

Nanotıp, mikrodizilimler ve klinik mikrobiyolojide kullanımları

Nanomedicine, microarrays and their applications in clinical microbiology

Erkan Yula¹, Özcan Deveci²

¹Kızıltepe Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Mardin, Türkiye

²Kızıltepe Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Mardin, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 01.09.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 03.11.2010

ÖZET

Nanoteknolojinin gelecekteki tıbbi uygulamalarına artan ilgi, "nanotıp" olarak adlandırılan yeni bir alanın ortaya çıkmasına öncülük etmiştir. Nanotıp, nano boyutlarda işlenmiş alet ve cihazları kullanarak insan biyolojisi ve sağlığının moleküler düzeyde incelenmesi, tedavisi, yeniden yapılması ve kontrolü olarak tanımlanabilir. Mikrodizilim teknolojisi, enfeksiyöz hastalıklarda genlerin rollerini aydınlatmada, araştırmaların geleneksel yöntemlerden entegre yaklaşıma kaymasına yol açan devrimci bir araçtır. Bu teknoloji tıbbi tanıda, tedavinin izlenmesinde, enfeksiyöz hastalıklardan korunma ve/veya yönetiminde yeni araçlar geliştirilmesinde büyük potansiyele sahiptir. Bu yazı, deneysel mikrobiyolojide mikrodizilim platformunda ve nanotıpta günümüz uygulamalarına ve klinik düzeyde bu teknolojinin etkisine genel bir göz gezdirmek amacını taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Nanoteknoloji, Nanotıp, Mikroçip, DNA mikrodizilim.

GİRİŞ

"Nanoteknoloji", nano boyutlardaki elementleri işleyen teknoloji olarak kısaca tanımlanabilir. Günümüzde hızla ilerleyen nanoteknoloji, birçok yeni buluş gibi önce savaş endüstrisi ve uzay teknolojisinde gelişimini sürdürüp olgunlaşmış, bilimin diğer alanlarında olduğu gibi, Tıp alanında da tanı ve tedavide çığır açacak yeniliklere açık bir halde, daha önce hiç düşünülmemiş yöntemleri ve fırsatları önümüze getirmiştir.

Tıbbın Radyoloji, Adli Tıp ve Patoloji gibi tanıya yönelik bütün alanlarında olduğu gibi Klinik Mikrobiyoloji alanında da son 20 yıl içerisinde baş döndürücü gelişmeler yaşanmıştır. Bütün tanının,

ABSTRACT

Growing interest in the future medical applications of nanotechnology is leading to the emergence of a new scientific field that called as "nanomedicine". Nanomedicine may be defined as the investigating, treating, reconstructing and controlling human biology and health at the molecular level, using engineered nanodevices and nanostructures. Microarray technology is a revolutionary tool for elucidating roles of genes in infectious diseases, shifting from traditional methods of research to integrated approaches. This technology has great potential to provide medical diagnosis, monitor treatment and help in the development of new tools for infectious disease prevention and/or management. The aim of this paper is to provide an overview of the current application of microarray platforms and nanomedicine in the study of experimental microbiology and the impact of this technology in clinical settings.

Key words: Nanotechnology, Nanomedicine, Microchip, DNA microarray.

kültür ortamında mikroorganizmaların üretilmesi veya bu yapılamıyorsa basit serolojik tetkiklerle hasta serumunda antikorların gösterildiği yöntemler üzerine kurulduğu bu alanda, uzayı keşfetme tutkusunun ihtiyaçlarına cevap vermek üzere geliştirilen teknolojinin yan ürünleri ile otomatize edilmiş cihazlar kullanılmaktadır. Önceleri kültür-antibiyoqram sistemleri, arkasından klinik örneklerdeki mikroorganizmalara ait spesifik genetik materyalin 2-3 saat gibi kısa bir sürede amplifiye edilerek çoğaltıldığı nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, bütün önceki tanı protokollerini değiştirmiştir. Zaman kaybı azaltılmış, duyarlılık ve özgüllük artırılmış, eski hastalıkların bilinmeyen etiyojileri aydınlatılmış ve fenotipik özellikler yerine gendeki nokta

mutasyonların epidemiyolojik bilgi edinmek için kullanıldığı bir çağ başlamıştır. Bu gelişim sırasında varılan en son nokta nanoteknolojidir.¹⁻⁴ Bütün diğer gelişmeler gibi aklımızın ve hayalimizin sınırlarını zorlayan bu yenilikler yakın bir gelecekte mikrobiyolojik tanının vazgeçilmez yöntemlerini oluşturacak gibi görünmektedir.^{4,5} Bu derlemede nanoteknoloji ile ilgili yeni bazı terminolojik kavramlara, tarihçeye ve konunun ümit vaadeden avantajlarına değindikten sonra klinik mikrobiyolojide neredeyse rutin olarak kullanılmaya başlanan mikroçip teknolojisinin ana prensipleri irdelenmiştir.

NANOTEKNOLOJİ VE TERMİNOLOJİ

Yeni bir teknolojinin en iyi tanımlaması, o teknoloji ile edinilen yeni kelime ve kavramların anlaşılması, kullanım alanlarının en iyi şekilde betimlenmesi ile mümkündür. Eski Yunan dilinde küçük, bodur manasına gelen “Nano”, terminolojik olarak bir metrenin milyarda biri anlamında kullanılmaktadır. Uzunluk birimi olarak mikrometrenin (μm) binde birini ifade eder. Kıyaslama yapabilmek amacıyla; yaklaşık 10 hidrojen atomunun 1 nanometre (nm) büyüklüğünde olduğunu söyleyebiliriz.

“Nanoteknoloji” materyalleri nanometrelerle ölçülebilecek düzeyde işleyen, pek çok çalışma alanını ya da disiplini birleştiren uygulamalı multidisipliner bir teknolojidir. “Nanobilim” ise bu teknoloji ile uğraşan bilim dalıdır ve bu alanın top lanmasıdır.⁶

“Nanoişleme” (Nanoprocessing) terimi ile ürünlerin atomik düzeyde işlenmesi belirtilmektedir. Günümüz teknolojisi bu büyüklükteki maddeleri işlemeye başlamış ve maddenin şimdiye kadar bilinmeyen özelliklerini ortaya çıkarmıştır.⁷ Örneğin; bu büyüklükte tasarılan bazı moleküllerin sürtünme katsayıları sıfırlanmakta, iletkenlikleri artmakta, dayanıklılıkları ve esneklikleri değişmektedir. Bu teknoloji ile 100-1000 atom büyüklüğündeki alanlarda çalışılmakta ve madde küçüldükçe beklenmedik bir şekilde hızı artmaktadır.

“Çip” (chip) nanoteknoloji alanında sık kullanılan diğer bir kavramdır. Küçük parça, kırıntı, yonga manasında bir tamamlayıcı anlamına gelen çip, kendinden türetilmiş birçok kelimenin köküdür. Örneğin; “biyoçip” (biochip) genel bir kavram olmakla beraber biyolojik materyaller için hazırlanmış bütün çipleri tanımlar. Yine literatüre son zamanlarda gir-

miş birbiri ile yakın manalardaki “Microarray genechip”, ‘DNA microchip’, ‘DNA array’, ‘DNA microarray’, ‘Oligonucleotide array’ ve “Genechip” ile üzerinde sekansı bilinen belli bir DNA fragmanını taşıyan çip kastedilmektedir.^{1,8,9}

NANOTEKNOLOJİNİN ÖNEMİ VE TARİHÇE

Nanoteknoloji, birçok gelişmiş ülke tarafından en önemli, öncelikli ve kritik uğraş alanı olarak kabul edilmiş ve büyük yatırımların yapıldığı, araştırma merkezlerinin kurulduğu, en çok desteklenen projeler arasında yerini almıştır. Milyarlarca dolarlık bütçeler bu yeni teknoloji üzerinde çalışan merkezler (Nanocenter) için ayrılmıştır. Bu yeni teknoloji ile maddenin daha önce bilinmeyen ve tahmin edilemeyen özellikleri keşfedilmiş, elde edilen bulguları kullanan moleküler biyoloji, cerrahi bilimler, uzay bilimleri, bilgisayar, elektrik-elektronik bilimleri, savunma sanayi, gen mühendisliği ve hatta çevre mühendisliği gibi geniş bir alanda kullanılan yeni cihaz ve sistemler geliştirilmiştir.⁷ Ülkemizde de bu yeni teknoloji ile paralel olarak bazı üniversitelerde nanoteknoloji anabilim dalı ve araştırma merkezleri kurulmaya başlamıştır.¹⁰⁻¹¹ Nanoteknolojide ulusal stratejik hedefler, TÜBİTAK önderliğinde vizyon 2023 projesi biyoteknoloji ve gen teknolojileri strateji grubu tarafından, biyoteknoloji ve gen teknolojileri strateji raporları adı altında yayınlanmıştır.⁷

Doğal olarak diagnostik moleküler mikrobiyoloji de bu gelişmeden etkilenerek hızlı bir atılım ve ilerleme sağlamıştır. Bu teknoloji sayesinde bilinen bütün bakteri ve virüslerin identifikasyonu bir petri kabı büyüklüğünde, elektronik devrelerle birbirine bağlanmış, otomatize çiplerin kullanıldığı sistemlerle yapılabilir hale gelmeye başlamıştır (Şekil 1). Bu alanda yayınlanan makalelerin sayısı her geçen gün artmış ve kısa bir sürede nanoteknolojiyi kullanan çalışmaların yayınlandığı dergiler yayın hayatına başlamıştır.¹²

Nanoişleme ile ilgili olarak Richard Feynman 1959 yılında, maddenin atomik katmanda işlenebileceği konulu ilk hipotez ve uygulamaları ile Nobel ödülünü kazanmıştır. Daha sonra D. Eigler ve E. Schweizer, Kasım 1989’da 35 ksenon atomu ile IBM logosunu yapmışlardır. Buradaki bir nokta işareti 350 milyon logo sığdırılabilmektedir. K. Eric Drexler, nanoteknoloji terimini kullanan ilk kişi olmakla birlikte 1981’de moleküler mühendislik ve moleküler elektronik devreler üzerinde yaptığı çalışmalarla adını duyurmuş, takip eden yıllarda

moleküler görüntüleme ve nanofabrikasyon için moleküler tip diziler, nanoteknolojide yöntemler ve moleküler imalat konulu birçok yayına imzasını atmıştır.¹³ Rick Smalley ise nano üretimin babası olarak kabul edilir ve çalışmaları Nobel ödülünü getirmiştir.¹⁴

NANOTIP VE PRATİK UYGULAMALAR

Tıp biliminde nanoteknolojinin kullanım alanı “Nanotıp” olarak isimlendirilmektedir.¹⁵ Konu olarak nanotıp; tanı, tedavi, hastalık ve travmatik yaralanmaların önlenmesi, ağrının giderilmesi ve insan sağlığının korunup geliştirilmesi amaçlı vücudun moleküler bilgileri ile moleküler araçların kullanılmasını içermektedir.¹⁶ Moleküler biyologların, fizikçilerin, matematikçilerin, tıp mensuplarının ve bilgisayar mühendisleri ile diğer mühendisler gibi

multidisipliner birçok bilim adamının ortak çalışması gereken bir alan olup, ilk defa nanobiyoteknoloji laboratuvarı 2000 yılında Cornell Üniversitesi’nde kurulmuştur.

Mikrodizilim (microarray) teknolojisinin klinik mikrobiyolojideki önemi

Mikroçip teknolojisi ile identifikasyon problemlerinin çözülmesi, antibiyotik ve antiviral direnç genlerinin tespiti, tanı zamanının kısaltılması, klinik mikrobiyolojik aciller ve değerli örneklerde (BOS vb.) identifikasyon sorunlarının giderilmesi planlanmakta ve bu alanda her geçen gün yeni yöntem ve sonuçlar yayınlanmaktadır.^{15,17} Patojen mikroorganizmaların tespitinde nano boyutlardaki sensörler geliştirilerek DNA/RNA analiz sistemleri (GeneChip) yapılandırılmıştır (Tablo 1).^{16,18}

Tablo 1. Mikrodizilim tekniği uygulama alanları

Çalışma Hedefi	Uygulama	Hedef organizma
Patogenez	Virulans faktörlerinin identifikasyonu İmmün kaçış mekanizmaları	Patojen Patojen/Konak
Duyarlılık	Konağın patojene duyarlılığı	Konak
İlaç cevabı	Konağın ilaca cevabı Patojenin ilaca cevabı	Konak Patojen
Aşı geliştirme	Antijen keşfi	Patojen/Konak
Patojen identifikasyonu	Özgül konak cevabı Patojen dizi analizi	Konak Patojen

Tanısal mikrobiyolojide kullanıma başlanan HIV Mikroçip sensörlerinin bazı gelişmiş ülkelere rutinde kullanımı yaygınlaşmaktadır.^{18,19} Daha çok mutant HIV genlerinin tespiti ve ilaç direncinin belirlenmesi amacıyla kullanılan mikroçip sensörleri ileri analizlerle HIV ile enfekte insanların bir kısmında neden AIDS gelişmediğini tam anlamıyla açıklayabilmiştir.

Mikro total analiz sistemi (μ TAS) olarak adlandırılan çip üzerindeki birkaç santimetre kare alan içerisinde kendi mikropompaları, mikroakım sensörleri, mikromikserleri, mikrofiltreleri ve optik dedektörleri olan ve yalnızca bir petri kabına sığdırılabilen laboratuvar sistemleri geliştirilmiştir (Şekil 1). Bu sistemler tam otomatize olarak örneklerin işlenmesini (örnek alımı, konsantrasyonu, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemi), biyokimyasal testleri (immünolojik reaksiyonlar, enzimatik reaksiyonlar,

DNA testleri) yapabilmekte ve sinyalleri (optik veya elektrokimyasal) tespit edebilmektedir.^{20,21}

HIV-I genomundaki direnç mutasyonlarının tanımlanması için; HIV-I gag genindeki en az 18 bazı, pol genindeki tüm bazıları (297) ve RT genindeki 123 bazı tespit edecek şekilde çipler geliştirilmiştir (RNA çipleri-revers transkriptaz). Küçük miktarda plazma ile enfeksiyon varlığı ve direnç genlerinin tespiti yapılabilmektedir. HIV Genotipleri için Multiple Genetik Testler amacıyla Minyatür Otomatize Entegre Çip’ler geliştirilmiştir.

Genlerin çalışma düzeninin belirlenmesinde mikroçiplerin kullanıldığı günümüz mikrodizilim teknolojisi ile prokaryotik genom projesi (prokaryotic whole genome projects) başarılı bir şekilde tamamlanmıştır.

Mikroçip (oligonükleotidçip) siklusu ve DNA çip üretimi

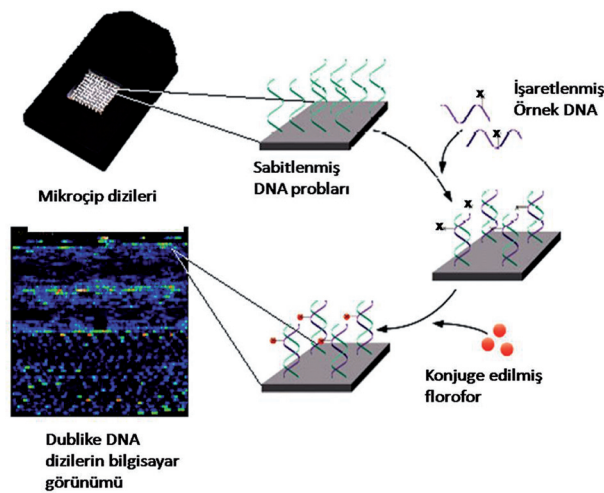
Bu yöntemde silikon çipler üzerine baz dizisi bilinen oligonükleotidler belirli bir düzenle yerleştirilir. Bu istenen baz dizisine sahip silikon çipler algılayıcı olarak kullanılır ve elde edilen verileri analizleri yapılmak üzere bilgisayara aktarılır (Şekil 2).²²

μTAS (Micro Total Analysis System)

- Mikropompalar
- Mikroakım (flow) sensörleri
- Mikromikserler
- Filtreler
- Optik dedektörler



Şekil 1. Mikro Total Analiz Sistemi (μTAS)²⁰



Şekil 2. Mikroçip (oligonükleotidçip) siklusu (21 nolu kaynaktan değiştirilerek uyarlanmıştır.)

Silika zemin (matriks) üzerine oligonükleotidler için bir köşeden diğerine binlerce yerleşim yeri hazırlanabilir. Ek olarak DNA'dan ters transkriptaz ile elde edilen RNA dizileri de çip üzerine yerleştirilebilmektedir. Ayrıca silika zeminin her bir yerine her defasında bir nükleotid olmak üzere özgün oligonükleotid problemler yerleştirilir. Araştırılacak nükleik asitler sıklıkla floresan özellikli bir boya ile konjuge edilir. Konjuge nükleik asitler hazırlanan matrikse (mikroçip) eklenir. Örnekte tamamlayıcı DNA varsa hibridizasyon gerçekleşir. Çip üzerinde oluşan hibridizasyon ve açığa çıkan floresanın şiddeti "scannig laser confocal fluorescence microscope" ile tespit edilir. Bilgisayarla otomatize mikroskop sayesinde zemin taranır ve birkaç dakika içerisinde çip yüzeyinin resmi alınır. Bu floresan resim, bilgisayarda spesifik program ile incelenir. Sinyal yoğunluğu ile bağlanan prob moleküllerinin sayısı hakkında bilgi elde edilebilir.²³ Çipteki küçük bir taşıyıcı yüzeye (silika matriks), kısa oligomerler yerine DNA fragmanları veya bir organizmaya ait genlerin PCR ürünleri de bağlanabilir.²⁴

Baz dizisi bilinmeyen bir organizmanın tüm genom fragmanı taşıyıcı bir yüzeye bağlanarak transkripsiyon analizinde veya genom karşılaştırmalarında kullanılabilir. Matriks hibridizasyonunun en önemli avantajı amplifiye edilen baz dizilerinin kompleks yapılarını çözebilmesidir. Bakteri kolonisinden elde edilen bakteri RNA'sı çip ile inkübe edilirse baz dizisi tespit edilebilir ve gen ekspresyon farklılıkları açıklanabilir. Mikroçipler ile duyarlılık 10 pg nükleik asitten daha aşağı seviyelere kadar düşürülmüştür. Bununla birlikte özgüllük, istenilen kros hibridizasyon düzeyi ile değişebilmektedir.

Bununla birlikte günümüzde mikroçip teknolojisinin en önemli problemi kompleksite sorunudur. Tolere edilebilen kirlilik (noise) düzeyi, tasarlanan çiplerde değişiklik göstermektedir. Genomların çeşidinin ve büyüklüklerinin fazla olması, bazı genlerin az veya aşırı eksprese edilmesi ve mobil genlerin varlığı bu soruna katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte halen üretimleri çok pahalı ve birçok kompleks aşamalardan sonra gerçekleşmektedir. Test maliyetlerinin yüksek olması ve yetişmiş eleman ihtiyacı da bulunmaktadır. Bu yöntemlerin tam standardizasyonu ve yeterli kalibrasyonu için gerekli olan bilgi birikimine hızla ulaşılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bir prob için ideal olan şartlar diğer bir prob için oldukça değişken olabilmektedir. Sen-

sitivite ve spesifite düzeyleri ile testin tekrarlanabilirliği gibi değerlendirmelerin de dikkatli bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Geleceğin parlayan yıldızı ‘mikroçip’ teknolojisinde, mikrobiyologları neler bekliyor?

Yüzlerce veya binlerce mikrobiyal hedef için DNA problu çipler hazırlandığında enfeksiyon hastalıklarının tanısının kolaylaşması hedeflenmektedir. Bu tür çipler bilinen tüm bakteriyel ilaç direnç genlerini içerecek şekilde hazırlanabilecek, bakteriyel genlerle birlikte patojen ve konak kromozomal faktörler de belirlenebilecek ve hasta ile uyumlu optimum ilaçların listesi oluşturabilecektir. Ek olarak tedaviye yanıtı değerlendiren biyoçiplerin üretimi tasarlanmaktadır. İdentifikasyon süresinin kısalması ile “klinik mikrobiyolojik aciller” artık sorun olmaktan uzaklaşacaktır. DNA çipleri üzerinde inşa edilecek mikrocihaz şeklindeki “moleküler laboratuvar” hazırlama çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu moleküler laboratuvarlar otomatik olarak mikropompaları, mikromikser ve sensörleri ihtiva eden, filtrele ve optik dedektörlere sahip Micro Total Analysis System (μ TAS) olarak adlandırılan bu yeni analiz alanı sadece bir petri kabı büyüklüğünde dizayn edilmektedir (Şekil 2).²⁰

Enfeksiyöz hastalıklarda mikrodizilim uygulamaları

Mikrodizilim teknolojisi, genlerin enfeksiyöz hastalıklardaki rollerini belirlemede konvansiyonel yöntemlerden farklı olarak karmaşık sistemleri izleyebilmeye olanak vermesiyle alanında çığır açmıştır. Mikrodizilim platformunda günümüzde temel amaçlardan biri de konak ve patojen etkileşmesini ve bu ilişkinin nihai olarak kliniğe etkisini araştırmaktır. DNA mikrodizilim teknolojisi, enfeksiyon hastalıklarının araştırılmasında farklı biyolojik durumlarda paralel sonuç vermesiyle hızlıca kabul görmüş bir yöntemdir. Bir mikrobiyal genom için DNA mikrodizilimin dizaynı ile; mikrobiyal genlerin ekspresyonunun izlenmesine, karakterize edilmiş genlerin fonksiyonunun belirlenmesine, farklı çevresel koşullar altında fizyolojik adaptasyonların anlaşılmasına, virulansla ilişkili genlerin tespiti ve ilaçların etkisinin belirlenmesinin en doğru şekilde araştırılmasına olanak sağlanmaktadır (Tablo 1). Konak gen mikrodizilimleri ile de enfeksiyonu takiben konak cevabın moleküler seviyede belirlenmesi mümkün olmaktadır. Konak profilinin belirlenmesi

ile her bir patojen için özgül olan gen ekspresyon sinyallerinin tespiti, enfeksiyöz hastalıkların tanısı, tedavisi ve prognozunun belirlenmesinde yeni araçların üretilmesine de olanak sağlayacaktır.^{24,25}

Modern biyoloji ve genomik bilimlerin daima artan bir oranda enfeksiyöz hastalıkların araştırılmasına yoğunlaşmıştır. Pnömonokların biyolojisiyle ilgili ilk çalışmalar sayesinde 1944 yılında genlerin protein tabiatında olmayıp DNA yapısında olduğunun anlaşılmasının ardından yarım yüzyıl geçtikten sonra bugün artık pahalı olmayan, güvenilir ve otomatik DNA dizi analiz yöntemleri ile yaklaşık 2.000 farklı bakteri ve virüsle beraber insan ve birçok konak organizmanın tam genom analizlerinin yapılması mümkün olmuştur. Yoğun ve hızlı bilgi birikimi ile günümüzde nükleotid bazları ile ilgili milyarlarca bilgi ışığında enfeksiyöz hastalıkların moleküler iz düşümünü anlamada bir el feneri olacak yöntemlerin başında DNA mikrodizilim bazlı yöntemler yer almaktadır.

Patojen mikroorganizmaların tespiti ve identifikasyonu

Mikroorganizmaların tüm genetik materyalleri mikrodizilimler ile incelenebilmektedir. Wilson ve arkadaşları prokaryot, ökaryot ve virüslerden 18 patojen mikroorganizmayı aynı anda tespit eden “Multi-Pathogen Identification (MPID)” mikrodizilim geliştirmişlerdir.²⁶ Bu çalışmada araştırmacılar her bir organizmanın özgül DNA bölgelerini amplifiye etmişler ve mikrodizilimleri kullanarak patojene özgü DNA sekanslarının varlığını araştırmışlardır. Bazı durumlarda patojen DNA saptama sınırı 10 femptogram kadar az bir miktar olarak tespit edilmiştir. Mikrodizilimler, *P. aeruginosa*’nın 11 ve *Mycobacterium tuberculosis*’in 12 farklı suşunun genom hibridizasyon yöntemleri ile karşılaştırılmasında da kullanılmıştır. Örneğin; *M. tuberculosis*’de 16S ribozomal DNA sekansları patojenin tür düzeyinde identifikasyonu için kullanılmış ve rpoB genindeki rifampin direnci karakterize edilebilmiştir.^{27,28}

Suş tiplendirme ve epidemiyoloji

Mikrodizilim teknolojisi, patojenlerin tespit ve tanımlanmasına ek olarak aynı tür içinde yer alan farklı izolatlar arasındaki genetik farklılıkları da karakterize etmekte kullanılabilir. Örneğin; bir çalışmada oksasilin dirençli 21 adet *Staphylococcus aureus* izolatu mikrodizilim tekniği ile incelenmiş

ve ribotipleme ve pulsed-field gel electrophoresis'e (PFGE) benzer şekilde kümelenmeler verebildiği hatta mikroçip yönteminin özellikle virulans faktörleri ve antimikrobiyal direnç faktörlerinde daha yüksek ayırım yeteneğinin olduğu gösterilmiştir.²⁹ Menenjit etkenlerinin araştırılması için düzenlenmiş mikrodizilim testinde etkenlerin hızlı şekilde tespiti mümkün olabilmektedir.

Patojen mikroorganizmaların identifikasyonunda ekspresyon profil sinyalleri

Araştırmacılar mikroçip ekspresyon dizilimlerini kullanarak konak ekspresyon profilleri veya sinyallerini tanımlayabilmektedirler ve bu veriler patojenin tanımlanmasında kullanılabilir. Ekspresyon profilleri ve prediktör genler, kanserin farklı tiplerinin sınıflanmasında kullanıldığı gibi enfeksiyöz hastalıkların farklı çeşitlerinin sınıflandırılmasında da kullanılabilirler. Örneğin; *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis* ve intrasellüler *Salmonella typhimurium* kıyaslanmasında Hess ve ark. konak cevap ekspresyon profillerini bulmuşlardır.³⁰ Cins veya grup spesifik transkripsiyonel cevap paternleri muhtemelen her bir hastalığın farklı patolojilerinin oluşmasına katkıda bulunmaktadır.

Enfeksiyöz hastalığa yatkınlığın belirlenmesi

Bazı bireylerin enfeksiyöz hastalığa olan genetik duyarlılık ve/veya dirençlerinin hızlıca tespit edilmesinde veya bilinmeyen genetik faktörlerin belirlenmesinde mikrodizilimler oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Örneğin; HIV ile ilişkili insan CKR5 koresseptör mutasyonlarının viral enfeksiyona karşı dirence yol açtığı gösterilmiştir.³¹ Resequencing mikroarray teknolojisi ile geniş popülasyonlardaki bu mutasyonlar hızlıca taranabilecek ve bireylerin hastalıklara olan yatkınlıkları belirlenebilecektir.

İlaç cevabı(konakvepatojen mikroorganizmadaki genotipik varyasyonlar)

Bakteriyel enfeksiyonların etkin tedavisinde patojendeki genotipik varyasyonların belirlenmesi ile major antibiyotik gruplarına direncin hızlıca belirlenmesi ve tedavinin direnç profiline göre şekillendirilmesi oldukça büyük önem arz etmektedir. DNA sequencing mikroarrayler, metisilin direncinde *mecA* geni, tetrasiklin direncinde *tetA* geni, penicilin direncinde *bla* geni ve rifampicin direncinde

rpoB geni gibi birçok dirençle ilişkili mutasyon varlığının belirlenmesinde de kullanılabilir.¹⁷

Ek olarak konaktaki genotipik varyasyonun tespiti de tedavinin şeklini etkileyecektir. Antibiyotiklere bağlı toksisite birçok ilacın kullanımını sınırlayan ve bazen letal sonuçlara yol açabilen bir faktördür.³² Mikrodizilimler, bireylerdeki ilaç metabolizma genlerindeki varyasyonların kataloğunu hazırlamak üzere kullanılmaktadır. Örneğin; bir çalışmada *Helicobacter pylori* ile enfekte 143 hastanın 50'sinde bir haftalık üçlü antibiyotik tedavisinin başarısız olduğu tespit edilmiş ve enfekte kalmaya devam eden bu 50 hastanın antibiyotikleri daha hızlı metabolize ederek vücuttan atılımını hızlandıran CYP2C19 genotype25'e sahip oldukları tespit edilmiştir.^{32,33}

Ön analizler ile klinisyenlerin en iyi ilacı en iyi dozda verebilme olanağının ve yan etkilerden korunmanın sağlanabilmesi hedeflenmektedir. İlaç cevabı, etkinliği ve toksisite ile ilişkili konak genlerinin tespitinin belirlenmesi ile ilişkili tüm genom DNA analizleri en umut verici uygulamalardan biridir.

Aşı geliştirme çalışmaları

Araştırmacılar mikroçip dizilimler ile in-vivo şartlar altında patojen mikroorganizmanın tüm genlerinin transkripsiyonel aktivitesini inceleyebilmektedirler. Hatta bu şekilde çok nadiren eksprese edilen fakat potansiyel olarak önemli genlerin incelenmesi bile mümkün olabilmektedir. Sadece in-vivo ortamda eksprese edilen genlere bağlı yeni antijenlerin keşfedilmesi ve aşılarda için yeni hedeflerin keşfedilmesi kolaylaşmaktadır.^{30,34} Örneğin; bir çalışmada *N. meningitidis*'in in-vivo şartlar altında indüklenen yüzey proteinlerini bulmak için tüm genomu çapında ekspresyon analizi yapılmıştır.

SONUÇ

Günümüzde nanoteknoloji, enfeksiyöz hastalıkların araştırılmasında eşi görülmemiş fırsatlar yaratmakta ve klinik mikrobiyologların yeni çalışma düzeneklerinde tanıdan tedaviye eşsiz olanaklar sunmaktadır. Ulaşılan bu son noktada nanoteknolojideki yeniliklerin takip edilebilmesi için ülkemizde konu ile ilgili merkezlerin ve araştırmacıların sayısının artırılması hayati önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jain KK. Nanodiagnostic: Application of nanotechnology in molecular diagnostic. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:153-61.
2. Hanai T, Hamada H, Okamoto M. Application of bioinformatics for DNA microarray data to bioscience, bioengineering and medical fields. *J Biosci Bioengin* 2006;101:377-84.
3. Leroy Q, Raoult D. Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. *J Microbiol Methods* 2010;25:81-95.
4. Severino P. Microarrays and infectious diseases: overview and perspectives. *Einstein* 2005;3:287-9.
5. West JL, Halas NJ. Applications of nanotechnology to biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:215-7.
6. Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 2005;1:2-9.
7. Fu L, Cao L, Liu Y et al. Molecular and nanoscale materials and devices in electronics. *Adv Colloid Interface Sci* 2004;111:133-57.
8. Eguíluz C, Viguera E, Milla'n L et al. Multitissue array review: A chronological description of tissue array techniques, applications and procedures. *Pathology Res Pract* 2006;202:561-8.
9. TÜBİTAK, Vizyon 2023 projesi biyoteknoloji ve gen teknolojileri strateji grubu, biyoteknoloji ve gen teknolojileri stratejisi. Ulaşılabileceği adres: <http://vizyon2023.tubitak.gov.tr>.
10. Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı. Ulaşılabileceği adres: <http://www.nanott.hacettepe.edu.tr>.
11. Gazi Üniversitesi Nanotıp Araştırma Merkezi. Ulaşılabileceği adres: <http://www.nanomed.gazi.edu.tr>.
12. Journal of Nanomedicine. Ulaşılabileceği adres: <http://www.nanomedjournal.com/aims>.
13. Drexler KE. Engines of creation: the coming era of nanotechnology. New York: Anchor Pres/ Doubleday 1986:99-129.
14. Ulaşılabileceği adres: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1996/smalley-autobio.html
15. Infectious Disease Application Note. 2005; Part No.702010 Rev.1. Ulaşılabileceği adres: www.affymetrix.com.
16. Mastrangelo C. DNA analysis systems on a chip. *Adv. Sci. Technol* 1999;26:465-76.
17. Jones P. DNA on a chip: microsystems for DNA analysis. *The Biochemist* 1999;21:14-7.
18. Saunders NA, Alexander S, Tatt I. env Gene typing of Human Immunodeficiency Virus Type 1 strains on electronic microarrays. *J Clin Microbiol* 2005;12:1910-6.
19. Dittrich PS, Tachikawa K, Manz A. Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Anal Chem* 2006;78:3887-908.
20. Tso Liu WT, Liang Zhu. Environmental microbiology-on-a-chip and its future impacts. *Trends Biotechnol* 2005;23:1-6.
21. Ulaşılabileceği adres: http://www.cfgbiotech.com/microarray/images/gene_chip_expression.jpg.
22. Souteyrand E. DNA chips: from elaboration to application. *Analisis* 1999;27:639-46.
23. Dufva M. Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Engineer* 2005;22:173-84.
24. Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R et al. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004;4:100-11.
25. Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ et al. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol Cell Probes* 16, 2002;119-27.
26. Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8484-9.
27. Mostowy S, Tsolaki AG, Small PM, Behr MA: The in vitro evolution of BCG strains. *Vaccine* 21, 2003:4270-4.
28. Sougakoff W, Rodrigue M, Truffot-Pernot C et al. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:289-94.
29. Dunman PM, Mounts W, McAleese F et al. Uses of *Staphylococcus aureus* GeneChips in genotyping and genetic composition analysis. *J Clin Microbiol* 2004;42:4275-83.
30. Hess S, Peters J, Bartling G et al. More than just innate immunity: comparative analysis of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* effects on host-cell gene regulation. *Cell Microbiol* 2003;5:785-95.
31. Dean M, Carrington M, Winkler C et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996;273:1856-62.
32. Sapone A, Vaira D, Trespidi S et al. The clinical role of cytochrome P450 genotypes in *Helicobacter pylori* management. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1010-5.
33. Rouveix B: Antibiotic safety assesment, *Int J Antimicrob. Agents* 2003;21(3):215-21.
34. Bagge N, Schuster M, Hentzer M et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1175-87.