



NANOGENAIR MARKA CLEAN TEKNOLOJİ MODEL ÜRÜNLERİN BİYOSİDAL  
ETKİ ARAŞTIRMASI

ARAŞTIRMA PROJESİ RAPORU  
ARGE TTO-20-093

NİSAN 2021

(Firma talebine göre TCID50 yüzde değişim fark tablosu eklenmiş hali ile revize rapor)

## Giriş:

“Nanogenair Marka Clean Teknoloji Model Ürünlerin Biyosidal Etki Araştırması” isimli proje 4691 sayılı kanun kapsamında AR-GE / YAZILIM projesi olarak, GOSB Teknopark A.Ş. “Nanogenair Marka Clean Teknoloji Model Ürünlerin Biyosidal Etki Araştırması” başlıklı proje kapsamında ilgili teknolojinin zamana ve yüzeye bağlı biyosidal etkilerinin dolaylı olarak incelenmesi amacı ile. Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünden Prof. Dr. Işıl Aksan Kurnaz ve Prof. Dr. Elif Damla Arısan danışmanlığında yürütülen TTO-ARGE-20-093 nolu sözleşme gereğince bir Ar-Ge projesi iki ana aşamada gerçekleştirilmiştir: ilk aşamada memeli hücrelerinde temelde önerilen teknolojinin etkilerinin memeli hücreleri üzerinde canlılık ve ölüm parametreleri açısından incelenmesi floresan mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Temelde bu kapsamda belirli bir zaman periyodunda önerilen teknoloji ile iklimlendirilmesi yapılmış ortamda hücrelerin sağkalım ve ölüm parametreleri değerlendirilmiştir. Eş zamanlı olarak iklimlendirme yapılmayan hücre kültürü ortamına uygun ve eş niteliklerde ikinci inkübatörde yetişen hücrelerdeki çoğalma hızı karşılaştırmalı olarak takip edilmiş ve raporlanmıştır. Bu kapsamda seçilen memeli hücreleri immortalize nitelikte olup farklı kökene sahip hücreler üzerinde biyolojik süreçleri incelenmiştir.

Projenin ikinci aşamasında sıklıkla viral enfeksiyon kaynağı olarak tanımlanan Influenza (ATCC VR-1679) ve/veya Human respiratory syncytial virus (ATCC® VR-1540™) ile kontamine olmuş 5 farklı yüzey tipi için (metal, kağıt, ahşap, plastik, cam, seramik gibi yüzeylerde) önerilen teknoloji ile zamana bağlı bir şekilde iklimlendirilen ortamda kalma süresi ve virülens etkisi herbir virüse özgü seçilen konakçı memeli hücresinde gerçekleştirilen plak deneyi ile irdelenmiştir.

## Yöntem:

“Nanogenair Marka Clean Teknoloji Model Ürünlerin Biyosidal Etki Araştırması” başlıklı proje kapsamında ilgili teknolojinin zamana ve yüzeye bağlı biyosidal etkilerinin virus ve konakçısı olan memeli hücreleri üzerinden tanımlanması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda elde edilecek bulguların, iklimlendirme teknolojileri kapsamında başarı ile imal edilen ve inovatif özellikleri ön plana çıkan ürünün geçmişte gösterilen antibakteriyel özelliklerine ek olarak bu proje kapsamında Influenza A (ATCC VR1743) ve(ya) RSV gibi virüslerin bulaşı gösterdiği yüzeylerde potansiyel etkisi dolaylı olarak irdelenmiştir.

Proje özelinde temel amaçlar, uygulama yapılan alanın havasında biyogüvenilir ölçekte iklimlendirme standartlarına sahip olan teknolojinin memeli hücreleri üzerindeki etkisi MTT hücre canlılığı ve mitokondri membrane potansiyelindeki değişimler, hücre membran bütünlüğü açısından irdelenmiştir.

Sitotoksik etkinin tayini için zamana bağlı MTT hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiştir. Önerilen cihaz CO<sub>2</sub> inkübatör içerisine yerleştirilmiş ve hücrelerin büyümesi için 37°C de hücre canlılığı testi rutin hücre kültürü uygulaması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı olarak kontrol hücre uygulaması için bir başka inkübatör (eş özelliklerde) kullanılmıştır. Eş zamanda olacak şekilde 1 saat uygulaması sonrasında MTT testi için  $1 \times 10^4$  hücre 96 kuyucuklu petrilere test edilmiştir. Bu amaçla proje önerisinde insan epidermis larenks karsinoma hücreleri (HEp-2 ATCC CCL-23) ve MEF hücreleri öngörülmüş ancak virüslerin ACE2 kapısında daha çok takılı kalmaları nedeni ile daha iyi bir modelleme amacı ile BEAS akciğer kanseri (cccc) ve HEK293 (cccc) hücreleri ile deneyler gerçekleştirilmiştir.

Belirlenen zaman (0-1 saat) boyunca normal koşullara karşın önerilen teknoloji ile iklimlendirilen inkübatörde bekletilen hücrelere 10 µl MTT boyası (50 mg/ml PBS) eklenmiş ve 4 saat her bir örnek grubu kendi bekletildiği inkübatörde tutulmuştur. Mitokondriyal enzimler tarafından indirgenen mavi renkli ürünün 570 nm’de yaptığı absorbansın ölçümü prensibine dayanan kolorimetrik MTT testi sonuçları her bir deneme grubu için en az 3 tekrarlı olarak belirlenmiştir. Toplanacak veriler ile hücrelerde kontrole oranla göreceli canlılık testi sonuçları sunulmuştur (Chen vd. 2015, Arisan vd. 2020). DiOC6/mitotracker boyama yine aynı miktarda ve aynı zamanda tutulan deney gruplarında gerçekleştirilmiştir.

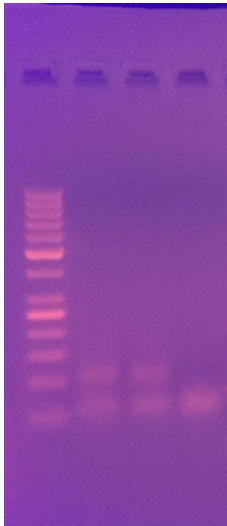
Uygulama sonrasında 4nM DiOC6/Mitotracker boyası içeren besiyer ile tüm hücrelerin üzerindeki besiyeri yenilenmiş ve 15 dk bekleme sonrasında yeşil floresan ışımaya floresan mikroskopta (Zoe, Biorad) en az 3 tekrarlı hücre grupları için belirlenerek temsil şekilleri sonuç kısmında sunulmuştur. Ayrıca floresan okuyucusu (Thermo VarioScan) 488nm/525 em:ex oranında okuma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kontrole oranla yüzde değişim olarak

ifade edilmiştir. Propidyum iyodür boyama ile hücrelerdeki membrane geçirgenliği test edilmiştir. Bu kapsamda 5 mg/ml propidyum iyodür (PI) veya DCFDA içeren besiyeri ile tüm hücrelerin üzerindeki besiyeri değiştirilmiş ve 30 dakika boyunca inkübatörde bekletildikten sonra analiz floresan mikroskopunda gerçekleştirilmiştir. Kırmızı renkte ölü hücrelerin boyanmasına yönelik gözlemin yanısıra 536/617 nm ex:em değerlerinde okuma gerçekleştirilmiştir. DiOC6/mitotracker boyamada olduğu gibi en az üç tekrarlı elde edilen sonuçlar kontrole oranla yüzde değişim olarak grafik olarak sonuç kısmında sunulmuştur.

Virüs canlılığı üzerindeki etkinin tanımlanması için H1N1 için MDCK hücreleri (ATCC CCL-3), Human respiratory syncytial virus (ATCC® VR-1580™) için insan epidermis larenks karsinoma hücreleri (HEp-2 ATCC CCL-23) ve Human coronavirus 229E (ATCC® VR-740™) için MRC-5 (ATCC® CCL-171™) ve Human herpesvirus 2 (ATCC® VR-734™) için Vero cells (ATCC® CCL-81) üretici firmadan temin edilmiştir. Tüm hücreler Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle ortamında (DMEM) veya MEM besiyerinde, %10 ısı ile etkisizleştirilmiş fetal buzağı serumu (FCS/FBS) ve penisilin/streptomisin ile birlikte büyütülecektir. Virüs deneyleri için virüslerin hücrelere aktarımı amacı ile konakçı hücreler 6 veya 12 kuyucuklu petrielerde 18-48 saat arasında %90 yoğunluğa geldikten sonra üretici firma önerisine göre Virüs Büyüme Besiyerinde (VBB)  $10^5$ - $10^7$  kadar olan virüsler ile 1:10 seri dilüsyon ile seyreltilerek aktarılmıştır. 37°C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde hücrelerin virüs örnekleri ile 1 saat bekletilmesi suretiyle enfekte hücreler elde edilmiştir.

Bu aşamadan sonra 5 farklı yüzey üzerine (metal, kağıt, ahşap/seramik, plastik ve cam yüzeyin) sürüntü şeklinde tatbik edilen virus miktarı farklı zamanlarda önerilen teknoloji ile iklimlendirilmiş biyogüvenli ortamda bekletilmiştir. Cam yüzey için steril lamel, metal yüzey için steril alüminyum folyo, kağıt yüzey için steril kağıt, seramik yüzey için UV ile sterilize edilmiş seramik parça, plastik yüzey için steril tek kullanımlık 50 ml falkon kapağı, ahşap yüzey için ise tek kullanımlık UV de 30 dk boyunca bekletilen ahşap karıştırıcı tercih edilmiştir. Ahşap yüzeyde gerçekleşen sonuçlarda kontaminasyon olması nedeni ile sonuç elde edilememiştir. Bu örnek yerine standart MDF yüzey denenmiştir. MDF yüzey sadece oda sterilizasyonu ile temizlendikten sonra UV ışığı ile doğrudan ışık altında tutularak (1 saat boyunca) deney için hazırlanmıştır. Nanogenair cihazı ile örnekler arasındaki uzaklık doğrudan 1 m<sup>2</sup>'i geçmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Her bir virus örneği için 30 µl damlacık (en az 3 tekrarlı) yüzeyler üzerine aynı anda konulmuş ve 3 saate kadar hava sirkülasyonu olmayan daha önceden UV ışığı ile steril edilmiş ortamda örnekler Nanogen air cihazı açık durumda iken bekletilmiştir. Yaklaşık olarak her bir virus örneği için  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml olup 30 µl damlacık için yaklaşık  $7-8 \times 10^5$  PFU/ml olduğu belirlenen örnekle çalışılmıştır. Daha sonrasında seçili

zaman dilimlerinde herbir virus kendi konakçısı için önceden ekim yapılan ve tam yoğun petriler üzerine aktarılmıştır. Deneylede kontrol olarak nanogen air cihazı ile iklimlendirme yapılamayan ortam örnekleri aynı zaman diliminde bekletilerek karşılaştırmalı olarak yer almıştır. Ticari olarak antiviral etkisi gösterilmiş temizleyici ajan ile MTT testi ayrıca gerçekleştirilmiştir. Virüs içeren besiyeri 1 saat sonrasında hücre petrisinden uzaklaştırılmış ve serumsuz ortamda hücreler uygun besiyerinde 48-72 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerde MTT hücre canlılığı testi ile hücrelerin virus enfeksiyonu sonucundaki canlılığı gösterilmiştir. Ayrıca kristal viyole ile belirleme yapılmıştır. Olası antiviral aktiviteler neticesinde plak oluşumunda meydana gelen göreceli azalma antiviral herhangi bir uygulamanın yapılmadığı petrilerde virüs enfeksiyonu neticesinde oluşan plak sayısı %100 olarak kabul edilecek, antiviral uygulamaların etkinliği bu sayıya kıyasla göreceli olarak hesaplanmıştır (Belser vd. 2015; Ramakrishnan 2016). Influenza ile enfekte edilen hücrelerde ayrıca virus varlığı PCR testi enfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA izolatlarında doğrulanmıştır.



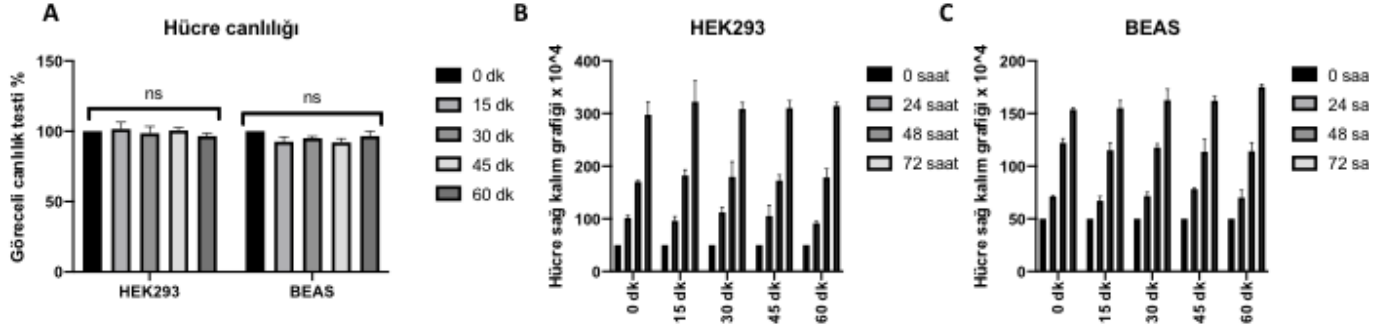
Ek şekil. H1N1 PCR sonucu, 50 bp marker, H1N1 146 bp (2 ve 3. kuyular).

## Sonuçlar

### *Farklı memeli hücrelerinde cihaz ile iklimlendirme yapılan ortamın dolaylı etkisinin gösterilmesi*

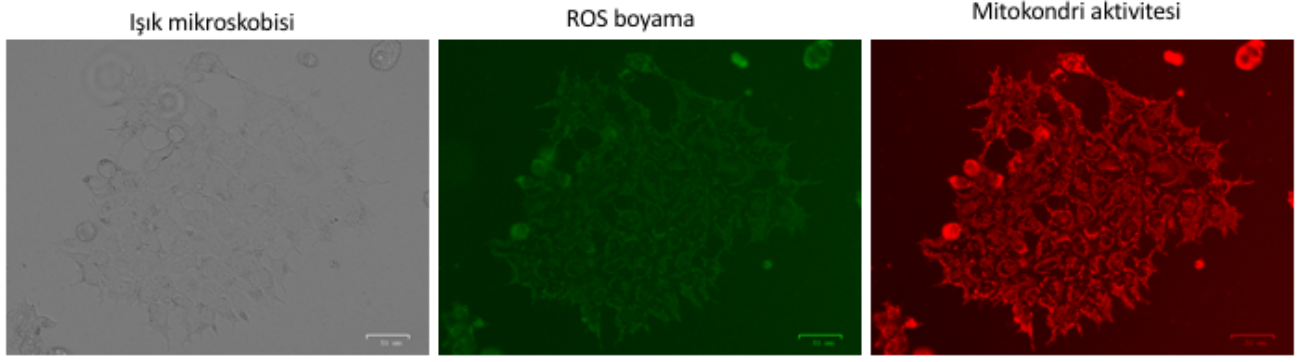
Projenin elde edilen ilk sonuçlarına göre CO<sub>2</sub> inkübatörde hücreler Nanogenair cihazı ile beraber farklı sürelerde olmak üzere 0-60 dk içerisinde tutulmuşlardır. Seçili deneylerde HEK293 ve BEAS hücreleri kullanılmıştır (Şekil 1). Deneylerin 60 dk çalışılabilmesinin ana nedeni, proje konusunu oluşturan cihazın olmadığı CO<sub>2</sub> inübatör koşullarına göre (Kontrol) cihaz ile

muamele edilen ortamda 1-1,5 °C sıcaklık farkının meydana gelmesidir. Bu nedenle deneyler 60 dk ile sınırlandırılmıştır.

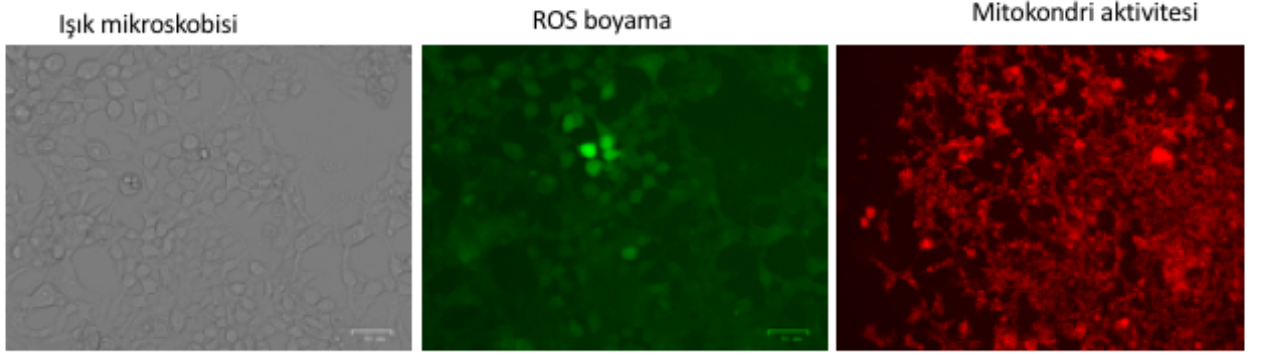


Şekil 1. A. Hücre canlılığı testi 0-60 dk boyunca farklı zamanlarda cihazın bulunduğu ortamda inkübe edilen hücrelerin 24 saat sonrasındaki MTT hücre canlılığı testi ile kontrol edilmiştir. 0 dk cihazın bulunduğu ortama maruz bırakılan hücreler %100 canlı kontrol hücreler olarak kabul edilmiş ve sırası ile 15, 30, 45 ve 60 dk uygulama yapılan hücrelerdeki mitokondri aktivitesi kontrol edilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arasında değer anlamsız (ns) olarak belirlenmiştir. N=2. B-C. HEK293 ve BEAS hücreleri -60 dk boyunca farklı zamanlarda cihazın bulunduğu ortamda inkübe edildikten sonra hücre sağ kalım parametreleri için 0-72 saat boyunca sayılmıştır. Hematositometre sayımlarında zamana bağlı hücre proliferasyonu takip edilmiştir.

Uygulamanın hücre canlılığı ve hücre sağ kalım süreçlerine yönelik sonuçlarına göre, Nanogen air ile iklimlendirilen ortamda hücre kültüründe yer alan ve aseptik koşulların gözetildiği ortamda uygulama yapılmayan kontrole göre anlamlı bir farklılığı hücre canlılığı deneylerinde göstermemiştir (Şekil 1). Benzeri şekilde hücre çoğalmasına bu kapsamda ket vurulmamış olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Bu sonuçlar ile uyumlu bir şekilde, 60 dk iklimlendirme ortamında farklı zaman dilimlerinde herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir. DCFDA boyama ile ortaya çıkan ROS oluşumu sınırlı ve mitokondri aktivitesi yüksek olarak (mitotracker boyama- Şekil 2 ve 3) olarak değerlendirilmiştir. Hücrelerin ışık mikroskopunda görünümünde morfolojik bir değişiklik göze çarpmamıştır. Hem HEK293 hem de BEAS hücrelerinde benzeri şekilde 60 dk boyunca Nanogenair ile iklimlendirilen inkübatör ortamında hücrelerde kontrole oranla anlamlı bir fark görülmemiştir.



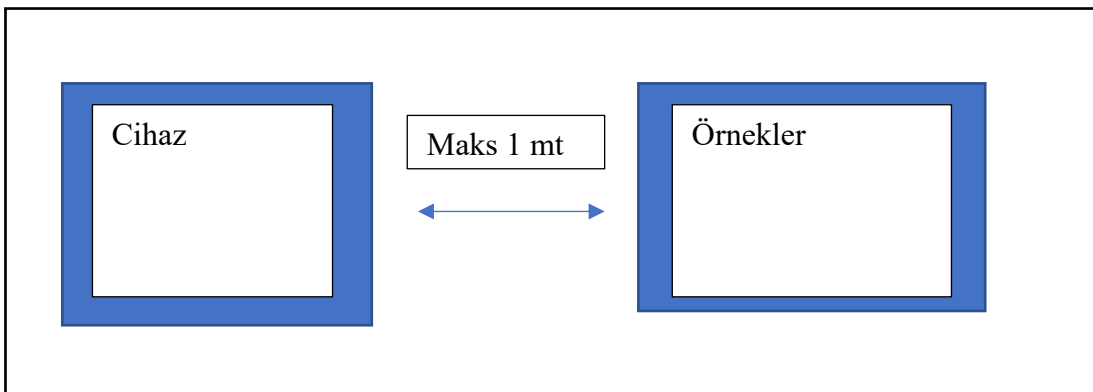
Şekil 2. HEK293 hücreleri 60 dk boyunca cihazın bulunduğu ortamda inkübe edildikten sonra ışık mikroskobunda (Sol) hücrelerin genel morfolojisi takip edilmiştir. (Orta) hücrelerde ROS formasyonu DCFDA boyama sonrasında kontrol edilmiştir. (Sağ) Mitotracker ile muamele edilen hücrelerde mitokondri aktivitesi gözlenmiştir.



Şekil 3. BEAS hücreleri 60 dk boyunca cihazın bulunduğu ortamda inkübe edildikten sonra ışık mikroskobunda (Sol) hücrelerin genel morfolojisi takip edilmiştir. (Orta) hücrelerde ROS formasyonu DCFDA boyama sonrasında kontrol edilmiştir. (Sağ) Mitotracker ile muamele edilen hücrelerde mitokondri aktivitesi gözlenmiştir.

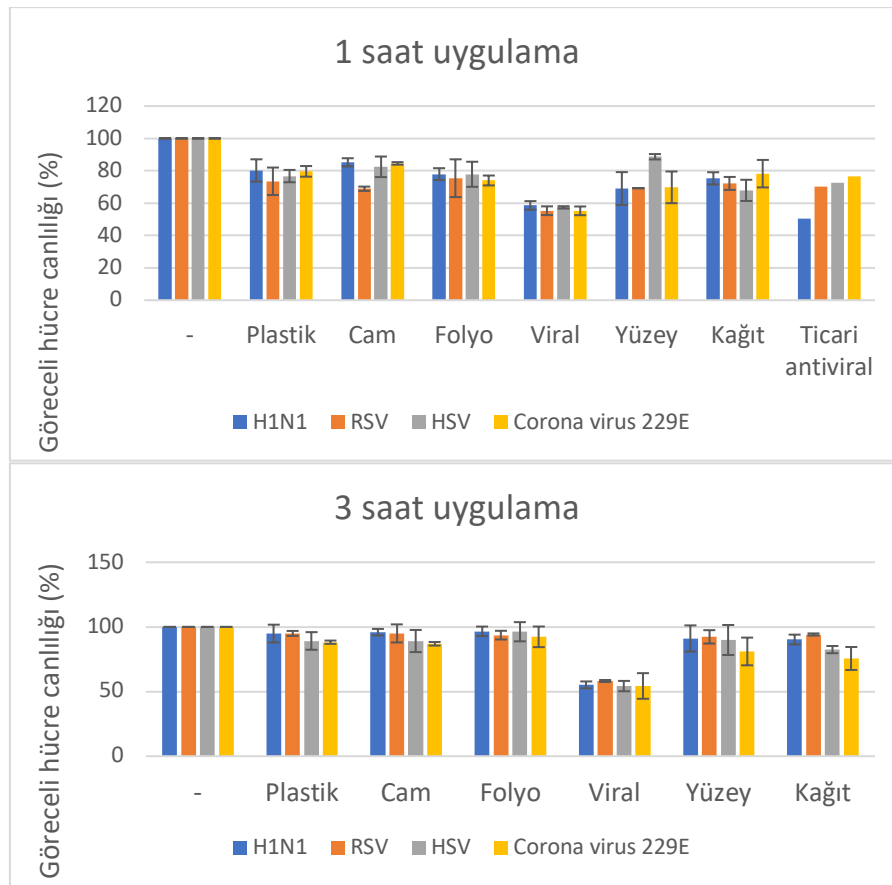
Sonuç olarak 1 Aralık 2020 tarihinde, projenin iş ve zaman takvimine uygun bir şekilde 2 farklı hücre hattında iklimlendirme süresi *in vitro* koşullara göre optimize edilerek Nanogenair ile ilgili iş paketi 1 tamamlanmıştır.

Projenin ikinci aşamasında farklı virus tipleri ve konakçısı olan hücrelerdeki etkileri iklimlendirme optimizasyonu gerçekleştirilen örnekler arasında test edilmiştir. Nanogen air cihazını doğrudan görece şekilde örnekler daha önceden temizlenen ve steril hale getirilen (hücre kültüründe bakteri kontaminasyonuna neden olmayan) farklı yüzeylerde 1-3 saat bekletildi.



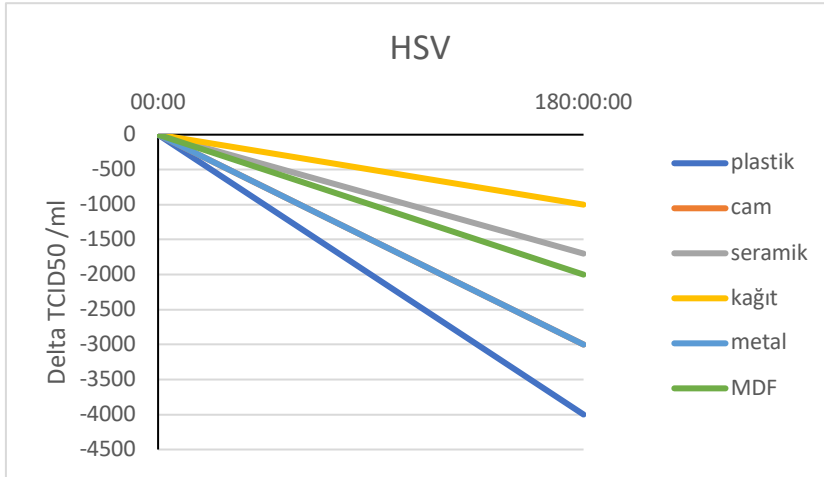
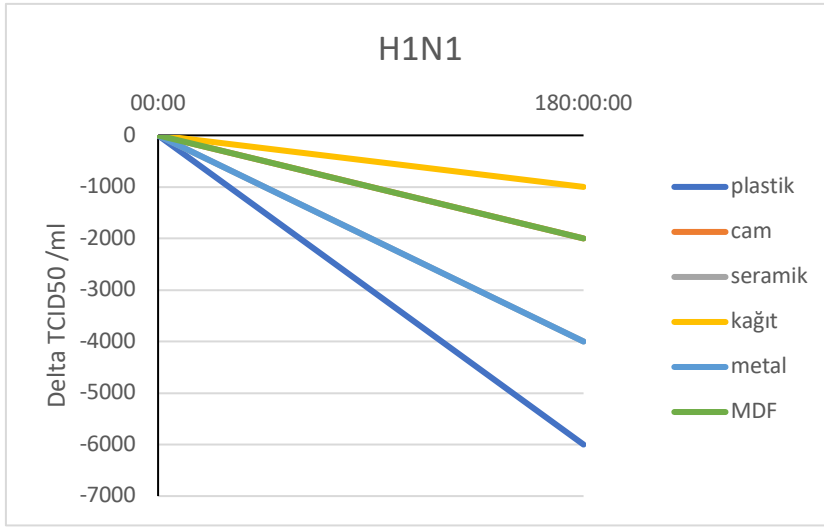
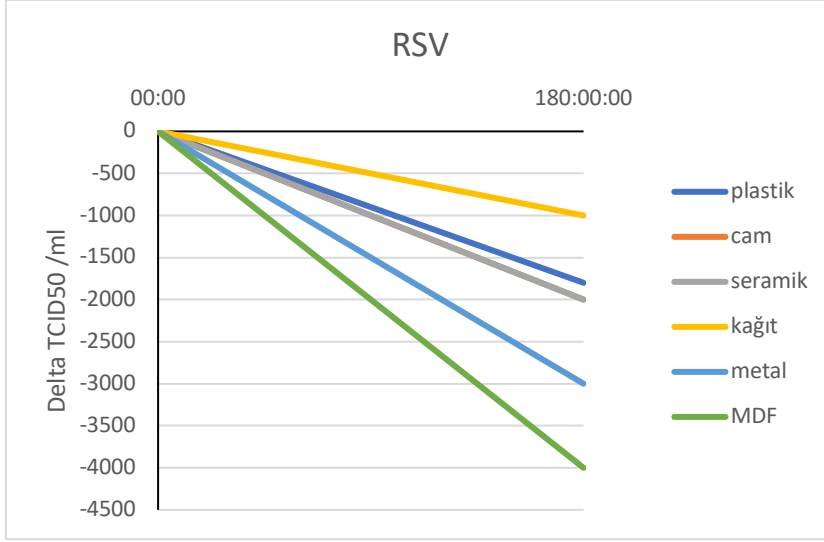
MTT hücre canlılığı sonuçlarına göre 1 saat ve 3 saat boyunca cihazın karşısında bekletilen örnekler, konakçı hücreleri üzerinde 1 saat bekletildikten sonra, virus içeren besiyerleri değiştirildi ve hücreler yeni besiyerlerinde (FBS olmadan) 48 saat boyunca bekletildi. Sonuçlar MTT boyasının eklenmesinin 4 saat sonrasında DMSO da örneklerin çözünmesi ile kolorimetrik olarak 570 nm’de spektrofotometrede okutuldu.

Virüsler ortalama%50 civarında hücre canlılığında azalmaya neden olmakla birlikte nanogen air e karşı yüzey üzerinde bekletilen virüslerde farklı sonuçlar gözlenmiştir. En az kağıt, en fazla folyo olmak üzere zamana bağlı bir şekilde cihaz farklı yüzeylere inoküle sıvıların kuruması ile birlikte 3 saat uygulama sonucunda %80-96,5 aralığında etki göstermiştir. Kağıt yüzeyde kuruma ve inoküle edilen sıvının dağılması muhtemel bir virus örneğinin geri kazanımında limit oluşturmuş olabilir. Ancak MDF yüzeyde dahil olmak üzere tüm örneklerde 3 saat önemli düzeyde sadece virus inokülasyonu yapılan konakçı hücrelere göre önemli düzeyde etki sağlamıştır (Şekil 4).



Şekil 4. MTT hücre canlılığı testi ile virüslerle muamele edilen hücrelerde nanogen air cihaz iklimlendirmesi 1 ve 3 saat uygulama sonrasında göreceli hücre canlılığı testi sonuçları. Kolon grafikler 2şer tekrarlı 2 bağımsız testin ortalama std hata değeri olarak sunulmuştur. Viral örnekler hücrelere doğrudan uygulanan virus sonuçlarını göstermektedir. Diğer yüzeyler ise steril edildikten sonra virüslerin bekletildiği ortam sonuçları olarak yer almaktadır.





Şekil 5. Delta TCID50/ml nanogen air cihazı ile iklimlendirme yapılan ve yapılmayan örnekler arasındaki fark olarak 180 dk uygulama sonrasında H1N1, RSV ve HPV için sırası ile uygulandı. 30 ul virus stoğu her bir virus numunesi için uygulandı. Her bir stok  $1 \times 10^6$  TCID50/ml yaklaşık  $8,0 \times 10^5$  PFU/ml olacak şekilde 12 kuyucuklu petrielerde bulunan konakçı hücrelere uygulama sonrasında veya öncesinde uygulandı. Her bir uygulama esnasında

örnekler en fazla 1 mt doğrudan cihaz ile karşıkarşıya olacak şekilde yüzeyler üzerinde bekletildi.

Ayrıca TCID50/ml hesaplamalarına göre uygulama yapılan ve yapılmayan örneklerde Reed Muench yöntemine göre veri eldesine göre fark hesapları 180 dk uygulama sonrasında Şekil 5 te sunulmaktadır. Şekil 5 e göre en az kağıt örneklerde bu fark görülmekte olup, metal ve plastik örneklerde önemli ölçüde farklı TCID50/ml değeri gösterilmiştir.

Bu ürün en az yukarıda belirtilen uzaklık ve sürelerde kullanılmak sureti ile oda içerisinde farklı yüzeylerde tutunması muhtemel yukarıda yer alan virüslere karşı yüzey tipine bağlı olarak 1 mt uzaklıktaki uygulama ile %90 ve üstü etkili olma potansiyelindedir. Aynı ürün 1 saat boyunca insan hücrelerinde CO2 etüv ortamında negatif sitotoksik bir etkiye neden olmamıştır.

Bu kapsamda deney koşulları ve zamanındaki virüs biyolojik yetkinliğinde TCID50/ml değerindeki farklılıklara göre aşağıdaki tabloya benzer yetkinlikte değerlendirilebilir.

Virüs adı		Temas süresi	Log 10 virüs titre ortalaması	Log10 azalma oranı	Yüzde azalma oranı
H1N1	Kontrol	0 dk	6,45	-	
H1N1	Kontrol	180 dk	6,28	0,17	
	<i>plastik</i>		5,28	1,17	≥%90
	<i>cam</i>		5,36	1,09	Kağıt hariç
	<i>seramik</i>		5,32	1,13	
	<i>kağıt</i>		6,40	0,05	
	<i>metal</i>		5,32	1,13	
<i>MDF</i>	5,36	1,09			
RSV	Kontrol	0 dk	6,5	-	
	Kontrol	180 dk	6,00	0,5	
	<i>plastik</i>		5,15	1,35	≥%90
	<i>cam</i>		5,08	1,42	≥%90
	<i>seramik</i>		5,08	1,42	≥%90
	<i>kağıt</i>		6,00	0,50	

	<i>metal</i>		5,48	1,02	≥%90
	<i>MDF</i>		5,60	0,90	%90
HPV	Kontrol	0 dk	6,57	-	
	Kontrol	180 dk	6,40	0,05	
	<i>plastik</i>		5,60	0,85	%90
	<i>cam</i>		5,48	0,97	%90
	<i>seramik</i>		5,23	1,22	≥%90
	<i>kağıt</i>		6,40	0,05	
	<i>metal</i>		5,48	0,97	%90
	<i>MDF</i>		5,30	1,15	≥%90

*Sonuçlar GTÜ tarafının yazılı izni olmadan kopyalanamaz, yazılı veya görsel reklam gibi resmi işler haricinde GTÜ izni olmadan kullanılamaz. Taraflar ortak yayın olarak mutabık kaldıkları son metin üzerinden akademik yayın, patent vb. gerçekleştirebileceklerdir.*

#### Kaynaklar:

*Belser, J. A., Maines, T. R., Creager, H. M., Katz, J. M., Tumpey, T. M. (2015). Oseltamivir inhibits influenza virus replication and transmission following ocular-only aerosol inoculation of ferrets. Virology, 484, 305-312.*

*Chen, G. H., Lin, Y. L., Hsu, W. L., Hsieh, S. K., Tzen, J. T. (2015). Significant elevation of antiviral activity of strictinin from Pure tea after thermal degradation to ellagic acid and gallic acid. journal of food and drug analysis, 23(1), 116-123.*

*Ramakrishnan M. A. (2016). Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. World journal of virology, 5(2), 85-86. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>.*

*Greici Petry, Luciana Grazziotin Rossato, Jaqueline Nespolo, Luiz Carlos Kreutz & Charise Dallazem Bertol (2014) In Vitro Inactivation of Herpes Virus by Ozone, Ozone: Science & Engineering, 36:3, 249-252, DOI: 10.1080/01919512.2013.862165*