



**DNA HASAR TESPİTİNE İLİŞKİN ELISA TEST SİSTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Hazırlayan: Muhammet Ali EREN

1. Danışman: Doç. Dr. Canan GÜLMEZ SAMSA

2. Danışman: Doç. Dr. Cevahir ALTINKAYNAK

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Yüksek Lisans Tezi

İĞDIR/2025

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
İĞDIR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DNA HASAR TESPİTİNE İLİŞKİN ELISA TEST SİSTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ

Muhammet Ali EREN

BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

İĞDIR/2025

TAAHHÜTNAME

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

Muhammet Ali EREN



Bu çalışma Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TMY0523Y08

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

DNA HASAR TESPİTİNE İLİŞKİN ELISA TEST SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

EREN, Muhammet Ali

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik ve Bilimleri Ana Bilim Dalı

1. Tez Danışmanı: Doç. Dr. Canan GÜLMEZ SAMSA

2. Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cevahir ALTINKAYNAK

Ocak 2025,63 Sayfa

8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG), DNA’da meydana gelen oksidatif hasarın direkt göstergesi olarak kabul edilmektedir ve kanser ve yaşlanma başta olmak üzere çeşitli hastalık süreçlerinde düzeyleri artmaktadır. Geleneksel tespit teknikleri iyi bir seçiciliğe ve uygun tespit limitlerine ulaşmış olsa da bunlar zaman alıcıdır ve genellikle karmaşık ve zahmetli teknolojilerin, son derece kalifiye personelin ve biyolojik örneklerin aşırı işlenmesinin kullanımını gerektirir. Bu nedenle, 8-OHdG tespiti için hızlı, hassas, kullanımı kolay ve düşük maliyetli yöntemlerin geliştirilmesi bir zorluk olmaya devam etmektedir.

Bu çalışmada biyotin antikoru içeren ve 8-OHdG poliklonal antikoru ve horseradish peroksidaz enzimi içeren nano çiçek yapılar sentezlenerek mikro yapısı ve kimyasal özellikleri SEM, EDX, FTIR ve XRD analizleri ile karakterize edilmiş, ardındandirekt ve sandviç enzim bağlantılı immunosorbent testi (ELISA) yöntemlerinde test edilmiştir. Yüksek enkapsülasyon verimi ile sentezlenen işlevselleştirilmiş hibrit konjugat sisteminin yüksek antijen bağlama kapasitesiyle çalıştığını ve tespit limitinin ticari ELISA sistemlerine yakın olduğu ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, sentezlenen konjugat, hastalıkların tanısına yönelik doğru, hızlı ve hassas bir test sisteminin tek bir ELISA analiziyle belirlenmesi açısından önemli bir potansiyele sahiptir.

Anahtar Sözcükler: 8-OHdG, ELISA, Kanser, DNA hasar tespiti, Nano çiçek.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELISA TEST SYSTEM FOR DNA DAMAGE DETECTION

EREN, Muhammad Ali

Master's Thesis

Department of Bioengineering and Sciences

1. Thesis Advisor: Assoc. Prof. Canan GÜLMEZ SAMSA
2. Thesis Advisor: Assoc. Prof. Cevahir ALTINKAYNAK

January 2025, 63 Page

Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) is recognized as a direct indicator of oxidative damage in DNA, with elevated levels observed in various disease processes, particularly cancer and aging. Although traditional detection techniques have achieved good selectivity and appropriate detection limits, they are time-consuming and typically require complex and labor-intensive technologies, highly qualified personnel, and extensive processing of biological samples. Therefore, developing rapid, sensitive, user-friendly, and cost-effective methods for 8-OHdG detection remains a significant challenge.

In this study, nano-flower structures containing biotin antibodies, 8-OHdG polyclonal antibodies, and horseradish peroxidase enzyme were synthesized and characterized in terms of their microstructure and chemical properties using SEM, EDX, FTIR, and XRD analyses. These structures were then tested in direct and sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. The functionalized hybrid conjugate system, synthesized with high encapsulation efficiency, demonstrated a high antigen-binding capacity and detection limits comparable to commercial ELISA systems.

In conclusion, the synthesized conjugate shows significant potential as an accurate, rapid, and sensitive test system for disease diagnosis, enabling precise detection through a single ELISA analysis.

Keywords: 8-OHdG, ELISA, Cancer, DNA damage detection, Nanoflower

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi kapsamında hazırlanan bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için bana yol gösteren, eğitim süresi zarfında iyi niyet, sabır ve anlayış noktasında yardımlarını esirgemeyen, her yönleriyle bana örnek olan çok değerli ve çok kıymetli tez danışmanlarım, fikir hocalarım Doç. Dr. Canan GÜLMEZ SAMSA'ya ve Doç. Dr. Cevahir ALTINKAYNAK'a şükranlarımı sunarım. Eğitim-Öğretim hayatım boyunca her türlü fedakarlıkta bulunan, hayatımın her anında yanımda olduklarını daima hissettiren aileme sonsuz teşekkür ve şükranlarımı borç bilirim.

Muhammet Ali EREN
İĞDIR/2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi	2
2.2. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarının Oluşum Mekanizması	3
2.2.1.DNA Hasarı ve Nedenleri.....	3
2.2.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin.....	4
2.3.İmmüendiagnostik.....	6
2.3.1.Antijen-Antikor Birleşimi.....	7
2.3.2. Enzim Bağlantılı İmmüenosorbent Testi (ELISA).....	9
2.3.2.1. Direkt ELISA Yöntemi	12
2.3.2.2. İndirekt ELISA Yöntemi.....	13
2.3.2.3. Kompetitif ELISA Yöntemi.....	13
2.3.2.4. Nonkompetitif ELISA (Sandviç) Yöntemi	14
2.3.2.5. ELISA'nın Avantaj ve Dezavantajları	16
2.4.Nanomalzemeler.....	17
2.4.1.Boyutlarına Göre Nanomalzemeler	18
2.4.2.Nano çiçekler (Nanoflower)	19
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1 Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	23

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	23
3.2. Metot	23
3.2.1. Biotin antikoru içeren nano çiçek (Biotin Ab-NFs) sentezi	23
3.2.2. 8-OHdG poliklonal antikoru ve horseradish peroksidaz içeren nano çiçek (8-OHdG pab/HRP-NFs) sentezi-1.....	24
3.2.2 8-OHdG poliklonal antikoru ve horseradish peroksidaz içeren nano çiçek (8-OHdG pab/HRP-NFs) sentezi-2	25
3.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini	25
3.2.4. Nano çiçeklerin karakterizasyonu.....	26
3.2.5. Enzimle İşaretli İmmünosorbent Analiz Deneyleri	26
4. BULGULAR	31
4.1. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini.....	31
4.2. SEM Görüntüleri	31
4.3. EDX Analizi	35
4.4. Elemental Haritalama	37
4.5. XRD Analizi.....	39
4.6. FTIR Analizi.....	40
4.7. ELISA Deney Sonuçları	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
dk	Dakika
EDX	Enerji Dağılımlı X-Ray Floresans Spektrometre
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	Gram
M	Molar
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Mm	Milimol
ng	Nanogram
pH	Bir sıvının asit veya bazlık derecesi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
XRD	X-Işını difraksiyon spektroskopisi
λ	Dalga boyu
µL	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Oksidatif stresin oluşumu	4
Şekil 2. 8-OHdG'nin yapısı (Kasai, 2002)	5
Şekil 3. Antijen antikor birleşmesi.....	8
Şekil 4. ELISA yönteminin çalışma prensibi.....	10
Şekil 5. ELISA testi ile tanısı konulan bazı hastalıklar	11
Şekil 6. Direkt ELISA.....	12
Şekil 7. İndirekt ELISA	13
Şekil 8. Kompetitif ELISA	14
Şekil 9. Sandviç ELISA	15
Şekil 10. ELISA' nın teknolojik ve endüstriyel kullanım alanları.....	21
Şekil 11. Nano çiçek oluşumu	24
Şekil 12. ELISA plakası üzerinde nano çiçek sentezi	25
Şekil 13. Ticari kit protokolü (Streptavidin-biyotin işaretli sandviç ELISA).....	27
Şekil 14. Direkt sandviç ELISA.....	28
Şekil 15. Sandviç ELISA	29
Şekil 16. BSA standart grafiği	31
Şekil 17. Biyotin Ab-NFs (1 µL) SEM görüntüsü.....	32
Şekil 18. Biyotin Ab-NFs (2 µL) SEM görüntüsü.....	33
Şekil 19. Optimum sentez olarak kabul edilen biyotin Ab-NFs'nin (4 µL) SEM görüntüsü.....	33
Şekil 20. 8-OHdG pab/HRP-NFs sentez denemesi SEM görüntüsü	34
Şekil.21. 8-OHdG pab/HRP-NFs SEM Görüntüsü	34
Şekil 22. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin görüntüsü	35
Şekil 23. Optimum koşullarda sentezlenmiş biyotin Ab -NFs EDX analizi.....	36
Şekil 24. 8-OHdG pab/HRP-NFs EDX analizi.....	37
Şekil 25. Biyotin Ab -NFs'nin elementel haritalaması (A) Mix, (B) C, (C) O, (D) P ve (E) Cu.....	38
Şekil.26. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin elementel haritalaması. (A) Mix, (B) C, (C) N, (D) O, (E) P ve (F) Cu	38
Şekil 27. Biyotin Ab-NFs'nin XRD analiz grafiği	39

Şekil 28. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin XRD analiz grafiği	39
Şekil 29. Biotin Ab-NFs ve serbest biyotinin FTIR analiz grafiği	40
Şekil 30. 8-OHdG pab/HRP-NFs ve serbest 8-OHdG'nin FTIR analiz grafiği	41
Şekil 31. Ticari kit protokolüne göre elde edilen standart grafik.	42
Şekil 32. İşaretsiz 8-OHdG antikoru ile tekrarlanan kit protokolünden elde edilen standart grafik.....	42
Şekil 33. Sentezlenen konjugat yapıdaki nano çiçekler.....	43
Şekil 34. Biotin Ab-NFs'lerin kullanıldığı standart grafik	43
Şekil 35. Antijen-antikor çifti oluşturarak gerçekleştirilen ELISA test sistemi standart grafiği	44
Şekil 36. 8-OHdG pab/HRP-NFs'in kullanıldığı standart grafik	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge.2.1. Oksidatif stres yaratan bazı koşullar.....	2
Çizelge.2.2. İmmüendiagnostik testler	7
Çizelge.2.3. ELISA yönteminin çeşitleri	12
Çizelge 2.4. ELISA' nın avantajları.....	16
Çizelge.2.5. Nano çiçek yapıların avantajları (Zhang, 2017)	20
Çizelge 2.6. Nano çiçek yapıların bazı kullanım alanları	20
Çizelge 3.1. Ticari kitin standart test aralığı	27
Çizelge4.1. Biotin Ab -NFs elementlerin dağılımı	36
Çizelge 4.2. 8-OHdG pab/HRP-NFs elementlerin dağılımı	37
Çizelge 4.3. Her bir deneyde spike edilen 8-OHdG konsantrasyonları ve geri kazanım oranları	46

1.GİRİŞ

Oksidatif stres, yaşlanma, kanser ve antioksidanlar günümüzde yaygın çalışılan konulardır. Oksidan üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge fonksiyonu vardır. Bu dengenin oksidanlar tarafına bozulması, oksidatif stres olarak tanımlanabilir (Büyüksu vd., 2015). Oksidatif stresin temel kaynağı olarak bilinen oksidanlar reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS), sülfür merkezli radikaller ve diğerleri olarak gruplandırılabilir (Kurtde de vd., 2018). Organizmada oluşan DNA hasarını ölçebilmek için kullanılan çeşitli belirteçler ve yöntemler kullanılmaktadır. Bu belirteçler içinde en çok kullanılanlar 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), timin glikol (Tg), 5- hidroksiurasil (5-OHUr a) ve 8-oxoadenin (8-oxoA)'dir. Çalışmamız için 8- OHdG'yi tercih etmemizin sebebi; 8-OHdG oluşumunun organizmaya, reaktif oksidatif stres (ROS) tipine ve etkiye maruz kalma süresine bağlı kalmadan diğer DNA modifikasyonlarıyla orantılı şekilde olmasıdır. Bu sebeple 8-OHdG düzeyleri ölçölüp oksijen radikallerinin indüklediği hasarın uygun maliyetlerde hesaplanması daha anlamlıdır (Omari Shekaftik vd., 2021).

Son zamanlarda teknolojinin gelişimi ile birlikte popülerliği artan nanoteknoloji, yapıların ve malzemelerin nanometre ölçeklerinde tasarım, üretim, imalat ve uygulamalarıyla ilgilenen, umut verici bir bilimsel alandır. Nanobilim ve nanoteknoloji, malzeme üretiminden başlayarak, elektronik, manyetik, optik, mekanik ve biyomedikal amaçlı uygulamaları ile birçok bilimsel alanda kullanılan disiplinler arası bir alandır. Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki atom, molekül ve birkaç yüz nanometreye kadar ki yapıların eşsiz fiziksel özelliklerini anlamaya olanak sağlamaktadır (Bhushan, 2017). Son yirmi yılda, analizler için yüksek verimli teknolojilerin geliştirilmesi, çoğu tanımlanmış analizler üzerine çağ atlatacak keşifler çıkarmaktadır. Enzim bağlantılı immünosorbent test (ELISA) yönteminin kayda değer pratikliği ve enzim üzerinden yapılan teşhisi, klasik yöntemlere göre yüksek verimlilik ve hassasiyet içermektedir. Nanoteknolojiyle birlikte ELISA'nın ekonomik ve az maliyetli olması, verimliliğin yüksek olmasına olanak sağlamaktadır. Hastalıkların doğru şekilde teşhisinde kullanılan ELISA, nanoteknolojiyle birlikte çeşitli kanserler, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çok faktörlü hastalıkların izlenmesi ve sınıflandırılması için çoklu biyobelirteçlerin analizini gerektirmektedir (Vanmassenhove vd., 2013).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

Oksidatif stres, organizmalarda hücrel savunma sistemi aracılığı ile yok edilenden, oranla daha çok reaktif yapıda oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıdır. Serbest radikaller yörüngesel olarak dış çemberinde bir veya birden çok eşlenmemiş elektron bulunduran reaktif atomlar ya da moleküller olarak adlandırılmaktadır. Reaktif özellikte olması nedeniyle çeşitli moleküllerle reaksiyona girip yapılarını bozma eğilimindedirler (Alkadi vd., 2020).

Oksidanlar ve antioksidanlar arasında, oksidanlar lehine potansiyel olarak hasara yol açabilecek bir dengesizliğe ‘oksidatif stres’ adı verilmektedir. Vücuttaki hücrelerde enerji üretilirken ya da metabolik olaylar sırasında oksijen molekülünün dengesizleşmiş bazı formları açığa çıkmaktadır. Bu durum serbest oksijen radikalleri olarak adlandırılmaktadır. Bu form dengesiz olmasından kaynaklı DNA, hücre zarı gibi birçok hücre yapısına saldırmaktadır. Normal koşullarda oluşan serbest oksijen radikalini, hücrenin antioksidan sistemleri hemen etkisiz kılmaktadır. Ancak serbest oksijen radikalleri çok fazla oluştuğunda vücudun antioksidan sistemi bu durumu etkisiz kılmakta yetersiz kalmaktadır. Bu durumda radikaller vücutta herhangi bölgeye zarar vermeye devam etmektedir. Bu olaylar zincirinin sonucuna ise oksidatif stres adı verilmektedir. (Sadiq, 2023).

Çizelge.2.1. Oksidatif stres yaratan bazı koşullar

Oksidatif Stres Yaratan Bazı Koşullar

Sağlıksız Beslenmek
Düzenli Egzersiz Yapmamak
Sigara İçmek
Alkol Tüketmek
Doğru Solunum Yapmamak
Stresli Koşullarda Yaşamak
Ağır Metallere Maruz Kalmak
Kirli Hava Solumak

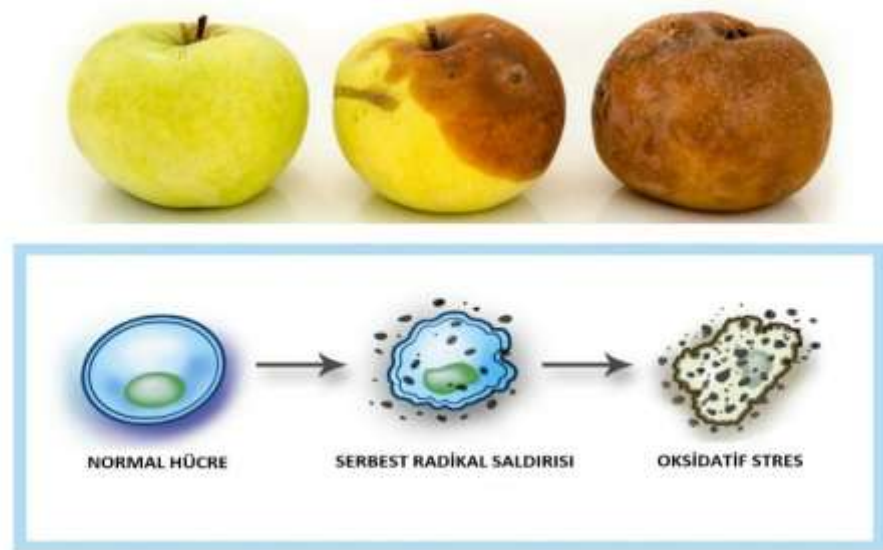
Oksidatif DNA hasarının tespitinde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak bu tekniklerin birçoğunda yalnızca tek çeşit hasar ürünü ölçülebilmektedir. Bununla beraber kütle spektrometre ölçüm teknikleriyle hem tanımlama hem de görülen bazı hasar ürünlerinin miktar tayini tespiti yapabilmek mümkündür. (Marrocco vd., 2017). Antioksidan sistem, reaktif türlerle karşı yeterli korumayı sağlayabilmektedir. Oksidatif stres ya da hasar prooksidanların fazla oranda oluşması ile meydana gelmektedir. Prooksidan hasara kanser ile kardiyovasküler hastalıklar eşlik etmektedir. Antioksidanlarla, bu hastalıkların durdurulması adına çalışmalar literatürde önemli ve hassas bir yer edinmektedir. Antioksidanların görevleri arasında reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasını durdurmak var ise ortadan kaldırmak ve gerekiyorsa etkilerini kısıtlamak yer almaktadır. (Li vd., 2016). Oksidatif strese ait olan total değer; total oksidatif stres veya total oksidan kapasite (TOK) olarak adlandırılmaktadır. Total antioksidan kapasite (TAK), biyolojik sıvılarda mevcut halde bulunan hücresel komponentler ve antioksidanların membranları oksidatif hasar oluşumuna karşı olarak koruma sığasının bir belirteci olarak görülmektedir. (Erel vd., 2017). Toplam antioksidan ölçümü yapılması, antioksidanların ayrı ayrı ölçümünden çok daha önemli bilgiler verebilir. Zira TAK değeri, serum içeriğindeki bütün antioksidan yapılı maddelerin toplam aktivitesini yansıtarak, en doğru sonucu ortaya çıkarır. (Erel, 2004). Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak iki aşamaya ayrılır. Hücre içindeki savunma merkezinin enzimatik antioksidanları; katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD)'dır. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidan türleri; beta-karoten, glutatyon, membran yapısına bağlanabilen, transferin, alfa-tokoferol, askorbat, bilirubin ve seruloplazmin olarak adlandırılır. Çinko gibi iz elementler ve serbest radikal türü yok ediciler ise hücre dışında antioksidan savunma sistemini meydana getirmektedir. Ekzojen kaynaklı antioksidanların birçoğu sıkça tükettiğimiz gıdalarda bolca bulunur. Ekzojen kaynaklı antioksidanlar içerisinde ise polifenoller, flavonoidler ve bazı vitaminler yer almaktadır (Yetük, 2013).

2.2. Oksidatif Strese Bağlı DNA Hasarının Oluşum Mekanizması

2.2.1.DNA Hasarı ve Nedenleri

Endojen ya da ekzojen kaynaklı olarak nitelendirilen genetik materyalin moleküler bütünlüğünde oluşan tüm değişikliklere DNA hasarı adı verilmektedir. Genomik DNA devamlı olarak çevresel nedenlerden etkilenmektedir. DNA hasarı,

DNA eşleşmesi olarak nitelendirilen DNA rekombinasyonu veya DNA replikasyonu gibi tüm hücresel yapıdaki olaylar bütününe oluşumu esnasında endojen olarak DNA'nın yapısal bütünlüğünde de ortaya çıkabilir (Sancar ve Kulaksız, 2007). DNA hasarı, hücre yaşamında sürekli gözlemlenen yaşlanma, mutasyon, kanser ve sonrasında hücre ölümlerine yol açan olaylar bütünüdür. DNA, hali hazırda yaşam süresi boyunca ekzojen ajanlar ve hücresel yapıdaki metabolitler tarafından sürekli olarak değişimlere zorunlu bırakılır. Bu nedenle yaşanan farklılaşmalar, çok hücreli organizmalarda yaşlanmaya, tek hücrelilerde ise hücrenin ölmesine neden olmaktadır (Sancar vd., 2004). DNA'da ise reaktif oksijen türlerinden dolayı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürünü oluşmaktadır (Renaudin vd., 2021). Bu bazların en önemlisi olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), hassas ve çok sık rastlanılan oksidatif DNA hasarı ölçütüdür.

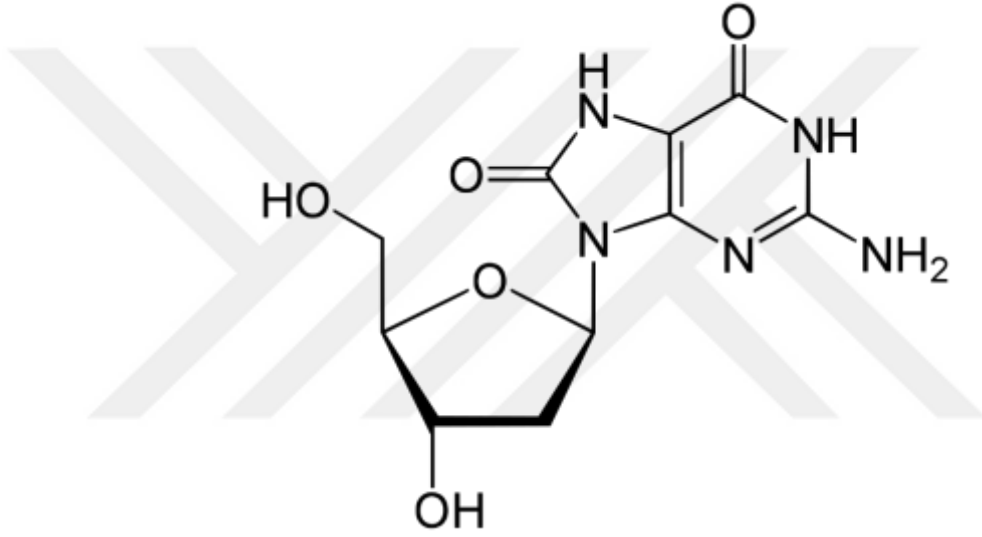


Şekil 1. Oksidatif stresin oluşumu

2.2.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

Guanin, DNA yapısı içerisinde bulunan en zayıf iyonizasyon potansiyelinde olan ve oksidasyona en eğilimli baz tipi olarak adlandırılmaktadır (Dorman vd., 2005). Modifiye yapıya sahip olan bir baz 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), DNA yapısında reaktif oksijen çeşitlerinin ortaya çıkardığı 20'nin üzerinde oksidatif baz hasarlanma ürününden birisi olup guanine ait olan 8. karbon atomuna hidroksil radikalinin yaptığı ataklar sonucu meydana gelen, oksidatif DNA hasarının hassas bir

belirticidir. ROS'un, DNA'da ortaya çıkardığı bu baz hasar ürünleri arasında en çok karşılaşılan ve mutajenik yapısı en iyi tanımlanan 8- OHdG'dir. OH radikali, guanin yapısındaki 4, 5 ve 8. konumlardaki karbon atomları ile birlikte reaksiyona girer ve sonuç olarak DNA ürün radikallerini ortaya çıkar. OH radikalının C-8'e dahil edilmesiyle ortaya çıkan katılma ürünü radikali (C8-OH) proton ve 1 elektron kaybederek 8- OHGua'e okside olmaktadır. (Cadet vd., 2024). Bununla birlikte 8-OHdG'nin ölçümü, DNA ortaya çıkan oksidatif hasarın direkt göstergesi ve en çok çalışılanıdır (AbuArrah vd., 2021).



Şekil 2. 8-OHdG'nin yapısı (Kasai, 2002)

DNA, sürekli ekzojen ve endojen sebepli olarak oksidanlardan gelen oksidatif hasara maruz kalır. Bu sonuçta endojen veya ekzojen kaynaklı her çeşit oksidatif hasara yol açabilecek sebebin DNA hasarına ve bununla beraber 8-OHdG oluşumuna neden olabilmektedir. Etil alkol, demir nitrilotriasetat (Fe-NTA), 3-metil alkol-4 dimetilaminoazobenzen, asbest gibi kimyasal maddelerin deneysel ortamlarda deneklere verilmesinden sonra; karaciğer, böbrek, yemek borusu ve akciğerde, 8-OHdG düzeylerinin büyük oranda yükseldiği bildirilmiştir (Simioni vd., 2018). Bununla beraber mazot, sigara ve kadmiyum gibi günlük yaşamda sürekli maruz kalınan kimyasal maddelerin de deneysel olarak uygulandığında 8-OHdG oranını yükselttiği gözlemlenmiştir (Simioni vd., 2018). Ayrıca, oksidatif hasarın yaşlanmada aktif bir rol oynadığı görülmektedir ve antioksidanların kullanımı doğrudan bir yaşlanma karşıtı strateji seçeneği olabilir (Gan vd., 2012). Bu nedenle, şaşırtıcı olmayan bir şekilde, 8-OHdG çeşitli çalışmalarda yaşa bağlı hasar birikiminin potansiyel bir belirteci olarak

araştırılmıştır. (Nie vd., 2013). İnsanlarda yaşa bağlı değişiklikleri açıklamak için, 8-OHdG hasar seviyeleri farklı yaş gruplarında araştırılmış ve her iki cinsiyet için 21-30 yaşındaki bireyleri 81-90 yaşındaki bireylerle karşılaştırarak hem DNA hem de RNA'da oksitlenmiş guanin seviyesinde yaşa bağlı bir artış gösterilmiştir. Bu veriler, yaşa bağlı patolojileri belirlemek için kullanılabilecek umut verici yaşlanma biyobelirteçleri olarak 8-OHdG'yi önermektedir (Gan vd., 2018).

2.3.İmmüendiagnostik

İmmünodiagnostik testler veya tanı amaçlı kullanılan bu analizler, birçok bilimsel alanda yaygın olarak kullanılmıştır. Bu tür testler antikorları reaktif olarak kullanan ve sonuçları tanısall yorumlamaya yardımcı olan her türlü analitik yöntemi kapsamaktadır. En belirgin kullanım alanları klinik uygulamalardır, ancak farklı araştırma alanlarında da (Örneğin; çevre kirliliği, gıda bozulmaları vs.) görmek mümkündür (Kourea, 2016). Mikrobiyolojik analizlerde bazı hastalıkların çeşitli formlarının teşhislerini incelemek için ileri teknikler kullanılmaktadır. Hastalık aktivitesinin işleyişini, büyük risk altında olduğunu saptama potansiyeline sahip olan bu analizler içerisinde immüendiagnostik metotlar kullanılmaktadır. İmmünolojik test olarak da bilinen immüendiagnostik, bir numunede spesifik antijenlerin (virüsler veya bakteriler gibi) veya antikorların (bağışıklık sistemi tarafından bir enfeksiyona yanıt olarak üretilen proteinler) varlığını saptamak için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, kanser ve otoimmün bozuklukların saptanmasında olduğu gibi çeşitli bulaşıcı hastalıkların da tanı ve teşhisinde kullanılmaktadır. Asıl bir deyişle immünodiagnostik; bulaşıcı hastalıkları, tümörleri, diyabeti, tedavi ilaçları ve alerjenleri tespit etmek adına “antikor” kullanan ve sonuçlarını duyarlılık ile analiz eden bir yöntemdir (Liu, 2024).

Çizelge.2.2. İmmüendiagnostik testler

Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA)	Bir numunede spesifik antijenlerin veya antikorların varlığını saptamak için enzimler kullanılmaktadır.
Western blot	Bir numunedeki proteinleri ayırmak için jel elektroforezi kullanılmaktadır ve ardından spesifik antijenlerin veya antikorların varlığını saptamak için spesifik antikorlar kullanılmaktadır.
İmmünfloresans Testi (IFA)	Bir numunede spesifik antijenlerin veya antikorların varlığını tespit etmek için floresan etiketli antikorlar kullanılmaktadır.
İmmünokromatografi	Bir numunede spesifik antijenlerin veya antikorların varlığını saptamak için katı bir yüzey (kağıt şeridi gibi) üzerinde immobilize edilmiş antikorlar kullanılmaktadır.
Hızlı teşhis testleri (RDT)	Bu testler basit, kullanımı kolay ve kısa sürede sonuç vermektedir.

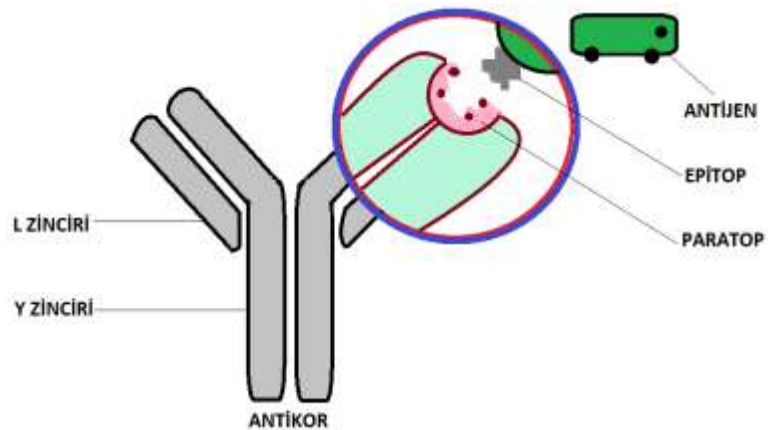
2.3.1. Antijen-Antikor Birleşimi

Antijenler ve antikorlar, birbirleri ile tepkimeye girerek organizmada bazı durumları ortadan kaldırabilmek adına büyük bir rol üstlenmektedir. Bağışıklık sistemine direnç gösterebilme veya organizmanın bağışıklık kazanma durumuna karşı, vücuda giren antijenleri vücutta bulunan antikorlar sayesinde yok edebilme durumuna antikor-antijen tepkimeleri denir. Bu sebeple immünolojinin genelinde bağışıklık olduğu gibi, antijen-antikor ilişkisi bu alanın temel yapısını oluşturmaktadır (Ladjemi vd., 2010). Antijen ve antikorun birbirine bağlanmasını saptamak için immünolojideki en önemli prensip “Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi -ELISA” tekniğidir (Doğa ve Bilim, 2006). ELISA kullanılarak, antikorların antijene maruz kalmalarının ve antikorların antijene bağlanmalarının sonuçlarını tespit etmek mümkün olmaktadır. Bağışıklık sistemi, organizmayı patojenik mikroorganizmalara, virüslere ve kanser gibi hücrelere karşı koruma mekanizması sağlayan kompleks bir savunma sistemidir. Savunma sistemi öncelikle vücudun temel bariyerleri olan deri ve mukozalardan oluşmaktadır. Bunun yanında non-spesifik hedefler ve spesifik hedefler yer alır. İmmün sistem ise spesifik hedefler arasında yer almaktadır. Bu immün sistemin bileşenleri antijenlerle etkileşirler (Pishesha vd., 2022).

Antijen, antikor üretimine sebep olan ve vücudumuza dışarıdan alınan yabancı maddeler olarak adlandırılır. Bu yabancı maddeler vücuda girdiğinde bağışık yanıtı oluştururlar. Antijenler sindirim, solunum, deri ve mukoza yolu gibi doğal yollarla vücuda girebileceği gibi, yapay olarak şırınga ile deri, derialtı, kas ve damar gibi yollardan verilebilir. Antijenin antikor molekülünün antijen bağlayan bölgesi ile birleşen parçası antijenik determinant (epitop) olarak adlandırılmaktadır. Antijenik moleküllerin değişik antijenik determinantları vardır ve her biri değişik antikor üretimini uyarmaktadır. Bazı epitoplar diğerinden daha antijeniktir ve onların reaksiyonu tüm cevapta baskındır. Bu tür epitoplara immünodominant denir. Epitoplara uyan ve antikor molekülünde bulunan kovuk kısmına da paratop adı verilmektedir (Liu vd., 2022).

Antikor, vücudun savunma sistemi tarafından salgılanan, antijenlerle bağlanarak oluşturulan protein molekülleridir. Antikorlar, antijenlerin virüsler, bakteriler ve diğer mikroorganizmalar ile etkileşimlerini bloke eder ve vücudun dış etkenlerden korunmasını sağlamaktadır. Antikorlar, antijenlerin vücut tarafından tanınmasını ve daha sonra onları hedef alan bağışıklık hücrelerinin üretilmesini sağlar. Antikor üretimi, antijen ile temas etkileşiminde oluşur ve bağışıklık sistemi tarafından kontrol edilir. Organizma dışına çıkartılan ve dağıtılan antijenlerin tekrar organizmaya girmesini engellemekle birlikte immün sistem tarafından üretilen antikorlar, antijene bağlanarak onları bloke etmektedir (Kapingidza vd., 2020).

Antikorlar, antijenlere bağlanarak bu olayı gerçekleştirmektedir. Bu olaya immünizasyon adı verilmektedir. Antijenik determinant yani epitop kısım, antikorların paratop kısmına temas etmesi sonucu bağlanma meydana gelmektedir.



Şekil 3. Antijen antikor birleşmesi

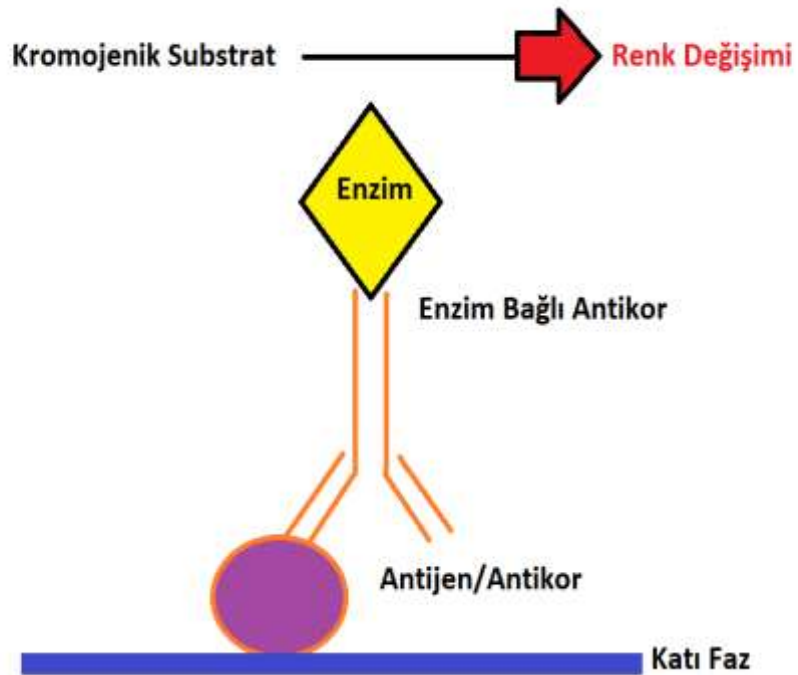
2.3.2. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA)

ELISA yöntemi, özgül antikor-antijen bağlanmasının antikorlara enzim bağlanması ve enzim substratının renkli ürünlere dönüşmesi amacına dayanan biyokimyasal- immünolojik bir yöntemdir. Çok duyarlı bir yöntem olması nedeniyle çeşitli araştırmalarda, hastalıkların belirlenmesinde, geçirilmiş hastalıkların antijenlerinin kanda tayininde, gıda alerjilerinde kullanılmaktadır. Hücre kültürü, doku ve vücut sıvıları kullanılarak ELISA çalışılmaktadır (Tabatabaei vd., 2022). ELISA, immünolojik teknikler arasında yer alan, test şeklinde kullanılan, antijen ve antikor arasında reaksiyondan faydalanarak farklı hastalıkların tanısına olanak sağlayıp hastalıkları, otoimmün bozuklukları ve alerjenleri tespit eden kantitatif bir yöntemdir. Bunun yanı sıra, enfeksiyon etkenleri veya bunlara karşı vücudun oluşturduğu antikorlar saptanabilmektedir (Konstantinou, 2017). Yaygın olarak uygulanan bu teknik, farklı türdeki numunelerde çok çeşitli hedef analitlerin spesifik tespitini sunar. Tekniğin yaklaşık kırk yıl önce icat edilmesinden bu yana ELISA, diğerlerinin yanı sıra gıda kalitesi, çevre, biyoteknolojik ve kimyasal disiplinlerde hızla çeşitli uygulamalar bulmuştur (Hosseini vd., 2018). Esas olarak bağışıklığı tanımada kullanılan bu teknik hızlı ve basit bir teknik olduğundan genellikle araştırma laboratuvarlarında, endüstride kalite kontrolünde, hastalık biyobelirteçlerinin teşhisinde kullanılmaktadır. (Aydın vd., 2015).

Bu yöntemde reaksiyon kabaca en az bir antikor ve antijen içermektedir. Yüzeye bağlı antijene, enzime bağlı antikor bağlanır. Spesifik tanıma ve destekleyici substrat üzerinde immobilize antikor veya antijen yakalanabilir. Daha sonra substrat yüzeyi bloke edici ajan tarafından bloke edilmektedir. Substrat eklemesindeki amaç numunedeki antijen değeri ile alakalı renk değişikliği veya sinyal üretmektir. Sonraki adımlarda spesifik olmayan adımlardan kaçınılır. Daha sonra reaksiyonu katalize edebilen biyokonjugasyon reaktifler, enzim etiketli antikor eklenerek antijen ile inkübe edilmektedir. Her kaplama ve inkübasyon adımında istenmeyen maddeleri, substrat durumundaki fazla proteinleri uzaklaştırmak için reaksiyon plaka yıkama tamponu ile yıkanmaktadır. Son olarak enzimatik reaksiyonları indüklemek ve renk oluşturmak için kromojenik reaktifler eklenmektedir. Böylelikle rengin yoğunluğu çıplak gözle veya bir spektrofotometre tarafından kantitatif olarak ölçülüp, değerlendirilmektedir (Wu vd., 2019). Enzime bağlı immünosorbent testi adında anlaşıldığı üzere sorbent substrattan

oluşan bir immünoassay yöntemidir. Antijen veya antikor sorbent substrat görevi görür. Destekleyici maddeye ardından da tamamlayıcı biyomoleküllere bağlanır. Enzim ile etiketlenmiş sorbent ile birleştirilir ve biyokonjugasyon oluşturur. Özetle, ELISA sisteminde sorbent substrat temeldir, enzim etiketi sinyaldir, dönüştürücü ve kromojenik reaktif ise çıkış sinyali olarak işlev görmektedir. Bunlar, ELISA testinin dört önemli temel varlıklarını oluşturmaktadır (Wu vd., 2019).

ELISA, diğer tespit yöntemlerinden oldukça farklıdır. ELISA, spesifik antijen-antikor etkileşimleri sırasında genellikle antikora konjuge edilmiş bir enzim dahil edilmesiyle tanınmaktadır. Heterojen bir immünolojik bir test olan ELISA' nın, antijen ve reaktif kullanımında yüksek hassasiyet, hız, özgüllük, ekonomik olması ve verimliliğinin yüksek olması gibi avantajları mevcuttur (Wu vd., 2019). Maliyetsiz, hassasiyetli ve kullanım kolaylığı gibi avantajları nedeniyle ELISA, gıda güvenliği ve doğrulamasında güçlü bir araç olmuştur. Ancak, düşük hassasiyet ve doğruluk, ELISA'nın gıda analizinde uygulanmasını engelleyen sınırlamalardır. Bu nedenle doğruluğu, hassasiyeti ve kararlılığı artırmada büyük ilerleme kaydedilmesi adına nanomalzemelere dayalı ELISA (nano-ELISA) geliştirmiş ve üstün performans göstermiştir (Sun vd., 2020)



Şekil 4. ELISA yönteminin çalışma prensibi

Son yirmi yılda, analizler için yüksek verimli teknolojilerin geliştirilmesi, şimdiye kadar çoğu tanımlanmış analizler üzerine klinik uygulamalara yönelik çağ atlatarak keşifler ortaya çıkarmaktadır. Diğer analiz yöntemleri her ne kadar hastalık teşhislerinde veya tedavilerinde kullanılmaya devam etse de ELISA yönteminin kayda değer pratikliği ve enzim üzerinden yapılan teşhisi, klasik yöntemlere göre çok daha özgüllük ve yüksek hassasiyet içermektedir. Bununla birlikte testin hem ekonomik hemde az maliyetli olması avantaj sağlamaktadır (Vanmassenhove vd., 2016).

Güncel ELISA yaklaşımları, tek bir analitik karakterizasyonun yeterli olduğu (örn. HIV) hastalıkları doğru bir şekilde teşhis edebilirken; kanserler, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar (dokuları ve organları etkileyen sürekli bir süreç hastalığı) gibi daha karmaşık, çok faktörlü hastalıkların izlenmesi, sınıflandırılması için çoklu biyobelirteçlerin analizini gerektirir. Bu da ELISA için uygun bir durumdur (Frampton vd., 2014).



Şekil 5. ELISA testi ile tanısı konulan bazı hastalıklar

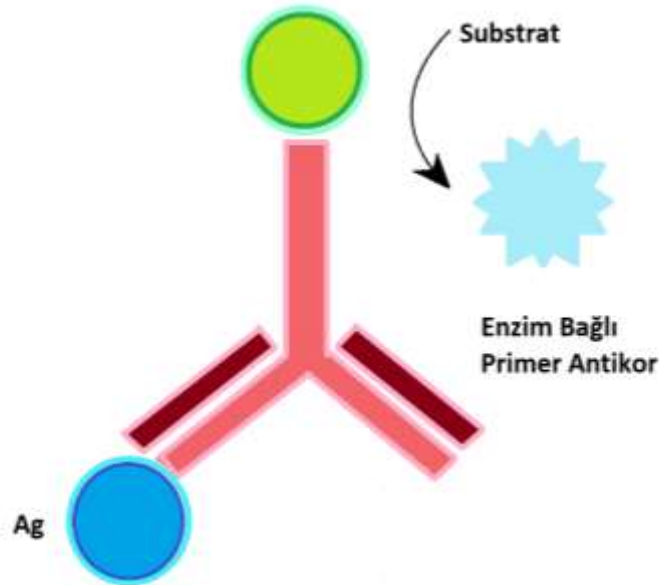
ELISA tüm hastalıklar için bir teşhis testi olmamaktadır. Bunun yerine spesifik belirteçler için bir tarama testi olarak görev yapar ve daha sonra PCR ve Western Blotlama gibi diğer testlerle doğrulanabilmektedir (Manole vd., 2018)

Çizelge.2.3. ELISA yönteminin çeşitleri

ELISA Yöntemlerinin Çeşitleri
Direkt ELISA
İndirekt ELISA
Kompetitif ELISA
Nonkompetitif ELISA (Sandviç Yöntemi)

2.3.2.1. Direkt ELISA Yöntemi

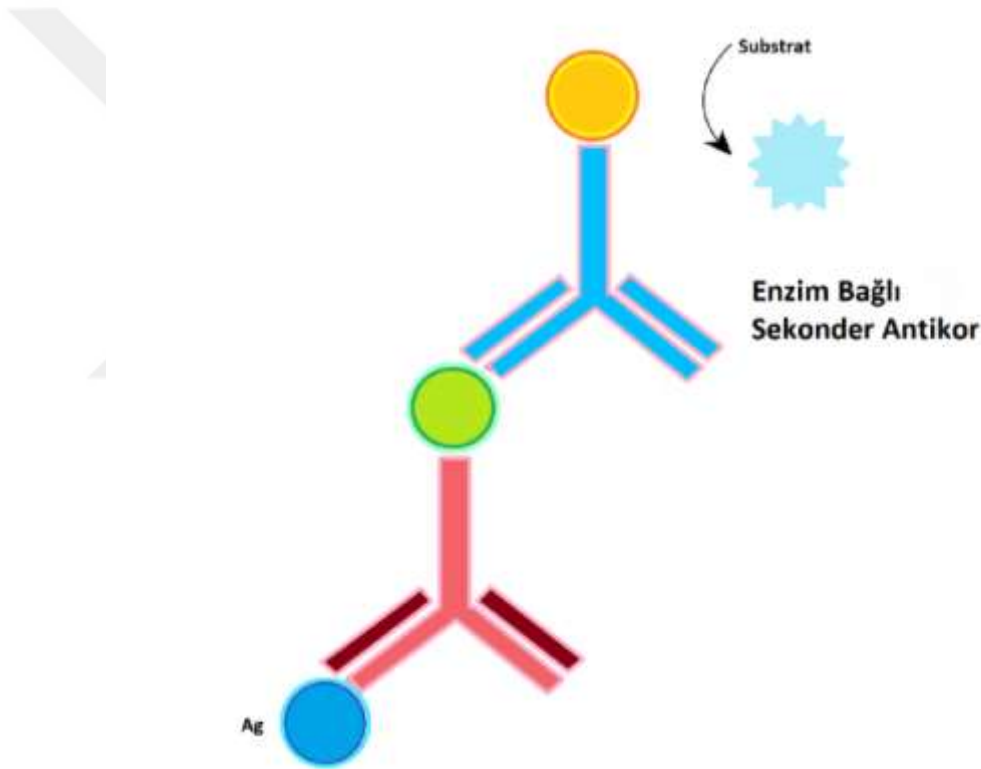
Molekül ağırlığı büyük antijenin miktarını belirlemek için kullanılan yöntemdir. Numunede yer alan antijenler, kapta yer alan kuyu yüzeyine tutturulur. Daha sonra işaretli olan antikorlar kuyucuklara ilave edilir. Bir süre inkübe edilir. Sonrasında yıkama işlemi yapılır. Yıkama ile bağlanmamış işaretli antikorlar ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Üzerine enzimin substratı eklenerek renk değişimi meydana getirilir. Bu sayede kuyucuktaki bağlanmış enzim işaretli antikor miktarı belirlenmiş olmaktadır. (Hayrapetyan vd., 2023)



Şekil 6. Direkt ELISA

2.3.2.2. İndirekt ELISA Yöntemi

Numunede yer alan antijenler plaka kuyucuklarının yüzeyine bağlanmaktadır. Öncelikle işaretsiz birincil antikorlar kuyucuklara eklenmektedir. Antijen ile birincil antikor belli bir zaman inkübe edilmektedir. Daha sonra yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan birincil antikorlar ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra birincil antikora özgü enzim ve ikincil antikor kuyucuklara eklenerek belli bir süre inkübe edilmektedir. Bağlanmayan işaretli ikincil antikorlar yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. En son kuyulara enzim substratı eklenerek renk değişimi elde edilir ve antikorlar belirlenir (Tabatabaei ve Ahmed, 2022).

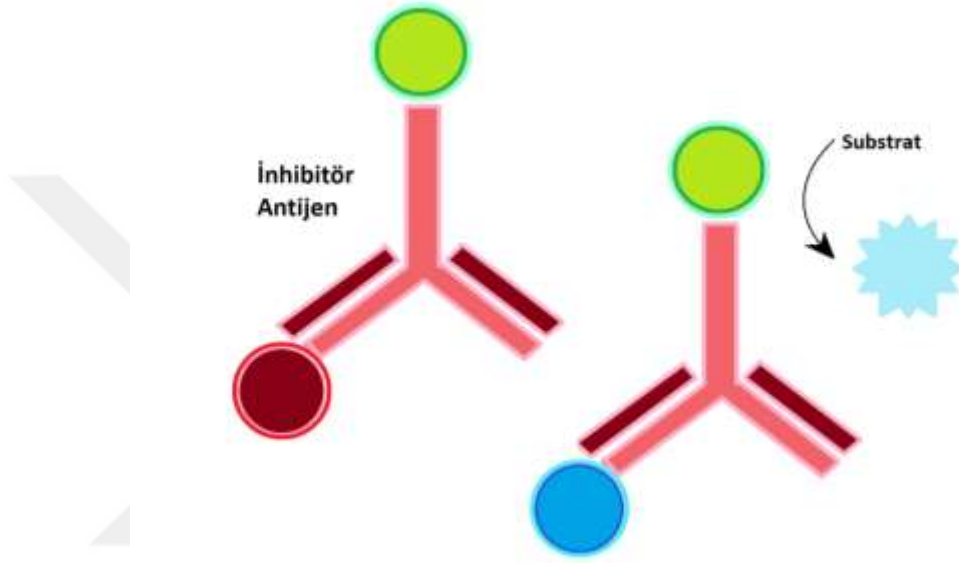


Şekil 7. İndirekt ELISA

2.3.2.3. Kompetitif ELISA Yöntemi

Büyük oranda antikor ölçümünde kullanılmaktadır. Mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına antikor veya antijen bağlanmaktadır. Kaptaki çukurlara serum (işaretsiz ligand) ve reaktif (işaretli ligand) eklenmektedir. Kısa inkübasyon boyunca işaretsiz ligand ve enzim işaretli ligand immobilize antijen veya antikora bağlanmak için yarışır. Antijen veya antikorla, işaretsiz veya enzim işaretli ligand kompleks oluştururlar. Sonra yıkama işlemi yapılır ve yıkama işlemi ile antijen (antikor) ve ligand dışındaki ürünler ortamdan uzaklaştırılırlar. Yıkama işleminden

sonra enzimin substratı ortama eklenmektedir. Reaksiyon sonucunda renk değişikliği meydana gelmektedir ve bu değişim işaretli ligandın (antikor veya antijen) derişimi ile ters orantılıdır. Örnekte işaretli ligand az ise işaretli ligand miktarı fazla olacaktır. (Mohan vd., 2019)

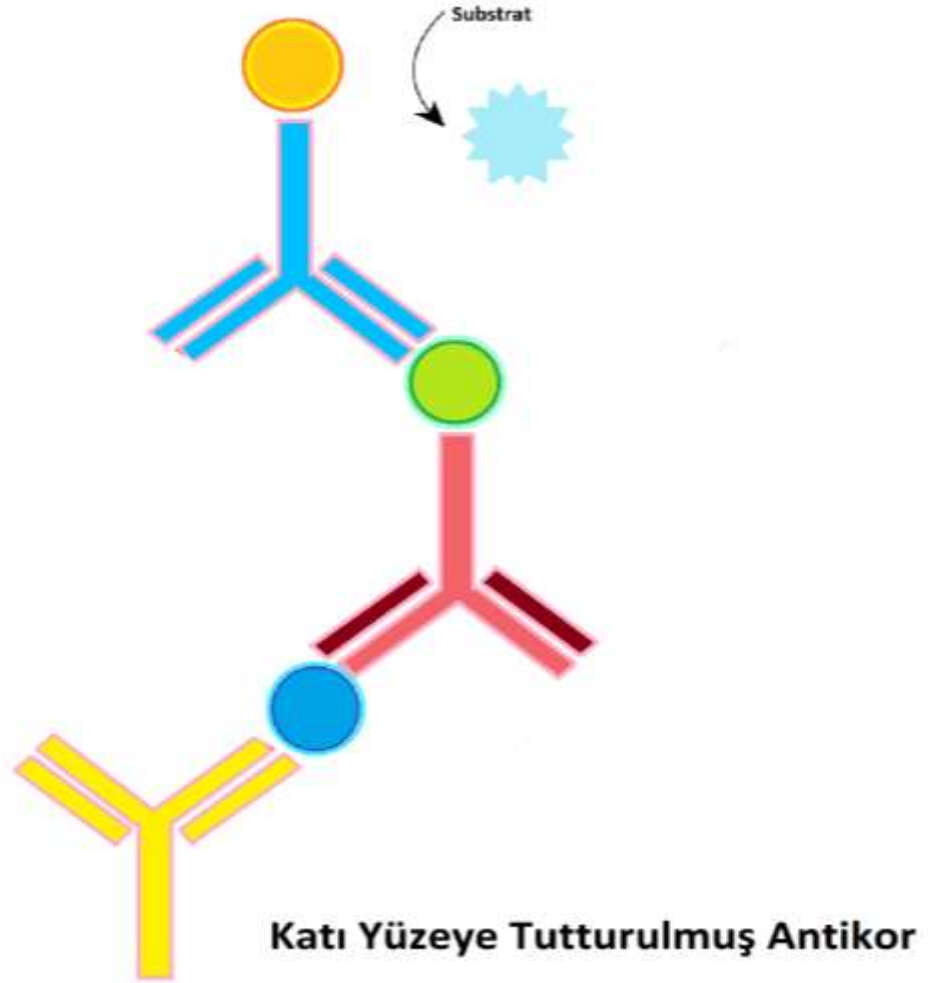


Şekil 8. Kompetitif ELISA

2.3.2.4. Nonkompetitif ELISA (Sandviç) Yöntemi

Bu yöntemde bilinmeyen örneklerdeki antijenin miktarı reaksiyon sonucunda meydana gelen renk değişimi ile antijenin varlığı tayin edilebilmektedir. Bu yöntemin en önemli avantajı antijenin saflaştırılmasına gerek duyulmamasına karşın, istenilen her reaktifin kullanılamaması dezavantaj sayılabilir. Seçilen antikorların aynı antijen üzerinde üst üste gelmeden değişik epitopları tanıması gerekmektedir. Sandviç ELISA yönteminde antikorlar, polistiren plakadaki kuyucukların katı fazına immobilize edilmektedir. Ardından ölçüm kuyusuna antijen içeren örnek ilave edilmektedir. İnkübasyon boyunca örnekteki antijenlerin tümü antikorlarla bağlanmaktadır ve antijen-antikor kompleksleri oluşmaktadır. Antijen-antikor kompleksleri dışındaki bağlanmayan proteinler, yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu adımı takiben ölçüm tüpüne enzim işaretli antikor eklenmektedir. İkinci inkübasyon boyunca birincil antikor-antijen kompleksi oluşur. Yıkama işlemi ile enzim dışındaki yabancı maddeler

ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Daha sonra enzime ait substrat ortama eklenmektedir. Substrat, dedeksiyon antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek renk değişimine neden olmaktadır. Meydana gelen renk değişimi spektrofotometre ile ölçölmektedir. Kinetik ölçümle ise izlenmektedir. Renkli ürün oluşumu işaretsiz ligandın (serumdaki antijen veya antikor) derişimi ile doğru orantılıdır. Oluşturulan standart grafik ile konsantrasyon belirlenebilmektedir. (Lim vd., 2015)



Şekil 9. Sandviç ELISA

2.3.2.5. ELISA'nın Avantaj ve Dezavantajları

ELISA'nın avantajları genel olarak duyarlılık, çok yönlülük, kullanım kolaylığı ve yüksek verim olarak ele alınmaktadır. Çizelge 2.4'te testin avantajları listelenmiştir.

Çizelge 2.4. ELISA'nın avantajları

ELISA yöntemi son derece duyarlıdır. Bir numunede var olan çok küçük miktardaki antijenleri veya antikorları dahi ölçebilmektedir.
ELISA yöntemi çok yönlüdür. Bu yöntem ile kan, idrar, tükürük ya da vücutta bulunan diğer sıvılardaki antikor veya antikoru tespit edebilecek şekilde düzenlenmektedir.
ELISA yönteminin uygulanması kolaydır. Çok karışık ekipmana gerek duyulmaz.
ELISA yöntemi için bir uzmanlığa gerek duyulmamaktadır. Bu nedenle birçok laboratuvar da bu yöntem erişilebilir ve kullanılabilir olmaktadır.
ELISA yöntemi birden fazla numuneye paralel olarak uygulanabilmektedir. Bu da onları yüksek verimli tarama uygulamaları için erişilir ve aranır bir yöntem kılmaktadır.
ELISA yüksek oranda tekrarlanabildiği gibi bilimsel araştırma ve klinik teşhis verileri için yüksek oranda doğru sonuçlar vermektedir.
ELISA diğer immünolojik testler ile nispeten güvenilir ve hassas sonuçlar ortaya koymaktadır.
ELISA canlı hücrelerde dahi kromojenik sinyal üretmektedir. Biyogörüntüleme için yeni stratejiler sağlayabileceği düşünülmektedir.
Antijen- antikor eşleme modeli kendine özgüdür ve anahtar kilit modeline benzetilmektedir.
Kan serumu ve immünolojik testlerde, iyi ve doğru sonuçlar vermektedir. Yüksek performansı, kolay erişilebilirliği ve reaktiflerin seçiciliği nedeniyle çoğu laboratuvar da tercih edilmektedir.
ELISA'nın hassasiyeti amplifikasyon stratejileriyle doğrudan bağlantılıdır. Duyarlılığını artırmak için enzim değişikliğine gidilebilmektedir.

ELISA'nın dezavantajları ise girişim, sınırlı özgüllük, zaman alıcı olması, düşük dinamik aralığı test özelinde yaşanabilmektedir. ELISA yönteminde antikor veya antijen tespitinden ortamdaki diğer maddelerden etkilenilebilir. Bu da sonucun yanlış çıkmasına neden olmaktadır. ELISA, her zaman özgül değildir. Diğer maddelerle çapraz reaktivite verebilir ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. ELISA, sınırlı bir

dinamik aralığı vardır. Yani bir numunede var olan çok düşük veya çok yüksek antijen veya antikor seviyelerini tespit etmek için uygun olmayabilir. Yöntem zaman alıcı olabilir. Tamamlanması birkaç saat veya daha fazla süre alabilmektedir. Klinik tanılarda yüksek numune hacmi istenmemektedir. Yüksek tekrarlanabilme özelliğine rağmen sayılan dezavantajları uygulamada klasik hatalara neden olabilmektedir. Bu nedenle testi dikkatli bir şekilde yapmak ve iyi uygulama becerisine sahip olmak gerekmektedir. Her türlü araştırmada kullanılan bir biyolojik tespit yöntemi olduğundan performansı çeşitli manipülasyonlarla optimize edilmiştir. Özellikle doğruluk, hassasiyet ve kararlılığı noktasında büyük ilerleme kaydedilmiştir (Shah vd., 2016).

ELISA sisteminde yüksek hassasiyet ve hedef molekülleri tespit etmek oldukça önemlidir. Bu amaçla fonksiyonel moleküllerin mikro plaka üzerindeki immobilizasyon verimlerinin artırılması, sinyal gürültü oranının yüksek tutulması gerekmektedir. Bu sebeple konvansiyonel immobilizasyon yöntemlerinin beraberinde antikorla fonksiyonelleştirilmiş malzemelerin test sistemine dahil edilmesi yüksek enzim kapasitesi ile dikkate değer sinyal artışına neden olabilmektedir. Örneğin; son yıllarda farklı bir enzim immobilizasyon yöntemi olan protein/enzim ve $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ içeren hibrit yapılar hiyerarşik mikro yapılara sahip olmaları ve geniş aktif yüzey alanları oluşturmaları sonucunda içeriğindeki protein yapılı moleküller serbest formuna göre daha yüksek katalitik aktivite gösterebilmektedir (Ekremoğlu ve Altınkaynak, 2020).

2.4.Nanomalzemeler

Nano boyutlu atom parçacıkları, tabiatta doğal olarak bulunan karbon ve gümüş gibi homojen yapılardan meydana gelmektedir. Bu homojen yapıların nanomalzeme olarak tanımlanabilmesi için ise boyutunun nano mertebesinde yani 100 nanometreden küçük olması şarttır (Sudha., 2018). Atom boyutunda bulunan bu nano ölçekteki yapılar, nano üretimde kullanılan malzemelerin farklı şekillerde düzenlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Malzemelerin atom ve molekül yapıları üzerinde yapılan değişiklikler sonucu elde edilen farklı yapılar işlevsel hale getirilerek üretimi gerçekleştirilmektedir (Ariga vd., 2016). Nanomalzemeler, iç yapılarına ve boyutlarına göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Nanomalzemelerin sınıflandırılması yapılırken nasıl bir moleküler yapıya sahip olduğu ve boyutları göz önünde bulundurulur. Günümüzde kullanımda olan nanomalzemeler incelendiğinde, farklı boyutlarda elde edilen bu yapıların birçok özelliğinde değişimler meydana geldiği görülmektedir.

Nanomalzemelerin iç yapıları incelendiğinde, atomlarının son yörüngesinde bulunan serbest elektronların serbestlik derecesi malzemelerin boyutları üzerinde etkileyici bir rol oynadığı görülmektedir. Malzemelerin iç yapıları, bu serbest elektronların hareket kabiliyetlerinin bir ölçüsü olarak değişime uğramaktadır. Eğer atomların son yörüngesindeki serbest elektronlar eksenel olarak üç yönde hareket edebilme kabiliyetine sahip ise katı maddeli (üç boyutlu) yapılar elde edilir. Serbest elektronlar eksenel olarak iki yönde hareket edebilme kabiliyetine sahip ise iki boyutlu, tek yönde hareket edebilme kabiliyetine sahip ise bir boyutlu nanotel ve nanotüp gibi yapılar elde edilir. Bu elektronlar, hareket edebilme kabiliyetine sahip değil ise sıfır boyutlu nanotop ve toprak gibi yapılar elde edilir (Kumar vd., 2024).

Nanoteknoloji nano malzemelerden oluşan bir bilim dalıdır. Biyomalzemeler ise nano kristal, nanopartikül, nanotüp, nanotel, nano çubuk, nano ince film, nano çiçek gibi pek çok farklı yapıdan oluşabilirler (Kütük ve Çetinkaya 2019).

Doğal enzimlerin çeşitli endüstrilerde, atık su arıtımı ve biyomedikal gibi çeşitli alanlarda uygulamalarını sınırlayan bazı dezavantajlarına karşılık son yıllarda araştırmacılar enzimi taklit eden nanomalzemeler ve enzimin alternatifi olan enzimatik hibrit nano çiçek benzeri yapıları geliştirmişlerdir. Oldukça geniş endüstriyel uygulamaları olan, çeşitli enzim taklit aktiviteleri, gelişmiş katalitik aktiviteler, düşük maliyet, hazırlanma kolaylığı, stabilite artışı ve biyouyumluluk gibi doğal enzim fonksiyonlarını taklit eden nanozimler ve organik-inorganik hibrit nano çiçekler sentezlenmiştir (Perwez vd., 2023).

2.4.1.Boyutlarına Göre Nanomalzemeler

Sıfır boyutlu (0D) nanomalzemeler nanotoz veya nanodispersiyon şeklinde, birbirinden izole halde bulunan malzemelerdir. 0D malzemeler kuantum noktalar, nanoküreler, fullerenler, çekirdek nanoparçacıkları ve içi boş nanokürelerdir (Adam vd., 2024). Tek boyutlu (1D) nanomalzemeler, düşük malzeme tüketimine ve yüksek gerilme özelliklerine yol açan doğal bir yüksek en-boy oranına sahiptir (Wang vd., 2014). 1D nanomalzemelere örnekler; nanoçubuklar ve nanotüplerdir (Adam vd., 2024). Üstün fizikokimyasal özellikleri, ultra ince kalınlıkları olan (Cao vd., 2018) iki boyutlu nanomalzemeler (2D) nanometrik boyuttaki film ve kaplamalardır. Üç boyutlu nanomalzemeler (3D) toz yapılı, lifli, çok katmanlı ve polikristal malzemelerdir. Örnekleri; elmas ve grafitir (Chelladurai vd., 2018).

2.4.2.Nano çiçekler (Nanoflower)

Son zamanlarda popülerliği artan ve enzim immobilizasyon sınıfına dahil edilen nano çiçekler, ayırma, biyotanıma, enzim mimetikler, kataliz, kaplama ve enerji depolama gibi pek çok farklı uygulamaları bulunan çiçek benzeri şekillere sahip nano malzemelerdir. Bu nanomalzemeler arasında 'nano çiçek' terimi mikroskobik boyutlarda bakıldığında, çiçeklerle benzerlik gösteren üç boyutlu yapıları ifade etmektedir. Biyomoleküllerin (DNA ve proteinler gibi) hem stabilitesini hem de aktivitesini arttırmak tüm immobilizasyon yöntemlerinin temel amacıdır. DNA, protein ve enzim gibi biyomoleküllerin çiçek şekilli nano yapılar haline dönüştürülmesi, bunların çevresel faktörlere karşı aktivitelerini ve stabilitelerini önemli ölçüde arttırmaktadır (Altınkaynak vd., 2016).

Bu yapılar, doğal biyokatalizörlerdir. Nano çiçek yapıların en dikkat çeken yönü, katalitik aktivite, kararlılık, seçicilik, düşük toksisite ve sudaki çözünürlüğüdür. Fakat sulu çözeltideki enzim uygulamaları sınırlı kalmaktadır. Bu problemi çözmek, enzimin aktivitesini ve kararlılığını arttırmak için iki yöntem bulunmaktadır. Bunlar kimyasal modifikasyon ve immobilizasyondur. İmmobilize edilmiş enzim, gelişmiş kararlılık gösterir, verimi artar ve tekrar kullanılabilir hale gelir (Luo vd., 2017).

Nanomalzemeler üzerinde yapılan çalışmalar hızlı bir şekilde gelişmektedir. Bu sayede oluşturulan organik ve inorganik nano çiçekler kimya biliminin gelişmesine büyük ölçüde fayda sağlamıştır. Nano çiçekler, nanomalzemeler arasında özel bir sınıf olarak ayrılmıştır. Klasik nanoparçacıklara göre oluşturulan nano çiçekler yüzey alanı genişliğinden dolayı reaksiyonların verimini arttırmıştır (Somturk vd., 2015). Çizelge 2.5'te nano çiçek yapıların avantajları listelenmiştir.

Çizelge.2.5. Nano çiçek yapıların avantajları (Zhang, 2017)

Nano çiçekler, hızlı reaksiyon alabilmek, yüzey adsorpsiyonunu büyütmek amacıyla artmış yüzey-hacim oranı göstermektedir.

Nano çiçekler, geniş yüzeyli alana sahiptir. Bununla birlikte daha iyi yük aktarımı ve taşıyıcı hareketsizliği göstermektedir.

Üç boyutlu nano çiçek yapısında yüzey reaksiyonunun etkinliği artırılmıştır.

Nano çiçek yapıların hazırlanışına yönelik kullanılan iyonotropik jelasyon, çöktürme yöntemi ve yeşil sentez gibi sentetik yöntemler basit ve uygun maliyetlidir.

Proteinlerin ve enzimlerin kararsız olması sebebiyle metal yüzeyindeki immobilizasyonu ile stabilite artar.

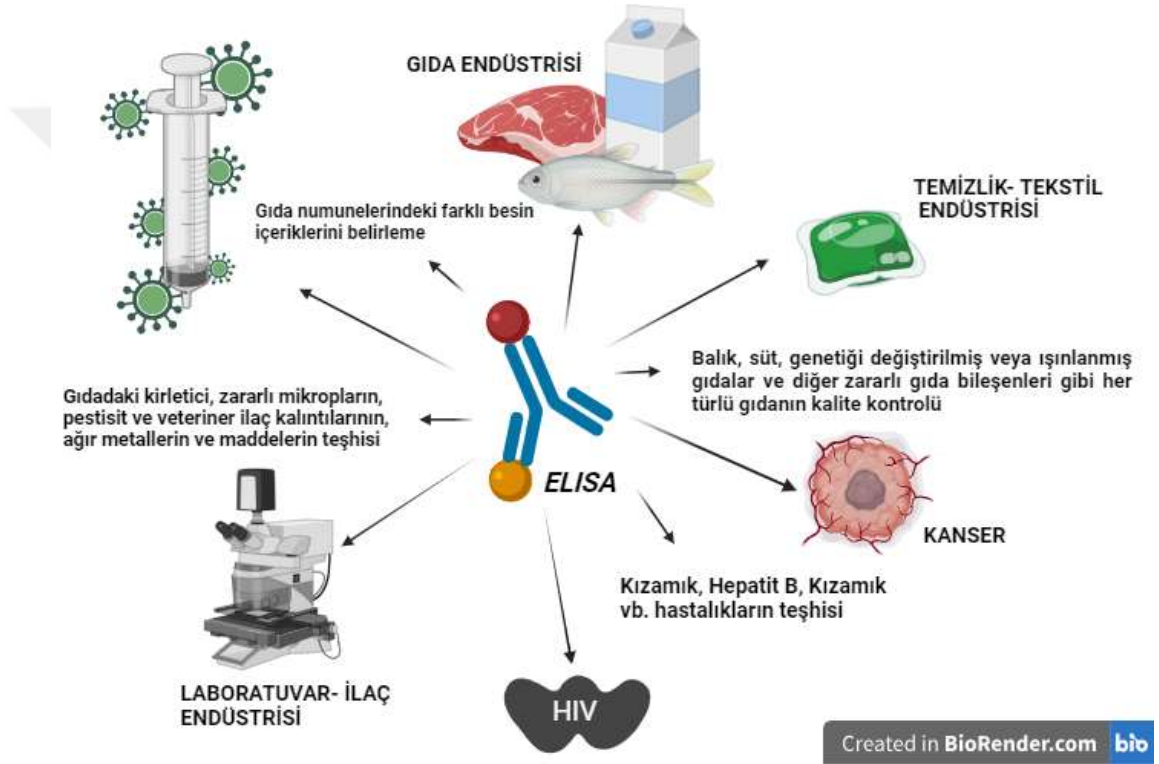
Çizelge 2.6. Nano çiçek yapıların bazı kullanım alanları

Nano çiçek yapıların bazı kullanım alanları

Biyokataliz
Proteoliz
Hidroksit ve fenol tespiti
Enzim yapısının stabilizasyonu
DNA bağlanması
Nano yapıli kapsül eldesi
Biyodizel üretimi
Kirleticilerin ve çeşitli biyolojik moleküllerin tespiti

Son zamanlarda, “nano çiçek-nanoflower (hNF'ler)” olarak adlandırılan organik-inorganik çiçek şeklindeki hibrit nano yapılar, ilk olarak 2012 yılında Zare vd. tarafından inorganik bir kısım olarak Cu^{2+} ve organik bileşikler olarak protein/enzim kullanılarak kazara keşfedilmiş, elde edilen biyomalzemenin katalitik aktivite ve stabiliteyi desteklediği tanımlanmıştır (Ge vd., 2012). hNF'ler, enzim saflaştırma süreçleri, ilaç dağıtımı, aşı çalışmaları ve çevre koruma gibi olası uygulamalar için de önemlidir (Lee vd., 2015). Laktoperoksidazdan türetilen hNF'lerin serbest laktoperoksidazdan daha verimli katalitik aktivite gösterdiğini ve hNF'lerin aktivitesini kaybetmeden yeniden kullanılabilirliğini gösterilmiştir. hNF'nin keşfinden bu yana yaban turpu peroksidaz (Ocsoy vd., 2015), peroksidaz (Altinkaynak vd., 2016) gibi çoklu enzimler yeni hNF'lerin üretimi için organik bileşen olarak kullanılmıştır. Bunların yanı sıra bitki özütleri de organik kısım olarak çok kullanılan bileşikler arasındadır (Wu vd., 2017).

ELISA, birçok avantajının yanı sıra, kendi yapısından kaynaklanan bazı sınırlamaları da bünyesinde barındırmaktadır. Geleneksel ELISA' nın performansını arttırmak için büyük çabalar sarf edilmektedir. Kararlılığın, hassasiyetin, algılama aralığının artırılması, nanomalzemelerin kullanımıyla birlikte daha belirgin hale gelmiştir. Nanomalzemelerin kullanılması, geleneksel ELISA'nın gelişmesine, nano ELISA'nın kullanımına büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Wu vd., 2019).



Şekil 10. ELISA' nın teknolojik ve endüstriyel kullanım alanları

ELISA, nanoteknolojinin popüler olmasıyla birlikte geleneksel yöntemleriyle günümüze gelen birçok endüstri alanında katkı sağlayacak gelişmeler sağlamıştır. Hastalıkların teşhisi ve laboratuvarlarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu sayede günümüz hastalıklarının tespiti hızlı ve ekonomik olmaktadır. Gıda kirleticileri arasında zararlı mikroplar, pestisit ve veteriner ilacı kalıntıları, ağır metaller vb. yer alır. Zararlı bakteriler, geleneksel tespit yöntemi ile tespit edilmekteydi. Geleneksel yöntem, uzun analiz süresi, karmaşık zenginleştirme ve kültüre alma sürecinin zor olması nedeniyle geliştirilmiştir. Nano-ELISA gıda kirleticilerinin tespitinde büyük kolaylık

sağlamaktadır. ELISA, nanoteknolojiyle birlikte bunun gibi maddelerin hassas, hızlı ve spesifik tespitini gerçekleştirebilmektedir (Wu vd., 2019).

Bu çalışmada, DNA hasar tespitine yönelik biyotin antikoru, 8-OHdG poliklonal antikoru ve horseradish peroksidaz içeren nano çiçek yapılar sentezlenerek direkt ve sandviç enzim bağlantılı immunosorbent testi (ELISA) yöntemlerinde denenmesi, ticari kitlerden daha uygun maliyetlerde test sisteminin kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi ve fiyat/maliyet avantajı sağlayıp/sağlamadığının araştırılması amaçlanmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

8-Hidroksi-deoksiguanozin (Sigma, Kat No: H5653), Rabbit 8-Hidroksi-deoksiguanozin ELISA kit (BT Lab, Kat No: E0087Rb), 8-Hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG) poliklonal antibody (Bioss Antibodies Kat No: bs-1278R-TR), Anti-rabbit IgG-Horseradish peroksidaz (HRP) (Sigma, Kat No: 77332), Bradford solüsyonu, CuSO₄, bovin serum albumin (BSA), stabilcoat immunoassay stabilizer, Surmodics (SC05-0100), Tween 20, fosfat tampon, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), H₂SO₄.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Spektrofotometre (Heales MB-580)
- Mini-Shaker (Biosan PSU-2T)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
- İnkübatör (Memmert UN 100))
- Hassas terazi (Sartorius)
- Etüv (Memmert IPP 55)
- pH Metre (Adwa)
- Saf Su Cihazı (Milestone Rios Tm 8)
- Derin Dondurucu (4°C ve -20°C)
- Otomatik pipetler (Glassco)
- Pipet ucu (mavi 1000 µL, sarı 200 µL, beyaz 10µL)
- Mikrosantrifüj Tüpü (Isolab)
- Spektrofotometre Küveti (2 mL)

3.2. Metot

3.2.1. Biyotin antikoru içeren nano çiçek (Biyotin Ab-NFs) sentezi

Konjugat amacı ile kullanılacak olan nano çiçek sentezi için fosfat tamponu, ticari ELISA kit içeriğinde bulunan biyotin ile işaretlenmiş 8-OHdG (Biyotin-Ab) ve CuSO₄ çözeltisi kullanıldı. İlk olarak, 3 adet 10 mL' lik falkon tüplerin her birine PBS (136 mmol/L NaCl, 8 mmol/L Na₂HPO₄, 1.46 mmol/L KH₂PO₄, 2.7 mmol/L KCl, pH 7.4) ve 120 mM CuSO₄ çözeltisinden 0.8 mM konsantrasyonda olacak şekilde (120 µL) ilave edildi. Ardından her tüpe sırasıyla 1, 2 ve 4 µL (sırasıyla 0.1, 0.2 ve 0.4 µg

konsantrasyonlarda) hacminde Biotin-Ab eklenerek her tüp en az 60 s vortexle karıştırıldı. Süre bitiminde sentez oda sıcaklığında hareket ettirilmeden karanlıkta 72 saat inkübe edildikten sonra tüplerin dibinde birikmiş olan mavi renkli pellet 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek ortamdan ayrıldı. Elde edilen pellet 3 kez saf su ile yıkandı, santrifüj edildi ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra tüplerden elde edilen ürünün yüzde ağırlık verimi hesaplandı. Ürün sonraki analizlerde kullanılmak üzere saklandı.



Şekil 11. Nano çiçek oluşumu

3.2.2. 8-OHdG poliklonal antikor ve horseradish peroksidaz içeren nano çiçek (8-OHdG pab/HRP-NFs) sentezi-1

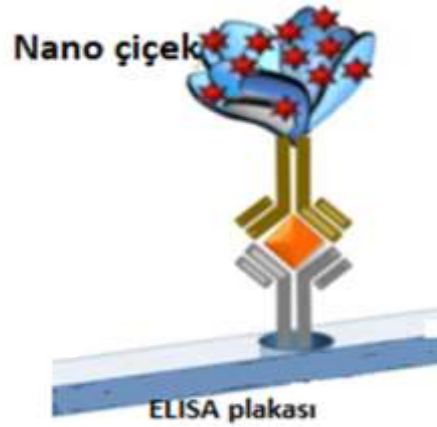
Hibrit konjugat sentezi için fosfat tamponu, ELISA kit içeriğinde bulunan 8-OHdG poliklonal antikor (8-OHdG pab), anti-rabbit IgG-HRP ve CuSO_4 çözeltisi kullanıldı. Bir önceki prosedürde olduğu gibi 3 adet 10 mL’lik falkon tüplerin her birine PBS tamponu ve son konsantrasyon 0.8 mM olacak şekilde CuSO_4 çözeltisinden ilave edildi. Ardından her tüpe sırasıyla 1, 2 ve 4 μL (sırasıyla 1.0, 2.0 ve 4.0 μg konsantrasyonlarda) hacimlerde 8-OHdG pab eklendi. Takiben her tüpe 0.008 mg/mL anti-rabbit IgG-HRP eklenerek karıştırıldıktan sonra 72 saat hareketsiz şekilde inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renkli pellet 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek ortamdan ayrıldı. Süpernatanta Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve enkapsülasyon oranı aşağıdaki eşitlikten hesaplandı. Elde edilen pellet 3 kez saf su ile yıkandı, santrifüj edildi ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra tüplerden elde edilen ürünün yüzde ağırlık verimi hesaplandı. Ürün sonraki analizlerde kullanılmak üzere saklandı.

$$\text{EY} = \frac{\text{CT} - \text{CS}}{\text{CT}} \times 100$$

(E_y: Enkapsülasyon verimi, C_T: Başlangıç çözeltideki total protein miktarı, C_s: Süpernatantta bulunan total protein miktarı)

3.2.2 8-OHdG poliklonal antikor ve horseradish peroksidaz içeren nano çiçek (8-OHdG pab/HRP-NFs) sentezi-2

Sentez için bir önceki prosedürde nano çiçek yapının oluşmaması ihtimaline karşılık 8-OHdG pab ve anti-rabbit IgG-HRP'ın daha yüksek konsantrasyonları test edildi. Bu amaçla 10 mL'lik falkon tüplere fosfat tamponu ve 0.8 mM konsantrasyonda olacak şekilde CuSO₄ çözeltisinden ilave edildi. Ardından 8 µL hacimde (8 µg konsantrasyonda) 8-OHdG pab eklendi. Takiben üzerine 0,02 mg/mL anti-rabbit IgG-HRP eklenerek karıştırıldı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renkli pellet 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek ortamdan ayrıldı. Ürün yıkanıp kurutulmasının ardından sonraki analizlerde kullanılmak üzere saklandı.



Şekil 12. ELISA plakası üzerinde nano çiçek sentezi

3.2.3. Bradford yöntemi ile protein tayini

Sentezlenen yapıların protein miktarı Bradford yöntemine (Bradford, 1976) göre belirlendi. Bu yöntem Bradford solüsyonunda bulunan 'Coomassie Brilliant Blue' boyar maddesinin proteinleri bağlaması temeline dayanmaktadır ve standart olarak bovin serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Stok BSA çözeltisinden 0.1-1,0 mg/mL konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak optik dansiteler 595 nm'de spektrofotometrede ölçüldü ve standart grafiğe göre protein konsantrasyonları belirlendi.

3.2.4. Nano çiçeklerin karakterizasyonu

Yapının morfolojisini aydınlatmak için alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) (ZEISS GEMINI 500), yapıda bulunan elementlerin varlığını doğrulamak için enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi (EDX) (ZEISS GEMINI 500), kristal ve kimyasal yapısını analiz etmek için X-ışını Kırınım yöntemi (XRD) (Panalytical) ve sentezlenen yapının kimyasal yapısını onaylamak için FTIR Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (PERKIN ELMER 400 FT-IR) kullanıldı. Biotin Ab-NFs içerisinde ve 8-OHDG pab/HRP-NFs içerisinde C, O, P ve Cu, elementlerinin homojen bir şekilde dağılıp dağılmadığını görebilmek adına element haritalama analizi yapıldı.

3.2.5. Enzimle İşaretli İmmünosorbent Analiz Deneyleri

Ticari kitin çalışma prensibi, sandviç ELISA-Biyotin/Streptavidin-HRP konjugat sistemidir. Çalışmanın test aralığı kitin çalışma aralığını oluşturan Çizelge 3.1.'de olduğu şekilde planlanmıştır.

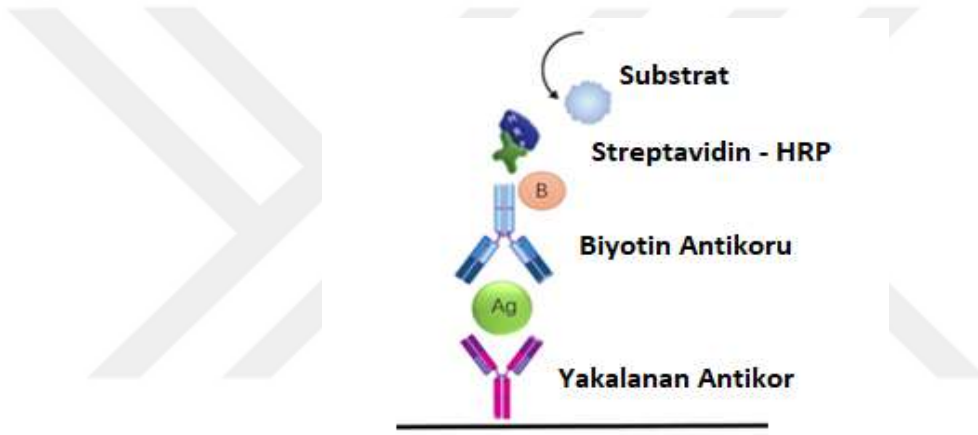
Bu tezde ticari olarak temin edilen ELISA kiti karşılaştırma ve kontrol amacı ile kullanılmıştır.

1. Ticari kitin protokolü kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

- 0,75-12 ng/mL konsantrasyon aralığında 8-OHDG standardı (kitin içeriğinde tarif edildiği şekilde) hazırlandı.
- Rabbit 8-OHDG antikoru ile kaplı kuyulara 50 µL 8-OHDG standardı ilave edildi.
- Üzerine 10 µL biyotin ile işaretlenmiş anti-8-OHDG antikoru ilave edildi.
- Ardından 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi. Kör üzerine Streptavidin-HRP eklenmedi.
- Karıştırıldıktan sonra üzeri kapatılıp, 60 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Süre bitiminde plak 5 defa 300 µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Üzerine 50 µl substrat A ve 50 µL substrat B ilave edildi.
- Plak karanlıkta 37°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Süre bitiminde 50 µL stop solüsyonu kuyulara ilave edildi.
- 450 nm'de 10 dk içerisinde optik okuma yapıldı.

Çizelge 3.1. Ticari kitin standart test aralığı

Standart 8-OH-dG Konsantrasyonları (ng/mL)	
Standart No:5	12
Standart No:4	6
Standart No:3	3
Standart No:2	1.5
Standart No:1	0.75
Kör	Standart dilüent



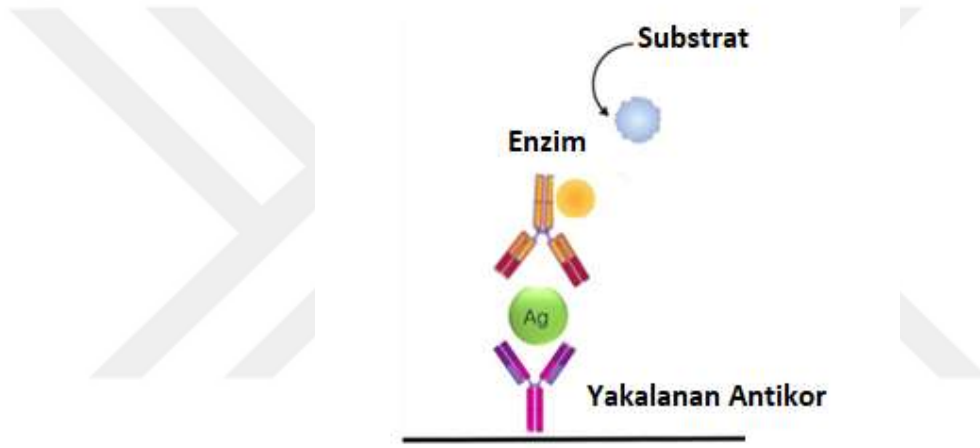
Şekil 13. Ticari kit protokolü (Streptavidin-biyotin işaretli sandviç ELISA)

2. Ticari kit içerisinde yer alan standartlar biyotin ile işaretlenmiş olduğundan serbest formdaki bir 8-OHDG ile de kitin aynı sonucu verip vermediğini test etmek için kitin rabbit 8-OHDG antikoru ile kaplı kuyuları üzerine işaretli 8-OHDG ve takiben biyotinlenmiş anti-8-OHDG antikoru ilave edilerek kit protokolü tekrarlandı. 8-OHDG, ticari kitin standart aralığı dikkate alınarak 0.75-12 ng/mL konsantrasyon aralığında hazırlandı.

3. Sentezlenen organik-inorganik hibrit nano çiçeklerin ELISA’ da kullanımı test edildi. Bu amaçla kitin protokolü nano çiçeklerin kullanımına uygun şekilde birkaç revizyonla tekrarlandı. Deney basamakları aşağıdaki gibidir.

- 0.75-12 ng/mL konsantrasyon aralığında işaretli 8-OHDG standardı hazırlandı.
- Rabbit 8-OHDG antikoru ile kaplı kuyulara 50 µL 8-OHDG standartlarından ilave edildi.
- Üzerine 10 µL biyotin Ab-NFs ilave edildi. (100 µg/mL NFs PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlandı.)

- Üzerine 50 μ L streptavidin-HRP ilave edildi. Kör üzerine streptavidin-HRP ilave edilmedi.
- Karıştırıldıktan sonra üzeri ile kapatılıp 60 dk 37°C’de inkübe edildi.
- Süre bitiminde plaka 5 defa 300 μ L yıkama tamponu ile yıkandı.
- Üzerine 50 μ L substrat A ve 50 μ L substrat B ilave edildi.
- Plak karanlıkta 37°C’de 10 dk inkübe edildi.
- Süre bitiminde 50 μ L stop solüsyonu kuyulara ilave edildi.
- 450 nm’de 10 dk içerisinde optik okuma yapıldı.

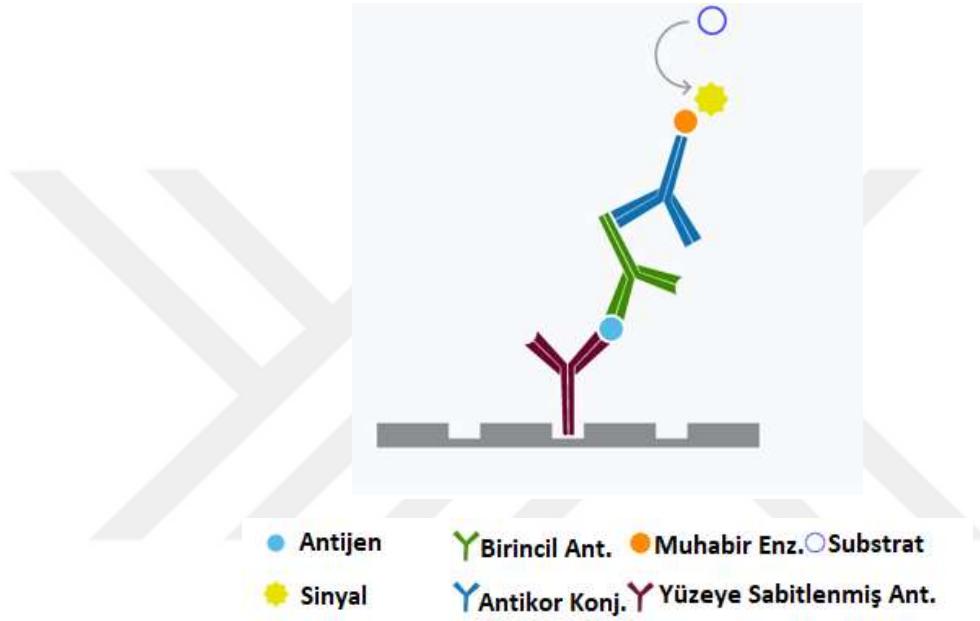


Şekil 14. Direkt sandviç ELISA

4. Antijen-antikor çifti oluşturarak test sistemi geliştirildi.

8-OHdG poliklonal antikorunun (8-OHdG pab) kullanım kılavuzunda ELISA için tavsiye edilen kullanım miktarı dikkate alınarak seyreltme 1:1000 oranında PBS tampon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 8-OHdG pab, her kuyucuğa 100 μ L hacimde eklenerek plak kaplandı. Kaplanan plaka +4°C’de gece aşırı inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün çıkarılarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda plak aspire edildi ve havlu kâğıda iyice vurularak kurutuldu. Üzerine PBS içerisinde hazırlanmış 1X stabilcoat kullanılarak 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı. Ardından %0.05 (v/v) Tween 20 içeren PBS’den her kuyucuğa 100 μ L eklenerek 3 defa yıkama yapıldı. Yıkama işlemini takiben plakaya PBS’de hazırlanmış olan 6.25-100 ng/mL konsantrasyon aralığında 8-OHdG eklendi ve 40 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre bitiminde plak içi aspire edildi ve 3 defa yıkama yapıldı. Üzerine 1:1000 konsantrasyonda 8-OHdG pab PBS içerisinde seyreltilerek ilave edildi. 40 dk inkübasyon sonunda plak içi aspire edildi. 3 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra

sekonder antikor olarak 1:4000 konsantrasyonda anti-rabbit IgG-HRP sekonder antikorunu stabilzyme içerisinde seyreltildi ve 100 µL olacak şekilde ilave edildi. 40 dk inkübasyon sonunda 3 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) eklendi. Karanlıkta 15 dakika bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinde 50 µL her kuyucuğa eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Optik dansiteler 450 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Deneyde kör olarak PBS kullanıldı.



Şekil 15. Sandviç ELISA

5. Bu deneyde, bir önceki ELISA test sisteminden sekonder antikor basamağı kaldırılarak 8-OHdG pab ve anti-rabbit IgG-HRP içeren nano çiçekler kullanıldı.

Test için tavsiye edilen kullanım miktarı dikkate alınarak 1:1000 oranında PBS'de seyreltilen 8-OHdG pab, her kuyucuğa 100 µL hacimde eklenerek plak kaplandı. Kaplanan plak 4°C'de gece aşırı inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün +4°C'den çıkarılarak, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda plak aspire edildi ve havlu kâğıda iyice vurularak kurutuldu. Üzerine PBS içerisindeki 1X stabilcoat ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı. Ardından %0.05 (v/v) Tween 20 içeren PBS'ten her kuyucuğa 100 µL eklenerek 3 defa yıkama yapıldı. Yıkama işlemini takiben plakaya PBS'de hazırlanmış olan 6.25-100 ng/mL konsantrasyon aralığında 8-OHdG eklendi ve 40 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre bitiminde plak içi aspire edildi, 3 defa yıkama yapıldı. Üzerine 10 µL PBS (pH 7.4) içerisinde 10 µg/mL konsantrasyonda seyreltilmiş 8-OHdG pab ve NFs ilave edildi. 60 dk inkübasyon sonunda plak içi aspire edildi. 3 kez

yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 100 µL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) eklendi. Karanlıkta 15 dakika bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinde 50 µL her kuyucuğa eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Optik dansiteler 450 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Deneyde kör olarak PBS kullanıldı.

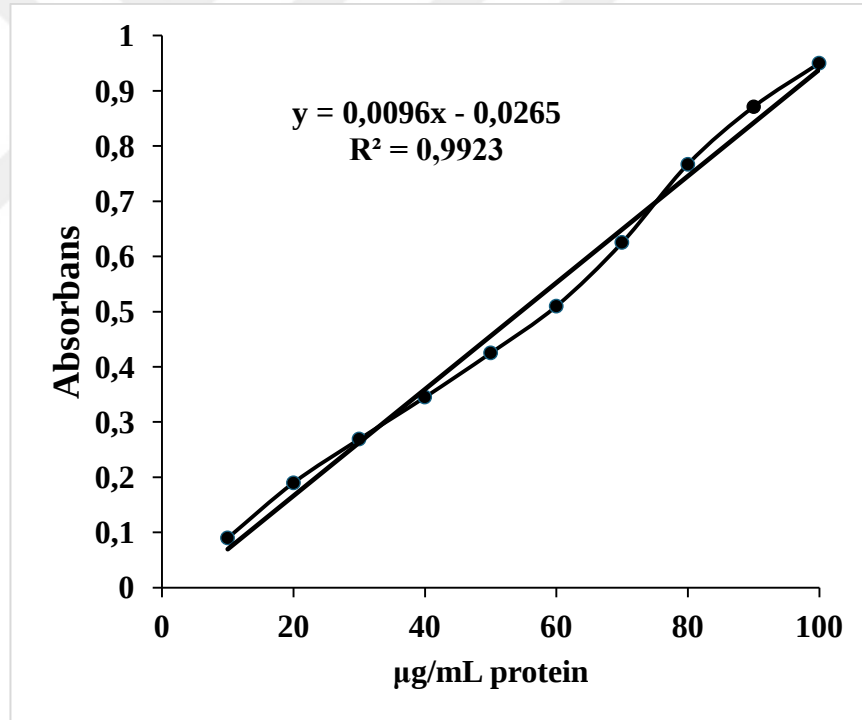
Her bir analizde belli konsantrasyonlarda 8-OHdG spike edilmiştir ve geri kazanım oranları belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Biyotin Ab/NFs ve 8-OHdG pab/HRP/NFs materyalleri sentezi sonrası oluşan mavi renkli ürünlerde çiçek şekilli hibrit nano yapılar gözlemlendi. Süpernatanta Bradford yöntemi uygulanarak protein tayini yapılmıştır. Protein tayini için 0.1-1.0 µg/mL konsantrasyonlarda standart albümin çözeltisi hazırlanarak standart BSA kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 16). Elde edilen grafikten biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin enkapsülasyon oranları sırasıyla %95 ve %97 bulunmuştur. Biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin enkapsülasyon oranları sırasıyla %95 ve %97 bulunmuştur. Elde edilen total ürün miktarı sırasıyla 10 mg ve 8 mg olup, ortalama ağırlık verimleri ise sırasıyla %5,78 ve %3,64 belirlenmiştir.

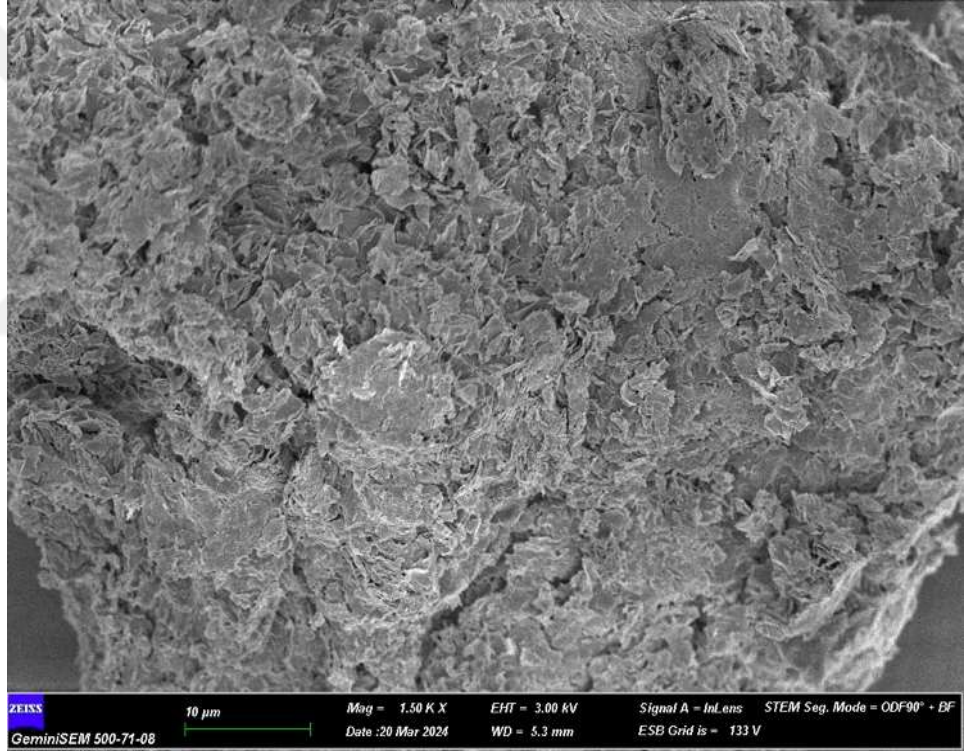


Şekil16. BSA standart grafiği

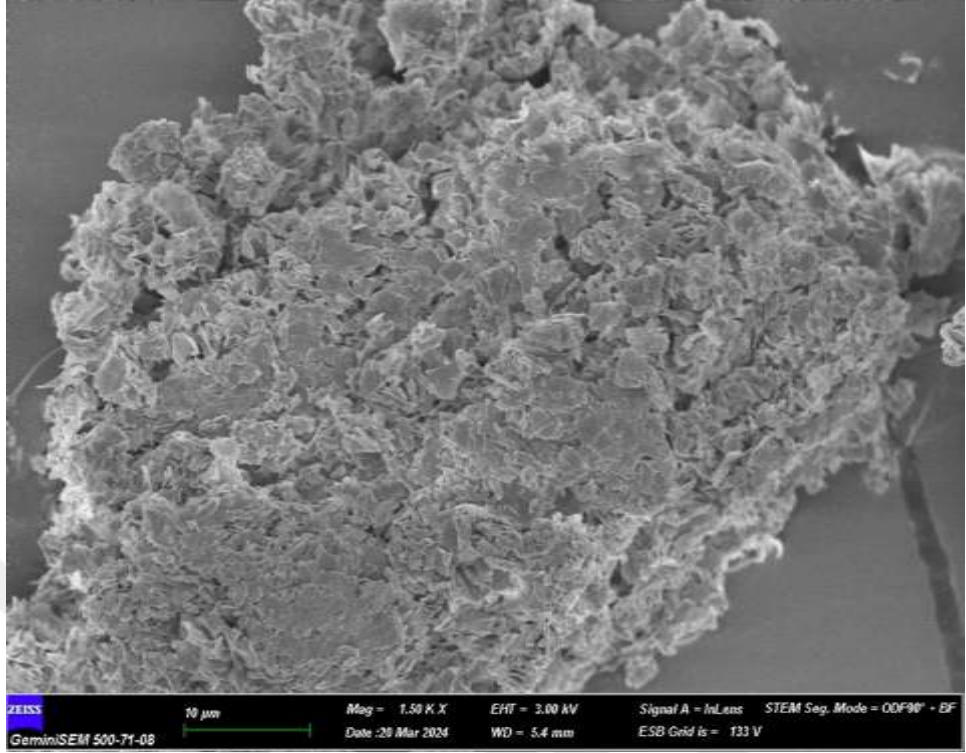
4.2. SEM Görüntüleri

Konjugat olarak kullanılmak üzere sentezlenen hibrit nano çiçek yapılardan 1 ve 2 µL biyotin-Ab kullanılarak sentezlenen materyallerde çiçek benzeri bir yapı elde edilmemiştir (Şekil 17 ve 18), 4 µL biyotin-Ab'nin kullanıldığı sentez sonucunda çiçek morfoloji (Biyotin Ab-NFs) gözlemlenmiştir (Şekil 19). Bir diğer hibrit konjugat olan 8-OHdG pab/HRP-NFs sentezi için 1, 2 ve 4 µL 8-OHdG pab ve 0.008 mg/mL anti-

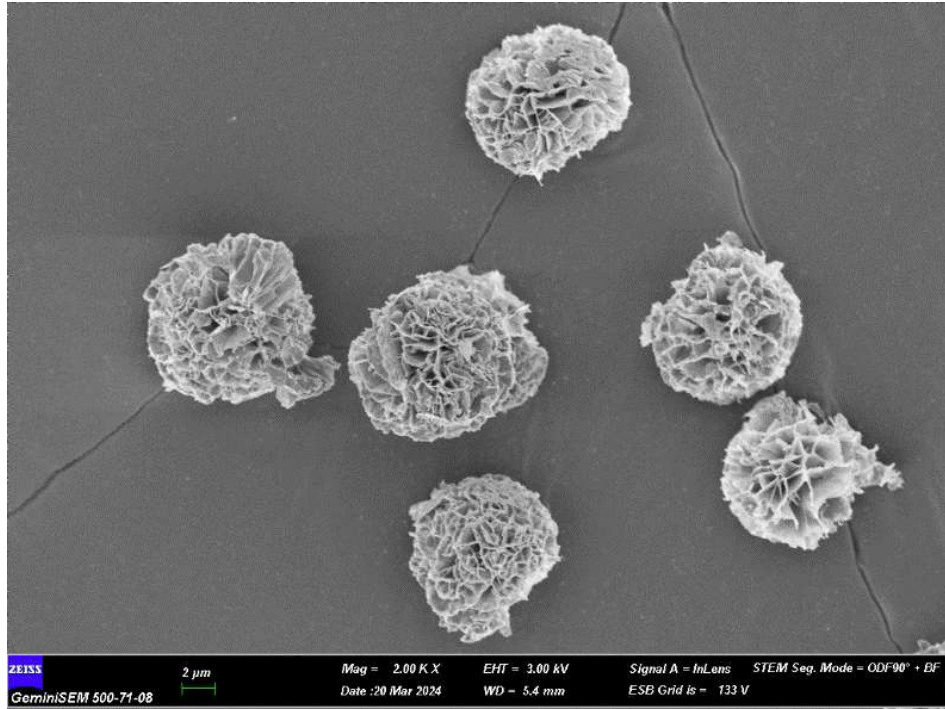
rabbit IgG-HRP kullanılarak yapılan sentez sonucu çiçek benzeri bir morfoloji gözlenmediğinden (Şekil 20) 8-OHdG pab ve anti-rabbit IgG-HRP konsantrasyonları değiştirilerek yeniden sentez test edildi. 8-OHdG pab'ın 8 μ L ve anti-rabbit IgG-HRP'nin 0,02 mg/mL konsantrasyonda kullanıldığı deneyde elde edilen ürünün çiçek şekilli morfolojiye sahip olduğu kaydedildi (Şekil 21). Bu nano çiçekler hem biyotin Ab-NFs hem de 8-OHdG pab/HRP-NFs için benzer yapıda olup tek tip morfolojiye sahiptir. Biyotin Ab-NFs çapı yaklaşık 8-10 μ m iken 8-OHdG pab/HRP-NFs çapı yaklaşık 4-5 μ m olarak ölçülmüştür. Çiçek morfoloji tespit edildikten sonra diğer analizler gerçekleştirilmiştir.



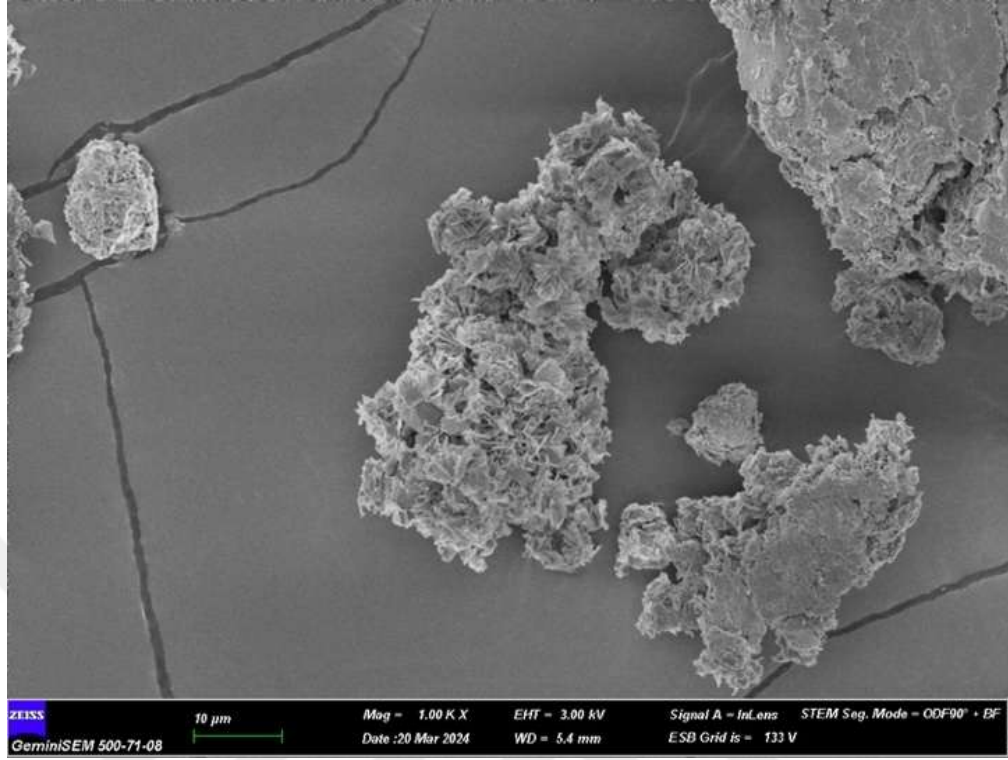
Şekil 17. Biyotin Ab-NFs (1 μ L) SEM görüntüsü



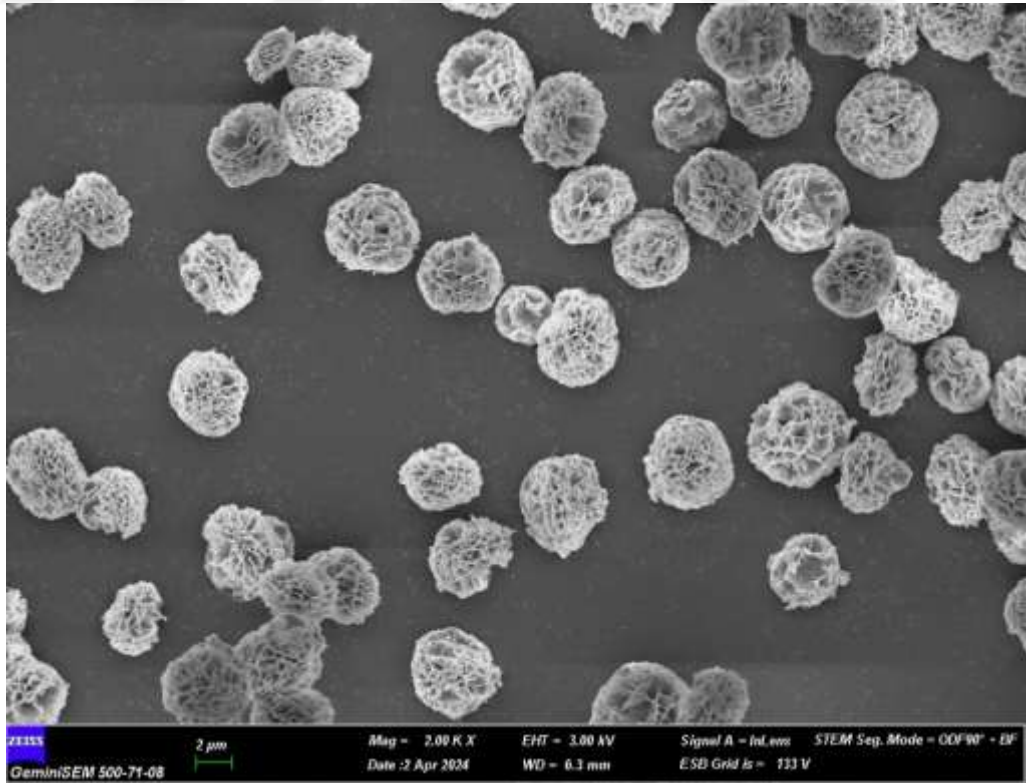
Şekil 18. Biotin Ab-NFs (2 µL) SEM görüntüsü



Şekil 19. Optimum sentez olarak kabul edilen biyotin Ab-NFs'nin (4 µL) SEM görüntüsü



Şekil 20. 8-OHdG pab/HRP-NFs sentez denemesi SEM görüntüsü



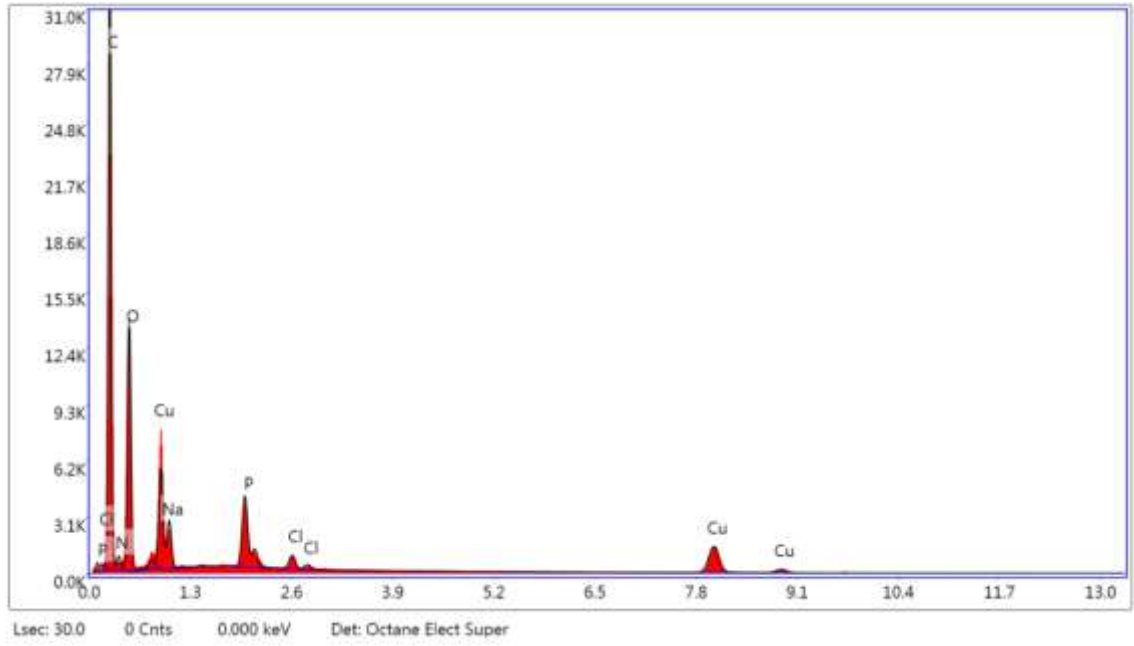
Şekil.21. 8-OHdG pab/HRP-NFs SEM Görüntüsü



Şekil 22. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin görüntüsü

4.3. EDX Analizi

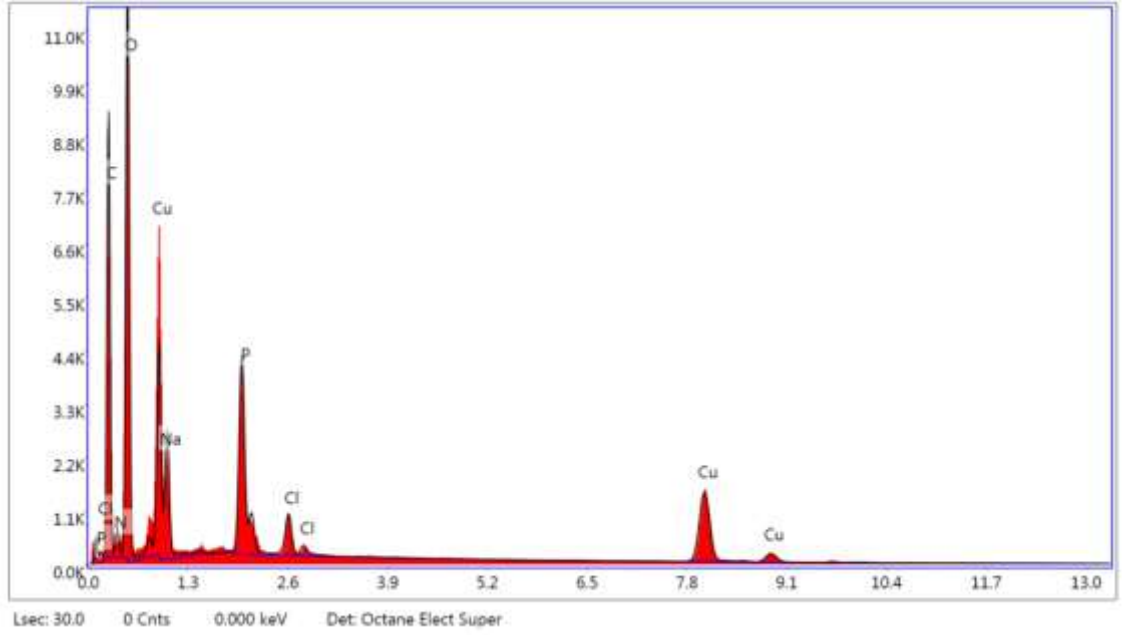
Hibrit nano çiçek konjugat yapılarda bulunan Cu^{2+} metal iyonunun varlığı EDX analizi ile doğrulanmıştır. Biotin Ab-NFs'e ait EDX spektrumunda görüldüğü gibi (Şekil 23) Cu, C, N, O, Na, P ve Cl elementlerinin yapıdaki dağılımları belirlendi. Konjugat yapının Cu^{2+} ağırlığı ve atomik yüzdesi sırasıyla %6.71 ve %1,52 olarak ölçüldü. C, N, O, Na, P ve Cl elementlerinin spektrumdaki atomik yüzdeleri ise sırasıyla %66.19, %3.11 %26.03, %1.77, %1.16 ve %0.23 olarak kaydedildi (Çizelge 4.1.). 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin Cu^{2+} ağırlığı ve atomik yüzdeleri sırasıyla %12.21 ve %3.09 olarak ölçülürken C, N, O, Na, P ve Cl elementlerinin atomik yüzdeleri %50.75, %4.0, %35.47, %3.63, %2.54 ve %0.51 belirlendi (Şekil 24. ve Çizelge 4.2.)



Şekil 23. Optimum koşullarda sentezlenmiş biyotin Ab -NFs EDX analizi

Çizelge 4.1. Biyotin Ab -NFs elementlerin dağılımı

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.
C K	55.36	66.19	5478.01
N K	3.03	3.11	99.96
O K	29	26.03	2637.21
NaK	2.83	1.77	586.49
P K	2.51	1.16	1171.11
ClK	0.56	0.23	249
CuK	6.71	1.52	791.12



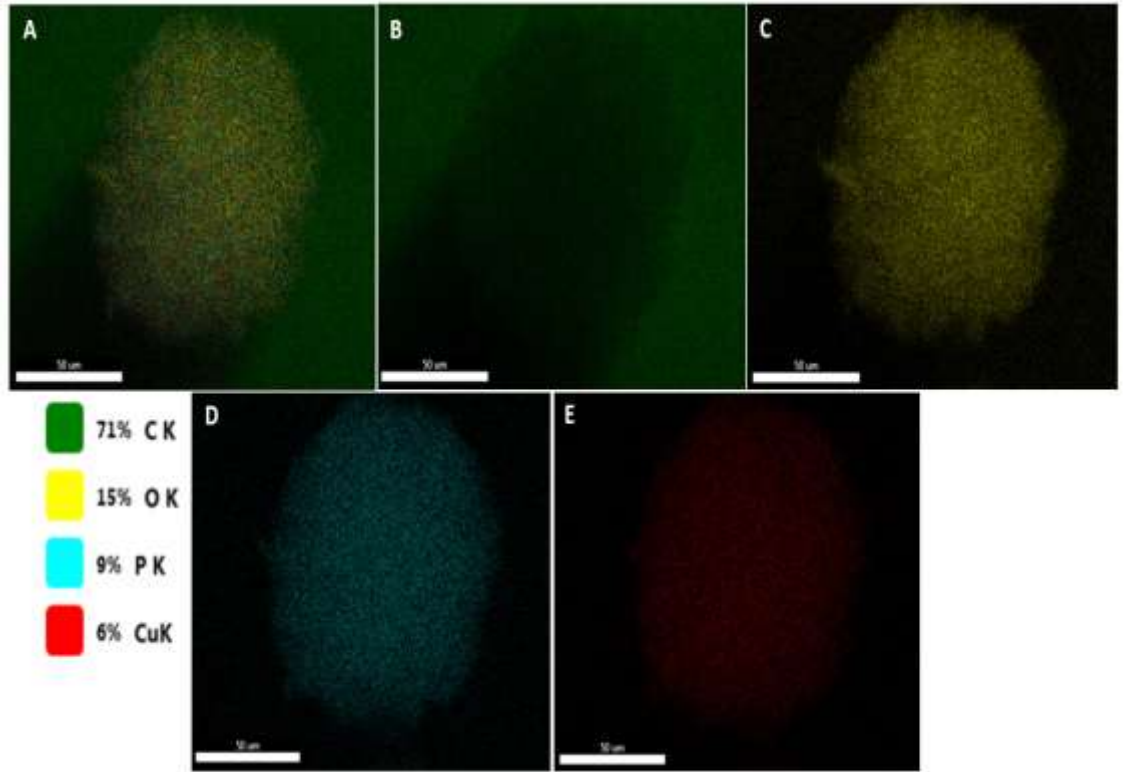
Şekil 24. 8-OHdG pab/HRP-NFs EDX analizi

Çizelge 4.2. 8-OHdG pab/HRP-NFs elementlerin dağılımı

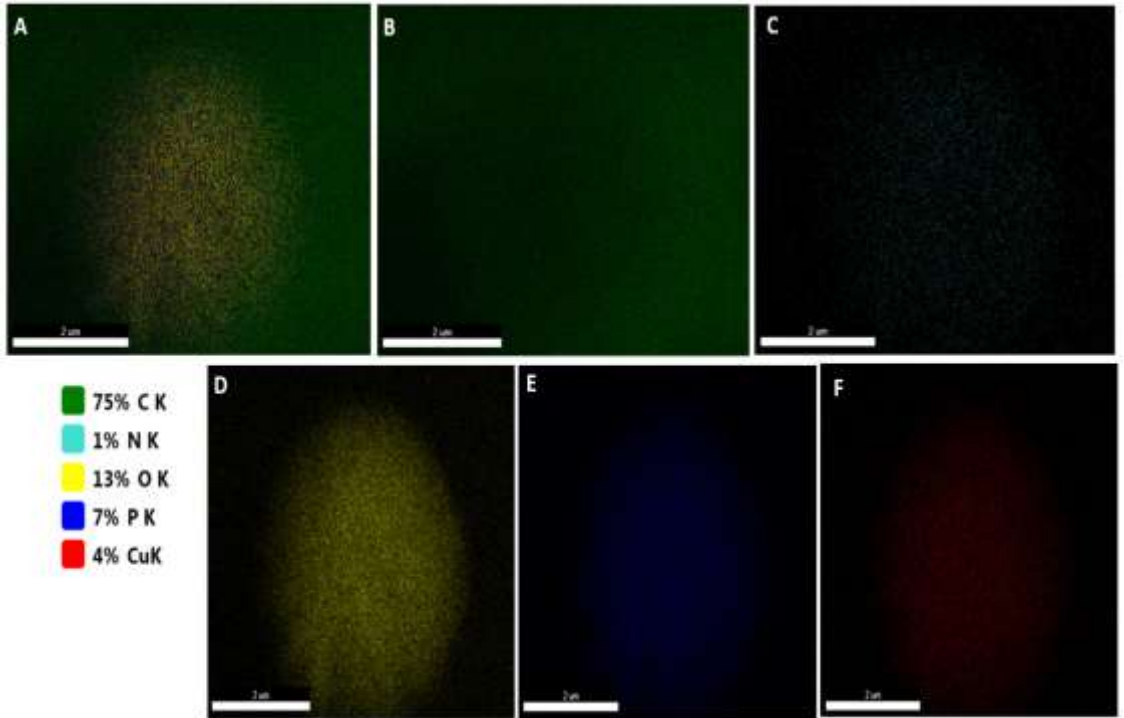
Element	Weight %	Atomic %	Net Int.
C K	37.86	50.75	1504.04
N K	3.48	4	85.41
O K	35.25	35.47	2320.03
NaK	5.19	3.63	538.58
P K	4.89	2.54	1224.45
ClK	1.13	0.51	276.01
CuK	12.21	3.09	803.12

4.4. Elemental Haritalama

Elementel haritalamalar incelendiğinde Şekil 25'te görüldüğü üzere biyotin Ab-NFs içerisinde C, O, P ve Cu, elementlerinin homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Benzer şekilde 8-OHdG pab/HRP-NFs içerisinde de C, N, O, P ve Cu elementlerinin homojen şekilde dağılmıştır (Şekil 26).



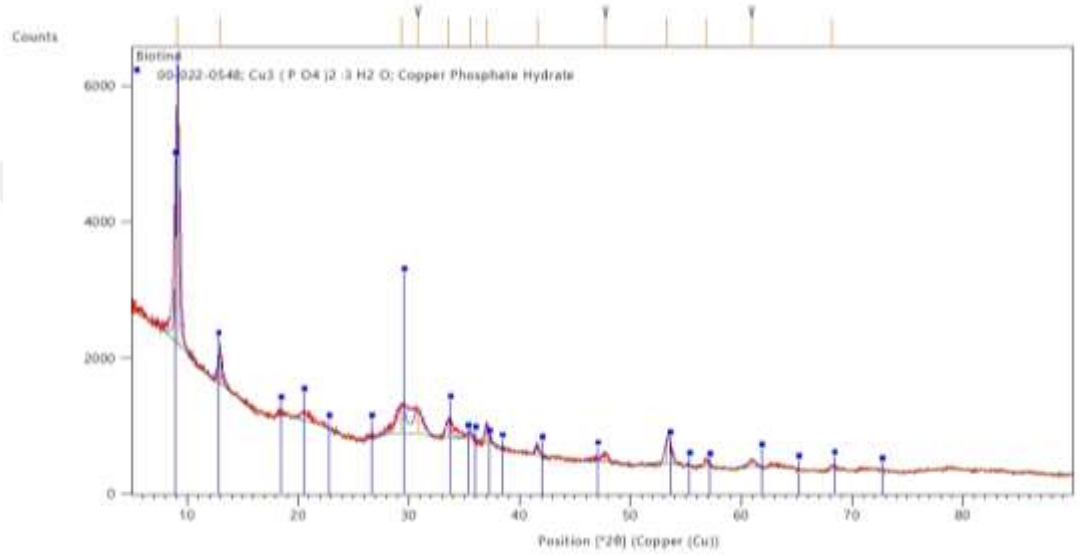
Şekil 25. Biyotin Ab -NFs'nin elementel haritalaması (A) Mix, (B) C, (C) O, (D) P ve (E) Cu



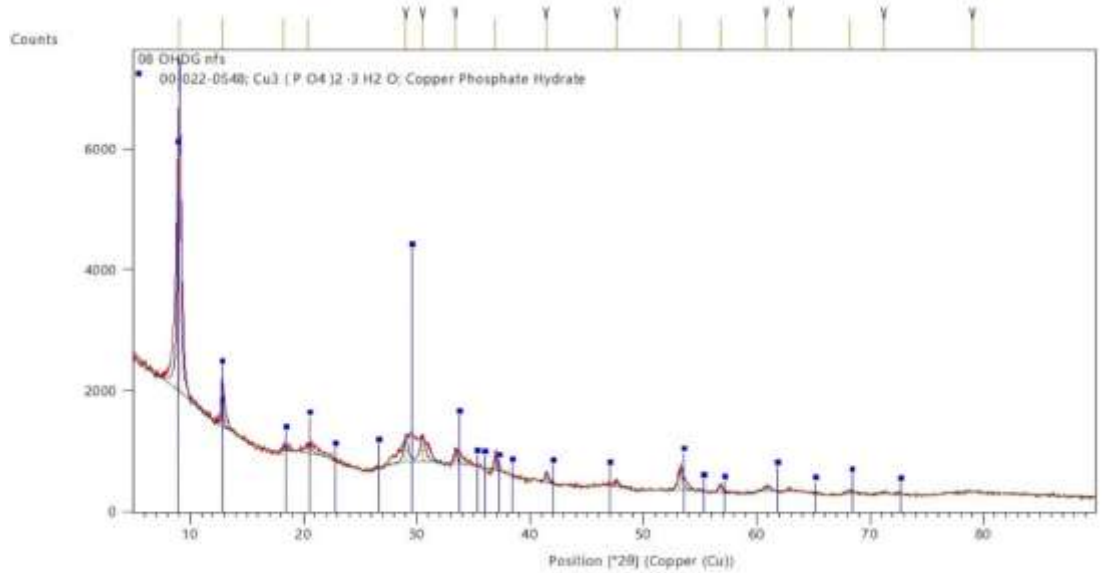
Şekil.26. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin elementel haritalaması. (A) Mix, (B) C, (C) N, (D) O, (E) P ve (F) Cu

4.5. XRD Analizi

Biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs' lerin parçacık boyutu, faz dengesi ve kristal yapısının ölçümü XRD ile araştırıldı. Biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs spektrumları analiz edildiğinde JCPDS kartı (00-022-0548) numaralı $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kristal yapısı ile her iki spektrumun tüm kırınım zirveleri iyi bir şekilde eşleştiğı görüldü (Şekil 27 ve Şekil 28).



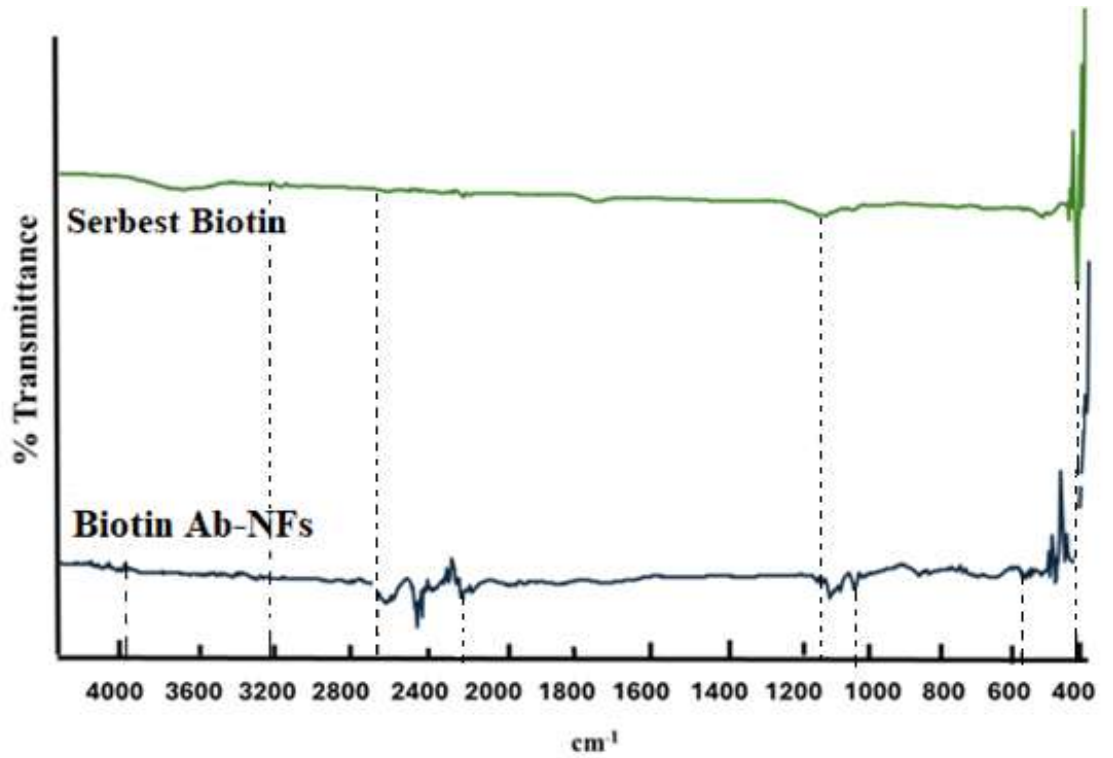
Şekil 27. Biyotin Ab-NFs'nin XRD analiz grafiğı



Şekil 28. 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin XRD analiz grafiğı

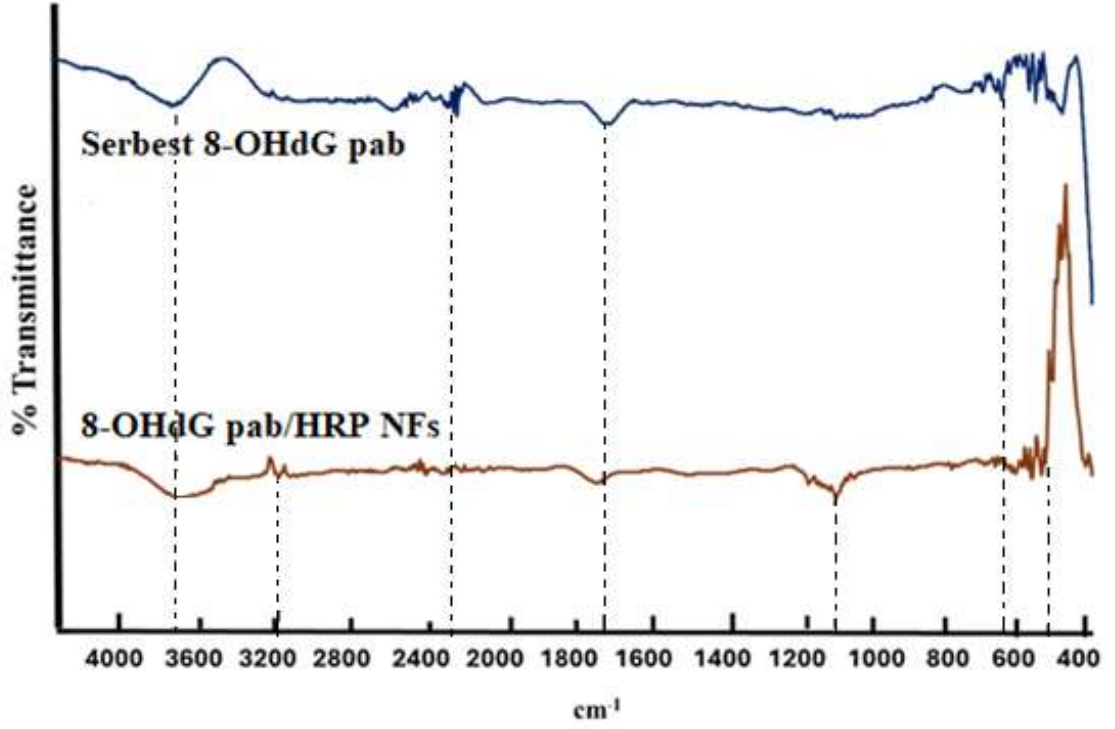
4.6. FTIR Analizi

Serbest biyotin ve biyotin Ab-NFs hakkında bilgi sahibi olmak ve hibrit yapı formuna geçildiğinde serbest yapıda meydana gelen değişiklikleri incelemek için FTIR spektrum analizi yapılmıştır. Serbest biyotin ve biyotin Ab-NFs'in karakteristik pikleri sırasıyla verilen FTIR spektrumunda gösterilmiştir (Şekil 29). Serbest formda $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2400\text{ cm}^{-1}$, $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ civarında pik vermektedir. Bu pikler biyotin Ab-NFs'de de gözlemlenmiştir.



Şekil 29. Biotin Ab-NFs ve serbest biyotinin FTIR analiz grafiği

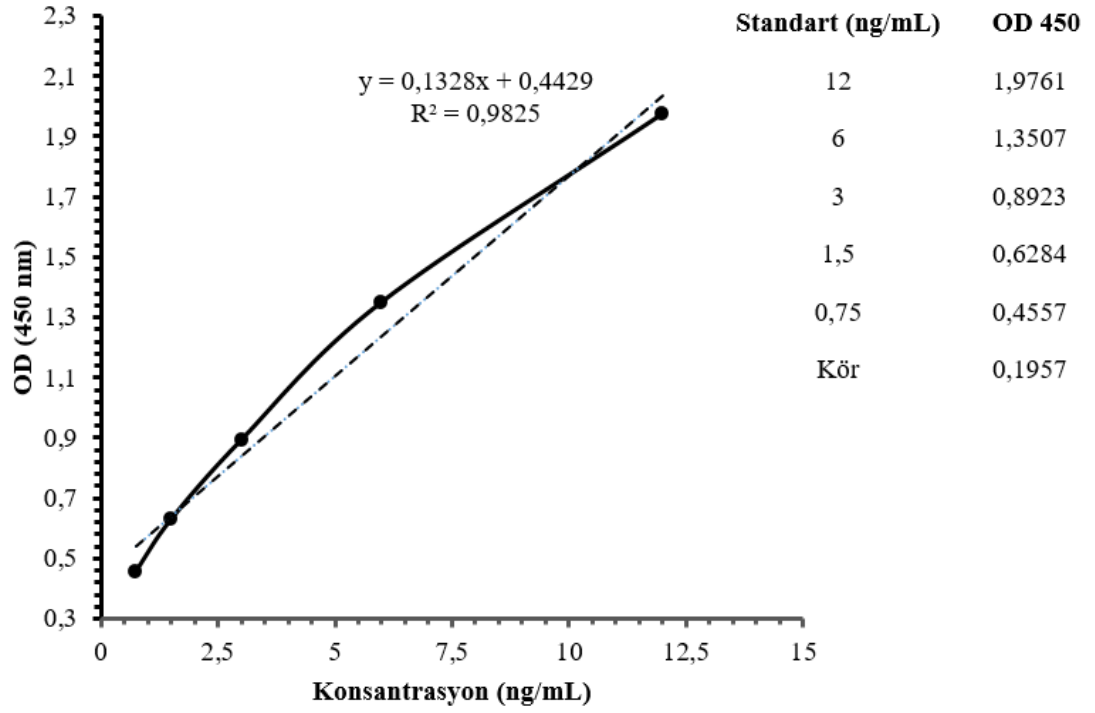
Aynı şekilde serbest 8-OHdG pab ve 8-OHdG pab/HRP NFs'nin FTIR spektrum analizi gerçekleştirilmiştir. Serbest 8-OHdG ve 8-OHdG pab/HRP NFs'nin karakteristik pikleri sırasıyla verilen FTIR spektrumunda gösterilmiştir (Şekil 30). 8-OHdG pab/HRP NFs'de görüldüğü üzere, $\sim 500\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 3700\text{ cm}^{-1}$ civarında pik vermektedir.



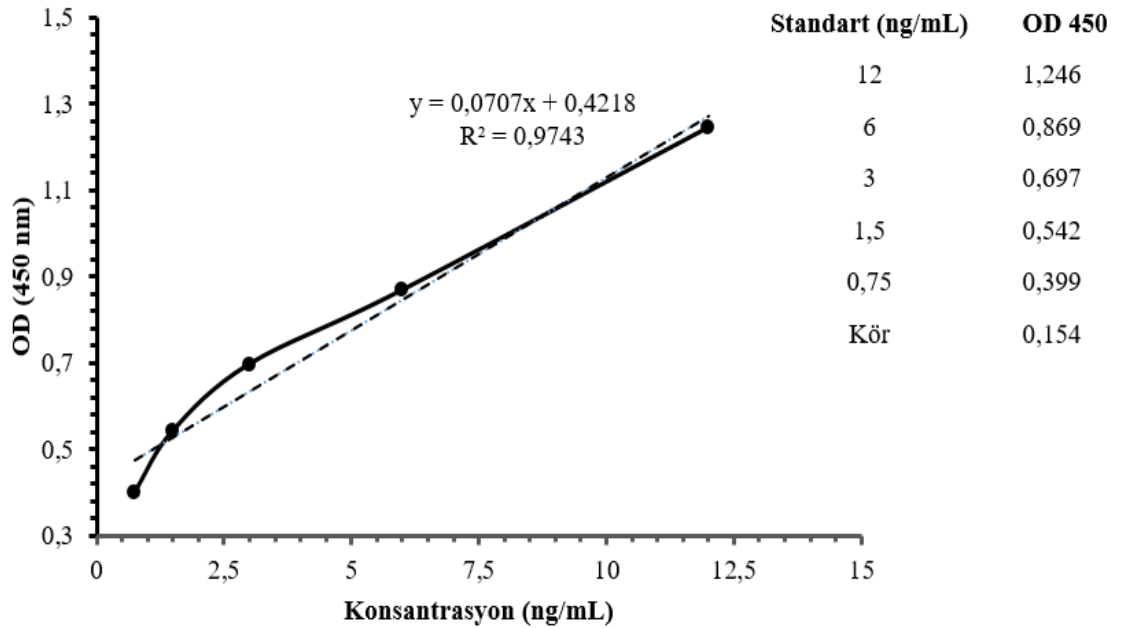
Şekil 30. 8-OHdG pab/HRP-NFs ve serbest 8-OHdG'nin FTIR analiz grafiği

4.7. ELISA Deney Sonuçları

Deney 1'de belirtildiği şekilde ticari kitin kullanım kılavuzu olduğu gibi uygulandı ve Şekil 31'de görülen sonuçlar elde edildi. Kontrol amacı ile gerçekleştirilen ticari kit protokolünde standartlar biyotin ile işaretlenmiş 8-OHdG antikoru içerdiğinden ayrıca işaretsiz 8-OHdG antikoru ile deney tekrarlandı (**Deney 2**). Bu sonuçlara göre standartların optik dansitelerinde bir miktar düşüşle birlikte standart kalibrasyon grafiği benzer şekilde bulundu (Şekil 32.).

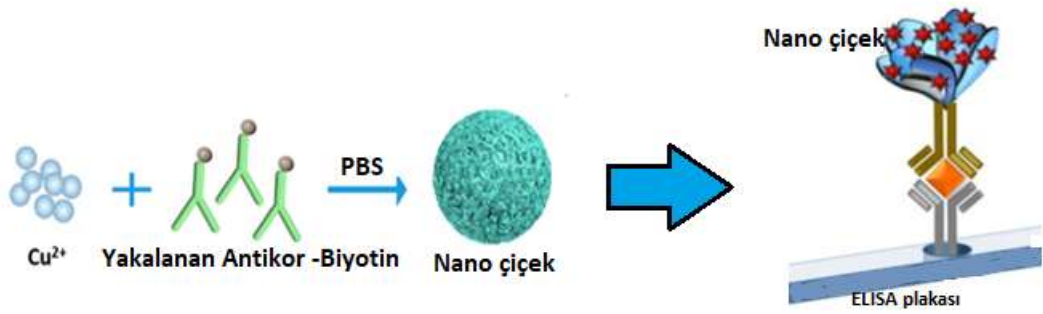


Şekil 31. Ticari kit protokolüne göre elde edilen standart grafik.

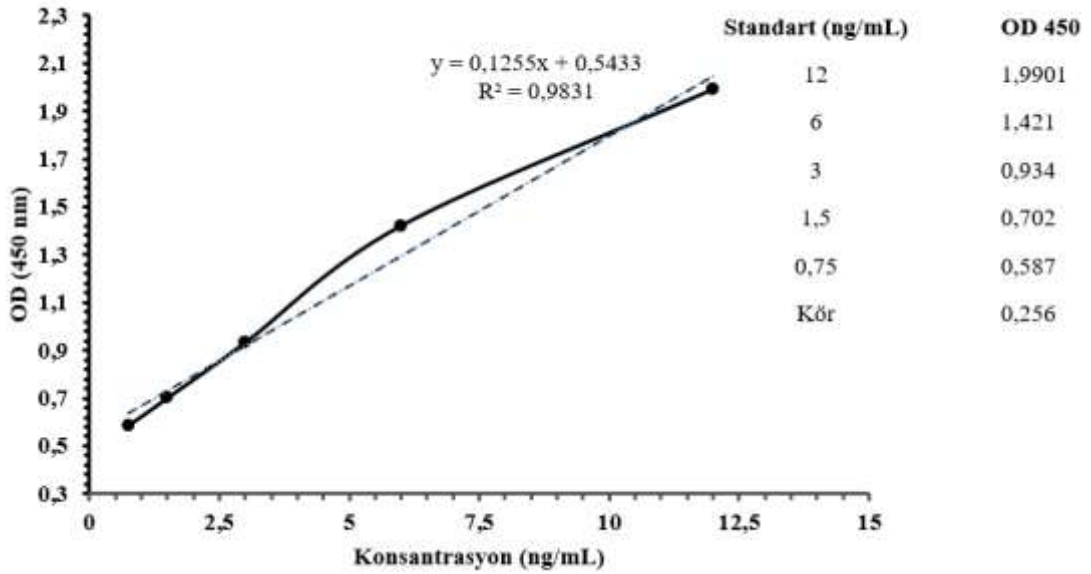


Şekil 32. İşaretsiz 8-OHdG antikorı ile tekrarlanan kit protokolünden elde edilen standart grafik

Deney 3: Sentezlenen organik-inorganik hibrit nano çiçeklerin ELISA’da kullanımını test etmek amacıyla biyotin-Ab-NFs sentezlendi ve ticari kit protokolünde birkaç revizyonla deney gerçekleştirildi (Şekil 34.). Elde edilen sonuçlar hibrit nano çiçek kullanımında tespit limitinin ticari ELISA sistemlerine yakın sonuç verdiğini göstermektedir. Biyotin ile işaretlenmiş anti-8-OHdG antikorunun kit protokolünde 10 µL direkt kullanımı önerilmiştir. Nano çiçek sentezinde ise 4 µL biyotin ile işaretlenmiş anti-8-OHdG antikoru kullanılarak 10 mg biyotin-Ab-NFs ürünü elde edilmiştir. ELISA testi kullanımında ise nano çiçekler 100 µg/mL hazırlanıp 10 µL/kuyu olacak şekilde uygulanmıştır.

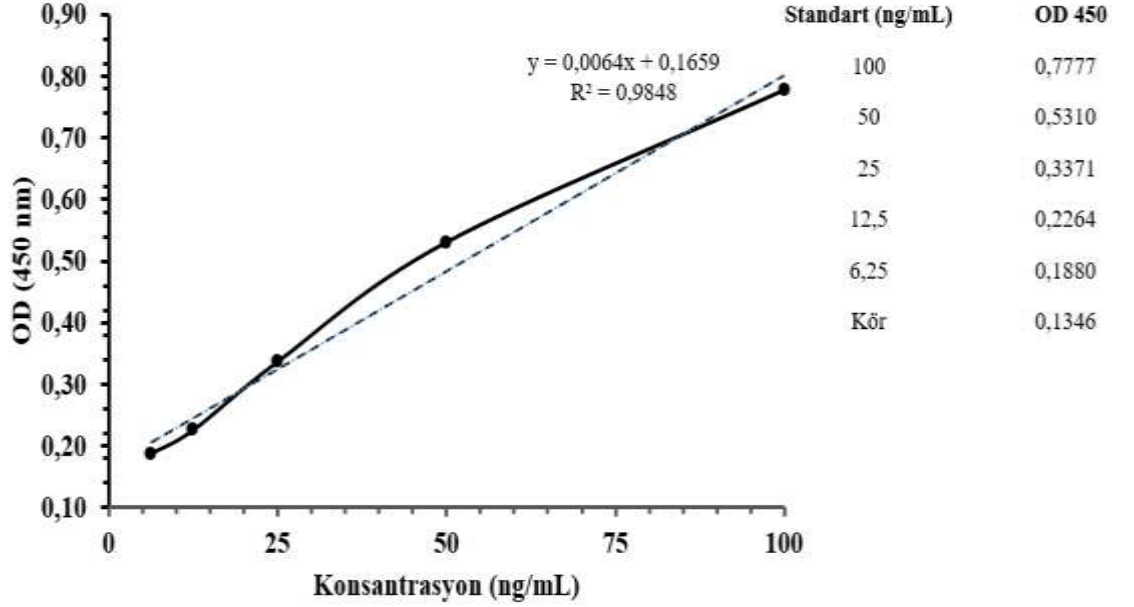


Şekil 33. Sentezlenen konjugat yapıdaki nano çiçekler



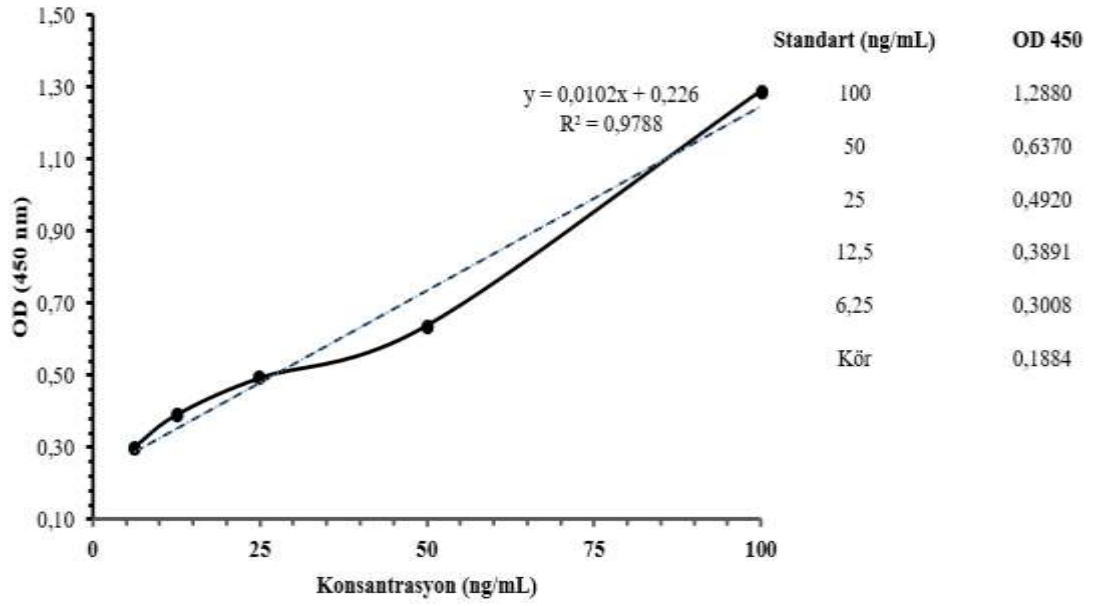
Şekil 34. Biyotin Ab-NFs’lerin kullanıldığı standart grafik

Deney 4: Daha önce belirtildiği şekilde antijen-antikor çifti oluşturarak geliştirilen ELISA test sisteminden elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir (Şekil 35.). 8-OHdG pAb hem kaplama hem de primer antikor olarak test sisteminde kullanılmıştır



Şekil 35. Antijen-antikor çifti oluşturarak gerçekleştirilen ELISA test sistemi standart grafiği

Deney 5: Deney 4'ten sekonder antikor basamağı kaldırılarak 8-OHdG pab ve anti-rabbit IgG-HRP içeren nano çiçekler kullanılarak test tekrarlanmıştır (Şekil 36.). Oluşturulan antijen-antikor çiftinde nano çiçek kullanımında tespit limiti ticari ELISA sistemlerine yakındır. Anti-8-OHdG pAb 100 µL olarak 1:1000 konsantrasyonda sentez ortamına ilave edilmiştir ve 8 µL anti-8-OHdG pAb kullanılarak 8 mg 8-OHdG pab/HRP-NFs ürünü elde edilmiştir. ELISA uygulamasında 10 µg/mL nano çiçek PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanıp 10 µL/kuyu olacak şekilde kullanılmıştır.



Şekil 36. 8-OHdG pab/HRP-NFs'in kullanıldığı standart grafik

Her bir deneyde reaksiyon ortamına spike edilen 8-OHdG konsantrasyonları ve geri kazanım oranları Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Her bir deneyde spike edilen 8-OHdG konsantrasyonları ve geri kazanım oranları

Deney	Standart (ng/mL)	Denklem	R ²	Spike edilen 8-OHdG miktarı (ng/mL)	Spike edilen 8-OHdG Absorbansı	Geri Kazanım miktarı (ng/mL)	Geri Kazanım Standart Sapma
1	0,75-12	$y=0,1328x+0,4429$	0,9825	10	1,7300	9,69	0,22
2	0,75-12	$y=0,0707x+0,4218$	0,9743	5	0,8100	5,49	0,35
3	0,75-12	$y=0,1255x+0,5433$	0,9831	5	1,1120	4,53	0,33
4	6,25-100	$y=0,0064x+0,1659$	0,9848	40	0,4600	45,95	4,21
5	6,25-100	$y=0,0102x+0,2260$	0,9788	40	0,6713	43,66	2,59

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşayan aerobik organizmalarda, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi, hücre hasarı ve sonuç olarak hücre ölümleri üzerindeki etkileri nedeniyle birçok biyolojik süreç ve hastalığın nedeni olarak kabul edilmektedir. ROS oluşumu yaşlanma, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ve ayrıca kanserle ilişkilidir (Alqahtani vd., 2023). Kronik ve birikimli oksidatif stres, DNA, lipitler ve proteinler dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerde hasar verici değişikliklere neden olur. Bu bağlamda, DNA hidroksilasyonu yoluyla 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumu, oksijen radikal kaynaklı mutagenезin önemli bir mekanizmasıdır (Valavanidis vd., 2009). 8-OHdG, oksitlenmiş guanin lezyonlarının bir onarım ürünüdür ve oksidatif stresin uygun bir biyobelirteci olarak kabul edilmiştir (Urbaniak, 2020). 8-OHdG sıklıkla ölçülen ve baz hasarı ürünleri arasında en bilenen bir DNA hasarı parametresidir. Bu nedenle çeşitli biyolojik numunelerde 8-OHdG düzeylerinin ölçümü oksidatif DNA hasarının direkt indikatörü olarak kabul edilmektedir (Chiorcea and Paquim, 2022; Sancar vd., 2021).

Oksidatif stres seviyelerindeki artış ile karsinogenez arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Saha, 2017). Hücre zarlarının, proteinlerin ve DNA'nın lipidlerinde kalıcı olarak oksidatif hasar meydana geldiğine dair kapsamlı deneysel kanıtlar vardır. Nükleer ve mitokondriyal DNA'da, 8-OHdG veya 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG), serbest radikal kaynaklı oksidatif lezyonların baskın formlarından biridir ve bu nedenle oksidatif stres ve karsinogenez için bir biyobelirteç olarak yaygın olarak kullanılmıştır. Çalışmalar, idrar 8-OHdG'nin çeşitli kanserler ve dejeneratif hastalıkların risk değerlendirmesi için iyi bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir (Graille vd., 2020). 8-OHdG ölçümüne yönelik en yaygın kullanılan kantitatif analiz yöntemi, elektrokimyasal algılama (EC) ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ve HPLC tandem kütle spektrometresidir (Khelfi 2024).

Son yıllarda yapılan tüm araştırma çabalarına rağmen, kanser için erken teşhis hala sağ kalım için en önemli belirleyicidir. Bu nedenle, geniş tarama programlarında yürütülen oksidatif stres biyobelirteç analizlerine olan talep kritiktir. Hali hazırda 8-

OHdG biyomolekölü, idrar (Lee vd., 2010; Subash vd., 2010; Wang vd., 2014), tükürük (Guan vd., 2014), kan (Bolner vd., 2011) ve doku (Arnett vd., 2005) gibi çeşitli biyolojik örneklerde ölçülmektedir. Sağlıklı insanlarda ortalama 8-OHdG seviyelerinin yaklaşık 20 ng/mL olduğu ve oksidatif stres arttıkça bu değerin arttığı bulunmuştur (Cutler, 2002). Bir diğer çalışmada parkinson hastalarında 8-OHdG düzeylerinin sağlıklı kontrollerden 2-3 kat daha yüksek olabileceğini gösterilmiştir (Bolner vd., 2011). Ayrıca kardiyovasküler hastalarının kontrollerden daha yüksek 8-OHdG seviyeleri gösterdiği görülmüştür. Meta-regresyon modelleri, yaşın, hipertansiyonun ve erkek cinsiyetinin kardiyovasküler hastaları ve kontroller arasındaki 8-OHdG seviyelerindeki farkı önemli ölçüde etkilediğini analizlerle test edilmiştir (Minno vd., 2016). Bu nedenle, 8-OHdG değerlendirmesi için oldukça hassas (nanomolar düzey) metodolojilere ihtiyaç vardır. Alternatif olarak, literatürde çoğunlukla elektrokimyasal veya kuvars kristal mikro terazisi tespit modlarına dayanan birkaç biyoalgılama cihazı bildirilmiştir. Bu tür cihazlar, camsı karbon (Gutiérrez vd., 2016) destekler üzerindeki aktif redoks özelliklerini kullanarak, çok duvarlı karbon nanotüpler veya grafen gibi yüksek iletkenliğe sahip nanomalzemelerle modifiye edilmiş 8-OHdG'nin doğrudan okunmasını sağlamaktadır (Gabriela vd., 2016). Elektrokimyasal biyosensörlerde alternatif bir tanıma elemanı olarak plastik antikorlar, 8-OHdG tespitine yeni avantajlar getirebilir. Bu sentetik malzemeler moleküler baskılı teknoloji ile elde edilir ve doğal muadillerine göre daha uzun kararlılık özellikleri ve daha düşük üretim maliyetleri ile bağlantılıdır. Ek olarak, bu tür malzemeler 2008-2009 yıllarında bildirilmiştir ve o zamandan beri literatürde moleküler baskılı teknolojideki önemli gelişmeler ele alınmıştır (Gabriela vd., 2016). Biyolojik örneklerdeki 8-OHdG'yi analiz etmek için rezonans rayleigh saçılması (RRS) (Guo vd., 2012), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) (Mei vd., 2005), ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Kasai, 1997) dahil olmak üzere çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bu geleneksel tespit teknikleri iyi bir seçiciliğe ve uygun tespit limitlerine ulaşmış olsa da bunlar zaman alıcıdır ve genellikle karmaşık ve zahmetli teknolojilerin, son derece nitelikli personelin ve biyolojik örneklerin aşırı işlenmesinin kullanımını gerektirir. Bu nedenle, 8-OHdG tespiti için hızlı, hassas, kullanımı kolay ve düşük maliyetli yöntemlerin geliştirilmesi bir zorluk olmaya devam etmektedir (Korkmaz vd., 2018) Bu geleneksel

yaklaşımlar dışında, enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzim bağlantılı immünoabsorbent test (ELISA), biyomarkerlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Özellikle hastalık teşhisinde hızlı ve hassas sonuçlar sunması nedeniyle tercih edilmektedir. ELISA, birçok biyomarkerin tespitinde standart bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Yüksek hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve hızlı sonuç alma gibi özellikleri, klinik uygulamalarda tercih edilmesinin başlıca nedenlerindendir. Ayrıca, ELISA testleri genellikle düşük maliyetli olup, büyük veri setleri üzerinde çalışmaya olanak tanır. 8-OHdG'nin ELISA ile analizi, hastalıklara özgü durumların erken teşhisinde önemli bir rol oynar ve tedavi süreçlerinin izlenmesine yardımcı olur. Bu yöntemle hastalıkların tespit ve izlenmesinde kullanılan kitlerin pahalı olması, uzun bekleme süreleri, sınırlı olabilen özgüllük, düşük dinamik aralık ve uzman ihtiyacı gibi dezavantajların saf dışı bırakma potansiyeli oldukça yüksektir. Özellikle nanoteknolojideki gelişmelerle birlikte ELISA yönteminde birtakım modifikasyonlar ve inovasyonlar gerçekleştirilmektedir (Jaria vd., 2020; Peng vd., 2022). Bu çalışmalarda diyagnostik endüstrisinde potansiyeli yüksek yeni hibrit malzemeler sentezlenmiştir. Rezonans Rayleigh saçılması (RRS), elektrokimyasal algılama ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-ED), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), kapiler elektroforez (CE) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) gibi çeşitli analitik yöntemler 8-OHdG araştırması için geliştirilmiştir (Ye vd., 2020). Geçmişte yapılan birçok çalışmada, 8-OHdG'nin belirlenmesi için en sık elektrokimyasal tespitli bir HPLC prosedürü kullanılmıştır. HPLC, doku, lenfosit ve plazmada 8-OHdG'yi ölçmek için kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir. Lily vd., (2004) 8-OHdG'yi analiz etmek ve ölçmek için HPLC prosedürünü kullanmıştır. Doku ve lenfositte 8-OHdG'yi analiz etmek için, HPLC ile ölçülebilmesi için 8-OHdG'nin nükleer DNA'dan enzimlerle çözünebilir bir bileşiğe salınması gerekir. Ashwin vd., (2023) çalışmalarında diyabetli ve diyabetsiz okülofaringeal müsküler distrofi ve oral skuamöz hücreli karsinom hastalarının potansiyelli kanser olma durumları değerlendirilmiştir. Bu çalışmasında tükürük 8-OHdG seviyesi, SOD ve GPx düzeylerinin değerlendirilmesi ELISA yöntemi kullanılarak ölçmüştür. Bir başka çalışmada daha önce serum arginaz I'in astımlı hastalarda arttığını ve küçük bir sağlıklı popülasyonda oksidatif stresle ilişkili

olduğunu bildirmişlerdir. Ancak, arginaz I'in oksidatif stresle kesin ilişkisi bilinmemektedir. Yaptıkları bu çalışma, ELISA ile yeni bir araştırma ile daha sağlıklı bir popülasyonda arginaz I'in oksidatif stresle ilişkisini analiz etmeyi amaçlamıştır (Keiki, 2013). Başka bir çalışmada, 50 migren hastasının (11 auralı ve 39 aurasız) oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG ölçmüştür. Çalışmalarında migren atakları arasındaki dönemde, auralı ve aurasız hasta alt gruplarını dikkate alarak, oksidatif DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG düzeyleri değerlendirilmiştir (Geyik vd., 2016). 8-OHdG serum düzeyleri, dokularda, serumda ve plazmada DNA oksidasyonunun kantifikasyonu için uygun rekabetçi bir ELISA kiti kullanılarak ölçülmüştür. Kurgan vd., (2015) çalışmalarında kronik periodontitisli hastalarda periodontal tedaviden önce ve sonra tükürükte 8-OHdG'nin tespiti için tandem kütle spektrometre sıvı kromatografisinin (LC-MS/MS) ELISA ile karşılaştırıldığında duyarlılığını test etmişlerdir. Yaygın kronik periodontitisli 23 hastadan (sekiz kadın ve 15 erkek; yaşları 46.1 ± 5.1 yıl) ve periodontal olarak sağlıklı 25 kişiden (15 kadın ve 10 erkek; yaşları 44.9 ± 6.8 yıl) tükürük örnekleri toplanmıştır. Tükürük 8-OHdG seviyeleri tedavi öncesi ve sonrasında ELISA ve LC-MS/MS kullanılarak ölçülmüştür. Benzer şekilde tükürükten 8-OHdG karakterizasyonu, premalign oral bozukluklar (PMOD) ve oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) hastalarında oksidatif stres izlemek için Nandakumar vd., (2020) mevcut çalışmalarında, oral submukoza fibrozisi (OSMF) ve OSCC hastalarında sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında potansiyel olarak malign oral bozukluktan açık maligniteye hastalığın ilerlemesini değerlendirmek için tükürük 8-OHdG seviyelerini ölçmek için 90 hastadan 4 mL uyarılmamış tükürük toplamışlardır. Tükürük 8-OHdG'nin kantifikasyonu için Sandviç ELISA testi uygulanmıştır. Bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere oksidatif stres günümüzde pek çok çeşitli alanda araştırılmaktadır ve bu noktada 8-OHdG tespiti hayati noktadadır. ELISA dışında, 8-OHdG tespiti için alternatif yöntemlerin avantajları ve dezavantajları üzerine tartışmalar sürmektedir. Bu yöntemlerin doğruluğu, duyarlılığı ve maliyet etkinliği gibi konular, araştırmaların odağındadır ve bilimsel ve klinik ilgi artmaktadır (Menzel vd., 2021).

ELISA'nın çeşitli alanlarda kullanılmasıyla birlikte nanoteknolojinin hızla gelişmesi, ELISA için olumlu sonuçlar vadetmiştir. Son yıllarda önem taşıyan nanoteknoloji, literatürde ELISA ile birçok avantaj sunmaktadır. Bunlardan en önemlisi

nano çiçek sentezidir. Shi vd. (2014) yaptıkları çalışmada sentezledikleri bakır nano çiçek yapıların yüzeyinin, yüzey üzerinde homojen bir şekilde dağılmış bir yaprak birikintisine benzediğini saptayarak nano çiçeklerin oluşum mekanizmasını şu şekilde tanımlanmıştır; enzim, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ kristallerinin çekirdeklenmesini indükleyerek, yapraklar için iskeleti oluşturmakta ve yaprakları birbirine bağlamak için bir "tutkal" olarak görev yaptığını rapor etmişlerdir. Lee vd., (2020) yaptıkları çalışmada enzim kapsülü bulunan serum albümini nanopartikülü ile ultra duyarlı olan ELISA testini kullanarak tioredoksin-1'i tespit etmişlerdir. Hastalıkların erken teşhis edilmesinde vücut sıvıları veya kandaki biyolojik durumun göstergelerini ölçen biyobelirteç testleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler, biyobelirteçlere karşı dayanıklılığın düşük olması nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Sentezlenen nanopartiküller kullanarak meme kanserinin biyolojik belirteci olan tioredoksin-1, doğrudan sandviç yöntemi ile ölçmüşlerdir. Dayanıklılığın yanı sıra ELISA, yüksek özlülük ve hassasiyete sahip bir nano çiçek bazlı yöntem olması sebebiyle Yin vd., (2022) *Staphylococcus aureus* patojeninin tespiti için nano çiçek bazlı ELISA yöntemi oluşturmuşlardır. Yöntemlerinde, nanoarsitektomatik yoluyla, spesifik bir hücre duvarı için bağlama alanı oluşturmuş ve organik-inorganik hibrit nano çiçek kompleksi hazırlamışlardır. Liu vd., (2017) yapılan çalışmalarında düşük maliyet, ölçüm kolaylığı, yüzey-hacim oranı ve kolay hazırlanabilir olmasından dolayı nano çiçekleri kullanmışlardır. Aynı şekilde Wen vdadaşları, yaptıkları çalışmada *S. Aureus* tespiti için nano çiçek tabanlı ELISA yöntemi geliştirmiştir. *S. aureus* yüksek özgül bağlanma yeteneği ve HRP'nin gelişmiş stabilitesi ve aktivitesi nedeniyle, nano çiçeğin biyo-hibrit nanomimarisi, *S. aureus*'un etkili ve hassas tespiti için yeni bir ELISA yöntemi geliştirmelerine olanak sağlamıştır. Deneyde, öncelikle 96 kuyulu bir plakanın kuyularını, *S. aureus*'u yüksek afiniteyle spesifik olarak yakalayabilen anti- *S. aureus* poliklonal antikoru ile kaplanmıştır. Numunedeki diğer maddeleri yıkadıktan sonra, kuyudaki spesifik olmayan bağlanma bölgesini bloke etmek için sığır serum albümini (BSA) uygulanmış, ardından sisteme hazırlanmış CBD-HRP- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ üçü bir arada hibrit nano çiçek eklenmiştir (Wen vd., 2022). Yucheng vd., (2017) ise çalışmalarında, PBS tamponunda belirli bir süre oda sıcaklığında bir bakır iyon çözeltisine SA ve HRP ekleyerek kolay tek kapta yeşil sentez stratejisiyle streptavidin (SA) ve HRP- $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ hibrit nano çiçeği hazırlamışlardır. Sentezde kullanılan biyolojik maddeler (SA ve HRP), immobilize proteinin aktivitesini korumak

için diğer geleneksel yöntemlere kıyasla daha az manipölasyona maruz kalmaktadır. SA-HRP-Cu₃(PO₄)₂ hibrit nano çiçek, genellikle ELISA'da kullanılan klasik bir sistem olan biyotine olan yüksek afinitesi nedeniyle tanıma birimi olarak seçilmiştir. Bu nedenle, SA ve HRP'nin tanıtımı nano çiçeğe ikili bir işlev kazandırılmıştır. Biyotinlenmiş antikora özgül yakalama yeteneği ve sinyal amplifikasyonu üretmek için geliştirilmiş enzimatik aktivite ve kararlılık sağlanmıştır. Hazırlanan SA-HRP nano çiçek, AFP testi için basit ama güçlü bir kolorimetrik sensör oluşturmak üzere ELISA'da daha sonra kullanılmıştır. Gülmez vd., (2018) proteaz enzimi kullanarak sentezledikleri organik-inorganik hibrit yapı sentezinde enkapsölasyon verimlerini %95, %96 ve %94 olarak benzer aralıkta tespit etmişlerdir. Liu vd., (2017) yaptıkları çalışmada enzim ile grafen oksit yardımıyla hibrit nano çiçek yapıları sentezlemiştir. Bu sayede morfolojilerinin çiçek yapraklarına benzediğini belirtmiş, streptavidin (SA)-HRP-Cu₃(PO₄)₂ hibrit nano çiçek sentezledikleri çalışmalarında 0,1-50 ng/mL aralığında AFP konsantrasyonları ve absorbansları arasında ($R^2=0.990$) doğrusal bir ilişki saptamışlardır. Bu çalışmada, Biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs materyalleri sentezlenmiştir. Oluşan mavi renkli ürünlerde çiçek şekilli hibrit nano yapılar gözlemlendiği görülmüştür. Elde edilen grafikten biyotin Ab-NFs ve 8-OHdG pab/HRP-NFs'nin enkapsölasyon oranları sırasıyla %95 ve %97 bulunmuştur. Elde edilen total ürün miktarı sırasıyla 10 mg ve 8 mg protein olarak hesaplanmıştır. Biyomimetik yöntemler, nano-ELISA deneyinde antikorları veya enzimleri hareketsizleştirme zorluklarını karşılamak için ideal bir yol olan sulu çözeltilerde kendiliğinden bir araya gelme süreçleriyle hibrit organik-inorganik çok seviyeli yapı nano çiçek sentezlemek için her zaman kullanılmaktadır. Chen vd., (2024) biyomimetik bir yöntem kullanarak sığır serum albümini (BSA), yaban turpu peroksidazı (IgG-HRP) ve bakır (II)'den oluşan protein-inorganik nano çiçek geliştirmişlerdir. BSA-(IgG-HRP)-Cu₃(PO₄)₂ hibrit 3D nano çiçek daha sonra piridaben tespiti için bir nano-ELISA platformuna uygulanmış ve 3,90 ng/mL ve %50 inhibisyon konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmada sentezlenen hibrit konjugat yapının karakterizasyon çalışmaları kapsamında morfoloji SEM analizi ile belirlenmiştir. Bu nano çiçekler hem Biyotin Ab-NFs hem de 8-OHdG pab/HRP-NFs için benzer yapıda olup tek tip morfolojiye sahip olduğu ve biyotin Ab-NFs çapı yaklaşık 8-10 µm iken 8-OHdG pab/HRP-NFs çapının

yaklaşık 4-5 µm olduğu tespit edildi. Liu vd., (2017) yaptığı bir çalışmada SA-HRP-Cu₃(PO₄) hibrit nano çiçeklerin ortalama 5 µm boyutunda olduklarını yüksek çözünürlüklü SEM görüntüsü ile doğrulamıştır. Aynı şekilde Zhang vd., (2019) yaptıkları çalışmada katalaz enzimi ile bakır hibrit nano çiçek yapılarını sentezlediklerinde elde edilen bakır hibrit nano çiçek yapıların boyutlarının 10 µm ile 20 µm arasında olduğunu tespit etmişlerdir. S. Batule vd., (2019), yaptıkları çalışmada BSA-Cu²⁺ nano çiçek yapılarını sentezlediklerinde ortalama büyüklüğü yaklaşık 10 µm olan hiyerarşik olarak yapılandırılmış çiçek benzeri mikropartiküller, BSA'nın mevcudiyetinde oluştuklarını rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada protein içermeyen oluşturulan kontrol numunesinin herhangi bir çiçek benzeri yapı oluşturmadığını ve sonuçta ortaya çıkan nanomalzemelerin çiçek benzeri yapısının oluşması için protein bileşeninin gerekli olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak nano çiçeklerin ortalama boyutlarının kullanılan protein türü, miktarı, sentez şartları gibi reaksiyon koşullarına bağlı olarak 4-30 µm arasında değiştiği bildirilmiştir. Altınkaynak vd., (2020) çalışmalarında kudret narının peroksidaz aktivitesini ve hibrit nano çiçek formlarını araştırmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek peroksidaz aktivitesi olgun meyvede ve hibrit nano çiçek formunda görülmüştür. Yine farklı bir çalışmada floresan bakır fosfat nano çiçek (FCPnfs) sentezlenmiş olup farklı miktarda akridin turuncusunun farklı morfolojiye neden olduğu ve organik bileşenin nano çiçek içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı gösterilmiştir (Altınkaynak vd., 2020). Bu çalışmada ise iki farklı malzeme sentezlenmiştir (biyotin antikoru içeren nano çiçekler/ 8-OHdG poliklonal antikoru içeren ve HRP enzimi içeren nano çiçekler). Optimum koşullarda sentezlenen nanomalzemelerin karakterizasyonu için, yapıda bulunan metal iyonların ve diğer iyonların varlığını doğrulamak adına EDX analizi gerçekleştirilmiş ve her iki nanomalzemelerin içerisindeki element yapıların dağılımında yer aldığı görülmüştür. Element haritalama ile elementlerin nano çiçeklerin içerisinde homojen dağıldığı tespit edilmiştir. Yapının parçacık boyutunu ve kristal yapısının ölçümünü araştırmak amacıyla gerçekleştirilen XRD analizinde her iki nano çiçek yapının kırınım zirvelerinin verilen kart numaraları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen FTIR analizlerinde serbest ile nano çiçek yapılara ait piklerin büyük ölçüde aynı olduğu gözlemlenmiş ve böylelikle serbest yapıların nano çiçek yapılar içerisinde var olduğu tespit edilmiştir. Karakterizasyon analizlerini takibe ELISA deneyleri gerçekleştirmiştir.

Ticari kitin protokolünde birkaç revizyonla konjugatı tamamlamak hedeflenmiş ve tespit limitinin ticari kit sistemine yakın sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Sonraki deneyde 8-OHdG pAb hem kaplama hem de primer antikor olarak test sisteminde kullanılmıştır ve elde edilen standart grafik ile başarılı bir sonuç elde edilmiştir. Son deneyde, uzun ve zaman alan reaksiyon basamaklarını kısaltmak adına deneyden sekonder antikor basamağı çıkarılarak test tekrarlanmıştır. Bu deneyde de tespit limiti ticari ELISA sistemine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak 8-OHdG'ye özgü antikorlar kullanılarak nano çiçek yapılar sentezlenmiş ve sentezlenen bu yeni hibrit malzemelerin mikro yapısı ve kimyasal özellikleri SEM, EDX, FTIR ve XRD analizleri ile karakterize edilmiştir. Bulgular, işlevselleştirilmiş hibrit konjugat sisteminin yüksek antijen bağlama kapasitesiyle çalıştığını ve tespit limitinin ticari ELISA sistemlerine yakın olduğunu ortaya koymuştur. Sentezlenen konjugat, hastalıkların tanısına yönelik doğru, hızlı ve hassas bir test sisteminin tek bir ELISA analiziyle belirlenmesi açısından önemli bir potansiyele sahip olabilir. Klinik teşhiste kullanımını garanti altına almak için hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve stabilite ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sunulan bu yaklaşım, biyosensör, biyotıp ve biyokatalitik süreçlere kadar çeşitli uygulamalar için isteğe bağlı hibrit sistem geliştirme konusunda umut vaat edicidir. Çalışmamızın sonuçları ve literatür incelendiğinde 8-OHdG'nin teşhisinde önemli biyobelirteçler olabileceği, özellikle büyük çaplı saha çalışmalarında kullanımlarının oldukça avantajlı olabileceği düşünülmektedir. ELISA yöntemi, 8-OHdG'nin tespitinde önemli avantajlar sunmakla birlikte, 8-OHdG'nin hastalık teşhisindeki potansiyelinin daha iyi anlaşılabilmesi için, ELISA testlerinin geliştirilmesi ve diğer analitik yöntemlerle entegrasyonu gerekmektedir. Gelecekteki araştırmalar, 8-OHdG'nin klinik uygulamalarda daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamak için bu zorlukları aşmayı hedeflemelidir. Bu bağlamda, 8-OHdG'nin biyomarker olarak önemi ve ELISA'nın sağladığı olanaklar, sağlık alanında yeni teşhis yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sunabilir. Aynı zamanda elde edilen veriler ELISA test kitlerinin kullanılacağı maliyetli çalışmalar için de ilham verici olabilir.

KAYNAKLAR

- Athanasios, V., Spyridon, L., Thomi, V., Konstantinos Fiotakis., (2009). *Influence of ozone on traffic-related particulate matter on the generation of hydroxyl radicals through a heterogeneous synergistic effect*. Journal of Hazardous Materials, 2–3.
- AbuArrah, M., Setianto, BY., Faisal, A., Sadewa, AH., (2021). *8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin tıbbi iyonlaştırıcı radyasyonun oksidatif DNA hasarı biyobelirteci olarak: bir kapsam incelemesi*. Biyomedikal Fizik ve Mühendislik Dergisi, 11 (3), 389.
- Andries, A., Rozenski, J., Vermeersch, P., Mekahli, D., & Van Schepdael, A., (2021). *Recent progress in the LC–MS/MS analysis of oxidative stress biomarkers*. Electrophoresis, 42(4), 402-428.
- Ariga, K., Li, J., Fei, J., Ji, Q., & Hill, JP., (2016). *Atomik/moleküler düzeyde manipülasyondan makroskopik eyleme kadar dinamik fonksiyonel malzemeler için nanomimariler*. Gelişmiş Malzemeler, 28 (6), 1251-1286.
- Adam, T., Gopinath, SC., (2024). *Sıfırdan Çok Boyutlu Nano Hibrit Malzemeler: Sentez ve Karakterizasyon*. Hibrit Nanomalzemeler: Üretim, Karakterizasyon ve Uygulamalar, Singapur, 73-87.
- Al-Taie, A., Sancar, M., Izzettin, FV., (2021). *8-Hidroksideoksiguanozin: Kanser ve diabetes mellitus'ta oksidatif DNA hasarının değerli bir öngörücüsü*. Kanserde Akademik Basın, 179-187.
- Altinkaynak, C., Baldemir, A., Özdemir, N., Yılmaz, V., & Öçsoy, İ., (2020). *Kudret Narı (Momordica charantia Descourt.) Meyvesinden Saflaştırılan Peroksidaz Enzimi Kullanılarak Hibrit Nano Çiçekler Sentezlenmesi ve Direct Blue 1 Gideriminde Kullanılabilirlikleri*. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 9(2), 573-583.
- Alqahtani, T., Deore, SL, Kide, AA, Shende, BA, Sharma, R., Chakole, RD, & Ghosh, A., (2023). *Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve amiyotrofik lateral sklerozda mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stres-güncellenmiş bir inceleme*. Mitokondri, 71, 83-92.
- Ashwin, S., (2023). *Assessment of 8-OHDG, SOD, and GPx Levels in OPMD and OSCC Patients*. Clinical Cancer Investigation Journal 12.2.

- Aydin, S., (2015). *ELISA'nın kısa tarihi, prensipleri ve tipleri ve ELISA kullanarak peptit/protein analizleriyle ilgili laboratuvar deneyimiz*. Peptitler, 72, 4-15.
- Baykara T., Günay V., Musluoğlu E., (2010). *Nanoteknoloji ve Nano-Malzeme Süreçleri*. Tübitak Mam Malzeme Enstitüsü, Ankara.
- Balleste R.M., Novarro, C.G., Herrero, J.G., Zamora, F., (2011). *2D materials: to graphene and beyond*, Nanoscale, 3, 20-30
- Bhushan, B. (2017). *Nanoteknolojiye giriş*. Springer Nanoteknoloji El Kitabı, 1-19.
- Büyükuslu, N., Yiğitbaşı, T., (2015): *Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres*. Clinical and Experimental Health Sciences 5.3, 197-203.
- Cao, X., Halder, A., Tang, Y., Hou, C., Wang, H., Duus, J. Ø., & Chi, Q., (2018). *Engineering two-dimensional layered nanomaterials for wearable biomedical sensors and power devices*. Materials Chemistry Frontiers, 2(11), 1944-1986.
- Chen, H., An, L., Li, M., Liu, H., Jin, Z., Ma, H., Wu, X., (2024). *A self-assembled 3D nanoflowers based nano-ELISA platform for the sensitive detection of pyridaben*. Food Chemistry, 445, 138756.
- Chiorcea-Paquim, AM., (2022). *Oksidatif DNA Hasarının 8-oksoguanin ve 8-okso-deoksiguanozin Biyobelirteçleri: HPLC-ECD Belirlenmesi Üzerine Bir İnceleme*. Moleküller, 27 (5), 1620.
- Chelladurai, V., & Jayas, D. S., (2018). *Nanoscience and nanotechnology in foods and beverages*. CRC Press.
- Di Minno, A., Turnu, L., Porro, B., Squellerio, I., Cavalca, V., Tremoli, E., & Di Minno, M. N. D. (2016). *8-Hydroxy-2-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of the literature*. Antioxidants & Redox Signaling, 24(10), 548-555.
- Ge, J., Lei, J. ve Zare, R.N., (2012). *Protein-inorganik hibrit nanoflowers*, Doğa Nanoteknolojisi, 7, 428-432.
- Gan, W., Liu, XL., Yu, T., (2018). *Yaşlanmanın Potansiyel Bir Biyobelirteci Olarak İdrardaki 8-okso-7,8-dihidroguanozin*. Front Aging Neurosci, 10-34.

- Gan, W., Nie, B., Shi, F., (2012). *LC-MS/MS ile analiz edilen normal ve yaşlanma hızlandırılmış farelerde DNA, RNA ve bunların metabolitlerinin oksidatif hasarındaki yaşa bağlı artışlar: yaşlanmanın yeni bir biyobelirteci olarak idrar 8-oksoguanozini*. Free Radic Biol Med, 52:1700-7.
- Geyik, S., Altunısık, E., Neyal, A. M., & Taysi, S., (2016). *Oxidative stress and DNA damage in patients with migraine*. The Journal Of Headache And Pain, 17, 1-6.
- Graille, M., Wild, P., Sauvain, J.-J., Hemmendinger, M., Guseva Canu, I., & Hopf, NB., (2020). *Oksidatif Stres İçin Bir Biyobelirteç Olarak İdrardaki 8-OHdG: Sistematik Bir Literatür İncelemesi ve Meta-Analiz*. Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi, 21 (11), 3743.
- Gulmez, C., Altinkaynak, C., Özdemir, N., & Atakisi, O., (2018). *Proteinase K hybrid nanoflowers (P-hNFs) as a novel nanobiocatalytic detergent additive*. International Journal of Biological Macromolecules, 119, 803-810.
- Gulmez, C., (2022). *Glucose Tolerance, Antiprotease Activity and Total Oxidant/Antioxidant Capacity Studies of β -Glucosidase Hybrid Nanoflower for Industrial Applications*. Chemistry & Biodiversity, 19(7), 170.
- Gulmez, C., Altinkaynak, C., Ozturkler, M., Ozdemir, N., & Atakisi, O., (2021). *Evaluating the activity and stability of sonochemically produced hemoglobincopper hybrid nanoflowers against some metallic ions, organic solvents, and inhibitors*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 132(4), 327-336.
- Gulmez, C., Altinkaynak, C., Turk, M., Ozdemir, N., Atakisi, O., (2022). *Hemoglobin-Inorganic Hybrid Nanoflowers with Different Metal Ions as Potential Oxygen Carrying Systems*. Chemistry & Biodiversity, 19(1), e202100683.
- Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martinez-Chapa, S. O., Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., ... & Martinez-Chapa, S. O., (2018). *Advantages, disadvantages and modifications of conventional ELISA*. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) from A to Z, 67-115.
- Jaria, G., Calisto, V., Otero, M., Esteves, V.I., (2020). *Monitoring pharmaceuticals in the aquatic environment using enzyme-linked immunosorbent assay*

- (ELISA)-a practical overview.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, 412, 3983-4008.
- Liu, C., Lin, H., Cao, L., Wang, K. ve Sui, J. (2022). **Tek alanlı antikorların benzersiz paratop yapısı, antijen bağlanma modları ve sistematik mutagenezi stratejileri üzerine araştırma ilerlemesi.** İmmünoloji Alanındaki Sınırlar, 13, 1059771.
- Li, R., Jia, Z. ve Trush, MA., (2016). **Biyoloji ve tıpta ROS'un tanımlanması.** Reaktif Oksijen Türleri 1 (1), 9.
- Kourea, H., Kotoula, V., (2016). **Tümör immünodiagnostiğine doğru.** Translasyonel Tıp Yıllıkları, 4 (14).
- Kapingidza, A. B., Kowal, K., & Chruszcz, M., (2020). **Antigen-antibody complexes.** Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins, 465-497.
- Konstantinou, GN., (2017). **Enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA).** Gıda alerjenleri: Yöntemler ve Protokoller, 79-94.
- Keiki, O., Ikuo, M., Wang, D., Tsukiyama, Y., Takahashi, H., Masayuki, K., Sakano, N., Setiawan, H., Bando, M., Ohmoto, Y., (2013). **Evaluation of serum arginase I as an oxidative stress biomarker in a healthy Japanese population using a newly established ELISA,** Clinical Biochemistry, 46, 16–17.
- Kulaksız, G., Sancar, A., (2007). **Nükleotid eksizyon onarımı ve kanser.** Turk Biochem, 32 (3), 104-111.
- Kumar, A., Sulaiman, J. M. A., Kumar, P., Chowdhury, S., & Sreenivasa, S., (2024). **Novel Advancements in the Field of Nanostructured Materials: Zero-, One-, Two-and Three-Dimensional Materials.** International Journal of Maritime Engineering, 1(1), 209-218.
- Kurgan, Ş., Önder, C., Altıngöz, S. M., Bağış, N., Uyanık, M., Serdar, M. A., & Kantarcı, A. (2015). **High sensitivity detection of salivary 8-hydroxy deoxyguanosine levels in patients with chronic periodontitis.** Journal of Periodontal Research, 50(6), 766-774.
- Kurtdede, E., Pekcan, M., Karagül, H., (2018). **Florun serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres ile ilişkileri.** Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 13, 373-379.

- Kütük, N., Çetinkaya, S. (2019). *Yeşil Sentez ile Nanomalzeme Üretiminin İncelenmesi ve Kullanım Alanları*. 41-50.
- Ladjemi, MZ., Jacot, W., Chardès, T., Pèlegri, A., (2010). *NavarroTeulon I. Anti-HER2 vaccines: New prospects for breast cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 59, 1295-312.
- Liu, G., Liu, J., Zhou, H., & Wang, H., (2023). *Recent advances in nanotechnologyenhanced biosensors for α -fetoprotein detection*. Microchimica Acta, 190(1), 3.
- Luo, Y.K., Song, F., Wang, X.L. ve Wang, Y.Z., (2017). *Pure copper phosphate nanostructures with controlled growth: a versatile support for enzyme immobilization*, Cryst Eng. Comm, 19, 22, 2996-3002.
- Long Wu, Guanghui Li, Xin Xu, Lin Zhu, (2019). *Gıda analizinde nano-ELISA'nın uygulanması: Son gelişmeler ve zorluklar*. Analitik Kimyada TrAC Trendleri, 113.
- Li, H., Hou, J., Duan, L., Ji, C., Zhang, Y., Chen, V., (2017). *Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficientwater soluble dye removal*. Journal of Hazardous Materials. 338, 93-101.
- Lee, Myeong-Jun, (2019). *Detection of thioredoxin-1 using ultra-sensitive ELISA with enzyme-encapsulated human serum albumin nanoparticle*. Nano Convergence 6.1, 1-7.
- Mohamed Maarouf Ali Zeinhom, Yijia Wang, Lina Sheng, Dan Du, Lei Li, Mei-Jun Zhu, Yuehe Lin,, (2018). *Smart phone based immunosensor coupled with nanoflower signal amplification for rapid detection of Salmonella Enteritidis in milk, cheese and water*. Sensors and Actuators B: Chemical, 261.
- Mareike Müller, Dick Schijven, Kim Bruggink, Jan-Hendrik Venhuizen, H. Bea Kuiperij, Marcel M., (2012). *Development of a gold nanoparticle ELISA to detect low-abundant proteins in cerebrospinal fluid for diagnosis of Alzheimer's disease*. Alzheimer's & Dementia, 8, 4.
- Manole, E., Bastian, AE, Popescu, ID, Constantin, C., Mihai, S., Gaina, GF, & Neagu, MT (2018). *İmmünogenetik hastalıklarda biyobelirteçleri vurgulayan immünoassay teknikleri. İmmünogenetikte*. IntechOpen.

- Perwez, M., Lau, SY., Danish, H., Anboo, S., Arshad, M., Thakur, P., (2023). ***Nanozymes and nanoflower: Physiochemical properties, mechanism and biomedical applications.*** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 225.
- Marrocco, I., Fabio, A., Ilaria, P., (2017). ***İnsanlarda oksidatif stresin biyobelirteçlerinin ölçümü ve klinik önemi.*** Oksidatif Tıp ve Hücresel Uzun Ömür, 6501046.
- Nie, B., Gan, W., Shi, F., (2013). ***Çeşitli sıçan dokularında DNA ve RNA'da yaşa bağlı 8-oksoguanin birikimi.*** Oxid Med Cell Longev, 303181
- Nandakumar, A., Nataraj, P., James, A., Krishnan, R., & Mahesh, K. M., (2020). ***Estimation of salivary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker in assessing progression towards malignancy: a case-control study.*** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 21(8), 2325.
- Omari, S., Nasirzadeh, N., (2021). ***8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), nanomalzemelere mesleki maruziyetin neden olduğu oksidatif DNA hasarının bir biyobelirteci olarak: Sistematik bir inceleme.*** Nanotoksikoloji, 15 (6), 850-864.
- Gulnora, R., Azimov, A., Dilshod, A., (2015). ***The role of elisa in early diagnosis of Alzheimer's disease.*** Alzheimer's & Dementia, 11, 7.
- Renaudin, X., (2021). ***Reaktif oksijen türleri ve kanserde DNA hasarı tepkisi.*** Uluslararası Hücre ve Moleküler Biyoloji Dergisi, 364, 139-161.
- Saha, SK, Lee, SB, Won, J., Choi, HY, Kim, K., Yang, GM, ... & Cho, SG., (2017). ***Oksidatif stres, beslenme ve kanser başlangıcı arasındaki korelasyon.*** Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi, 18 (7), 1544.
- Sajous, L., Botta, A., & Sari-Minodier, I., (2008). ***Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of environmental oxidative stress.*** In Annales De Biologie Clinique, 66, 19-29.
- Shibata, Y., Sato, K., Kodama, M., Nanjyo, H., (2007). ***Alpha-fetoproteinproducing early gastric cancer of the remnant stomach: Report of a case.*** Surg Today, 37, 995–999
- Sun, J., Ning, X., Cui, L., Ling, M., Xu, X., & He, S., (2020). ***Geliştirilmiş ELISA için "taşıyıcı içermeyen" enzimatik nano-muhabirlerin montajı.*** Analyst, 145 (20), 6541-6548.

- Suleyman Aydin, A., (2015). **Short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide.** Protein Analyses Using ELISA, Peptides, 72.
- Simioni C., Zauli G., Martelli AM., (2018). **Oksidatif stres: yetişkinlikte ve yaşlanmada fiziksel egzersiz ve antioksidan nutrasötiklerin rolü.** Oncotarget 2018;9:17181-98.
- Shah, K., Maghsoudlou, P., (2016). **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics.** British Journal of Hospital Medicine, 98-101.
- Somturk, B., Hancer, M., Ocoy, I. ve Özdemir, N., (2015). **Synthesis of copper ion incorporated horseradish peroxidase-based hybrid nanoflowers for enhanced catalytic activity and stability.** Dalton Transactions, 44, 31, 13845- 13852.
- Shi, J., Zhang, S., Wang, X., Yang, C., & Jiang, Z., (2014). **Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach.** Journal of Materials Chemistry B, 2(27), 4289-4296.
- S.Batule, B., Park, K.S., Gautam, S., Cheon, H.J., Kim, M.I., Park, H.G., (2019). **Intrinsic peroxidase-like activity of sonochemically synthesized protein copper nanoflowers and its application for the sensitive detection of glucose.** Sensors and Actuators B: Chemical. 283, 749-754.
- Sudha, PN, Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., & Barhoum, A., (2018). **Nanomalzemelerin tarihi, sınıflandırılması, benzersiz özellikleri, üretimi ve pazarı.** Nanopartiküllerin ve mimari nanoyapıların ortaya çıkardığı uygulamalar, 341-384.
- Tabatabaei, MS, & Ahmed, M., (2022). **Enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA). Kanser hücre biyolojisinde: Yöntemler ve protokoller.** New York, NY: Springer US., 115-134
- Urbaniak, S. K., Boguszevska, K., Szewczuk, M., Kaźmierczak-Barańska, J., & Karwowski, B. T., (2020). **8-Oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a potential biomarker for gestational diabetes mellitus (GDM) development.** Molecules, 25(1), 202.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C., (2009). **8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and**

- carcinogenesis.** Journal of environmental science and health Part C, 27(2), 120-139.
- Vanmassenhove, J., Vanholder, R., Nagler, E., & Van Biesen, W., (2013). **Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature.** Nephrology Dialysis Transplantation, 28(2), 254-273.
- Wang, X., Li, Z., Shi, J., & Yu, Y., (2014). **One-dimensional titanium dioxide nanomaterials: nanowires, nanorods, and nanobelts.** Chemical reviews, 114(19), 9346-9384.
- Wen Y, Li Z, Hui X, Qing T, Yingxin M, Shan-Ho C, Jin H., (2022). **Bio-hybrid nanoarchitectonics of nanoflower-based ELISA method for the detection of Staphylococcus aureus.** Sensors and Actuators B: Chemical ,(366), 132005.
- Wei, T., Du, D., Zhu, M.J., Lin, Y., Dai, Z., (2016). **An improved ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay using hydrangea-like antibody-enzymeinorganic three-in-one nanocomposites.** American Chemical Society, Applied Materials & Interfaces, 8, 6329-6335.
- Wu, L., Li, G., Xu, X., Zhu, L., Huang, R. ve Chen, X., (2019). **Gıda analizinde nano-ELISA'nın uygulanması: Son gelişmeler ve zorluklar.** Analitik Kimyada TrAC Trendleri, 113, 140-156.
- Wang, X., Shi, J., Li, Z., Zhang, S., Wu, H., Jiang, Z., ... & Tian, C., (2014). **Facile one-pot preparation of chitosan/calcium pyrophosphate hybrid microflowers.** ACS Applied Materials & Interfaces, 6(16), 14522-14532.
- Yang, S., Dai, F., Lu, L., Yin, M., Xue, L., Feng, W., ... & Chen, Q., (2022). **All-in-one calcium nanoflowers for dual outputs biosensor: A simultaneous strategy for depression drug evaluation and non-invasive stress assessment.** Biosensors and Bioelectronics, 216, 114655.
- Ye, W., Zhang, Y., Hu, W., Wang, L., Zhang, Y., & Wang, P., (2020). **A sensitive FRET biosensor based on carbon dots-modified nanoporous membrane for 8-hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) detection with Au@ Zif-8 nanoparticles as signal quenchers.** Nanomaterials, 10(10), 2044.
- Ye, R., Zhu, C., Song, Y., Lu, Q., Ge, X., Yang, X., ... & Lin, Y., (2016). **Bioinspired Synthesis of All-in-One Organic-Inorganic Hybrid Nanoflowers Combined**

- with a Handheld pH Meter for On-Site Detection of Food Pathogen.*** Small Weinheim an Der Bergstrasse, Germany, 12(23), 3094-3100.
- Yorulmaz, A., Şener, S., Neşelioğlu, S., Erel, Ö., & Metin, A., (2017). ***Hafif Şiddetli Alopesi Areatada Etyopatogenez ve Oksidatif Stres İlişkisi.*** Turkish Journal Of Dermatology, 11, 114-8.
- Yucheng Liu, Jinyang Chen, Mingyuan Du, Xinxin Wang, Xinghu Ji, Zhike He., (2017). ***The preparation of dual-functional hybrid nanoflower and its application in the ultrasensitive detection of disease-related biomarker.*** Biosensors and Bioelectronics, 92.
- Yetük, G., (2013). ***Gıda katkı maddesi sodyum benzoat'ın insan eritrositleri üzerine in vitro toksik etkisi ve kateşin ve kuersetinin koruyucu rolü.*** Doctoral Dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-37.
- Zhang, M., Yang, N., Liu, Y., Tang, J., (2019). ***Synthesis of catalase-inorganic hybrid nanoflowers via sonication for colorimetric detection of hydrogen peroxide.*** Enzyme and Microbial Technology. 128, 22-25.
- Zhang G., (2017). ***Zno/Ag Composite Nanoflowers As Substrates For Surface-Enhanced Raman Scattering.*** Applied Surface Science, 154-160.