Düşük | ↑ | Yüksek   | Orta Risk      | Yüksek Risk | Çok Yüksek Risk |      |
|                         |   | Orta     | Düşük Risk     | Orta Risk   | Yüksek Risk     |      |
|                         |   | Düşük    | Çok Düşük Risk | Düşük Risk  | Orta Risk       |      |
|                         |   |          | Düşük          | Orta        | Yüksek          | Etki |
|                         |   |          | →              |             |                 |      |

**Tablo 4.** Olasılık ve Etki Matrisi

## 10. Kaynaklar

- Arapitsas, P., Sjöberg, P. R., & Turner, C. (2008, July 1). Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 109(1), 219-226.
- Bayer, E., Nether, K., & Egeter, H. (1960, December). Natürliche und synthetische Anthocyan Komplexe, III. Synthese der blauen, im Kornblumenfarbstoff enthaltenen Chelate. *Chemische Berichte*, 93(12), 2871-2879.
- Celik, C., Ildiz, N., Kaya, M. Z., Baldemir Kilic, A., & Ocsoy, I. (2020, September 1). Preparation of natural indicator incorporated media and its logical use as a colorimetric biosensor for rapid and sensitive detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Analytica Chimica Acta*, 1128, 80-89.
- Demirbas, A., Büyükbezirci, K., Celik, C., Kislakci, E., Karaagac, Z., Gokturk, E., et al. (2019, October 28). Synthesis of Long-Term Stable Gold Nanoparticles Benefiting from Red Raspberry (*Rubus idaeus*), Strawberry (*Fragaria ananassa*), and Blackberry (*Rubus fruticosus*) Extracts–Gold Ion Complexation and Investigation of Reaction Conditions. *ACS Omega*, 4(20), 18637–18644.
- Estévez, L., Otero, N., & Mosquera, R. A. (2011). Molecular structure of cyanidin metal complexes: Al(III) versus Mg(II). *Theoretical Chemistry Accounts*, 128(4), 485–495.

- Kamboj, A. K., Cotter, T. G., & Oxentenko, A. S. (2017, April). *Helicobacter pylori*: The Past, Present, and Future in Management. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(4), 599-604.
- Kinoshita, T., Ishiki, K., Nguyen, D. Q., Shiigi, H., & Nagaoka, T. (2018, February 28). Real-Time Evaluation of Bacterial Viability Using Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 90(6), 4098–4103.
- Li, B., Li, X., Dong, Y., Wang, B., Li, D., Shi, Y., et al. (2017, September 21). Colorimetric Sensor Array Based on Gold Nanoparticles with Diverse Surface Charges for Microorganisms Identification. *Analytical Chemistry*, 89(20), 10639–10643.
- Liu, D., Qu, W., Chen, W., Zhang, W., Wang, Z., & Jiang, X. (2010, November 11). Highly Sensitive, Colorimetric Detection of Mercury(II) in Aqueous Media by Quaternary Ammonium Group-Capped Gold Nanoparticles at Room Temperature. *Analytical chemistry*, 82(23), 9606–9610.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007, May). Anthocyanins from red cabbage--stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285-94.
- Patel, S. K., Pratap, C. B., Jain, A. K., Gulati, A. K., & Nath, G. (2014, September 28). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 12847–12859.
- Saha, K., Agasti, S. S., Kim, C., Li, X., & Rotello, V. M. (2012, February 2). Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical reviews*, 112(5), 2739–2779.
- Schofield, C. L., Haines, A. H., Field, R. A., & Russell, D. A. (2006, June 15). Silver and Gold Glyconanoparticles for Colorimetric Bioassays. *Langmuir*, 22(15), 6707–6711.
- Shimada, T., Ookubo, K., Komuro, N., Shimizu, T., & Uehara, N. (2007, September 29). Blue-to-Red Chromatic Sensor Composed of Gold Nanoparticles Conjugated with Thermoresponsive Copolymer for Thiol Sensing. *Langmuir*, 23(22), 11225–11232.
- Talebi Bezmin Abadi, A. (2018, May 22). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches. *Journal of pathogens*.
- Thaxton, C. S., Georganopoulou, D. G., & Mirkin, C. A. (2006, January ). Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 120-126.
- Unal, I. S., Demirbas, A., Onal, I., Ildiz, N., & Ocsoy, I. (2020, March). One step preparation of stable gold nanoparticle using red cabbage extracts under UV light and its catalytic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 204, 111800.

Wang, Y. K., Kuo, F. C., Liu, C. J., Wu, M. C., Shih, H. Y., Wang, S. S., et al. (2015, October 28). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology*, 21(40), 11221-11235.

Zhang, X., Arnold, I. C., & Müller, A. (2020). Mechanisms of persistence, innate immune activation and immunomodulation by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 1-10.

