

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİSTİK FİBROZİSİN ERKEN TANISINA YÖNELİK TANI KİTİ
GELİŞTİRİLMESİ

Bengü ERGENOĞLU

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Eş Danışman

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

Mart, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİSTİK FİBROZİSİN ERKEN TANISINA YÖNELİK TANI KİTİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Bengü ERGENOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 31.03.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **Doktora TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi
Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sezen CANIM ATEŞ, Üye
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Bulent KARADAĞ, Üye
Marmara Üniversitesi

Doç.Dr. Serap DERMAN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA ve Eş Danışmanım Doç. Dr. Fatıma YÜCEL sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Kistik Fibrozisin Erken Tanısına Yönelik Tanı Kiti Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri TÜBİTAK'ın 115S124 numaralı projesi kapsamında Eş Danışmanım Doç. Dr. Fatıma YÜCEL tarafından alındığını, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Bengü ERGENOĞLU

İmza

Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 115S124 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Sevgili Dedem

Kore Gazisi

Hamit MISIRLI'ya

TEŞEKKÜR

Şüphesiz ki bu araştırmanın en büyük destekçileri ve sahibi KF proje ekibidir (TÜBİTAK, 115S124). Başta Eşdanışmanım ve Proje Yürütücüsü Doç. Dr. Fatıma Yücel olmak üzere, Proje Yür. Yar. Dr. Esin Akçael'e, Dr. Özlem Ertekin'e Dr. Şerife Şeyda Pirinçci Göktürk'e, Dr. Erdal Ataç'a, Ali İhsan Manav'a, Proje Danışmanı Prof. Dr. Bülent Taner Karadağ'a, Proje Teknisyeni Harun Kocağa'ya bursiyer arkadaşlarım Tuğçe Nur Eralp, İlham Bahhar ve Mustafa Divyapıcıgil'e bu araştırma süresinde acısıyla tatlısıyla her anını paylaştığımız için minnettarım. Doktora çalışmalarım süresinde başarılı bir şekilde tezimi tamamlamama imkân sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Melahat Bağirova'ya yardımları için çok teşekkür ederim. Hem bir dost hem de meslektaş olarak tavsiyeleri ve desteğiyle hayatıma dokunan Fatih Karakaya'ya en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca yapmış oldukları değerlendirmeler ile sağladıkları bilimsel destek için doktora tez izleme jüri üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Dilek Turgut Balık ve Dr. Öğr. Üyesi Sezen Canım Ateş'e, hiç tanımadığı genç araştırmacılara elinden gelen her türlü desteği sağlayarak yüreğimi umutla dolduran Prof. Dr. Ferhan Sağın'a; sağladığı kongre bursları için Türk Biyokimya Derneği'ne ve FEBS'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojileri grubunda üç yıl boyunca keyifle çalışmamda katkısı olan, birlikte güzel anılar ve tecrübeler biriktirdiğimiz, desteğe ihtiyacım olduğunda yanımda olan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Sağladıkları burs imkânı ile doktora çalışmama büyük katkısı bulunan TÜBİTAK ARDEB'e teşekkür ederim.

Beni çok erken yaşlarda, kendi laboratuvarında bilimle tanıştıran, sevdiren ve destek olan Babam Bora Ergenoğlu'na; eğitim-öğretim hayatım boyunca sonsuz destek olan, bana güvenen ve benimle büyüyen Annem Gönül Mısırlı'ya; yaratıcılığı ve yol göstericiliğiyle her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Abim Üstün Ergenoğlu'na; sonsuz merakıyla tez sürecimi heyecanla takip eden dualarını eksik etmeyen fakat mezuniyet sevincimi benimle paylaşmaya zamanı yetmeyen Dedem Gazi Hamit Mısırlı'ya; bütün doktora sürecinde yanımda olan ve destekleyen Eşim Alvar Ortega Gonzalez'e, Annesi Esmeralda González Urruela'ya ve Babası José Ortega Valcárcel'e nasıl teşekkür edeceğimi bilemiyorum. Birbirinden kıymetli ve sevgi dolu ailem olduğu için çok şanslıyım, bana ve hayallerime inandıkları için her daim minnettar olacağım.

Bengü ERGENOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	5
2 GENEL BİLGİLER	7
2.1 Kistik Fibrozis.....	7
2.1.1 Kistik Fibrozisde Klinik Görünüm	8
2.1.2 KFTR Proteininin Yapısı.....	9
2.1.3 KF Görülme Sıklığı ve Dağılımı	11
2.2 KF Tanısı ve Yenidoğan Tarama Programı.....	12
2.2.1 Ter Testi.....	12
2.2.2 KF Yenidoğan Tarama Programları.....	13
2.2.3 İmmünoreaktif Tripsin Testi.....	17
2.3 Antikor Temelli Tanı Sistemleri ve Yenidoğan Tarama Test Kitlerinde Kullanımı.....	18
2.3.1 ELISA.....	21
2.3.2 Antikor Üretimi.....	22
2.3.3 Hibridoma Teknolojisi.....	25

2.4 In-vitro Tanı kitleri ve Tanı Kitlerinin Değerlendirilmesi.....	30
2.4.1 Performans Testlerinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	31
2.4.2 Doğrulama Önyargısı.....	33
2.4.3 Bayes Yöntemi.....	33
2.4.4 Gri Bölge ve Teşhis (Tarama) Ayrımcılığı.....	35
2.4.5 Korelasyon Çalışması.....	35
3 MATERYAL VE METOT	37
3.1 Materyal.....	37
3.1.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri.....	37
3.1.2 Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.2 Kullanılan Metodlar.....	44
3.2.1 SDS-PAGE Jel Elektforezi ve İmmünblotlama.....	44
3.2.2 İmmünizasyonlar.....	45
3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	48
3.2.4 Hibridoma Teknolojisi ile IRT Spesifik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi.....	49
3.2.5 Hibridoma Kültürlerinin Takibi ve IRT Spesifik Antikor Üreten Hücre Hatlarının Seçimi.....	52
3.2.6 Antikorların Karakterizasyon, Saflaştırma ve İşaretleme Çalışmaları.....	54
3.2.7 Sandviç ELISA Temelli Kit Geliştirme Çalışmaları.....	58
3.2.8 Sandviç ELISA Sistemi Geliştirilmesi.....	64
3.2.9 Saha Örnekleriyle Çalışmalar, ELISA Kitlerinin Aşamalı Değerlendirilmesi ve Verimliliklerinin İncelenmesi.....	66
4 SONUÇ	69
4.1 IRT Antijenine Spesifik Antikor Geliştirme Çalışmaları.....	69
4.1.1 IRT Antijenlerinin Karakterizasyonu.....	69

4.1.2 İmmün Yanıtın ELISA ile Ölçülmesi.....	70
4.1.3 Fare İmmünizasyonları.....	73
4.1.4 Füzyon Çalışmaları.....	76
4.1.5 IRT Spesifik Hibridoma Hücre Hatlarının Seçimi ve Alt Klonlama Çalışmaları.....	79
4.1.6 IRT Spesifik Antikorların Karakterizasyon ve Saflaştırılması Çalışmaları.....	81
4.2 ELISA Temelli Kit Geliştirme Çalışmaları.....	85
4.2.1 ELISA Kitinde Kullanılacak İnhibitörün E-CTIA ile Belirlenmesi.....	85
4.2.2 Sandviç ELISA Sisteminde Kullanılacak Antikorların Seçimi....	87
4.2.3 Sandviç ELISA Sisteminin Optimizasyon Çalışmaları.....	88
4.2.4 IRT1 ve IRT2 Antijenlerini Aynı ELISA Sisteminde Tespit Etme Çalışmaları.....	99
4.3 ELISA Kitlerinin Analitik Duyarlılıklarının Tespiti.....	100
4.4 Saha Örnekleriyle Çalışmalar ve ELISA Kitlerinin Aşamalı Değerlendirilmesi, Verimliliklerinin İncelenmesi.....	103
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	112
5.1 Tez Çalışması Kapsamında Geliştirilen Ürünler ve Kullanım Alanları.....	112
5.2 Geliştirilen IRT Kit Modellerinin Maliyet Analizi ve Ekonomik Katma Değerinin İncelenmesi.....	113
5.3 Tez Çalışması Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar ve Literatürle Karşılaştırması.....	116
5.4 Öneriler.....	118
KAYNAKÇA	119
A	128
B	134
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	136

SİMGE LİSTESİ

Balb/c	Bagg's Albino
bp	Baz çifti
β	Beta
Da	Dalton
γ	Gamma
κ	Kappa
kDa	Kilo Dalton
Λ	Lambda
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
M	Molar
μ	Mü
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
A_{405}	405 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri
A_{450}	450 nm dalga boyunda alınan absorbans değeri

KISALTMA LİSTESİ

AP	Alkalen Fosfataz
APS	Amonyum Per Sülfat
dH ₂ O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
E-CTIA	ELISA temelli yarışmalı inhibitör etkinliği ölçüm metodu
Fab	Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge)
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)
PBS	Fosfat tamponu
GMBE	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
HSGM	Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
HPPA	hidroksifenilpropionik asit
HCl	Hidroksi klorik asit
HAT	Hipoksantin, Aminopterin, Timidin
HRP	Horse Radish Peroksidaz
HT	Hipoksantin, Timidin
IEC	Ion Exchange Chromatography
IF	immünofloresan
Ig	İmmunoglobulin
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IHC	immünohistokimya
IRT1	İmmün Reaktif Tripsinojen 1
IRT2	İmmün Reaktif Tripsinojen 2
IRT3	İmmün Reaktif Tripsinojen 3
KF	Kistik Fibroz

KFTR	Kistik Fibroz Transmembran Regülatör
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
NHS	N-Hidroksisüksinimid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
NBD	Nucleotide Binding Domain
KOH	Potasyum hidroksit
ROC	Receiver Operating Characteristic - Alıcı Operatör Karakteristiği
NaOH	Sodyum Hidroksit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Normal KFTR proteinin ve KF Mutant proteininin hücre zarında yerleşiminin şematize gösterimi.....	8
Şekil 2. 2 KFTR molekülünün hücre zarında yerleşimi (Solda) ve domainlerinin şematize gösterimi (Sağda), TMD: transmembran domain; NBD: nükleotid bağlayıcı domain; R: düzenleyici	10
Şekil 2. 3 KF yenidoğan tarama programlarının şematize gösterimi	15
Şekil 2. 4 ELISA Sistemlerinin Şematik Gösterimi.....	22
Şekil 2. 5 Hibridoma Teknolojisi.....	25
Şekil 2. 6 Antikoru biyotin ile konjugasyonu	28
Şekil 2. 7 Enzimin IgG antikoruyla çapraz bağlanma reaksiyonu [55].	29
Şekil 2. 8 Dağılım grafikleri üzerinde belirtilen bölgelerin şematik gösterimi...	36
Şekil 3. 1 İnhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminin şematik gösterimi	47
Şekil 3. 2 Füzyondan önce açılan F0 hücreleri (20X).....	50
Şekil 3. 3 Füzyon sonrası hücre görüntüleri; A: Füzyon sonrası 1. gün; B ve C: 10. Gün gözlenen farklı büyüklüklerde hibridoma hücreleri	52
Şekil 3. 4 E-CTIA yönteminin akış şeması	61
Şekil 3. 5 Sandviç ELISA kitinde kullanılacak spot standartların hazırlanması .	63
Şekil 3. 6 Yeni doğan kanlarının, HSGM bünyesinde, Kistik Fibrozis hastalığı açısından taranmasının şematik gösterimi	67
Şekil 4. 1 IRT1 (solda) ve IRT2 (sağda) proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.....	70
Şekil 4. 2 ELISA plak kaplamada kullanılan inhibitörün (sığır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü) miktar optimizasyon çalışması.....	71
Şekil 4. 3 İnhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminde inhibitör (sığır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü) üzerine bağlanacak IRT miktarının optimizasyonu.	72
Şekil 4. 4 Geliştirilen Anti-IRT2 ve Ticari Anti IRT antikollarının İnhibitör-yakalayıcı ELISA test sonuçları.	73
Şekil 4. 5 50 ug IRT2 ile immünize edilen farelerin (1. Immünizasyon grubu) ELISA sonuçları.	74
Şekil 4. 6 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin (2. Immünizasyon grubu) ELISA sonuçları.	75
Şekil 4. 7 25 µg IRT2 ve 75 µg MCLAB IRT1antijeni ile immünize edilen farelerin (3. immünizasyon grubu) ELISA sonuçları.	75

Şekil 4. 8	50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin (4.immünizasyon grubu) tripsin inhibitor-yakalayıcı ELISA sonuçları.	76
Şekil 4. 9	Anti-IRT antikorlarının çapraz reaksiyonlarının ELISA sonucu.....	81
Şekil 4. 10	Anti-IRT MAM-13C9 Monoklonal antikorunun Protein A immunokromatografi saflaştırma sonuçları	83
Şekil 4. 11	Anti-IRT MAM-13C9 Monoklonal antikorunun saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE jel görüntüsü.	83
Şekil 4. 12	Farklı yakalayıcı inhibitörlerle uygulanan E-CTIA ile elde edilen doygunluk eğrileri.	85
Şekil 4. 13	İnhibitör-yakalayıcı ELISA’da farklı tripsin konsantrasyonuna karşı elde edilen O.D.405nm sinyal grafiği.....	86
Şekil 4. 14	E-CTIA ile elde edilen inhibisyon eğrileri ve hesaplanan IC50.	87
Şekil 4. 15	Sandviç ELISA antikor çifti seçimi ELISA sonucu	88
Şekil 4. 16	MAM-4B2 plak kaplama-MAM-2C1*HRP çifti ve MAM-11F9 kaplama-MAM-6G7*HRP çifti antikor kaplama optimizasyon çalışması	90
Şekil 4. 17	MAM-11F9-MAM-6G7*HRP ve MAM-4B2-MAM-2C1*HRP antikor çiftleri için kaplama ve konjugat miktar optimizasyonu	90
Şekil 4. 18	Kuru kan kalibratörünün 3 farklı noktasından örnek alma	91
Şekil 4. 19	MAM-4B2 plak kaplama-MAM-2C1*HRP çifti ve MAM-11F9 elüsyon tampon hacim optimizasyon çalışması.....	93
Şekil 4. 20	MP Biomedicals ve Zentech yenidoğan IRT test kitlerinin içerisinde bulunan spot kan kalibratörleriyle IRT1 test kitinin (MAM-4B2 kaplama – MAM-2C1*HRP çifti) çalışabilirlik testi.....	94
Şekil 4. 21	Tez kapsamında hazırlanan IRT1-spot kan kalibratörün farklı ELISA sistemlerinde karşılaştırılması.....	95
Şekil 4. 22	Yeni ve eski spot kan kalibratörlerinin ELISA sonucu	96
Şekil 4. 23	MAM-IRT1 kiti, %0,01 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu.	97
Şekil 4. 24	MAM-IRT1 kiti, %0,015 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu.	97
Şekil 4. 25	MAM-IRT2 kiti, %0,01 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu.	98
Şekil 4. 26	IRT2 kiti, %0,015 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu.	98
Şekil 4. 27	MAM-IRTmix kitinin MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitleriyle kıyaslama ELISA’sı.....	100

Şekil 4. 28	MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitinin IRT1 ve IRT2 spot kan kalibratörleriyle 3 tekrarlı gerçekleştirilen ELISA sonuç grafikleri, eğri denklemleri ve R2 değerleri.....	101
Şekil 4. 29	MAM-IRTmix kitinin IRT1 ve IRT2 spot kan kalibratörleriyle yapılan 3 tekrarlı ELISA sonuç grafikleri, eğri denklemleri ve R2 değerleri ..	101
Şekil 4. 30	ROC grafiği	104
Şekil 4. 31	MAM-IRT2 kiti rutin tarama örnekleriyle ve KF pozitif örneklerle yapılan gri bölge belirleme çalışması.	106
Şekil 4. 32	HSGM rutin tarama ve KF pozitif IRT test sonuçlarıyla yapılan gri bölge belirleme çalışması.	107
Şekil 4. 33	MAM-IRT2 kit sonuçları ve HSGM tarafından ölçülen IRT sonuçları ile korelasyon çalışması.	110
Şekil A. 1	Anti-IRT MAM-7G2 Monoklonal antikorunun Protein A immunokromatografi saflaştırma sonuçları	129
Şekil A. 2	Anti-IRT MAM-1E4 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	129
Şekil A. 3	Anti-IRT MAM-7A11 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	130
Şekil A. 4	Anti-IRT MAM-6D1 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	130
Şekil A. 5	Anti-IRT MAM-11F9 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	131
Şekil A. 6	Anti-IRT MAM-10B10 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	131
Şekil A. 7	Anti-IRT MAM-4B2 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları	132
Şekil A. 8	Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları.....	132

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1 KFTR mutasyonlarının moleküler sınıflandırılması, oluşturdukları fonksiyon bozuklukları ve ilk tedavi tipi [24]	11
Tablo 2. 2 2015-2018 yılı yenidoğan tarama programı kapsamında KF için taranan bebeklerin genel durumu	17
Tablo 2. 3 Bayes Olasılık tablosu (%)	34
Tablo 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri	37
Tablo 3. 2 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri (Devamı)	38
Tablo 3. 3 Ayırma Jel İçeriği (%15' lik)	39
Tablo 3. 4 Yükleme Jel İçeriği (%5' lik)	39
Tablo 3. 5 TMB Substrat hazırlanışı.....	42
Tablo 3. 6 HPPA Substrat Tampon hazırlanışı	42
Tablo 3. 7 IRT antijeni ile bağışıklanan farelerin immünizasyon bilgileri	46
Tablo 3. 8 Epitop analizi için sentezlettirilen peptit dizileri (sarı işaretli peptidler IRT1 ve IRT2 için ortak bölgelerdir)	56
Tablo 4. 1 Fare immünizasyon grupları	74
Tablo 4. 2 Yapılan Füzyon Çalışmalarının Sayısal Verileri	77
Tablo 4. 3 Anti-IRT antikorları ve immunglobulin tipleri.....	82
Tablo 4. 4 Lineer epitop analiz sonucunda Anti-IRT Antikorlar ve yanıt verdikleri peptitler	84
Tablo 4. 5 7A11 kaplama-6D1 konjugat ELISA modelinin optimizasyon çalışması	89
Tablo 4. 6 MAM-4B2 kaplama - MAM-2C1*HRP kitinin çözelti ve spot kalibratör kıyaslama sonuçları	92
Tablo 4. 7 MAM-11F9 kaplama - MAM-6G7 kitinin çözelti ve spot kalibratör kıyaslama sonuçları	92
Tablo 4. 8 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplamasında kullanılan formüller	102
Tablo 4. 9 Kitlerin (r^2), deteksiyon limiti (LOD) ve nicelik limiti (LOQ) değerleri	102
Tablo 4. 10 Geliştirilen kitler ve bu kitlerle test edilen numunelerin sayısal bilgileri	103
Tablo 4. 11 ROC Analizi istatistik sonuçları.....	104
Tablo 4. 12 Gri alan ve dışındaki bölgelerde ölçülen IRT konsantrasyonların istatistikleri.....	108
Tablo 4. 13 Korelasyon çalışması r değerleri tablo	111

Kistik Fibrozisin Erken Tanısına Yönelik Tanı Kiti Geliştirilmesi

Bengü ERGENOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA

Eş Danışman: Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

Kistik fibrozis (KF), otozomal resesif (çekinik) geçiş gösteren, beyaz ırkta en sık rastlanan genetik-metabolik bir hastalıktır ve Türkiye’de her 2.500 – 3.000 bebekten birinde görülmektedir. Akciğer, pankreas, bağırsak, ter bezleri ve dış salgı bezleri gibi vücudun birden çok sistem ve organını aynı anda etkileyebilen hastalıktır. Hastalığın erken tespit edilmesi, hastaların yaşam kalitesini artırmak ve etkili bir tedavi stratejisi başlatmak için çok önemlidir. Bu nedenle son yıllarda KF, ABD, Yeni Zelanda, çoğu Avrupa ülkesi ve Türkiye gibi birçok ülkede yeni doğan tarama programlarına dâhil edilmiştir.

KF’li yenidoğanlarda kan IRT düzeyleri genel olarak yüksektir fakat yenidoğan bebeklerde yüksek oranda yalancı pozitif test sonuçlarının varlığı nedeniyle, pozitif sonuçlar doğrulayıcı testlerle (IRT, PAP, DNA testi) izlenmelidir. Böylece kontrollü ve hızlı tarama test sonucuna ulaşılması mümkün olabilmektedir.

Bu alışmada KF hastalığının erken tanısında kullanmak üzere IRT ELISA kitlerinin geliştirilmesi çalışmaları yer almaktadır. ELISA kitlerinde kullanmak üzere IRT'ye karşı monoklonal antikorlar geliştirildi, saflaştırıldı ve karakterize edildi. IRT proteinlerini kantitatif ölçmek için iki adımlı sandviç ELISA yöntemi kullanıldı. Ticari IRT antijeni kullanarak standartlar ve model kan spotları hazırlandı. Geliştirilen monoklonal antikorların yakalama ve bağlama özellikleri araştırıldı, sandviç ELISA kit tasarımları ve optimizasyon çalışmaları yapıldı.

MAM-IRT1, MAM-IRT2 ve MAM-IRTmix ELISA prototiplerinin Ankara Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün (HSGM) Yenidoğan tarama testleri laboratuvarında saha çalışmaları gerçekleştirildi. Geliştirilen kitlerle gerçek bebek kan spotlarından elde edilen sonuçlarla ROC ve Bayes yöntemleri kullanarak tanı kiti performans analizi yapıldı. ROC performans analizine göre; MAM-IRTmix kitinin sonuçları, HSGM tarafından uygulanan rutin IRT test sonuçlarıyla %100 uyumlu olduğu görülmüştür. MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitlerinin sonuçları ise sırasıyla %98,6 ve %97,6 uyumlu olduğu görüldü. Bayes ile yapılan analizde ise, MAM-IRT2 kitinin rutin uygulanan IRT testine göre %2 daha seçici olabileceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Kistik fibrozis, yenidoğan tarama, hibridoma teknolojis, ELISA, immunoreaktif tripsinojen

Development of Diagnostic Kit For Early Diagnosis of Cystic Fibrosis

Bengü ERGENOĞLU

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Melahat BAĞIROVA

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatıma YÜCEL

Cystic fibrosis (CF), autosomal recessive inherited, is the most common genetic-metabolic disease in the Caucasian race and is seen in one out of every 2,500 – 3,000 newborns in Turkey. It is a disease that can affect multiple systems and organs of the body at the same time, such as the lungs, pancreas, intestines, sweat glands and exocrine glands. Early detection of the disease is very important to improve the quality of life of patients and to initiate an effective treatment strategy. Therefore, in recent years, CF has been included in newborn screening programs in many countries such as the USA, New Zealand, most European countries and Turkey.

Blood IRT levels are generally high in newborns with cystic fibrosis, but positive results should be followed up with confirmatory tests (IRT, PAP, DNA testing) because of the high rate of false positive test results in newborn babies. Thus, it is possible to reach a controlled and rapid screening test result.

This study includes the development of IRT ELISA kits to be used in the early diagnosis of CF disease. Monoclonal antibodies against IRT were developed, purified and characterized for use in ELISA kits. Two-step sandwich ELISA method was used to quantitatively measure IRT proteins. Standards and model blood spots were prepared using commercial IRT antigen. The capture and binding properties of the developed monoclonal antibodies were investigated, sandwich ELISA kit designs and optimization studies were carried out.

Field studies of IRT1, IRT2 and IRT Mix ELISA prototypes were carried out in Turkish Public Health Institution, Ankara. Diagnostic kit performance analysis of the developed kits was performed via ROC and Bayes methods with the results obtained from real baby blood spots. According to ROC performance analysis, the results of the MAM-IRTmix kit were found to be 100% consistent with the routine IRT test results performed by Turkish Public Health Institution. The results of MAM-IRT1 and MAM-IRT2 kits were found to be 98,6% and 97,6% compatible, respectively. In the analysis performed with Bayes, it was seen that the MAM-IRT2 kit could be 2% more specific than the routinely applied IRT test.

Keywords: Cystic fibrosis, newborn screening, hybridoma technology, ELISA, Immunoreactive trypsinogen

1.1 Literatür Özeti

Kistik Fibrozis (KF) (OMIM 219700) ilk kez 1938 yılında çocuk doktoru Dorothy H. Andersen tarafından tanımlanmış otozomal resesif bir hastalıktır [1]. Tüm ırklarda görülen bu hastalık en çok Avrupalılarda görülmektedir. KF vakfının 2018 yılında yayınladığı raporda, KF tanısı konmuş 30.775 birey bulunduğu ve tüm bu hastaların %93'ünün beyaz ırktan, %4,7'sinin Afrikan Amerikan ırkından ve geri kalanının %2,3'nünde diğer ırklardan insanlarda görüldüğü bildirilmiştir [2].

Hastalığın temel sebebi, yedinci kromozomda bulunan KF transmembran regülatör (KFTR) protein geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, hücrelerin sodyum klor dengesi bozulması ve organ sistemlerinin düzgün çalışmasını sağlayan salgı bezlerinin oluşturduğu ince ve akışkan sıvının yoğun, yapışkan ve kıvamlı hale gelmesidir. Yapışkan ve kıvamlı hale gelen doku yüzey sıvıları, akciğerde hava yollarında ve pankreas dokusundaki kanallarda dehidratasyona sebep olur. Solunum sisteminde oluşan dehidratasyon, sillerin fonksiyonuna etki ederek bozulmasına ve kanallara mukus birikmesine neden olmaktadır. Bozulan siller ve biriken mukus ileri aşamada kronik bakteriyel enfeksiyon oluşmasına sebep olur. Ayrıca pankreas dokusundaki kanalların tıkanması, salgılanan sindirim enzimlerinin ince bağırsağa ulaşmasını engellerek sindirim sisteminin düzgün çalışmasını engeller ve doku içinde biriken enzimler pankreatite sebep olur [3].

1950'lerde, KF hastaları için ortalama ömür birkaç aydı; ölümlerin ana nedenleri mekonyum ileus, yetersiz beslenme, sindirim ve emilim bozukluklarıydı. Geçen altmış yıl boyunca, pankreatik enzimlerin dışarıdan sağlanması ve multidisipliner

takımların işbirliği sayesinde yeni etkin terapilerin oluşturulabilmesiyle hayatta kalma yaşı ortalama 40 yıl civarındadır. Şimdilerde, akciğer nakli olamayan bireylerde solunum yetmezliği hastalığının en sık rastlanan ölüm nedenidir [4]–[7].

KF hastalarının terinde sağlıklı bireylere kıyasla yüksek konsantrasyonda tuz bulunması bu hastalığın en belirgin semptomlarındanıdır. Dorothy H. Andersen hastalığının tanısını koyduğu çalışmaların ardından, Paul A. Di Sant’Agnese ile 1953’te yayınladıkları ortak çalışmada KF hastalarının terinde bulunan yüksek elektrolit konsantrasyonu ilk defa ölçülerek kanıtlandı [8]. KF hastalığının tanısına yönelik Gibson ve Cooke tarafından 1959 yılında geliştirilen ter elektrolitlerinin konsantrasyon ölçüm yöntemi günümüzde halen altın standart olarak kabul görmektedir [9].

KF tanısı konmasıyla, yoğun antibiyotik tedavisi ve uygun beslenmenin sağlanması başta olmak üzere destekleyici tedavilerle yapılan iyileştirmeler morbidite ve mortaliteyi azaltmıştır. Fakat semptomların oluşmasından sonra tanı konmasıyla başlanan tedavi, bu süreçte gerçekleşen doku hasarı sebebiyle yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple, semptomlar gözlenmeden hastalığın tanısının konularak destek tedavi ve uygun beslenme takviyesinin sağlanması önemlidir. Bu da ancak yenidoğan tarama programının uygulanmasıyla mümkündür. Ter testinin pahalı olması ve yenidoğan bebeklere uygulanamaması sebebiyle farklı tarama test yöntemleri literatürde önerilmiştir [10].

Crossle ve arkadaşları tarafından geliştirilen bebek kanlarında serum-IRT seviyesinin ölçülmesi ve KF bebeklerde serum IRT seviyelerindeki artış olması esasına dayalı yöntem, tarama testi olarak günümüzde kullanılan KF yenidoğan tarama programlarının temelini oluşturmaktadır [11]. KF hastalığının yaygınlığının yüksek olduğu birçok ülkede uygulanan KF yenidoğan taraması ülkemizde de uygulanmaktadır [12]. Yenidoğan tarama programları hastalık şiddetini, bakım zorluğunu ve bakım masraflarını azaltmaktadır. Ayrıca, gecikmiş ve kaçırılmış teşhislerin de engellenmesini sağlar [13], [14]. Kullanılan KF tarama programlarında; DNA mutasyon analizi, çift immünoreaktif tripsin (IRT) testi ve

pankreatit ile ilişkili protein (PAP) testi ile birleştirilmiş immünreaktiv tripsinogen (IRT) testi de dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılır [15]. Henüz evrensel geçerli bir tarama protokolü geliştirilmediğinden, bu yöntemler kullanılarak ülkelerin yerel coğrafi, etnik ve ekonomik açılardan durumu değerlendirilerek ihtiyaçları karşılayan en etkili protokol belirlenmektedir. KF yenidoğan tarama programının ilk aşamasında tüm protokollerde ortak olarak, IRT testleri için kan örnekleri doğumdan hemen sonra ya da ilk üç gün içerisinde topuktan mebrana emdirilerek alınır, kurutularak analize alınana kadar muhafaza edilir. IRT değerlerinin görüldüğü durumlarda yeniden numune alımı ile IRT testi tekrar yapılır (IRT/IRT tarama programı) ya da IRT test tekrarı yerine bazı programlarda yine bebek kanında pankreatit ilişkili protein (PAP/regIII) ölçümü yapılmaktadır (IRT/PAP tarama programı). Çoğu tarama protokolünde tanı konması için ter testi yapılır. Ayrıca, bazı programlarda ter testinden önce bazılarında ise ter testinden sonra KF mutasyonlarının belirlenmesi için dizi analizi yapılır. Hastanın sahip olduğu mutasyona göre hangi tip KF olduğuna karar verilerek uygun tedavi ve beslenme takviyesi uygulanır. Yeni teşhis konan bebeklerin ebeveynleri için uygun destek sağlanmalı ve bu tür programlarda KF bakım merkezine yönlendirilmesi gerekmektedir [13].

Geçtiğimiz 10 yılda genetik temellerin aydınlatılmasıyla gerçekleşen genotip-fenotip ilişkisine ait verilerdeki artış, klinik bulguya neden olan moleküler problemlerin aydınlatılmasını sağlamıştır. Bu bilgiler ışığında tarama programları daha etkin hale getirilmiştir. Modifiye edici genetik yapıların geliştirilmesi yeni tedavi yaklaşımlarına olanak sağlamıştır [16].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada; KF hastalığında marker protein olan katyonik IRT (IRT1) formuna ve anyonik IRT (IRT2) formuna karşı hibridoma teknolojisiyle yüksek afiniteli antikor üretilmesi, elde edilen monoklonal anti-IRT antikorlarının serolojik yöntemler arasında en basit ve yaygın tipi olan ELISA sistemlerinde uygulanabilir

sistem tasarlanması ve geliştirilen ELISA sisteminin bebek topuk kanlarında çalışabilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda;

Birinci iş paketinde; Hibridoma çalışmalarında antijen olarak uygulanması amacıyla IRT1 ve IRT2 antijenlerinin kullanımı ve karakterizasyonu,

İkinci iş paketinde; Ticari antijen ve Anti-IRT monoklonal antikörler kullanılarak, antikör geliştirmede kullanılacak yöntemlerin optimizasyonu,

Üçüncü iş paketinde; Literatürde uygulandığı gibi antikör üretiminde rutin olarak kullanılan 6-8 haftalık Balb/c farelerin immünizasyonlarının periyodik olarak yapılması ve ELISA yöntemi ile immünizasyon kontrollerinin gerçekleştirilmesi,

Dördüncü iş paketinde; Füzyon

- F0 myeloma hücrelerinin devamlı kültürünün elde edilmesi,
- Balb/C türü farelerin peritonundan elde edilen makrofaj hücrelerinin ve makrofaj kültür metabolitlerinin hibrid hücrelerinin gelişiminin desteklenmesi amacıyla eldesi ve kullanılması,
- ELISA ile en yüksek immün cevabı verdiği belirlenen farelerden elde edilen dalaktan B hücrelerinin eldesi ve myeloma hücreleri ile füzyonlarının gerçekleştirilmesi,
- Füzyon sonrası hücrelerin seçici besiyerlerinde kültürlerinin yapılarak, monoklonal olarak IRT antijenine karşı spesifik yanıtı olan hücrelerin eldesi,
- IRT antijenlerine karşı spesifik yanıt veren hücre klonlarının tek düşürülüp monoklonal antikör sentezleyen hücrelerin eldesi,
- Geliştirilen hibridoma hücrelerinin büyük ölçekte çoğaltılarak saklanması ve IRT antijenlerine karşı monoklonal antikör üreten hücre hatlarının elde edilmesi,
- IRT antijenlerine karşı monoklonal antikör üreten hücre hatlarının ELISA test sistemleri ile özgünlüğünün kontrol edilmesi ve kültür ortamından saflaştırılması,

Beşinci iş paketinde; IRT antijenine karşı üretilen fare monoklonal ve tavşan poliklonal antikorlarının farklı enzimatik veya kimyasal yapılarla birleştirilmesi, sandviç ELISA sistemi gibi çeşitli tanı sistemlerinde test edilmesi,

Altıncı iş paketinde; Geliştirilen ELISA kitlerinin yeni doğan bebek kanları kullanılarak ticari kitlerle karşılaştırılması,

amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

KF gibi genetik hastalıklarda; hastalık semptomları görülmeden, yani dokularda hasar oluşturmaya başlamadan, destek tedaviler ile hastalığın kontrol altında tutulması, KF sebepli bebek ölümlerinin önlenmesi ve KF hastalarının yaşam kalitesinin yükseltilmesi için çok önemlidir. Erken tanı ise ancak ülke çapında tarama programlarının uygulanması ile mümkündür. KF yenidoğan tarama programı, Amerika, Yeni Zelanda ve bir çok Avrupa ülkesinde uygulanmaktadır. Bu tarama programlarında farklı protokoller izlense de bebeklerin topuk kanından IRT düzeylerinin incelenmesi en genel ve temel uygulamalardandır.

2015 yılı itibariyle T.C. Sağlık Bakanlığı Yenidoğan Ulusal Tarama Programında zorunlu testler arasına eklenmiştir ve bu kapsamda, IRT/IRT/Ter testi portokolü uygulanmak üzere, yenidoğan topuk kanı örneklerinde IRT analizlerine başlanmıştır.

KF tanısında kullanılan tanı kitleri, antikor ve antijenler yurt dışından ithal edilmekte ve ülke ekonomisine büyük külfet oluşturmaktadır. Yurt dışından satın alınan, yılda yaklaşık 1 270 000 yeni doğan bebek için yapılacak ve tekrar testleriyle birlikte yaklaşık 2 000 000 adete ulaşacak olan IRT ELISA test kiti ihtiyacı ülkemiz için çok önemlidir. Tezde KF yenidoğan taramalarında kullanılmak üzere ELISA temelli IRT serolojik test prototiplerinin geliştirilmesi ve çalışabilirliğinin test edilmesi amaçlanmıştır. Bu test sistemlerinin geliştirilmesine yönelik tez sonuçlarının uygulamaya aktarılmasıyla, bir yandan dışa bağımlılığın

azalması ile ilgili pazarlarda rekabete baēlı olarak maliyetlerin düşmesi söz konusu olabilecektir. Bu tez çalışması sonuçlarından kaynaklanan ürünlerin ihraç edilebilmeleri de mümkün olabilecektir.

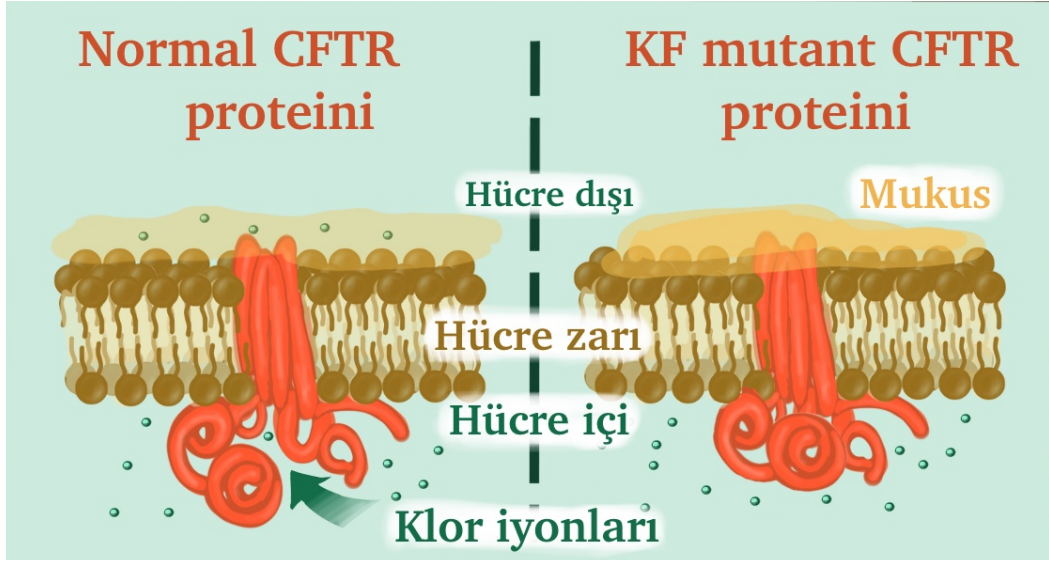
Ayrıca ticari kitlerinin IRT1 formuna spesifik olması ve literatürde IRT2 formunun KF yenidoēan taramalarında önemli olabileceēini belirten kısıtlı çalışma olması sebebiyle; IRT1 ve IRT2 formlarına spesifik farklı ELISA modelleri geliştirilmesi planlandı. Bu şekilde güncel kullanılan tarama programların iyileştirilmesi konusunda önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir

2.1 Kistik Fibrozis

Kistik fibroz (KF) eski zamanlardan beri, bebek ölümlerine ve çocukların yaşam sürelerinin kısalmasına sebep olmaktadır. Orta çağ Avrupa'sında bu hastalık hakkında, alından öpüldüğünde tuzlu tat olan çocuğun, öleceğine dair nesilden nesile aktarılan bilgi birikimi oluşmuştur. Tuzlu cilt, nedeni veya tedavisi olmayan bir hastalığın işareti olarak görülse de modern zamanlara kadar sebebi anlaşılamamıştır [17]. Dorothy H. Andersen tarafından yapılan 49 hastanın klinik takibi ve otopsi incelemelerinden oluşan detaylı çalışmalar sonucunda hastalığın ilk kez tanımı yapılmıştır [1]. 1949'da Lowe ve ark. tarafından KF hastalığının otozomal resesif kalıtım ile aktarılan genetik bir kusurdan kaynaklanması gerektiği varsayılmıştır [18]. KF hastalarının terindeki yüksek tuz seviyeleri, ter bezinden elektrolit taşınmasında bir anormallik olduğunu düşündürmüştür. Paul. M. Quinton 1983 yılında, bu hastalarda ter kanallarının klorür geçirimsiz olduğunu ileri sürmüştür [19].

John R. Riordan ve arkadaşlarının 1989 yılında KF hastalığına sebep olan genin klonlanması ve karakterizasyonu ile başlayan çalışmalar, KF hastalığının sebebinin moleküler düzeyde açıklanmasını sağlamıştır. Bu sayede, dış salgı bezlerinin klorür kanalı olan kistik fibrozis transmembran regülatör (KFTR) proteininin işlev bozukluğunun, KF hastalığına sebep olduğu anlaşılmıştır [20]. KFTR kanallarındaki bu bozulma, klorür salınımının azalmasına ve buna bağlı olarak epitelyal sodyum kanalları yoluyla, sodyum emiliminin artması sonucu hücre yüzey salgısındaki su oranını azaltmaktadır (Şekil 2. 1) [21]. Oluşan viskoz hücre

yüzey salgısı; tıkanma, iltihaplanma, enfeksiyon ve bunu takiben doku tahribatı ve fonksiyon kaybı oluşumuna sebep olur [22].



Şekil 2. 1 Normal CFTR proteininin ve KF Mutant proteininin hücre zarında yerleşiminin şematize gösterimi

2.1.1 Kistik Fibrozisde Klinik Görünüm

Kistik fibroz, mukus ve salgı bezlerinin fonksiyonunun bozulması sebebiyle birçok vücut sistemini etkileyen, kalıtsal bir hastalıktır. Kronik solunum ve sindirim sistemi sorunlarına sebep olması en sık görülen klinik bulgular arasındadır.

Mukus; organ ve dokuların yüzeylerini kayganlaştıran ve koruyan kaygan bir maddedir. Kistik fibrozlu kişilerde vücut anormal derecede kalın ve yapışkan olan mukus üretir. Bu anormal mukusun, KF hastalarının %99'unda [22], solunum yollarını tıkayarak akciğerlerde solunum ve bakteriyel enfeksiyonlara sebep olduğu görülmüştür. Bu enfeksiyonlar kronik öksürük, hırıltı ve iltihaplanmaya neden olur. Zamanla, mukus birikmesi ve enfeksiyonlar, akciğerlerde skar dokusu (fibroz) ve kist oluşumu dahil olmak üzere kalıcı akciğer hasarına neden olur [23].

Mukus, pankreas kanallarını tıkayarak sindirim enzimlerinin bağırsaklara ulaşmasını engeller. Bu da, ishal, yetersiz beslenme, yetersiz büyüme ve kilo kaybı gibi sindirim problemlerine neden olabilir[24]. Kistik fibrozlu bebeklerin %20'sinde, doğumdan kısa bir süre sonra ortaya çıkan bir bağırsak tıkanıklığı

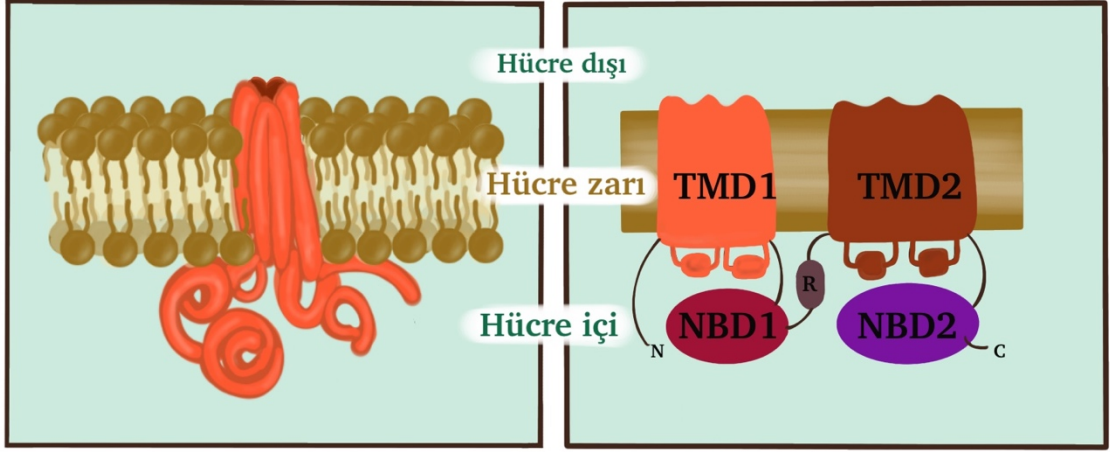
(mekonyum ileus) olduğu görülmüştür [22]. Sperm taşıyan tüpler mukus tarafından tıkanığı için uygun şekilde gelişmez ve bu sebeple KF'lu erkeklerin %97'sinde kısırlık görülür [22].

KF hastalığına sebep olan temel kusur tanımlanmış olmasına rağmen KF hastalarında izlenen klinik veriler hastalar arasında çeşitlilik göstermektedir. KF hastalığının şiddeti ve gözlenen klinik görünüm; organ duyarlılığına ve KFTR proteininin genetik mutasyonundan kaynaklanan fonksiyon kaybına göre değişiklik gösterir [22]. Hastalığın şiddeti, hastanın sosyoekonomik ortamına göre de değişkenlik göstermektedir [25]. Klinik verilerin genel takibi etkin semptomatik tedavilerin ve tarama yöntemlerinin geliştirilmesinde önemlidir.

2.1.2 KFTR Proteininin Yapısı

30 yıl önce KFTR geninin klonlanması ile KFTR proteininin laboratuvar ortamında üretilmesi mümkün olmuştur. Bu sayede KF hastalığının moleküler ve hücrel temelini çözmek için zemin hazırlamıştır [20], [26], [27].

KFTR proteini; iki transmembran domain (TMD), iki nükleotid bağlayıcı domain (NBD) ve düzenleyici (R) domainden oluşan, adenin nükleotid bağlayıcı kaset taşıyıcıları ailesine ait çok domainli bir membran proteindir (Şekil 2. 2) [28]. Hava yolu yüzey epitelinde, submukozal bezlerde ve diğer birçok epitel organda sentezlenir. KFTR, protein kinaz A'ya bağlı fosforilasyon düzenleyici domaini aracılığıyla ve ATP'nin nükleotit bağlanma bölgelerine bağlanması ile düzenlenen; Cl⁻ ve bikarbonat ileten anyon kanalı olarak işlev görür [29].



Şekil 2. 2 KFTR molekülünün hücre zarında yerleşimi (Solda) ve domainlerinin şematize gösterimi (Sağda), TMD: transmembran domain; NBD: nükleotid bağlayıcı domain; R: düzenleyici

KFTR proteininin iyonları vücuttaki epitel hücrelerinin membranı boyunca taşıma işlevinin yanı sıra, bikarbonat salgılanması ve sodyum taşınmasının önlenmesi dahil olmak üzere başka işlevleri de vardır [24].

2.1.2.1 KFTR Proteininin Genetik Mutasyonları

88.000 kistik fibroz hastasından elde edilen, varyant ve genotip kombinasyonları bilgisi, araştırmacılara, hastalara ve ailelerinin ihtiyacına KFTR2 veri bankası aracılığıyla sunulmuştur. Şimdiye kadar KFTR geninde 2.000'e yakın mutasyon tanımlanmıştır, ancak literatürde sadece 322 mutasyonun hastalığa neden olduğuna dair bilgi bulunmaktadır [30].

Kistik fibroz, bir monogenetik hastalık olmasına rağmen, aynı genotipli hastalarda gözlenen semptomlarının farklılık göstermesi sebebiyle oluşan fenotipik değişkenlik önemlidir. KFTR mutasyonları sonucu; kanal sayısı, kanal fonksiyonu veya her ikisi birden azalabilir ve/veya bunları değişik şiddette gösterebilir. Aynı KFTR mutasyonları, çeşitli hücresel mekanizmalar yoluyla hastalık semptomlarını ortaya çıkarabilir. Çevresel faktörlerin ve genetik modifiye edicilerin de bir rolü olmasına rağmen, her genetik kusur, hastalığın şiddeti (yani kistik fibroz fenotipi) üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Bu sebeple, KFTR geninde oluşan mutasyonların ve işlevlerinin bilinmesi, tanı ve tedavinin

uygulanması/geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu sebeple, hastalığın gidişatının değerlendirilmesi, bilinen mutasyonlar oluşturdukları moleküler bozukluklara göre sınıflandırılmıştır (Tablo 2. 1) [24].

Tablo 2. 1 KFTR mutasyonlarının moleküler sınıflandırılması, oluşturdukları fonksiyon bozuklukları ve ilk tedavi tipi [24]

Mutasyon Sınıfı	Fonksiyonel bozukluk	Moleküler sonuçları	Önerilen tedavi	Örnek mutasyonlar
Sınıf 1	Sayısında azalma	İşlevsiz protein	Translational readthrough	G542X, 394delTT ve 3905insT
Sınıf 2	Sayısında azalma	Üretim yok /azalmış	Düzeltilici Güçlendirici ilaçlar	F508del, N1303K ve A455E
Sınıf 3	Fonksiyonda azalma	Sorunlu kanal fonksiyonu	Güçlendirici ilaçlar	G551D, R117H ve F508del
Sınıf 4	Fonksiyonda azalma	Sodyum iletiminin azalması	Güçlendirici ilaçlar	R347H, R334W ve R117H
Sınıf 5	Sayısında azalma	Anormal ekler	Ek düzeltilici ilaçlar	621 + 1G>T, 3849 + 10kbC>T ve R117H+5T
Sınıf 6	Sayısında azalma	Hücre yüzeyindeki stabilitesinde azalma	Hücre yüzey stabilizatörleri	S1455X, L1399X ve F508del

Birçok mutasyon birden fazla özelliğe sahip olsa da KFTR alellerinin moleküler sınıflandırılması, hücresel bozukluğun anlaşılmasını kolaylaştırır. Mutasyonların karakterizasyonu, özellikle kişiye özel terapötikler hakkındaki bilgiyi standartlaştırmada ve veri havuzları aracılığıyla paylaşılmasında önemlidir [16].

2.1.3 KF Görülme Sıklığı ve Dağılımı

KF bütün ırkları etkileyen fakat en yaygın beyaz ırk arasında görülen kalıtsal genetik hastalıktır. Görülme sıklığı İrlanda'da 1400 canlı doğumda 1; Amerika Birleşik Devletleri'nde 3500 canlı doğumda 1 iken [31], Asya ve Afrika'da 15.000-20.000 canlı doğumda 1 [24] gibi çok daha düşük oranlarda görülmektedir.

Ulusal KF kayıtları sayesinde, KF popülasyonunun zaman içindeki gelişiminin anlaşılması mümkün olmuştur. Bu kayıtlar, onaylı KF merkezlerinde tedavi gören, doğrulanmış KF teşhisi olan hastalar hakkında ayrıntılı, demografik ve klinik bilgiler içeren değerli kaynaklardır. Toplanan bu bilgiler, tanı ölçüt ve yöntemlerinde iyileşmeler yapılmasını sağlamış ve bu durum kistik fibrozun görülme sıklığı ve dağılım oranlarını etkilemiştir. Hastalığın görülme sıklığına dair istatistiksel verilerin çoğunluğu batı ülkeleri kaynaklıdır; Ortadoğu, Asya ve Afrika dahil dünyanın büyük bir kısmı için epidemiyolojik veriler eksiktir [31].

KF'lu bireylerin medyan ölüm yaşı yirmili yaşların ortalarından otuzlu yaşların başlarına kadardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, 2000-2010 yılları arasında hayatta kalım her yıl %1,8 artış göstermiştir. Bu artışın devam etmesi durumunda bugün doğan KF'lu bebeğin medyan ölüm yaşının 54-58'lere ulaşabileceği düşünülmektedir. Hayatta kalım oranının artışı, tarama programlarının sürekliliğinin sağlanması ve iyileştirilmesi ile tanı ve semptomatik tedavilerin erken yaşta yapılması ile mümkündür [24].

2.2 KF Tanısı ve Yenidoğan Tarama Programı

Kistik fibroz tanısı için hastalığa dair en az bir klinik özelliğe sahip olması ve/veya hastalığı olan bir KF'lu kardeş olması durumu ve/veya bir neonatal tarama testinin pozitif sonucu ile ter testi KFTR disfonksiyonunun gösterilmesi gereklidir. Sonrasında, gen analizi veya bazı durumlarda elektrofizyolojik yöntemler de uygulanabilmektedir [22]. KF tanısı için kullanılan bu yöntemler ile oluşturulan farklı protokoller KF yenidoğan tarama programları olarak dünyanın birçok yerinde uygulanmaktadır.

2.2.1 Ter Testi

Ter testi, diğer adıyla “Kantitatif pilokarpin iyontoforez yöntemi”, 1959 yılında, L. E. Gibson ve R. E. Cooke tarafından geliştirilmiş ve hala KF tanısı için altın standarttır [9], [32]. Kistik Fibrozis Vakfı tarafından onaylanmış iki ter testi yöntemi vardır. Her iki yöntem de pilokarpin adı verilen bir kimyasal kullanarak

önkol veya uylukta terlemeyi uyarır. Ter, daha sonra filtre kağıdı veya gazlı bez (Gibson-Cooke yöntemi) veya mikro delikli boru (Macroduct® toplama sistemi) üzerinde toplanır. Testin doğru olması için minimum miktarda ter toplanmalıdır. Klor içeriği terde belirlenir. KFTR disfonksiyonunun gösterilmesi, aynı günde iki bağımsız ölçümde terde yüksek klorür değerleri (≥ 60 mmol/L) olmasını gerektirir. 29 mmol/L'nin altındaki değerler kistik fibrozis olasılığını ortadan kaldırır; 30 ile 59 mmol/L arasındaki değerler test tekrarını gerektirir. Tarama sonucu, pozitif bir IRT testi, bir tanımlanmış belirgin mutasyonu olan veya olmayan ve ter klorür konsantrasyonu 30-60 mmol/L aralığında olup tanısı tam konulamayan çocuklar dikkatle değerlendirilmeli ve takip edilmelidir. Çünkü erken dönemde asemptomatik olmasa da bazıları yaşlandıkça kistik fibrozis fenotipi geliştirir [9].

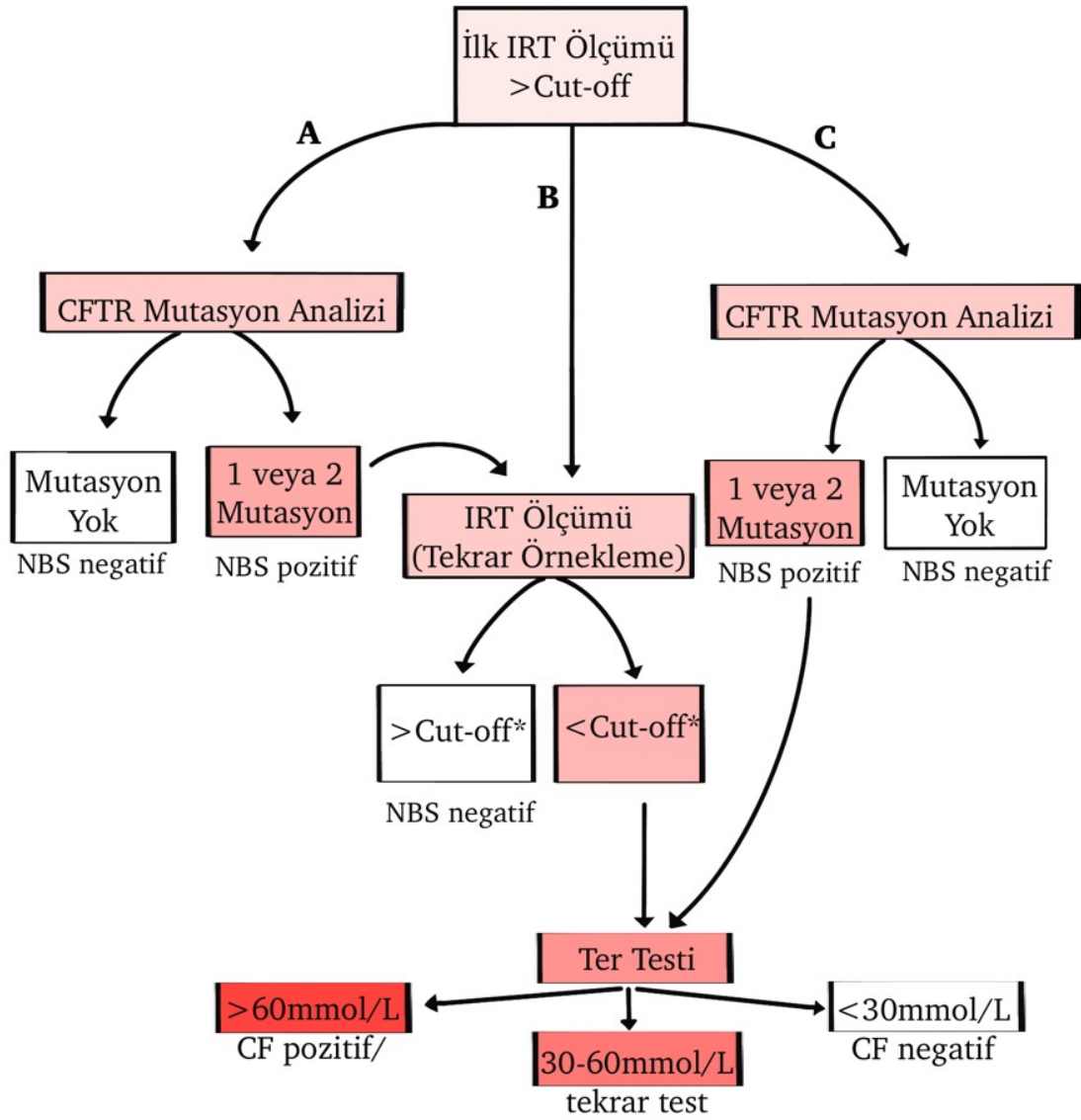
Terde klorür ölçümü %96,5 duyarlı ve %99 spesifiktir ve ilk tercih edilen yöntemdir. Bu testin bilgilendiriciliği, sertifikalı kistik fibrozis merkezleri için bir gereklilik olan performans ve değerlendirmesindeki kalite kontrolüne büyük ölçüde bağlıdır. Vücut ağırlığı en az 3000 g ve gebelik (postmenstrüel) yaşı en az 36 haftalık olan çocuklarda yaşamın üçüncü gününden itibaren ve optimal olarak yaşamın 14. gününden itibaren gerçekleştirilebilir [33].

2.2.2 KF Yenidoğan Tarama Programları

Yenidoğan taraması programı, fenilketonüri (PKU) ve konjenital hipotiroidizm (CHT) gibi kalıtsal/konjenital hastalıklar için 1970'lerin sonlarında yaygın bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Çok sayıda numuneye uygulanan bu biyokimyasal tarama, Robert Guthrie'nin geliştirdiği topuktan kan alınan kanların membran üzerinde kurutulan çok küçük miktarlarda kanda fenilalaninin doğru bir şekilde ölçülebileceğini gösteren çalışmasıyla mümkün olmuştur. Kurumuş kanın laboratuvara nakli sırasında ve saklama koşullarında içeriğindeki analiti stabil halde koruma avantajı vardır ve KF dahil birçok farklı tarama testini küçük miktarda alınan kan örneği ile yapılabilmesini mümkün kılmaktadır.

KF için yenidoğan taraması hastalığın yaygınlığının yüksek olduğu birçok ülkede olduğu gibi 2015'den beri ülkemizde de uygulanmaya başlanmıştır [12]. KF yenidoğan tarama programı hastalık şiddetini, bakım zorluğunu ve bakım masraflarını azaltmaktadır. Ayrıca, gecikmiş ve kaçırılmış tanıların da engellenmesini sağlar [13], [14]. KF tarama programında çift immünoreaktif tripsin (IRT) testi, pankreatit ile ilişkili protein (PAP) testi ile birleştirilmiş IRT testi, DNA mutasyon analizinin de dahil olduğu çeşitli yöntemler kullanılır. KF yeni doğan tarama programı için evrensel kabul edilmiş bir protokol bulunmamaktadır. Ülkelerin yerel, coğrafik, etnik ve ekonomik açılardan değerlendirilerek, ihtiyaçları karşılayan en etkili ve uygulanması en uygun protokol KF yenidoğan taraması için kullanılmaktadır. Uygulanan protokollerin sonuçları karşılaştırılarak iyileştirme çalışmaları birçok ülkede yapılmakta ve sonuçları tartışılmaktadır [22], [32].

KF tarama programı kapsamında uygulanan bütün protokollerde IRT testi ilk aşamayı oluşturur. Bunun için, doğumdan sonra (0-3gün) topuktan kağıt membrana emdirilerek alınan bebek kan örneklerinde, IRT seviyesinin ölçülmesi ve belirlenmiş cut-off kriterine göre yüksek örnekler tarama pozitif (TP) olarak değerlendirilmektedir. Bazı protokollerde ikinci aşama olarak KFTR mutasyon analizi yapılır (Şekil 2. 3A), bazı protokollerde ise tekrar örnek alınarak IRT testi tekrar edilir veya aynı örnekten PAP testi yapılır (Şekil 2. 3B). Bu protokollerde TP tespit edilen bebeklere sonraki aşamada tanı konabilmesi için ter testi uygulanır. Bazı KF tarama protokollerinde ise ikinci aşamada KFTR mutasyon analizi yapılır, mutasyon bulunamayan bebeklerde tekrar kan alınarak IRT testi tekrarlanır. KFTR mutasyonu taşıyan ve KFTR mutasyonu bulunmayan fakat IRT ikinci testi pozitif çıkan bebekler ter testi uygulanarak tanı konması sağlanır (Şekil 2. 3C) [34].



Şekil 2. 3 KF yenidoğan tarama programlarının şematize gösterimi

Yenidoğan taraması ile kistik fibroz tanısı birçok ülkede yaşamın erken dönemlerine taşınmıştır. 2003 yılında, kaydedilen hastaların %11,9'unun; 2018 yılında ise %61,5'inin yenidoğan taraması ile teşhis edilip tanı konulması sağlandığı KF Birliğinin 2018 raporunda sunulmuştur. 15 yılda gözlenen bu fark yenidoğan taramalarının iyileştirme çalışmalarının ve yaygınlaşmasının sonucudur. Medyan tanı koyma yaşının ise 2003'te 6 ay iken, 2018'de 3 aya düştüğü görülmüştür. Semptom gözlenmeden KF tanısının konmasının bireyin

daha iyi akciğer ve beslenme koşullarında olduğu bilgisi literatürde bulunmaktadır [35].

Kistik fibroz tanısı birçok ülkede yenidoğan taraması ile yaşamın erken dönemine taşınmasıyla, KF sağkalım oranı uyumlu olarak artış göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 2000 yılında KF tanısı konan bebeklerin sadece %8'i tarama programı ile teşhis edildi. 2010 yılında ise kistik fibrozu olan kişilerin yarısından fazlasına (%58) yenidoğan taraması tanısı konuldu. Bazı ülkelerde KF popülasyonunun %50'den fazlası 18 yaşından büyüktür. 1991'den 2002'ye kadar geçen sürede akciğer nakli almayan hastalarda medyan sağkalım 1,2 ila 5,3 yıl arasında artış göstermesinde tarama programının öneminin büyük olduğu düşünülmektedir. Sağ kalım yaşının artmasında, KFTR mutasyonlarının genotiplemesindeki ilerlemeler ve hafif kistik fibroz fenotiplerine sahip insan sayısının artması da katkıda bulunmuştur [24].

Ülkemizde de KF hastalığının yenidoğan tarama programına alınmasıyla, KF hastalarını erken dönemde belirleyip tedavilerine de erken başlanmasını sağlayarak mortalite ve morbiditede azalma sağlaması beklemektedir. Bu kapsamda yeni doğan kanları “Kistik fibrozis” hastalığı özelinde test edilmek üzere Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Çocuk ve Ergen Sağlığı Daire Başkanlığı, Yenidoğan Tarama Laboratuvarlarında toplanmakta ve test edilmektedir. 2016 yılından itibaren Türkiye verileri de Avrupa kayıt sisteminde yer almaktadır.

Tablo 2. 2'de 2015, 2016, 2017 ve 2018 yılı içerisinde yenidoğan tarama programı kapsamında, KF hastalığı açısından taranan bebek sayısı, tekrar numune istenen bebek sayısı, ter testi için sevk sayısı ve sevk edilen bebeklerin durumu ve KF tanısı alan bebek sayıları yer almaktadır. Ayrıca sevk dışı tanı alanlar ve toplam KF tanısı alan bebeklerin durumu aynı tabloda yer almaktadır (Kişisel iletişim, HSGM, Deniz Acıcan 2018).

Tablo 2. 2 2015-2018 yılı yenidoğan tarama programı kapsamında KF için taranan bebeklerin genel durumu

Yıllar	2015	2016	2017	2018
Taranan Bebek Sayısı	1.292.703	1.277.013	1.256.541	1.230.049
Tekrar Numune İstenen Bebek Sayısı	23.316	32.941	21.555	13.517
Ter Testi için Sevk Sayısı	3.123	5.737	3.306	2.674
Sevklerin Dökümü				
Aile Sevki Kabul Etmiyor	66	108	55	69
Aileye Ulaşılamıyor	13	20	2	1
Bebek Öldü	115	152	143	114
KF Tanısı Alan	119	132	98	82
Normal	2.799	5.274	2.904	1.735
Tanılama Sürecinde	3	40	89	658
KF Taşıyıcı Tanı Alan	8	11	15	15
Sevk Dışı Tanı Alanlar				
Tekrar Topuk kanı vermeyip, direk ter testine yönlendirilip KF tanısı alan	7	17	9	3
Üç aydan büyük olup direk ter testine yönlendirilip KF tanısı alan	3	2	3	-
Taraması normal çıkıp tanı alan	4	1	4	2
2014 yılında validasyon çalışmasında tanı alan bebek sayısı	12	-	-	-
Toplam KF tanısı alan	145	152	114	87

Ülkemizde hala yeni sayılabilecek bir uygulama olan KF yenidoğan tarama programı ile teşhis edilerek tanı konan bebekler takip edilerek uygulamanın etkisini gösteren çalışmalar literatüre eklenmeye başlanmıştır. Bu çalışmalar sayesinde ülkemizde yenidoğan tarama programının mortalite ve morbidite üzerinde etkisinin incelenmesi, uygulanan protokolün otokontrolünü ve iyileştirilmesini sağlamak açısından önemlidir [36].

2.2.3 İmmünoreaktif Tripsin Testi

KF'lu yenidoğan bebeklerde kan IRT konsantrasyonlarının arttığı Crossly ve ark. tarafından 1979'da yayınlanmasının ardından KF için yenidoğan taraması yapılması mümkün olmuştur [37].

IRT, pankreatik enzim öncüsü olan tripsinojenin kanda bulunan formudur. Tripsinojen, pankreasın asinar hücrelerince sentezlenir ve aktif formu olan tripsin enzimini oluşturmak üzere bağırsaklara taşınmaktadır. Tripsin, 24.000 dalton molekül ağırlığında bulunan, pI değeri 9,3 olarak bilinen ve pH 2–4 arasında stabil olan bir enzimdir. Normal fizyolojik şartlarda tripsinojen yapısının tripsine dönüşümü enterokinaz enzimi aracılığıyla olmaktadır. Tripsinojen formun aktif forma dönüşümü sağlayan diğer bir süreç ise tripsinin otokatalitik aktivitesidir. Tripsinin otokatalitik aktivitesi sonucunda da, tripsinojen hekzapeptitlerinden kesilerek aktif tripsin formuna dönüşebilmektedir [38].

Tripsinin üç izoformu mevcuttur fakat KF yenidoğan taramaları için marker olarak iki izoformu önerilmiştir. Bunlardan biri tripsinojen 1 (katyonik tripsinojen, IRT1), ağırlıklı olarak pankreasın ekzokrin hücreleri tarafından salınan formu, diğeri ise tripsinojen 2 (anyonik tripsinojen, IRT2) birçok dokuda sentezlenebilen formudur. Literatürde her iki formunda KF için marker olarak kullanılabileceği önerilse de, yapılan araştırmalar ve kullanılan test kitleri çoğunlukla IRT1 formuna yöneliktir [37], [39], [40]. Sağlıklı bireylerde IRT1 protein miktarının IRT2 miktarına oranı 3.0' dır [41]. KF'de pankreas kanallarının mukusla tıkanması sebebiyle kandaki IRT2 miktarı da yükselmektedir. IRT1 formunun erken doğum durumuna, bebeğin kilosuna ve ırkına bağlı olarak da yüksek konsantrasyonlarda bulunmasının yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine sebep olduğu, bu yüzden IRT testinin spesifitesinin düştüğü durumlardan literatürde bahsedilmiştir [40], [42]. IRT2 formundaki artış ise daha çok pankreatitis gibi patolojik durumlarla ilişkilendirildiği için, IRT2' nin, KF'de IRT1' den daha anlamlı olabileceği üzerinde duran yayınlar mevcuttur [37], [39].

2.3 Antikor Temelli Tanı Sistemleri ve Yenidoğan Tarama Test Kitlerinde Kullanımı

Antikorlar, canlı vücuduna giren yabancı antijenlere karşı, plazma hücreleri tarafından sentezlenen savunma proteinleridir. Vücutta serum/plazmanın bir grup küresel proteini olarak yer alır ve bu nedenle immünoglobulinler olarak da

bilinirler. Antikorlar, antijenlerle spesifik olarak kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla bağlanırlar. Antikor ve immünoglobulin kelimeleri literatürde birbirinin yerine kullanılmaktadır. İmmünoglobulin terimi, antijen bağlama spesifikliğinden bağımsız olarak antikor benzeri bir molekülü belirtmek için de kullanılabilir. Antikorlar, şimdiye kadar bilinen en çeşitli proteindir. Antikorlarla ilgili en şaşırtıcı gerçek, bu protein moleküllerinin polipeptit zincirinin ~%90-95'inde neredeyse benzer amino asit kalıntılarına sahip olması, buna karşın kalan ~%5 ile %10'unun, protein yapısında büyük varyasyon gösteren hiperdeğişken bir amino asit kalıntıları bölgeden oluşmasıdır.

Antikorlar, iki ağır, iki hafif zincirden oluşan, tetramerik bir yapıdan oluşur. Bu ikili zincirler birbirlerine kovalent (sülfür bağları) ve nonkovalent (hidrojen bağları) bağlarla bağlanmıştır. Ağır zincir ~ 450 aminoasitten, hafif zincir ~220 amino asitten oluşur. Her antikoru iki ana işlevi vardır: (1) antijenle birleşen kollar Fab (fragment antijen binding) ve (2) efektör sistemin reseptörleri ile birleşen kuyruk kısmı Fc (fragment constant). Antikoru Y-şekli yapısında, Y'nin kolları, bir konağın antijenlere karşı oluşturabileceği tepkinin çok yönlülüğünü ve özgülüğünü verirken, antikoru kök bölgesi biyolojik aktivitelere karar verir (örn. kompleman aracılı lizis, fagositoz, alerji vb.) Biyolojik aktivite her zaman antijenin antikora bağlanmasıyla başlar [43]. Tüm immünglobulinlerde hafif zincir benzer yapı göstermesine rağmen ağır zincirindeki fiziksel, kimyasal, antijenik farklılıklara göre IgG, IgA, IgM, IgD, IgE ismi ile 5 ayrı grupta incelenir. Her bir immünglobulin sınıfı diğerlerinden oldukça farklılık gösterir ki bu farklılıklar immünglobulin sınıflarının fonksiyonları ile ilgilidir.

Antikor temelli tanı sistemleri, çoğu durumda analite (antijene) özgü bir antikor (veya bir çift spesifik antikor) olan spesifik bir bağlayıcı molekül ile analitin bir kompleks oluşturarak bir numunedeki analit konsantrasyonunun ölçülmesi işlemidir. Yani, antikor temelli tanı sistemleri bir makromoleküler bağlanma reaksiyonudur, çünkü test antikoru ile antijen molekülü (hedef molekül, analit) arasında hiçbir kovalent kimyasal bağ oluşmaz [44]. Antijenler haptenler,

hormonlar vb. gibi küçük moleküller olabilir veya glikolipitler ve proteinler gibi çok büyük bileşikler olabilir [45]. Antikor ve antijen arasındaki etkileşim, zayıf hidrojen bağı ve van der Waals kuvvetleri ile oluşur. Antikoru Fab bölgesi, antikor-antijen etkileşimlerinden sorumludur. Ig moleküllerinin hem ağır hem de hafif zincirlerinin N-terminali 110 amino asit kalıntıları, değişkendir ve antijen ile etkileşime girerek antijen bağlama bölgelerini oluşturur. Antijen ile temasta 30 amino asidin rol oynadığı tahmin edilmiştir, ancak X-ışını kristalografik çalışmaları, antijenin antikora bağlanması maksimum sadece 17 amino asidin rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, bu 17 amino asit dizisindeki varyasyon, çok çeşitli antijenleri (analitleri) yüksek  zg ll klerle bağlayabilen çok sayıda antikorlarla sonuçlanır. Bu nedenle, immünoassay, antijenin aviditesine ve özgüllüğüne dayanan biyoanalitik bir tekniktir [44].

İmmünoglobulinlerin sayısız ve çeşitli patojenlere karşı sava ma yetenekleri, farklı antijenler arasında ayırım yapabilmesiyle mümkündür. Basit görünse de, antikor-antijen kompleksi sayısız kovalent olmayan etkileşimden oluşan bir etkile imdir. Antijen bağlanma sahası (epitop) ve antikor bağlanma sahası (paratop)  zerindeki amino asit kalıntıları, antijen-antikor kompleksinin stabilitesi için gereken enerjiye yakından katkıda bulunur. Antikorlar;  zg ll k ve yüksek afiniteleri sebebiyle, araştırma, teşhis ve tedavide değerli ve vazgeçilmez bir araç olmuştur [46].

İlk immünolojik testler, 1950'lerin sonlarında Yalow ve Berson'ın  nc  çalışmalarında ¹²⁵I gibi bir radyoizotopla etiketlenmiş antikorların kullanılması ile ba ladı. Antikor temelli tanı sistemlerinin temeli, yöntemden bağımsız olarak, bir antijenin bir antikorla etkileşimine dayanır. Bu etkileşimin meydana gelme derecesi (serbest ve antikora bağlanan antijen miktarı), analit bulunan hedef molekülün miktarına bağlıdır ve analitin niteliksel veya niceliksel olarak ölçülmesini sağlar [45].

Antikor-antijen etkileşimini esas alan ELISA, western blot, yatay akış testi, gibi yöntemler hastalık tanı yöntemi olarak sıklıkla kullanılır. Antikor temelli tahliller, tanısal testler için çekici bir seçenektir çünkü bunlar nispeten ucuzdur, toksik

değildir ve oldukça spesifiktir. Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) 96 veya 384 kuyulu bir mikroplakada gerçekleştirilen birkaç saat içinde tamamlanabilen bir testtir. Buna ek olarak, ELISA, doğru analiz için gereken hassasiyeti korurken yüksek numune verimine izin vererek tamamen otomatik hale getirilebilir. Sonuç olarak, antikor temelli teşhis kitleri için en yaygın olarak seçilen teknikler arasındadır [47].

2.3.1 ELISA

ELISA; çok miktarda örnek kullanımına uygun, yüksek kapasite uygulamaya elverişli, hızlı, ucuz, kit geliştirme çalışmalarında tercih edilen uygun tanı için ideal spesifite ve sensitiviteye sahip bir yöntemdir [48]. Yöntemin temeli; analite özgü olan spesifik bir antikor (veya bir çift spesifik antikor) ile mikro plak yüzeyinde antikor-antijen ve/veya antijen-antikor gibi komplekslerin oluşturulması ve kompleks üzerindeki enzim molekülünün oluşturduğu sinyal aracılığıyla numunedeki analit konsantrasyonunun belirlenmesidir [44]. ELISA temelde üç sistem başlığı altında incelenebilir (Şekil 2. 4).

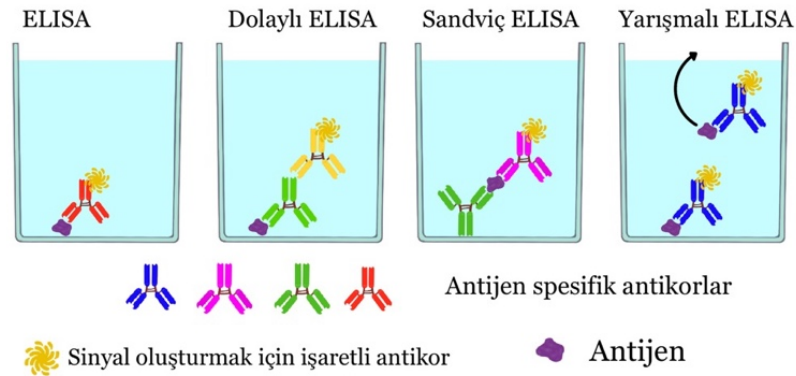
- Doğrudan (Direkt) ELISA
- Dolaylı ELISA
- Sandviç ELISA

Üç sistemin tümü, rekabet (kompetitif, yarışmalı) ELISA'ları olarak adlandırılan bir grup tanı sisteminin de temelini oluşturmak için kullanılabilir [49].

- **Direkt ELISA** ELISA sisteminin en basit halidir. Mikroplak üzerine adsorbe edilen antijen moleküllerinin, enzimle işaretli spesifik antikor aracılığıyla renk değişimine bağlı sinyal elde edilmesi prensibi ile çalışır. Test edilecek örnek içerisinde antijen olması halinde işaretli antikorun mikroplak yüzeyindeki antijen ile serbest antijen arasında yarışması prensibine ise yarışmalı direkt ELISA denilmektedir.
- **Dolaylı ELISA**'da Direkt ELISA'dan farklı olarak enzimle işaretlenmemiş birincil tespit antikorları kullanılır. Sinyal oluşturmak için işaretlenmiş ikincil

antikorlar (tespit antikorlarının türüne (IgG, IgM, IgA vb) karşı geliştirilmiş antikorlar) kullanılır.

- **Sandviç ELISA**'da ise mikropalak yüzeyinde immobilize edilmiş yakalayıcı antikor ile analit içerisindeki hedef molekülün yakalanması ve işaretli tespit antikoru ile sinyal oluşturulması sağlanır. Sandviç ELISA için iki farklı antikor veya tek antikor yakalayıcı ve tespit edici olarak kullanılabilir. Sandviç ELISA'da antijen molekülü iki farklı bölgeden spesifik etkileşime girdiği için daha spesifik bir ELISA sistemidir.
- **Yarışmalı ELISA** ise mikropalak (katı faza) üzerine bağlanan antijen ile sonradan sabit miktardaki antikorla birlikte eklenen farklı konsantrasyonlardaki serbest antijenin bağlanmaları esasına dayanır. Buna göre serbest olarak eklenen antijen miktarı arttıkça, zemine bağlı antijenin antikora bağlanma oranı düşeceğinden ELISA testi sonuunda oluşan sinyal azalacaktır.



Şekil 2. 4 ELISA Sistemlerinin Şematik Gösterimi.

2.3.2 Antikor Üretimi

Antikorlar (diğer adıyla immünoglobulinler, Ig'ler), insanlarda plazma proteinlerinin %20'sini oluşturur. İnsan immünoglobulinleri birkaç farklı izotipte bulunur. IgD izotipi bir antijen reseptörü olarak işlev görür ve B hücrelerinin yüzeyinde bulunur; IgE izotipi alerjenleri bağlar ve ardından mast hücrelerinden histamin salınımını tetikler (alerjik reaksiyon); IgG yabancı patojenlere karşı

başışıklık sağlar. IgM izotipi B hücrelerinin yüzeyinde monomer halde bulunabilir veya hücre dışına salgılandığında pentamer formda bulunabilir. IgM, bir enfeksiyona karşı ilk başışıklık tepkisini temsil eder ve yüksek aviditesi nedeniyle küçük miktarlarda antijeni bile saptayabilir.

Keçi, koyun veya tavşan gibi memeli hayvanlardan elde edilen poliklonal özellik gösteren IgG ve/veya IgGfragmanları, araştırma amaçlı sıklıkla kullanılmaktadır.

Poliklonal antikorların kullanımı, düşük özgünlük, çapraz reaksiyon gibi tercih edilmeyen özelliklere sahip olması ve kaynağın eldesinde süreklilik olmaması gibi nedenlere bağlı olarak pratik açıdan tercih edilmemektedir. Hibridoma teknolojisi kullanılarak kemirgenlerden veya tavşanlardan elde edilen monoklonal antikorlar ve ayrıca rekombinant elde edilen monoklonal antikorlar (mAb'lar), büyük ölçekli antikor uygulamalarının kaynağıdır. Antikorum kaynağına bağlı olarak saflaştırma ve analiz, son uygulamaya, GMP üretimi gereksinimine ve/veya uzun süreli saklama için gerekli saklama koşullarına bağlı olarak kısmen farklılık gösterecektir [49].

Hibridoma yöntemi kullanılarak geliştirilen monoklonal antikorlar, somatik iki hücrenin füzyonu ve hibridoma seçimi kullanılarak üretilir [50]. Geliştirilen hücre hattı homojen bir antikor popölasyonu içerisinde, tek bir antijenik epitopu spesifik olarak tanıyan hücre hattını temsil etmektedir. Belirli bir epitop için spesifik olmakla birlikte, monoklonal antikorların aynı epitopa sahip olan farklı antijenlerle çapraz reaksiyona girebileceği akılda tutulmalıdır. Bununla birlikte, hedef antijenlere özgün monoklonal antikorların geliştirilmesi, immünoassay metodolojilerinin gelişiminde çığır açmıştır. Çünkü iyi tanımlanmış ve spesifik olan monoklonal antikorları üreten hibridoma hücre hatları neredeyse sınırsız bir antikor kaynağı sağlayabilmektedir.

İmmüno deneylerde kullanılmak üzere antikorların geliştirilmesine yönelik bir diğer yaklaşım, önceden belirlenmiş bağlanma özgüllüğüne sahip antikor

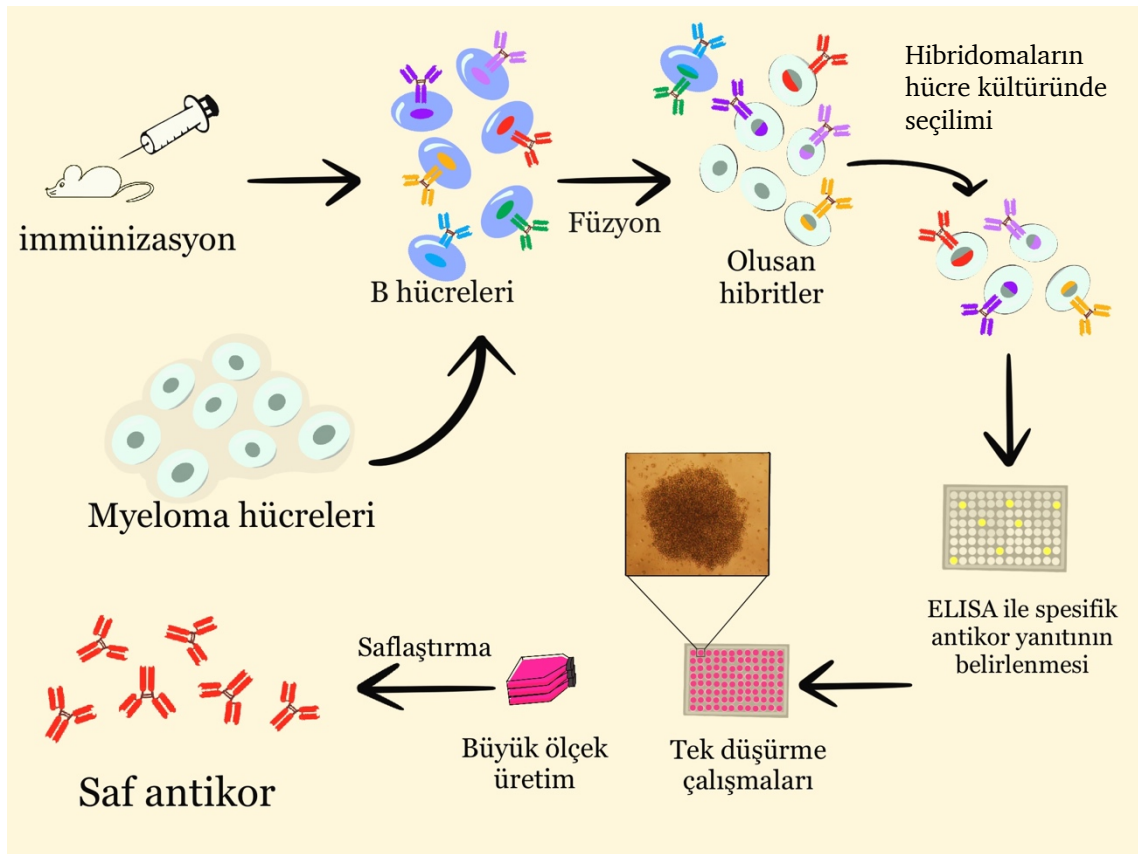
fragmanlarının bir fajda kodlandığı ve bakterilerde eksprese edildiği faj gösterim teknolojisi [51].

Tanı kitlerinde bir antijenin (protein, enzim, hormon, bakteri, virüs vb) tanımlanmasında kullanılabilecek en önemli belirteçlerden birisi de monoklonal antikorlardır. Monoklonal antikor (MAb) üretim teknolojisi ile ilgili ilk çalışmalar 1975 yılında başlatılmıştır. Bu çalışmada aynı antijene karşı farklı antikorlar üreten değişik hibrid suşların elde edilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Monoklonal antikor teknolojisinin temelini, tek bir epitopu tanıma özelliğine sahip antikor üreten hibrid hücre hatlarının elde edilmesi oluşturur. MAb üreten kalıcı hücre hatları, immunize edilmiş hayvanların dalak ve lenf düğümlerindeki antikor üreten B hücreleri (plazmosit) ile myeloma hücrelerinin füzyonu sonucunda elde edilir. Tek tip antikor molekülü üreten hibrid hücrelerin her biri genetik olarak özdeştir ve klon olarak adlandırılır. Monoklonal antikorlar homojenliği, sürekli elde edilebilirliği ve antijenlerin tek bir epitopuna özgünlüğü nedeniyle tanı ve tedavide çok sayıda kullanım alanı bulmuştur. Antijen ve antikor (Ab) arasındaki özgüllük ve yüksek afiniteye bağlı olarak antikor tabanlı test sistemleri, oldukça yüksek duyarlılık ve seçiciliği ile tıp, tarım, gıda, savunma, çevresel analiz ve biyokimyasal çalışmalarda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Monoklonal antikor kullanımına dayalı ELISA testleri biyokimyasal ve mikrobiyolojik testlere göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir ve bu nedenle artık hemen her laboratuvar da rutin uygulanan bir yöntem haline gelmiştir.

Antikorlar dünyada yılda 20 milyar \$'lık tanı endüstrisinin %30'unu kapsamakta, antijen-antikor ilişkisine dayalı tanı sistemleri ile pikomolar düzeyindeki antijenleri belirlemek mümkün olmaktadır. Antikor temelli tanı sistemleri, diagnostik pazarda ön plana çıkmaktadır. Gelişmiş ülkeler yaklaşık 25 yıldır antikorlar ve antikor tabanlı test sistemlerinin oluşturduğu pazarı dikkate alarak immünolojik tanı sistemlerine yönelik araştırma alanlarına yatırım yapmaktadırlar.

2.3.3 Hibridoma Teknolojisi

Füzyon çalışmaları iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması anlamına gelen bir yöntem olup iki yararlı özelliğe sahip hücrelerin kimyasal bir ajan yardımı ile birleştirilmesi esasına dayanır. B lenfositlerinin spesifik antikor üretici özellikleri ile myeloma hücrelerinin ölümsüz olma özelliğini kazanan hibrit hücreler özel şartlarda üretildiklerinde tek bir antijenik determinanta karşı çok yüksek özgüllükte ve sonsuz miktarda monoklonal antikor sentezlemektedir (Şekil 2. 5). Böyle bir çalışma için aşağıdaki işlemler gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2. 5 Hibridoma Teknolojisi

2.3.3.1 Antikor Saflaştırma

Antikorlar, diğer proteinler gibi, boyut, çözünürlük, yük, hidrofobiklik ve bağlanma afinitesi gibi benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri temelinde analiz veya karakterizasyon için ayrılabilirler. Bunların saflaştırılması için uygulanan strateji, çoğunlukla saflaştırılacak malzemenin kaynağına bağlıdır. Serum veya ascites sıvısının avantajı, yüksek miktarda immünoglobulin içermesidir, dezavantajı ise, çok fazla kirlilik yani farklı antikorlar ve proteinler içermesidir. Antijene spesifik antikorun miktarı toplam antikor miktarının küçük bir kısmını oluştursa da, bir çok uygulama için, serum veya ascites sıvısından IgG fraksiyonunun saflaştırılması yeterli bulunmaktadır [52].

Hibridomalar ise sınırsız hacim ve miktarda antikor üretebilir. Amonyum sülfat çöktürmesi, genellikle, serum veya ascites sıvısının antikorların saflaştırılmasında ilk adımdır. Aynı zamanda, büyük ölçek hücre kültür üst sıvılarında antikor dahil mevcut proteinlerin konsantre edilmesi için ucuz bir yöntem oluşturur [53].

Amonyum sülfat, denatüre olmayan proteinleri çökeltirerek antikorları küçük bir hacime konsantre ettiği için büyük miktar çözeltilerden antikorları çöktürmek için tercih edilen tuzdur. Hibridomaların kültür süpernatantlarında sıklıkla bulunan bir pH göstergesi olan fenol kırmızısı, bazı kromatografik ortamlara bağlanabilir ve saflaştırmadan önce numuneden uzaklaştırılmalıdır. Amonyum sülfat çöktürme ve sonrasında uygun bir tampon ile diyaliz işlemi gerçekleştirilerek ortamdaki amonyum sülfat tuzu ve fenol kırmızısı gibi moleküller ortamdan uzaklaştırılabilirler [52].

Protein A ve IgG tipi antikorlar arasındaki afinite, protein/antikor saflaştırması çalışmalarında afinite sistemlerinin geliştirilmesi için keşfedilen ilk doğal etkileşimlerden biri olmuştur. Antikorların saflaştırılması için en çok uygulanan afinite sistemi, Staphylococcal protein A ve bundan türetilen daha küçük ligandlardır. IgG saflaştırması için de kullanılan ve bir bakteri türünden kaynaklanan bir başka afinite ligandı, streptokok proteini G'dir. Protein A ve protein G materyali antikor saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılmasına

rağmen, ligand stabilitesi, kullanımlarını sınırlayan bir konu olmuştur ve afinite kromatografisinde kullanılan ligandların stabilitesini arttırmak için protein mühendisliği yöntemleriyle daha stabil protein veya ligantlar geliştirilmiştir. Protein A'nın protein G'ye kıyasla üstün stabilitesi, endüstriyel saflaştırmalarda protein G'nin kullanımını sınırlamıştır. Fakat protein A'nın serum ve insan IgG alt sınıflarına karşı düşük afinitesi nedeniyle, bu antikorların afinite saflaştırması için protein G normalde ilk tercih edilen olmaktadır [54].

2.3.3.2 Antikor İşaretleme

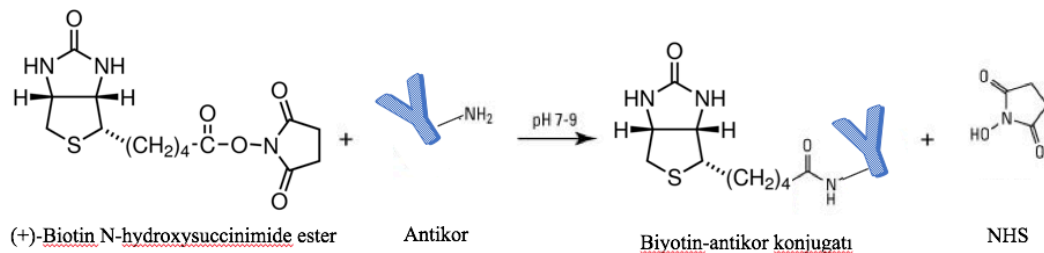
Antikorların işaretlenmesi tanı kiti geliştirmede en önemli basamaklardan biridir. İşaretlenmiş antikorlar, Western blotlar, ELISA'lar, akış sitometrisi, immünohistokimya (IHC) ve immünofloresan (IF) gibi immüno-bazlı analizler/testler için esastır. İşaretli antikorlar, tek bir proteini karmaşık bir protein karışımında inhibe etmek, tespit etmek ve saflaştırmak için de kullanılır. Diğer proteinler gibi antikorlar da küçük moleküller, radyoizotoplar, enzimatik proteinler, nanopartiküllerle ve floresan boyalarla işaretlenebilirler.

Genellikle antikorları küçük moleküllerle veya başka proteinlerle işaretlemek için serbest amin yada serbest karbonil grubu hedeflenerek işaretleme yapılabilir.

Biyotinle işaretlemek genellikle daha yüksek sinyal elde etmek açısından avantajlıdır. Çünkü biyotinle işaretli antikor basamağından sonra enzim konjuge edilmiş streptavidin-Horse Radish Peroksidaz (HRP) kullanılır. Bu basamakta biyotin molekülü HRP-işaretli streptavidin ile etkileşerek HRP enziminin sandviç ELISA sistemine bağlanıp substrat ile yanıt oluşturmalarını sağlar. Bu basamak amplifikasyon basamağı (Sinyal yükseltme basamağı) olarak adlandırılır. HRP enzimi ile işaretlemenin sağlayacağı avantaj geliştirilen kit prosedürünün bir basamak daha kısa olmasını sağlar. İki işaretleme yönteminin performansı da bağlanacağı antikor üzerindeki serbest amin gruplarının konformasyonu ile uyumuna bağlıdır. Bu sebeple ikisinin de denenmesi önemlidir. İşaretleme

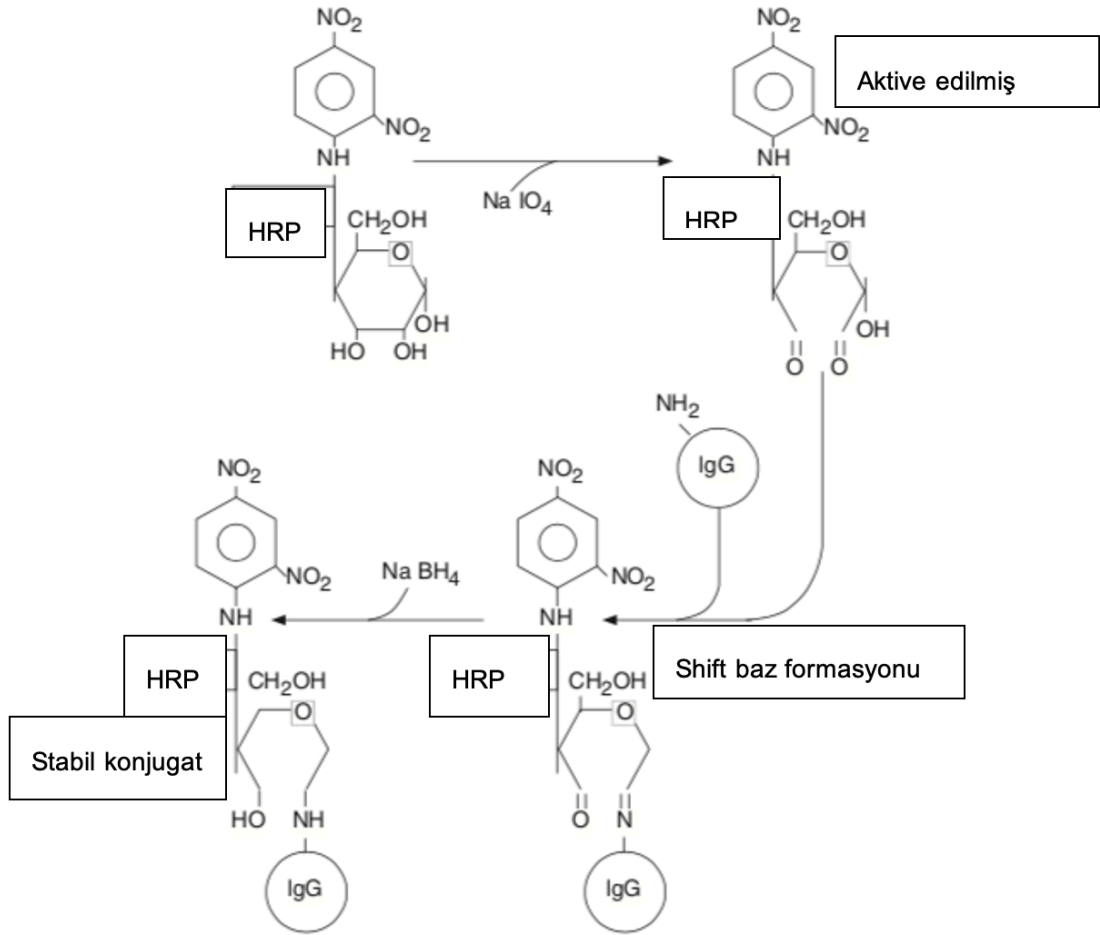
yöntemleri hakkında detaylı bilgi ve uygulanan protokoller alt başlıklarda açıklandı.

- **Biyotinle işaretleme** Biotin, avidin ve streptavidin proteinlerine yüksek afinite ile bağlanan küçük, doğal olarak oluşan bir vitamindir. Biotinlenmiş proteinler tipik olarak biyolojik aktiviteyi korur çünkü biyotin nispeten küçük bir moleküldür. Birkaç biyotin molekülü ile konjuge edilmiş bir antikor sinyali çoğaltabilir, böylece birçok testin duyarlılığı artar. Biotin ve avidin (veya streptavidin) arasındaki bağ oluşumu hızlıdır ve bir kez oluştuğunda, pH, organik çözücüler ve diğer denatüre edici ajanların çoğunun uç noktalarından etkilenmez. İşaretlenmiş proteinler, avidin, streptavidin ürünleri kullanılarak saflaştırılabilir ve tespit edilebilir. N-Hidroksisüksinimid (NHS) esterleri, en yaygın kullanılan biyotinyasyon reaktifleridir. pH 7-9 tamponlarında, NHS-biotin reaktifleri nükleofilik atak yoluyla primer amino grupları (-NH₂) ile etkin şekilde reaksiyona girer, bir amid bağı oluşturur ve NHS'yi serbest bırakır (Şekil 2. 6). Proteinler tipik olarak, lizin kalıntılarının yan zincirindeki primer amin ve her polipeptidin N terminali dahil olmak üzere birçok etiketleme yerine sahiptir [55].



Şekil 2. 6 Antikorum biyotin ile konjugasyonu

- **Horseradish peroksidaz ile işaretleme** Enzimlerin antikorlara konjugasyonu, yani işaretleme, antikorum aktif bölgesinde fonksiyonel bir değişim olmadan enzim ile arasında stabil, kovalent bir bağlantının oluşumu ile gerçekleşir. Enzimin saflaştırılmış antikorlara (IgG) çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 2.7'de sunulmaktadır.



Şekil 2. 7 Enzimin IgG antikoruna çapraz bağlanma reaksiyonu [56]

HRP enziminin serbest karbonil gruplarından veya serbest amin gruplarından diğer proteinlere konjugasyonu mümkündür fakat, HRP'nin kendisinde çok az lizin amino asidi olması nedeniyle, çok fazla HRP polimerizasyonu olmadan antikor-HRP konjugatları oluşturmak nispeten kolaydır. Sodyum periyodat işaretlemelerin büyük çoğunluğunda kullanılamaz, ancak tanı sistemlerinde en popüler olarak kullanılan HRP konjugasyonu için oldukça önemli bir reaktiftir. Sodyum periyodat, HRP molekülü üzerindeki karbonhidrat zincirlerini aktive eder ve antikor molekülleri üzerindeki serbest amin gruplarıyla reaksiyona girebilen aldehit grupları oluşturur [56].

2.3.3.3 Antikorların Lineer Epitop Analizi

Antijen molekülünün yüzeyinde bulunan ve kendi özgül antikorları ile birleşmeyi sağlayan, bölgelere determinant grup veya epitop adı verilir. Epitop tüm antijen molekülünün oldukça küçük bir kısmıdır (6-10 aminoasitlik) ve antijen molekülünde aynı veya farklı kimyasal yapıda birçok epitop bulunabilir. Antijenin sahip olduğu epitop sayısı molekül büyüklüğü ve kompleksliği ile yakından ilgilidir. Bu durum, bir antijen molekülünün farklı yapıdaki her epitopuna karşı spesifik antikorlarla aynı anda bağlanabilmesini sağlar [57]. Geliştirilen antikorların hangi epitopa bağlandığının bilinmesi, tasarlanan ELISA modelinde kullanılacak antikor çiftlerinin belirlenmesi ve kullanılan tamponların optimize edilmesi çalışmalarında kolaylık sağlayacaktır. Ayrıca geliştirilen antikorların epitopunun bilinmesi antikorların tek başına ticari değerlerini de arttıracaktır.

2.4 In-vitro Tanı Kitleri ve Tanı Kitlerinin Değerlendirilmesi

In-vitro tanı kiti, birlikte paketlenmiş ve belirli bir in vitro diagnostik muayeneyi veya bunun bir parçasını gerçekleştirmek için kullanılması amaçlanan bir dizi bileşen anlamına gelir. Kalibratör, kontrol malzemesi, alet, aparat, ekipman parçası, yazılım veya sistemi tek başına veya kombinasyon halinde kullanılan çeşitli tıbbi ekipmanları içerebilir. Fizyolojik veya patolojik bir süreç veya durumla ilgili, doğuştan gelen fiziksel veya zihinsel bozukluklarla ilgili, tıbbi bir duruma veya hastalığa yatkınlıkla ilgili olarak, tedavi yanıtını veya reaksiyonlarını tahmin etmek, terapötik önlemleri tanımlamak veya izlemek, kan ve doku bağışlarında potansiyel alıcılarla güvenliği ve uyumluluğu belirlemek için in-vitro tanı kitleri kullanılabilir [58].

Bir in-vitro tanı kitinin performans değerlendirmesi için, Avrupa birliği in-vitro tanı kiti (98/79/EC) yönetmeliğinin ikinci bölümü ve ek XIII kısım A'ya uygun olarak aşağıdaki tanımlanmış maddeleri içeren prosedür izlenmelidir:

- **Bilimsel geçerlilik:** Bir analitin klinik bir durum veya fizyolojik bir durumla ilişkilendirilmesi anlamına gelir. KF için IRT seviyelerinin hastalığa bağlı olarak

doğum sonrasında bebek kanlarında normalden yüksek seviyelerde bulunması ve literatürde destekleyen çalışmalar olması bilimsel geçerlilik maddesini sağlar.

- **Analitik performans** In-vitro tanı kitinin analitik duyarlılık (analytical sensitivity), analitik özgüllük (analytical specificity), kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik), doğruluk (gerçeklik ve kesinlikten kaynaklanan), saptama ve nicelik sınırları, çapraz reaksiyon kontrolleri, ölçüm aralığı ve numune toplama/işleme ile ilgili iç ve dış etkilerin ölçüm üzerindeki etkilerinin incelenmesini kapsar.
- **Klinik performans:** In-vitro tanı kitinin, tanı üzerine etkinliğinin klinik örneklerle test edilmesidir. In-vitro tanı kitinden elde edilen veri ve sonuçların değerlendirilmesinden sonra kitin performansı için klinik kanıt (klinik tanının konması) elde edilir. Klinik kanıtlar, amaçlanan klinik faydanın elde edileceğini ve kitin güvenli olduğunu bilimsel olarak gösterecek şekilde olmalıdır. Bu değerlendirmeler sonucunda bir performans değerlendirme raporu hazırlanır. Performans değerlendirme raporu, ilgili kit ile ilgili teknik dokümantasyonun bir parçasını oluşturur ve piyasaya arz sonrası gözetim planı ile ilgili cihazın yaşam döngüsü boyunca güncellenir [58].

2.4.1 Performans Testlerinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Performans çalışmasının tasarımının ve içerdiği analitik verilerin özeti aşağıdaki maddelerde belirtilmiştir.

- İncelenen popülasyon(lar): demografi, seçim, dahil etme ve hariç tutma kriterleri, dahil edilen bireylerin sayısı
- Numunelerin karakterizasyon yöntemi veya modu
- Performans testlerinde kullanılan istatistiksel yöntemler

Yapılan testler sonucunda elde edilen ham verilerin yorumlanması ve performansa dair bir fikir verebilmesi için bu verilerin bazı istatistiksel yöntemler ve bu hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler ışığında değerlendirilmesi gereklidir.

Bunlardan bazıları Alıcı Operatör Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic, ROC), doğrulama önyargısı, Bayes yöntemi, Gri bölge ve teşhis veya tarama ayrımcılığı ile korelasyon çalışmalarıdır. Bu yöntemlerle ilgili detaylı bilgi aşağıda sunulmaktadır.

2.4.1.1 ROC Eğrileri

İki veya daha fazla tarama testinin tanısallığını karşılaştırmak veya aynı hastalık için iki veya daha fazla biyobelirtecın öngörü yeteneğini değerlendirmek için kullanılır. ROC eğrileri uygun pozitiflik eşiğinin (cut-off değeri) belirlenmesinde ve farklı uygulayıcıların kıyaslanmasında da kullanılan bir yöntemdir. ROC eğrisinin ordinatında duyarlılık (tanı testinin gerçek pozitiflik değeri), apsisinde ise yanlış pozitiflik değeri vardır. Altın standarda aynı performansta çalışan test (0,0)-(0,1)-(1,1) noktalarını birleştirir. Bu test için ROC eğrisinin altındaki alan Eğrinin Altındaki Alan (Area Under Curve, AUC) 1 olarak hesaplanır. ROC eğrisi $x=y$ fonksiyonuna yaklaştıkça testin başarısı düşer. AUC için 0,5 değeri, ROC eğrisinin diyagonal (yani 45 derecelik çizgi) üzerine düşeceğini gösterir ve bu nedenle tanı testinin ayırt etme yeteneğinin olmadığını ve elde edilen sonuçların rastlantısallıkla da açıklanabileceğini gösterir [59].

Genel olarak, daha yüksek AUC'ye sahip test daha iyi kabul edilebilir. Bununla birlikte, belirli duyarlılık ve özgüllük değerlerinin yalnızca klinik olarak ilgili olduğu durumlarda karşılaştırma yapmak için, kısmi AUC'ler karşılaştırılması kullanılır. ROC eğrileri her hastanın iki (veya daha fazla) farklı tanı testine tabi tutulduğu hastalardan elde edilen veriler kullanılarak oluşturulan, ilişkili ROC eğrileri olarak kabul edilir. Her gruptaki hastaların iki farklı tanı testine tabi tutulduğu farklı hasta gruplarından alınan veriler kullanılarak oluşturulan ROC eğrileri, ilişkisiz ROC eğrileri olarak adlandırılır. İlişkisiz iki ROC eğrisinin karşılaştırılması nispeten basittir, iki eğrinin altındaki alandaki farkı ve her AUC'nin SD'sini kullanır [60].

AUC eğri kuralı kullanılarak hesaplanabilir. Genel olarak, 0,5'lik bir AUC, herhangi bir ayırım olmadığını gösterir (yani, testi temel olarak hastalığı veya durumu olan veya olmayan hastaları teşhis etme yeteneği), 0,7 ile 0,8 aralığı kabul edilebilir, 0,8 ile 0,9 aralığı mükemmel olarak kabul edilir ve 0,9'dan fazlası olağanüstü olarak kabul edilir. Bu diyagonal çizginin üzerindeki ROC eğrilerinin, hastalığı/durumu olan ve olmayan hastaları teşhis etmek için makul bir ayırt etme yeteneğine sahip olduğu kabul edilir [60].

2.4.2 Doğrulama Önyargısı

Tıbbi test doğruluğu şimdiye kadar altın standart çalışmalarıyla sınırlıydı, ancak doğruluğu ölçmek için özel yöntemlere odaklanılmaya da başlandı. Standart çalışmalarda her bir denek, hastalık durumunun bilinmesi için altın standart teste tabi tutulmuş olacaktır, ancak bunun mümkün olmadığı birçok çalışma bulunmaktadır. Negatif olanlar, hastalığa işaret eden başka göstergeler olmadıkça, negatif kabul edilecektir. 1976–1980 döneminde gerçekleştirilen 145 araştırma incelendiğinde, %26'sının yazarlar tarafından tanınmayan doğrulama yanlılığına sahip olduğunu gösterildi. Farklı alanlarda yapılan benzer araştırmaların en az 1/3'ünde tanımlanamayan doğrulama yanlılığı olduğu bildirilmiştir [61].

Kistik fibroz hastalığında da tarama testlerinin ve altın standart testi olan ter testinin yanlış negatif sonuç verdiği bilgisi literatürde bulunmaktadır. Bunlar literatürde KF tarama pozitif, teşhis konamayan vakalar olarak isimlendirilir [15]. Bu sebeple, tanısal spesifiteyi belirlemek için Bayes yönteminin kullanılması da faydalı olacaktır.

2.4.3 Bayes Yöntemi

Test doğruluğunu tahmin etmek için bir altın standardın bulunmadığı birçok durum vardır. Örneğin, bir yeni test ve aynı bakteriyel bir enfeksiyonu teşhis etmek için kullanılan kusurlu referans test olmak üzere iki test olabilir, ancak altın standart mevcut değildir. Kusurlu referans standardına göre, yeni testin doğruluğu tahmin edilebilir, ancak bu tür tahminler yanıltıcı olabilir. Benzer şekilde,

genellikle bir tarama testinde negatif olanlara altın standart test uygulanmadığı için elde edilen karşılaştırma objektif olmayacaktır [61].

Bu durumda, pozitif tanı testi sonucunun hasta olma olasılığı (veya negatif tanı testi sonucunun negatif olma olasılığı) bayes kuramı ile çözümlenir.

KF hastalığının 3000’de 1 gözlendiği ve yenidoğan tarama programının popülasyonun %98’lik kısmını ayıracak şekilde cut-off kullanıldığı popülasyon için Bayes olasılık hesabı yapılarak oranlar Tablo 2. 3’deki gibi özetlendi.

Tablo 2. 3 Bayes Olasılık tablosu (%)

GP: 0,03	YN: 0,0017 [62]	0,0317	KF Pozitif
YP: 1,97	GN: 97,9983	99,9683	KF Negatif
2	98	100	Toplam
IRT Tarama Testi Pozitif	IRT Tarama Testi Negatif	Toplam	

DP: Gerçek pozitif, YP: Yanlış pozitif, YN: Yanlış negatif DN: Gerçek negatif

Pozitif sonucun kestirim değeri (PKD), tarama pozitif sonucun KF pozitif olma olasılığıdır ve formül 2.1 ile hesaplanır.

$$PKD = \frac{GP}{(GP+YP)} \quad (2.1)$$

Negatif sonucun kestirim değeri (NKD) ise, tarama negatif sonucun gerçek negatif olma olasılığıdır ve formül 2.2 ile hesaplanır.

$$NKD = \frac{GN}{(GN+YN)} \quad (2.2)$$

Tanı testlerinin performans analizinde önemli başka bir oran ise test sonucu olasılık oranı (Likelihood ratio)’dır. Pozitif likelihood ratio (LR+); pozitif test sonucunun, gerçek pozitif olma ihtimalinin yanlış olma olasılığına oranıdır (Formül

2.3). Negatif likelihood ratio (LR-) ise, negatif sonucun doğruluk oranıdır (Formül 2.4) [63].

$$\text{Likelihood ratio (LR+)} = \frac{\text{duyarlılık}}{(1-\text{hassasiyet})} \quad (2.3)$$

$$\text{Likelihood ratio (LR-)} = \frac{(1-\text{duyarlılık})}{\text{hassasiyet}} \quad (2.4)$$

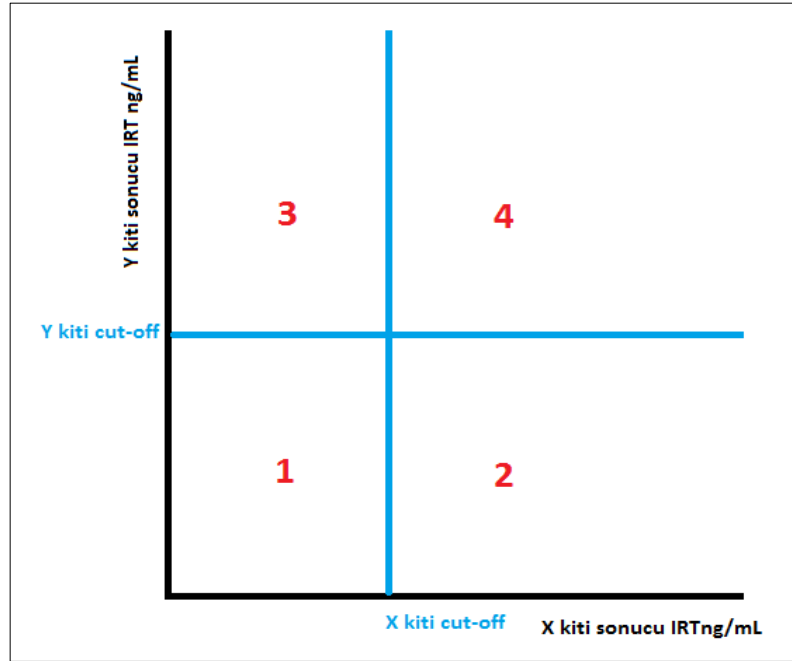
2.4.4 Gri Bölge ve Teşhis (Tarama) Ayrımcılığı

Klinisyenlerin, tanı sürecini mümkün olduğunca çabuk ve güvenilir bir şekilde sonlandırabilmesine olanak sağlayan kesin testlere ihtiyacı vardır. Kantitatif testlerde bunun mümkün olması için, cut-off değeri çok yüksek pozitif LR+ ve çok düşük LR- değerlerini sağlamalıdır ve bu şekilde bir tanı hipotezi tanımlanması gerekmektedir. Tarama testlerinde olabildiğince az sayıda yanlış negatif sonuç olmalıdır. Yanlış pozitifler de genellikle daha zor ve maliyetli yöntemlerle daha fazla araştırma gerektirdiği için hoş karşılanmaz. Gri bölge yaklaşımı sonuçlara karşı farklı bir bakış açısını mümkün kılar. Bu yaklaşımda sonuçlar; kesinlikle olumsuz (başka bir işleme gerek yok), kesinlikle olumlu (altın standart test ile doğrulama gerektirir) ve "gri" (başka bir test veya takip gerektirir) şeklinde sınıflandırılır. Bu üç bölgede elde edilen sonuçlara göre yöntemlerin performansları karşılaştırılabilir [64].

2.4.5 Korelasyon Çalışması

Korelasyon çalışması, farklı alanlarda ve amaçlarda iki değişken arasındaki ilişkinin tanımlamasıdır ve bunun için en sık kullanılan yöntemlerden biri Pearson yöntemi. Tanı teknolojilerinde gerçek veriyi elde etmek her zaman mümkün olmaz bu sebeple yeni yöntem ile elde edilen sonuçlar eski yöntemle karşılaştırılarak yani korelasyonu incelenerek yeni yöntemin performansı incelenebilir. Çok fazla ölçüm sonucunu birbiriyle karşılaştırmak ve değerlendirmek için; İki yöntem ile elde edilen sonuçlar (x kiti sonucu, y kiti sonucu) şeklinde x,y dağılım grafiği çizilir . Dağılım grafiği üzerinde r değeri

hesaplanarak sonucun 1,0-0,90 aralığı iki yöntemin çok ilişkili olduğunu; 0,90-0,70 aralığı ilişkili olduğunu; 0,70-0,30 aralığı zayıf ilişkili olduğunu; 0,30'dan küçük olması ise iki yöntemin arasında ilişki olmadığını gösterir [65]. Ayrıca x,y dağılım grafiği üzerinde kitlerin tanı için kullanılan cut-off değerleri veya gri bölgeleri belirtilerek, her iki yöntemle pozitif (4. bölge), negatif (1. bölge) veya kitlerin birbirinden uyumsuz olarak tespit ettiği sonuçların (2. ve 3. bölge) incelenmesi sağlanır.



Şekil 2. 8 Dağılım grafikleri üzerinde belirtilen bölgelerin şematik gösterimi. 1: iki kit sonucunda da negatif çıkan bebekler; 2:X kitine göre pozitif, Y kitine göre negatif çıkan bebekler; 3:Y kitine göre pozitif, X kitine göre negatif çıkan bebekler; 4:iki kit sonucunda da pozitif çıkan bebekler

Sonuç olarak, tüm bu değerlendirmeler ışığında bir tanı kitinin teşhis ve tanı için kullanılıp kullanılamayacağına ilişkin değerlendirmeler yapılır. Buna göre kullanım kriterlerine göre uygun özelliklere sahip kitler başarılı, diğerleri başarısız olarak değerlendirilir.

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan laboratuvar cihazları, ekipmanları, sarf malzemeleri, hazırlanan tamponlar, hücre hatlarının bilgileri, kullanılan deney hayvanlarının bilgileri bu bölümde detaylı açıklandı.

3.1.1 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri

Tez çalışmasında kullanılan genel laboratuvar ekipmanları ve sarf malzemelerinin detayları Tablo 3. 1’de gösterilmektedir.

Tablo 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
10, 50, 100, 1000 µl’lik mikropipetler	Thermo
300 µl’lik çok kanallı pipetler	Thermo
50, 100, 500, 1000 cc şişe	Schott
1000-5000 µl, 50-1000 µl, 10-200 µl ve 0.1-10 µl pipet ucu	Eppendorf
Blotlama cihazı	BioRad
Çalkalayıcı	BioSan
ELISA 96 kuyulu plakları	Nunc
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	BioTek Instruments
ELISA çoklu plak yıkama cihazı	BioTek Instruments
Fraksiyon ayırma makinesi	BioRad
Hassas terazi	Precisa Gravimetrics AG
Hava akımlı kabinler	Heraus
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica
İzotip belirleme kiti	Roche
Jel Elektrophoretik Sistemi	BioRad
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf
Orbital Karıştırıcı	Edmund Bühler
Otoklav	Sistek
pH metre	Mettler Toledo
Protein A kolonu	GE

Tablo 3. 2 Genel Laboratuvar Ekipmanları ve Sarf Malzemeleri (Devamı)

PVDF membran	Thermo
Santrifüj tüpü (0,2 mL-1,5 mL-2 mL)	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Nüve
Sıvı azot tankı ve azot taşıma tankları	Union Carbide Nitrojen
Spektrofotometre	Biochrom Libra
Ultra Santrifüj	Hitachi
Ultrasonik banyo	Bandelin
Vorteks	Scientific Industries
Kromatografi sistemi	NGC BioRad

3.1.2 Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerinin hazırlanması bu başlık altında anlatıldı.

3.1.2.1 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS PAGE) İçeriğinin Hazırlanması

SDS PAGE Jel içeriğinin Hazırlanması:

- %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi: 10 gram SDS, 100 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.
- %30 Akrilamid/ Bisakrilamid karışımı: 29,1 gram akrilamid ile 0,9 gram Bisakrilamid 100 ml dH₂O içerisinde karanlıkta çözdürülerek hazırlandı.
- %10 APS (Amonyum Per Sülfat), 1 ml dH₂O içerisine 0,1 gram APS eklenerek jel dökmeden önce taze hazırlandı.
- 1,5 M Tris pH:8.8 çözeltisi: 18,15 Trizma Base dH₂O içerisine eklendikten sonra pH'ı HCl ile ayarlanıp hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 1 M Tris pH:çözeltisi 6,05 gram Trizma Base dH₂O içerisine eklendikten sonra pH'ı HCl ile ayarlanıp hacmi 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 10 X Yürütme Tamponu: 72,1 gram Glisin, 15,15 gram Trisma- Base, 5 gram SDS karıştırıldıktan sonra pH:8,3'e ayarlandı. Ardından hacim 500 ml'ye dH₂O

ile tamamlandı. Jeller yürütülmeden önce dH₂O ile 10 kat seyreltilerek (1X) kullanıldı.

- Tablo 3. 3’de gösterilen miktarlarda ilgili tamponlar karıştırılarak, BioRad SDS-PAGE sisteminde üreticinin yönlendirmelerine uygun olarak camlar arasına dökülerek ayırma jelinin donması beklenir. Ardından Tablo 3. 4’de miktarları belirtilen çözeltiler karıştırılarak, donmuş ayırma jelinin üzerine yükleme jeli dökülerek jel formunun oluşması beklenir.

Tablo 3. 3 Ayırma Jel İçeriği (%15’ lik)

dH ₂ O	2,3 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	5 ml
1,5 M Tris HCl pH: 8.8	2,5 ml
%10 SDS	0,1 ml
%10 Amonyum Persülfat	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
Toplam Hacim	10 ml

Tablo 3. 4 Yükleme Jel İçeriği (%5’ lik)

dH ₂ O	3,4 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	0,83 ml
1 M Tris HCl pH: 6.8	0,63 ml
%10 SDS	0,05 ml
%10 Amonyum Persülfat	0,05 ml
TEMED	0,005 ml
Toplam Hacim	5 ml

3.1.2.2 SDS PAGE Gümüş Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması

- Fiksasyon Tamponu: %50 MetOH, %12 Asetik Asit, 0,5 ml %37 Formaldehit ile (1 litre için) çeker ocak altında hazırlandı.
- Yıkama tamponu (1): 500 ml etanol ve 500 ml dH₂O karıştırılarak hazırlandı.

- Ön muamele tamponun: 2 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 mL dH_2O içerisinde çözülerek hazırlandı.
- Bant fiksleme solüsyonu: 2 g AgNO_3 ve 0.75 ml %37 formaldehit son hacim 1 L olacak şekilde dH_2O içerisinde çözülerek çeker ocak altında hazırlandı.
- Bant geliştirme tamponu: 60 g Na_2CO_3 , 4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ve 0,5 ml %37 Formaldehit ile son hacim 1 L olacak şekilde dH_2O içerisinde çözülerek çeker ocak altında hazırlandı.
- Yıkama tamponu (2): 500 ml MetOH ve 500 ml dH_2O karıştırılarak hazırlandı.

3.1.2.3 İmmunblotlama Yönteminde Kullanılan Çözeltilerinin Hazırlanması

- TBS için 9.68 g Tris-Base ve 32 g NaCl tartılıp dH_2O içerisine eklendi ve ardından pH: 7. 6'ya ayarlandı.
- TBS T çözeltisi için 1 litre TBS çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween-20 eklendi.
- Transfer tamponu için 0.592 g Trisma-Base ve 0.293 g Glisin tartıldı. Ardından hazırlanan %10'luk SDS'ten 337 μl eklendikten sonra pH: 9.2'ye ayarlanıp ardından 20 ml Metanol, 100 ml'lik çözelti içerisine eklendi.
- Bloklama Solüsyonu: %1'lik çözeltinin hazırlanması için 20 ml PBS içerisine 0,2 gram yağsız süt tozu eklenip vorteksenerek hazırlandı.
- Substrat: 10 ml dH_2O içerisine 1 tablet BCIP/NBT Substratı çözdürülerek hazırlandı.

3.1.2.4 İmmünizasyon Çalışmaları için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

- İmmünizasyonda, belirlenen antijen miktarı için Freund's complete adjuvan ile PBS (fosfat tamponu) içerisindeki antijenin karışımı 1:1 olacak şekilde hazırlandı. İlk immünizasyon complete adjuvant ile sonraki immünizasyonlarda ise Freund's incomplete adjuvanı kullanıldı. Füzyona

alınacak fareye yapılan rapel işleminde ise yalnız PBS ve belirlenen miktarda antijen karışımı kullanıldı.

- Fare ve tavşanlardan kan alımında kullanılan Sodyum Sitrat tamponu: 100 ml dH₂O içerisinde 2.3 gram sodyum sitrat, 0.8 gram sitrik asit ve 2.2 gram glikozun çözülerek hazırlandı, küçük hacimlere ayrılarak -20oC’de saklandı.

3.1.2.5 Enzime Bağlı İmmünolojik Deneyler (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

- Fosfat (PBS) Tamponu; 10mM KH₂PO₄ ve 10mM K₂HPO₄ solüsyonları kullanılarak pH=7.2 olacak şekilde hazırlandı ve 0.15 M NaCl ilave edildi.
- Yıkama çözeltisi: PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenerek hazırlandı.
- Dolaylı ELISA Bloklama tamponu: %1 yağı alınmış süt tozu içerecek şekilde PBS ile hazırlandı.
- Sandviç ELISA Bloklama tamponu: %0,5 kazein ve %2 BSA PBS tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı
- Alkaline Fosfataz (AP) Substrat tamponu: 0, 027 gram ZnCl₂, 0,04 gram MgCl₂ ve 1,5 gram glisin 200 ml dH₂O içerisinde çözülüp KOH eklenerek pH: 10, 4’e ayarlandı.
- AP substrat çözeltisi: ELISA aşamasında AP substrat tamponuna 1 mg/ml para-nitrofenil fosfat eklenerek hazırlandı. Çözelti kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı ve karanlıkta muhafaza edildi.
- TMB substrat tamponu: Tablo 3. 5’te içeriği gösterilen A-tamponu (1 mL), B-tamponu (50 µL) ve 0.3 µL H₂O₂ kullanımdan hemen karıştırılarak önce hazırlandı.

Tablo 3. 5 TMB Substrat hazırlanışı

A-Tamponu (1 mL)	B-Tamponu (50 µL)
0,1 M Na-asetat çözeltisi 0,1 M sitrik asit ile pH 5'e ayarlanır	4 mg TMB/mL DMSO

- TMB durdurma tamponu: 2 M H₂SO₄
- HPPA substrat tamponu: Tablo 3. 6'de içeriği gösterilen A-tamponu (9 birim) ve B-tamponu (1 birim) kullanımdan hemen önce karıştırılarak hazırlandı.

Tablo 3. 6 HPPA Substrat Tampon hazırlanışı

A-Tamponu 9 birim	B-Tamponu 1 birim
Tris HCl tamponu 0.1 M pH 8.0 12.1 gr/L EDTA 2 mM HPPA 22 mM (3.65 gr/L)	NaCH ₃ COO 0.1 M pH 5.0 EDTA 2 mM H ₂ O ₂ 0.025 mM (2.55ml/L)
Son konsantrasyon: 20 mM HPPA, 2.5 mM H ₂ O ₂ , 2 mM EDTA	

- HPPA durdurma tamponu: 1.5 M Glisin, pH 10.3 NaOH ile ayarlanır.

3.1.2.6 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Hazırlanması: 13,36 gram DMEM, 2 gram Sodyum Bikarbonat ve 5,96 gram HEPES, 1 litre otoklavlanmış dH₂O içerisinde çözülüp, pH'ı NaOH ile 7,2'ye ayarlandıktan sonra vakum filtrasyon sistemi 0,22 µm filtre kullanılarak süzüldü.
- Hücre Kültür medyum Hazırlanması: Farklı hücrelerin büyüme medyumlarının hazırlanması amacıyla %80 DMEM, %20 FBS, 50 µg/ml Gentamicin; %10 FBS, %90 DMEM, 50 µg/ml Gentamicin veya %5 FBS, %95 DMEM, 50 µg/ml Gentamicin olacak şekilde kullanım öncesi hazırlandı.
- PEG Hazırlanması: Füzyon işleminden bir gün önce, 2 gram PEG, 1 ml PBS, 1ml dH₂O içerisine hazırlanıp otoklavlandı ve füzyon çalışmasına kadar 37oC'de muhafaza edildi.

- HAT medyumunu için, hücre kültür medyumunu içerisine %2'' lik (40ml/L) HAT (50x) solüsyonu ilave edildi.
- HT medyumunu için, hücre kültür medyumunu içerisine %2 HT (50x) (20ml/L) solüsyonu eklendi.

Dondurma Medyumunu: %10 FCS, %80 DMEM ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlandı.

İmmünizasyon Antijenleri:

- IRT 2 antijeni (İmmün Reaktif Tripsin 2) ticari olarak Prospec (Pro-770-b) ve RayBiotech (228-13214-3) firmasından temin edildi,
- IRT1 antijeni (İmmün Reaktif Tripsin 1/HTR1-200, Dogal (native) ticari olarak MCLAB firmasından temin edildi.

Hücre Hatları ve Hayvan Materyalleri;

Bu tez çalışmasında in vitro çalışmalar için F0 isimli myeloma hücre hattı (ATCC CRL-1646 (www.atcc.org)) kullanıldı. In vivo çalışmalarda ise Balb/C fareleri ve bu farelerden elde edilen makrofaj ve dalak hücreleri kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları TÜBİTAK deney hayvanları ünitesinden temin edilmiştir (TÜBİTAK HADYEK Etik Kurul No 16563500-111-187, EK C).

3.1.2.7 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması için Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

- **Amonyum Sülfat Çöktürme İşlemi**

Doymuş Amonyum Sülfat çözeltisi: 1 litre dH₂O içerisine çökme gözlenene kadar amonyum sülfat eklendi.

- **Immun Afinite Kolon Kromatografi (Protein-A) Çalışmasında Kullanılan tamponlar** Bağlama reaksiyonu için 20 mM Sodyum Fosfat pH 7 tamponu hazırlandı.

Elüsyon tamponu için 0,1 M Glisin hazırlanıp, HCl ile pH'ı 2,7'ye ayarlandı.

Denge tamponu 1M Trisma Base ile hazırlanıp, HCl ile pH'ı 9'a ayarlandı.

Saflaştırma aşamasında tüp başına 75 μ l olarak kullanıldı.

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce 0,22 μ m fitre ile süzülüp, ultrasonik banyoda degaze edildi ve kullanım öncesi oda ısısında bekletildi.

3.2 Kullanılan Metodlar

Tez çalışmasında kullanılan metodlar ve uygulanan protokoller bu bölümde detaylı anlatıldı.

3.2.1 SDS-PAGE Jel Elektroforezi ve İmmünblotlama

SDS-PAGE Jel elektroforezi immünizasyonlarda kullanılan antijenlerin ve çalışmada geliştirilen antikorların molekül ağırlığının incelenmesi ve içeriğindeki safsızlıkların gözlemlenmesi için kullanıldı. İmmünblotlama tekniği ise tripsin moleküllerinin spesifik görüntülenmesinde kullanıldı.

3.2.1.1 SDS-PAGE Jellerin Yürütülmesi

Örneğimize uygun akrilamit konsantrasyonunda hazırlanan jeller elektroforez sistemine alındı ve uygun miktarda tank tamponu eklendi. Jele yüklenecek proteinler 4X Laemmli Buffer ile uygun seyreltme yapılarak yaklaşık 100ng olacak şekilde hazırlandı ve jele yüklendi. 90V'ta proteinlerin üst jeli geçmesinin ardından güç kaynağı 120 V'a alındı ve proteinlerin yürütülmesi gözlemlendi.

3.2.1.2 Gümüş Boyama

Fiksleme Tamponunun 1 saat ya da gece boyu çalkalayıcıda inkübasyonu gerçekleştirildi. 3 kez herbiri 20'er dakika olacak şekilde yıkama tamponu (1) uygulandı. Ardından jel 1 dakika boyunca ön muamele tamponunda muameleye

bırakıldı. Daha sonra 3 kez 20'şer saniye dH₂O ile jel yıkandı. 20 dakika boyunca bant fiksleme solüsyonunda jel çalkalayıcıya alındı. Ardından jel 2 defa 20 saniye boyunca dH₂O ile çalkalamaya alındı. Geliştirme aşaması protein bantları görünene kadar yapıldı. Geliştirmenin durması için 10 dakika boyunca jel durdurma tamponunda inkübe edildi. Son olarak, jel yıkama tamponu (2)'ye alınarak, görüntülemesi yapıldı.

3.2.1.3 Poliakrilamid Jelden Membrana Proteinlerin Elektroforetik Transferi ve İmmünblotlama

İmmünblotlama uygulaması için yürütülen SDS- PAGE jeller Transblot cihazında transfer tamponu yardımıyla PVDF membrana geçirildi. Ardından bu membran TBS tamponu ile 30 dakika, 37°C de dengelendi ve bir gece +4°C de %1'lik süt çözeltisinde bloklandı. Ertesi gün 3 kez TBS-T ile yıkanan membran TBS içinde 1/1000 oranında sulandırılan uygun ticari monoklonal ve elde ettiğimiz poliklonal antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. 3 kez 15'er dakika TBS- T solüsyonuyla yıkamanın ardından 1/5000 dilüsyonda hazırlanmış alkalin fosfatazla işaretlenmiş anti-fare-polivalent ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar 3 kez 15'er dakika TBS-T ile son olarakta 1 kez 5 dakika TBS ile yıkandı. Yıkamalar sonunda membran, substrat solüsyonu içerisine konarak 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi ve görüntüsü alındı.

3.2.2 İmmünizasyonlar

Tripsin molekülüne spesifik antikorlar elde edilmesi için Balb-C tipi fareler tripsin molekülü ile immünize edildi. İmmünizasyon işleminin aşamaları "Antijenlerin Hazırlanması ve Fare İmmünizasyonları", "İmmün Yanıtlarının Dolaylı ELISA ile Kontrolü" ve "Tripsin İnhibitör-yakalayıcı ELISA sistemi" başlıkları altında açıklandı.

3.2.2.1 Antijenlerin Hazırlanması ve Fare İmmünizasyonları

Toplam olarak 4 grup fareye IRT antijenleri (IRT1 ve IRT2) ile immünizasyon çalışması gerçekleştirildi. Her bir grup için 6-8 haftalık Balb-C tipi 3-4 diş fare

kullanıldı. Oluşturulan grupların immünizasyon bilgileri Tablo 3. 7’da sunulmaktadır.

Tablo 3. 7 IRT antijeni ile bağışıklanan farelerin immünizasyon bilgileri

İmmünizasyon Grupları	Antijen türü (Firması)	Antijen miktarı	Fare Sayısı
1.grup	IRT2 RayBiotech	50 μ g	4
2.grup	IRT2 RayBiotech	50 μ g	4
3.grup	IRT2 RayBiotech IRT1 MCLAB	25 μ g IRT2 75 μ g IRT1	3
4.grup	IRT2 RayBiotech	50 μ g	3

İlk immunizasyonlarda antijen 1:1 oranında Complete Freund’s adjuvanı ile deri altından (intraperitoneal) şekilde yapıldı. Diğer immünizasyonlar, 14 günde bir olacak şekilde, aynı oranda incomplete Freund’s adjuvanı ile karıştırılarak deri altından enjekte edildi.

Fareler füzyona alınmadan önce hatırlatma amaçlı olarak füzyondan 4 gün önce rapel immünizasyonları interavenöz (kuyruktan) olacak şekilde, IRT antijeni adjuvan kullanmaksızın PBS içerisinde çözdürüldü ve 25 μ g/fare olacak şekilde, uygulandı.

3.2.2.2 İmmün Yanıtlarının Dolaylı ELISA ile Kontrolü

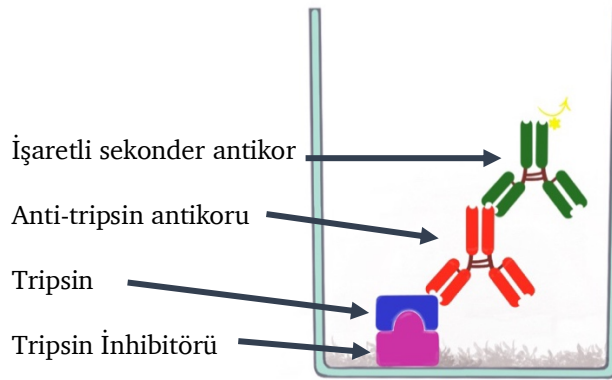
Fare immün yanıtlarının ve hibridoma hücrelerinin antikor aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla dolaylı ELISA yöntemi kullanıldı.

IRT2 proteini için, “115S124” nolu “Yenidoğan Taramalarında Kistik Fibrozisin Erken Tanısı İçin Immunreaktif Tripsinojen (IRT) ve Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) ELISA Kitlerinin Geliştirilmesi” projesi kapsamında gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda optimize edilen dolaylı ELISA protokolü kullandı. Buna göre, IRT2 kaplaması kuyu başına 100 μ L PBS içerisinde 100ng IRT2 olacak şekilde seyreltilerek gece boyu +4°C’de yapıldı. Ertesi gün 3 kez PBS-Tween 20 tamponu ile yıkanan plaklar, %1 oranında yağı alınmış süt tozu çözeltisi ile 1 saat 37°C de

bloklandıktan sonra, antikor olarak poliklonal fare serumu 1: 100, 1: 100, 1: 1000 ve 1: 5000 dilüsyon oranlarında plağa kaplandı. 1 saat, 37 °C’de inkübe edilen örneklere 1: 2000 oranında ikincil antikor olarak, alkaline fosfataz (AP) işaretli Anti-fare-IgG polivalen antikor (IgG, IgA, IgM polivalenti) 100 µl olarak eklendi. 1 saat 37 °C’de inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara 1mg/ ml olacak şekilde 100’er µl substrat tamponu (1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 M Glisin, pH=10.4 (KOH ile)) eklendi. Karanlıkta bir saat bekleme sonrası 30 dakika ve 60 dakikalık süreçlerde 405 nm’de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerde göz önüne alınarak değerlendirildi.

3.2.2.3 Tripsin İnhibitör-Yakalayıcı ELISA Sistemi

Dolaylı ELISA yönteminin IRT1 antijeni ve ticari olarak temin edilen anti-IRT antikorları için efektif çalışmaması sebebiyle alternatif olarak tez çalışmaları dahilinde geliştirilen inhibitör-yakalayıcı ELISA sistemi kullanıldı (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1 İnhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminin şematik gösterimi

Dolaylı ELISA yönteminden farklı olarak, IRT molekülünü bağlama yeteneği olan sıgır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü (T0256, Sigma) ELISA plaklara kaplanarak gece boyu, +4 °C’de bekletildi. Ertesi gün plaklar 3 kez PBS-Tween 20 tamponu ile yıkanıp, %1 kazein ve %1,5 PVP içeren PBS ile blokladı (1 saat, +37 °C’de). ELISA plaklarına kuyucuk başına 100 ng IRT antijeni PBS içerisinde hazırlanarak kuyulara yüklendi ve 1 saat, +37 °C’de bekletildi. 3 kez PBS-

Tween 20 tamponu ile yıkanan plaklar, 400ng/kuyu saflaştırılmış monoklonal antikor veya poliklonal fare serumu 1: 100, 1: 1000 ve 1: 5000 dilüsyon oranlarında plağa kaplandı. 1 saat, 37°C'de inkübe edilen örnekler 1: 2000 oranında ikincil antikor olarak, alkaline fosfataz (AP) işaretli Anti-fare-IgG polivalent antikor (IgG, IgA, IgM polivalenti) 100 µl olarak eklendi. 1 saat 37°C'de inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara 1mg/ml olacak şekilde 100'er µl substrat tamponu ilave edildi. Karanlıkta bir saat bekleme sonrası 30 dakika ve 60 dakikalık süreçlerde 405 nm'de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi.

- **Tripsin İnhibitör-Yakalayıcı ELISA Sisteminin Optimizasyonu**

Tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminin optimum çalışma şartlarının belirlenebilmesi için farklı kaplama konsantrasyonları (200, 400, 600, 800 ve 1000ng/kuyu inhibitör) ve farklı IRT konsantrasyonları (12.5, 25, 50, 75, 100 ng/kuyu) için yukarıda anlatılan protokol uygulandı.

3.2.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hibridoma teknolojisi kullanılarak antikor geliştirme ve büyük ölçek hücre üretme çalışmalarında kullanılan genel hücre kültür metodları bu başlık altında açıklandı.

3.2.3.1 Dondurulmuş Hücrelerin Açılması

-196°C'de sıvı azot tanklarındaki dondurulmuş hücreler; 37°C'deki su banyosunda çözülmesi beklenip, önceden hazırlanmış santrifüj tüp içerisindeki 37°C'ye ısıtılmış steril PBS'e eklendi ve tüpler 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Ardından çöken hücreler %10 FBS içeren hücre besi yeri ile süspanse edilerek, Hücre kültür flaskına alındı. Hücreler CO₂ inkübatörüne koyularak 1-2 günlük periyotlarda takibi yapıldı.

3.2.3.2 Hücrelerin Sayımı

PBS yardımı ile yıkanan ve belli bir hacimde steril santrifüj tüpünde mevcut olan hücrelerden mikro pipet yardımı ile 10-20 µl alındı (Hücre sayısı 1-2 x 10⁵

hücre/mL'den fazla olmamak şartıyla). 1:1 oranında tripan blue ile seyreltilip, hemositometreye dikkatlice konuldu. 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı. $10^4 \times$ hücre hacmi (ml) $\times$ seyreltme katsayısı $\times$ sayılan hücre miktarı formülü kullanılarak hücre sayısı hesaplandı.

3.2.3.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler belli bir çoğalma evresinden sonra hücre kültür flaskından kaldırılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, sararan hücre kültür üst sıvısı steril bir kaba alındı. Kültür şişesine, yüzeyini kaplayacak oranda PBS tamponu ilave edildi. Scraper yardımı ile hücreler nazikçe kazınarak PBS tamponu birlikte santrifüj tüpüne alındı. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Hücre sayımı yapıp, %10 FBS içeren besiyerinin içerisinde süspanse edilerek uygun ölçelerde flasklara dağıtıldı.

3.2.3.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin uzun süre muhafaza edilmesi amacıyla dondurma işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler yıkama işlemine alındıktan sonra, hücre pelleti dondurma medyumuna alındı. Her bir dondurma tüpünde 1×10^6 - 5×10^6 hücre/1,5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Dondurma tüpleri önce 1 saat -20°C 'de bekletildi. $1^\circ\text{C}/\text{dakika}$ hızla soğumasını sağlayan, içerisinde izopropil alkol olan özel kap içerisinde, -80°C 'lik dolaba koyuldu. En az bir gece en fazla altı ay -80°C 'de bekletildikten sonra, hücreler daha uzun süre saklanabilmeleri için -196°C sıcaklığındaki sıvı azot tanklarına kaldırıldı.

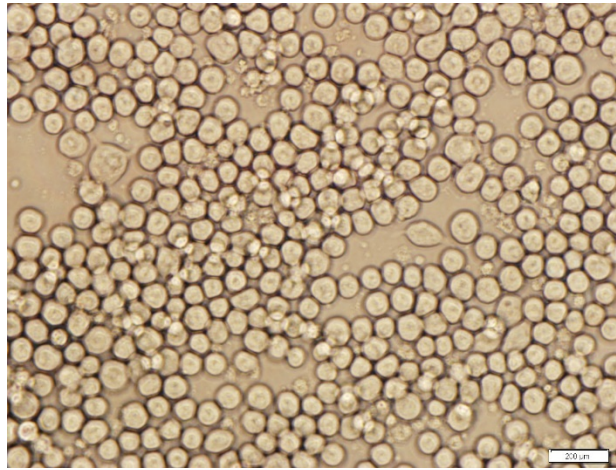
3.2.4 Hibridoma Teknolojisi ile IRT Spesifik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

Füzyon işlemi iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması yani hedef antijenik yapıya (IRT) karşı antikor üreten B hücreleri ile ölümsüzlük özelliği olan myeloma hücrelerinin kimyasal bir ajan olan PEG 4000 yardımı ile birleştirilmesi esasına dayanmaktadır [50]. Füzyonda

kullanılacak IRT'ye karşı antikor üreten hücreler elde edilebilmesi amacıyla, IRT immunize edilen fareler bu çalışmalarda kullanıldı.

3.2.4.1 Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 2 hafta öncesinde dondurulmuş myeloma hücreleri hücre kültüründe üretime alındı ve yeterli sayıda hücre çoğaltılarak ($100-500 \times 10^6$ hücre) ve yıkama işlemi yapılarak füzyona hazır hale getirildi ve hemositometre de hücre sayımı yapıldı (Şekil 3. 2).



Şekil 3. 2 Füzyondan önce açılan F0 hücreleri (20X)

3.2.4.2 Besleyici Hücrelerin (Feeder Cell) Hazırlanması

Her bir füzyon çalışması için besleyici hücre alım çalışması gerçekleştirildi. Füzyondan bir gün önce hibrit hücrelerin yaşayabileceği ortam koşullarını sağlamak üzere immunize edilmemiş normal farelerin periton içi yüzeyindeki besleyici hücreler (makrofajlar) kullanıldı.

Bunun için, füzyondan bir gün önce immünize edilmemiş sağlıklı bir fare servikal dislokasyon ile öldürülüp, içinde %70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde strafor üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi. Tam karnının üzerinden pens ile tutarak yukarı ve yanlara doğru kesiler yapılarak, bacaklarından ve kuyruğundan tutarak farenin derisi yukarı doğru yüzüldü ve peritonu zarar görmeden açığa çıkarıldı. 5 mL'lik enjektör ile 5 ml sadece DMEM besiyeri peritondan içeriye dikkatlice enjekte edildi. 30-40 sn bekleyip, organlara

zarar vermeden çekebildiğimiz kadar DMEM besiyeri geri çekildi (yaklaşık 3 mL). %80 DMEM, %20 FBS ve 50 µg/ml gentamisin içeren besiyerine, peritondan geri çekilen DMEM ilave edilerek her bir kuyuda 100 µl olacak şekilde, hücreler çoklu pipet yardımı ile 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı (her füzyon için yaklaşık 15 plak).

3.2.4.3 Bağışıklanmış B Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması

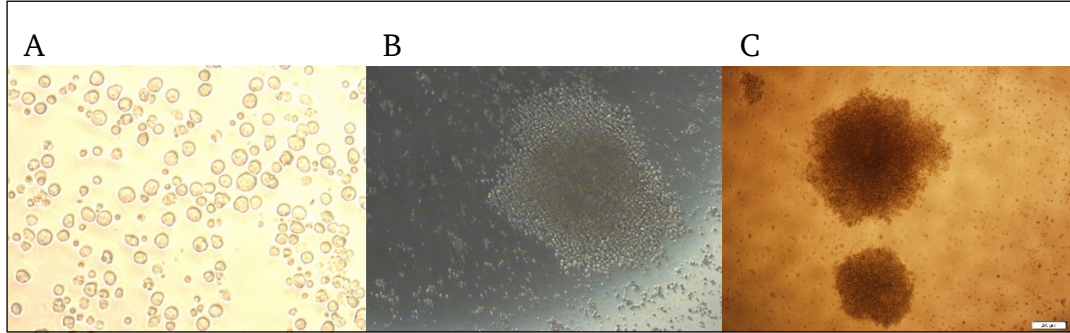
İmmünizasyonlar sonucunda dolaylı ELISA veya tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA yöntemiyle füzyona işlemine alınması uygun görülen fare servikal dislokasyon ile öldürülüp, içinde %70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde strafor üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi. Farenin karnında yukarı ve yanlara doğru kesiler yapıp, peritonu da keserek sol tarafından dalağı açığa çıkarılarak alındı.

Dalak, içerisinde PBS tamponu bulunan steril petride, steril süzgeç ve baget yardımı ile ezildi. Elde edilen hücreler pipetaj yardımıyla süspanse edilip, santrifüj tüpüne alındı. Hücreler 2 kez yıkandı ve hemasitometrede sayıldı. Aynı fareden ELISA'larda pozitif kontrol amaçlı kullanılmak üzere kalbinden kan alınıp 1:1 sodyum sitrat tamponu ile karıştırılarak, serumu santrifüjle ayrıldı. Küçük hacimlere ayrılan serum, -20°C'de saklandı.

3.2.4.4 Füzyon Çalışması

Hücre sayımları yapılan myeloma hücreleri ve lenfositler, istenilen oranda (1/2'den 1/10 arasındaki oranlarda) biraraya getirilerek PEG (Polietilen Glikol) varlığında füzyona alındı. Füzyon aşamasında 37°C'de ısıtılmış 1 ml Polietilen Glikol (PEG) 4000 1 dakika içerisinde çöken hücre karışımına oldukça yavaş eklendi. 1 dakika süresince hücre karışımı 37°C bekledi. 4 ml sadece DMEM, 4 dakika içerisinde yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra tekrar 10 ml DMEM yavaşça karıştırarak ilave edildi ve karışım 5 dakika 37°C ısıdaki CO₂ hücre inkübatöründe bekletildikten sonra, santrifüj edildi. Çöken hücrelere HAT medyumunu ilave edilerek bir önceki gün makrofaj ekilmiş hücre kültür plaklarına 150 µl/kuyu

olacak şekilde dağıtıldı. Füzyondan 10 gün sonra hücrelerin üst sıvılarından 100 μ l çekilerek üzerlerine 100 μ l seçici HAT medyum ilave edildi. 12. gün aynı şekilde seçici HT medyumunu eklenerek hibridomaların gelişime göre normal besi yerine geçildi. Şekil 3. 3'de füzyondan 10 gün sonra değişik büyüklüklerde gözlenen hibrit klonları yer almaktadır.



Şekil 3. 3 Füzyon sonrası hücre görüntüleri; A: Füzyon sonrası 1. gün; B ve C: 10. Gün gözlenen farklı büyüklüklerde hibridoma hücreleri

Füzyondan 10 gün sonra hücrelerin mikroskop altında takibi ve hibrit klonlarının belirlenmesi, klonların beslenmesi ve oluşan klon üst sıvılarından ELISA yöntemi ile IRT antijenine karşı antikor üretimlerini belirleme çalışmaları yapıldı. Bu amaçla test edilecek kuyulardaki hücre üstsıvısından 100 μ l çekilip, üzerine 100 μ l seçici HAT medyum ilave edildi. 12-14. günlerde aynı şekilde seçici HT ortamı eklendi. Hücrelerin gelişme periyoduna bağlı olarak normal besi yerine geçildi.

3.2.5 Hibridoma Kültürlerinin Takibi ve IRT Spesifik Antikor Üreten Hücre Hatlarının Seçimi

Füzyon sonrasında hibrit hücre gelişimine bağlı olarak, dolaylı veya tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA yöntemi kullanılarak hedef antijenlere (IRT1/IRT2/PAP) karşı antikor tarama testlerine devam edildi. Sonuçlar, negatif (besiyeri) ve pozitif (fareden alınan kalp kanı serumu, 1:2000 seyretilmiş) örneklerin sonuçlarıyla kıyaslanarak, antikor yanıtı olan kuyular belirlendi. Hedef antijenlere (IRT1/IRT2) karşı spesifik antikor ürettiği tespit edilen hibrit hücrelerden tek klondan oluşan hücreler elde etmek amacıyla sınırlı seyreltme (limited dilüsyon) yapıldı. Bu hücreler daha sonra her bir kuyuya bir hücre

düŖecek Ŗekilde 100'er μL 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı. Dolaylı ve/veya İnhibitör-yakalayıcı ELISA yöntemi ile 10 gün sonra hibrit çıkan kuyuların üst sıvıları tekrar test edildi ve uygun cevabı veren monoklon hücreler ikinci ve üçüncü kez tek düşürme işlemine tabi tutuldu. Tek klon olduğu tespit edilen hibridoma hücreleri farklı boyutlarda hücre kültür plaklarına aktararak çapraz reaksiyon kontrolü ve büyük ölçek üretim çalışmaları yapıldı.

3.2.5.1 Dolaylı ELISA Testi ile Çapraz Reaksiyon Kontrolü

Antikor yanıtı görülen hücre hatlarının, IRT antijenlerine karşı spesifitesini belirlemek amacıyla çapraz reaksiyon testi yapıldı. Çapraz reaksiyon testleri için ELISA plakları IRT1 (100ng/kuyu), IRT2 (100ng/kuyu), alfa1-anti tripsin (100ng/kuyu), chemotrypsin (100ng/kuyu), alfa-2-makro globülin (100ng/kuyu), hemoglobin (100 ng/ kuyu) ve insan serumu (1:100) ile kaplandı. Gece boyu bekletilen plaklar plak yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı ve ardından 2 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonuyla inkübe edildi. İnkübasyonun ardından PBS-T ile 3 kez yıkanan plaklara antikor yanıtı görülen hücre üst sıvıları eklendi. 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilen örneklere 1: 2000 oranında polyvalent eklendi. 1 saat 37 °C'de inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara, AP substrat çözeltisinden kuyu başına 100 μL karanlıkta eklenerek inkübe edildi. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 405 nm'de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi. Sonuçlar pozitif (IRT kaplı kuyu) ve negatif (PBS kaplama) kontrollerde göz önüne alınarak değerlendirildi.

3.2.5.2 Hibridoma Hücrelerinin Büyük Ölçek Üretimi

Hedef antijenlere (IRT1/IRT2) karşı özel (spesifik) antikor üreten Hibridoma hücrelerinden yüksek miktarda antikor elde etmek ve hücreleri muhafaza etmek üzere saklamak için 96 kuyucuklu plaklardan sırasıyla 24'lü hücre plaklarına, 6'lı plaklara ve 25cm²'lik flasklara pasajlanarak hücreler çoğaltıldı ve donduruldu. Ardından 75 ve 150 cm²'lik hücre kültür kaplarında büyük ölçek üretime geçildi. Antikor üretiminin devamlılığını görebilmek için pasajlar arasında, dolaylı ELISA veya tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA ile antikor yanıtlarına bakıldı. Hücre üst

sıvıları 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek hücrelerden ayrılarak +4 °C'de saflaştırma işlemi için saklandı.

3.2.6 Antikorların Karakterizasyon, Saflaştırma ve İşaretleme Çalışmaları

ELISA temelli tanı kitinde kullanılmak üzere geliştirilen antikorların IRT molekülüne spesifitesinin belirlenmesinin ardından uygun saflaştırma protokolünün belirlenebilmesi için önce antikorların immünoglobulin izotipleri belirlendi.

3.2.6.1 Antikorların İzotipinin Belirlenmesi

İzotip ve alt izotip belirleme, bir monoklonal antikorun sınıfının (IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD) ve alt sınıfının (IgG1, IgG2, IgG3, IgG2a, IgG2b) belirlenmesi çalışmalarını kapsamaktadır. Uygun saflaştırma yönteminin seçilmesi ve antikorun immunoassay analizlerinde kullanım şekli izotip ve alt izotipin belirlenmesi ile elde edilecek veriler doğrultusunda tasarlanır. Tez kapsamında geliştirilen antikorların immünoglobulin tipleri Roche IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping antikor alt tipi belirleme kiti ile belirlendi. Bu amaçla, antikor üreten hücre hatlarının üst sıvıları 1:100 oranında PBS ile seyreltilerek kit içerisindeki tüplere (her hücre hattı için bir tüp) 100 μ L eklendi ve tüpün içindeki kimyasalın çözünmesi sağlandı. Kitin içerisinde bulunan stripler tüplerin içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Bantlar görünür olduğunda stripler çıkarılarak sonuçlar kaydedildi.

3.2.6.2 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

- **Amonyum sülfat ile çöktürme:** Hibrit üst sıvıları üzerine, hücre üst sıvısı hacminin 1,1 katı kadar doyurulmuş amonyum sülfat çözeltisi +4oC'de manyetik karıştırıcıda karıştırılırken ile 60 dakika içerisinde yavaş yavaş eklendi. Sonrasında 2 saat daha +4oC'de manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmaya devam edildi. Çözeltinin santrifüje uygun şişelere alınmasının ardından ultrasantrifüjde 10.000 rpm'de, +4 oC'de, 30 dakika boyunca

santrifüj edildi. Pellet PBS içerisinde çözüldükten sonra yine PBS tamponu ile +40C'de diyaliz edilerek amonyum sülfat tuzunun uzaklaştırılması sağlandı.

- **İmmünoaffinite Kromatografisi ile Saflaştırılması:** Monoklonal antikorların, kültür medyumundaki diğer proteinlerden ayrılabilmesi için Protein A immünoaffinite kolon kromatografisi uygulandı. Her monoklonal antikor için ayrı ayrı amonyum sülfat ile çöktürülmüş protein fraksiyonu 10 dakika boyunca 13200 rpm' de santrifüj edildi. Ardından protein A kolonuna daha iyi bağlanabilmesi için 1:1 oranında bağlama tamponu (13C9 için 3M NaCl, 1,5 M Glisin pH 8; diğerleri için 20mM Sodyum fosfat tamponu pH 7) ile karıştırılarak antikor karışım solüsyonu kolona yüklendi. Kolon materyaline bağlı olan monoklonal antikorları ayırmak için 0.1 M Glisin-HCl pH 2.7 (7G2 için 0.075 M Glisin-HCl pH 2.5) tamponu kolona uygulandı ve 1 mL'lik fraksiyonlar halinde toplandı. 1 mL'lik eluatlar üstüne 75 µl denge tamponu (1 M Tris-HCl pH 9) ilave edildi. Örneklerdeki protein miktarı 280nm dalga boyunda spektrofotometrik sistemde belirlendi. Ardından protein içeren fraksiyonlar önceki basamaklardaki gibi dolaylı-ELISA tekniği (veya inhibitör yakalıyıcı ELISA) ile test edilerek IRT antijenlerine karşı yanıt veren kesimler toplandı.

3.2.6.3 IRT Spesifik Monoklonal Antikorların Lineer Epitop Analizi

Lineer epitop analizi, çalışmada geliştirilen IRT spesifik antikorların bağlandığı epitopların belirlenmesi için, dolaylı ELISA yöntemi kullanıldı. Lineer epitop analizinde kullanılmak için, IRT2'nin amino asit (a.a.) dizisinin tamamını kapsayacak şekilde her biri 13 a.a.'lık olmak üzere (7 a.a. sabit kalmak şartıyla kaydırılarak) peptit dizileri tasarlandı ve Eurogentec firmasına sentezlettiler. IRT1'in IRT2'den farklılık gösterdiği kısımlar için farklı peptitler tasarlanarak, benzer peptitlerin 2'şer kez sentezlenmemesi sağlandı (Tablo 3. 8).

Tablo 3. 8 Epitop analizi için sentezlettirilen peptit dizileri (sarı işaretli peptidler IRT1 ve IRT2 için ortak bölgelerdir)

IRT2		IRT1	
Peptit no	Peptit dizisi	Peptit no	Peptit dizisi-
1	NH ₂ -MNLLLLILTFVAAA-φ	41	NH ₂ -MNPLLLILTFVAAA-φ
2	*-LTFVAAAVAAPFD-φ	42	*-LTFVAAALAAPFD-φ
3	*-AVAAPFDDDDKIV-φ	43	*-ALAAPFDDDDKIV-φ
4	*-DDDDKIVGGYICE-φ	44	*-DDDDKIVGGYNCE-φ
5	*-VGGYICEENSVPY-φ	45	*-VGGYNCEENSVPY-φ
6	*-EENSVPYQVSLNS-φ	6	*-EENSVPYQVSLNS-φ
7	*-QVSLNSGYHFCG-φ	7	*-QVSLNSGYHFCG-φ
8	*-SGYHFCGGSLISE-φ	46	*-SGYHFCGGSLINE-φ
9	*-GGSLISEQWVWSA-φ	47	*-GGSLINEQWVVS-φ
10	*-EQWVVSAGHCYKS-φ	10	*-EQWVVSAGHCYKS-φ
11	*-AGHCYKSRIQVRL-φ	11	*-AGHCYKSRIQVRL-φ
12	*-SRIQVRLGEHNIE-φ	12	*-SRIQVRLGEHNIE-φ
13	*-LGEHNIEVLEGNE-φ	13	*-LGEHNIEVLEGNE-φ
14	*-EVLEGNEQFINAA-φ	14	*-EVLEGNEQFINAA-φ
15	*-EQFINAAKIIRHP-φ	15	*-EQFINAAKIIRHP-φ
16	*-AKIIRHPKYNSRT-φ	48	*-AKIIRHPQYDRKT-φ
17	*-PKYNSRTLNDNDIL-φ	49	*-PQYDRKTLNNDIM-φ
18	*-TLNDNDILLIKLSS-φ	50	*-TLNNDIMILLIKLSS-φ
19	*-LLIKLSSPAVINS-φ	51	*-MLIKLSSRAVINA-φ
20	*-SPAVINSRVSAIS-φ	52	*-SRAVINARVSTIS-φ
21	*-SRVSAISLPTAPP-φ	53	*-ARVSTISLPTAPP-φ
22	*-SLPTAPPAAGTES-φ	54	*-SLPTAPPATGTKC-φ
23	*-PAAGTESLISGWG-φ	55	*-PATGTKCLISGWG-φ
24	*-SLISGWGNTLSSG-φ	56	*-CLISGWGNTASSG-φ
25	*-GNTLSSGADYPDE-φ	57	*-GNTASSGADYPDE-φ
26	*-GADYPDELQCLDA-φ	26	*-GADYPDELQCLDA-φ
27	*-ELQCLDAPVLSQA-φ	27	*-ELQCLDAPVLSQA-φ
28	*-APVLSQAECEASY-φ	58	*-APVLSQAKCEASY-φ
29	*-AECEASYPGKITN-φ	59	*-AKCEASYPGKITS-φ
30	*-YPGKITNNMFCVG-φ	60	*-YPGKITSNMFCVG-φ
31	*-NNMFCVGFLEGGK-φ	61	*-SNMFCVGFLEGGK-φ
32	*-GFLEGGKDSCQGD-φ	32	*-GFLEGGKDSCQGD-φ
33	*-KDSCQGDGGPVV-φ	33	*-KDSCQGDGGPVV-φ
34	*-DSGGPVVSNQELQ-φ	62	*-DSGGPVVCNGQLQ-φ
35	*-VSNQELQGIVSWG-φ	63	*-VCNGQLQGVVSWG-φ
36	*-QGIVSWGYGCAQK-φ	64	*-QGVVSWGDCGCAQK-φ
37	*-GYGCAQKNRPGVY-φ	65	*-GDGCAQKNKPGVY-φ
38	*-KNRPGVYTKVYNY-φ	66	*-KNKPGVYTKVYNY-φ
39	*-YTKVYNYVDWIK-φ	39	*-YTKVYNYVDWIK-φ
40	*-YVDWIKDTIAANS-COOH	67	*-YVKWIKNTIAANS-COOH

*Asetil- φ-CONH₂

Sentezlenen peptitler ELISA plağına 15 µg peptit/kuyu olacak şekilde gece boyu, +4°C'de kaplandı. Pozitif kontrol olarak 100 ng/kuyu IRT1 ve IRT2 antijeni PBS içerisinde hazırlanarak ELISA plate kuyularına yüklendi. Ertesi gün 3 kez PBS-Tween 20 tamponu ile yıkandı. Ardından, PBS içerisinde 1mg/mL BSA çözeltisiyle blokladı (2 saat, oda sıcaklığında). 3 kez PBS-Tween 20 tamponu ile yıkanan plaklara, 400ng/kuyu saflaştırılmış monoklonal antikorlar eklenip 1 saat, 37°C'de inkübe edildi ve ardından 3 kez PBS-Tween 20 tamponu ile plaklar yıkandı. Örnekler 1: 5000 oranında ikincil antikor yani alkaline fosfataz (AP) işaretli Anti-fare-IgG antikor 100 µl olarak eklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara mg/ml PNPP olacak şekilde 100'er µl substrat tamponu (1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 M Glisin, pH=10.4 (KOH ile) eklendi. Karanlıkta ve oda sıcaklığında bir saat bekleme sonrası 405 nm'de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi.

3.2.6.4 IRT Monoklonal Antikorlarının Enzim ve Kimyasal Yapılarla Konjugasyonu

ELISA temelli tanı kitinde sinyal oluşturmak için, geliştirilen IRT spesifik antikorlar enzim ve kimyasal yapılarla konjuge edildi. Bu çalışmada Horseradish peroksidaz (HRP) enzimi ve biyotin molekülü işaretleyici ajan olarak kullanıldı.

- **Biyotin ile İşaretleme**

Konsantrasyonu 1-4 mg/ml aralığındaki antikor çözeltileri karbonat tamponu (0,1 M pH 9) ile gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz edilmiş antikor çözeltisi, 125 µg biotin /1mg antikor olacak şekilde, biotin çözeltisi (10 mg/ml DMSO içerisinde) ile karıştırıldı. Karışım, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında yavaşça 4 saat boyunca karıştırıldı. Ardından gece boyu PBS tamponu içinde diyaliz edildi. Ertesi gün 2 saatte bir 3-4 defa daha PBS tamponu değiştirilerek diyalize devam edildi.

Diyaliz işleminden sonra biotin-antikor konjugatı 20 µl'lik hacimlere ayrılarak -20°C'de muhafaza edildi.

- **Horseradish Peroksidaz (HRP) Enzimi ile İşaretleme**

0,5 mg HRP, 125 μ L dH₂O içinde hazırlandı. Üzerine taze hazırlanmış 0,2M NaIO₄'dan 25 μ L eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında karıştırarak inkübe edildi. Böylelikle HRP molekülünün karbonil uçlarının aktif hale gelmesi sağlandı. Daha sonra; hazırlanan HRP karışımı üzerine 1mM'lık pH:4,5 Na-asetat 300 μ L kadar eklenip, Vivaspin 500 kolon ile NaIO₄'ın ortamdan uzaklaşması sağlandı. pH aralığı 4-5 olan HRP'li mix'e pH'sı 9,5 olan 200 mM'lık karbonat tamponundan yaklaşık 40-50 μ L eklendi ve karışımın pH'sı 9-9,5 aralığına çekildi. 1mg antikor 200 mL 10 mM pH:9,5 karbonat tamponunda çözüldü. Antikor üzerine aktive edilmiş HRP eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırılarak inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 4mg/ml NaBH₄'den (taze hazırlanmış) 12,5 μ L kadar karışıma eklendi ve ardından +4 °C'de 2 saat inkübe edildi, NaBH₄ reaksiyonu durdurmak için kullanılır. Reaksiyon karışımı gece boyu +4 °C'de PBS tamponuna karşı diyaliz edildi (2litre). Ertesi gün 4 saatte bir 2 defa daha PBS tamponu değiştirilerek diyalize devam edildi. Diyaliz işleminden sonra HRP-antikor konjugatı 20 μ L'lik hacimlere ayrılıp -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.7 Sandviç ELISA Temelli Kit Geliştirme Çalışmaları

ELISA kit tasarımlarının oluşturulması aşamasında ise iki farklı antikorun kullanımı ile hem spesifiteyi artırmak hem de arka plan ışımlarını azaltarak düşük deteksiyon limitlerine ulaşmak için IRT1 ve IRT2 ELISA kit modellerinde iki adımlı sandviç ELISA (enzyme-linked immunosorbent-assay) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, ELISA kit yüzeyine immobilize halde bulunan ilk antikor, kan ortamında bulunan IRT1 ve IRT2 moleküllerini spesifik olarak bağlayarak test yüzeyinde tutulmalarını sağlamaktadır. Bu aşama test edilebilecek nitelikteki moleküllerin bir çeşit ön konsantrasyon işlemi olarak da algılanabilir. Test yüzeyinde tutunmuş IRT1 ve IRT2 benzeri moleküller arasından ilgili antijenin görüntülenmesini sağlamak adına IRT1 ve IRT2 'a karşı geliştirilmiş ikinci bir antikor kullanılır. Kullanılan ikinci antikorun amacı hem spesifiteyi artırmak hem de görüntülemeyi sağlamaktır.

Bu tez çalışmasında IRT molekülüne karşı geliştirilip saflaştırılan 7G2, 13C9, 6D1, 7A11, 1E4, 11F9, 4B2, 10B10 ve 7E10 antikorları ve proje süresince (TÜBİTAK 115S124) geliştirilmiş olan 6G7 ve 2C1 antikorları Sandviç ELISA temelli IRT1, IRT2 ve IRTmix kitlerinin geliştirmesi çalışmalarında kullanıldı.

IRT tanısı için ELISA Kit sistemi temel olarak aşağıdaki şekilde tasarlandı.

- Anti-IRT monoklonal antikorlarla mikro plakların kaplanması,
- 3 kez yıkama
- Plakların uygun bloklama tamponu ile bloklanması
- 3 kez yıkama
- Test edilecek örneğin (kan diski) plağa ilave edilip üstüne elüsyon tamponunun eklenmesi
- 3 kez yıkama
- Biotin/ Horseradish peroksidaz (HRP) işaretli Anti-IRT monoklonal antikor eklenmesi
- 5 kez yıkama
- Biotin işaretli antikor kullanılması durumunda, streptavidin HRP eklenmesi
- 5 kez yıkama
- Substrat tamponu eklendi ve reaksiyon sonucu oluşan absorbans okunması.

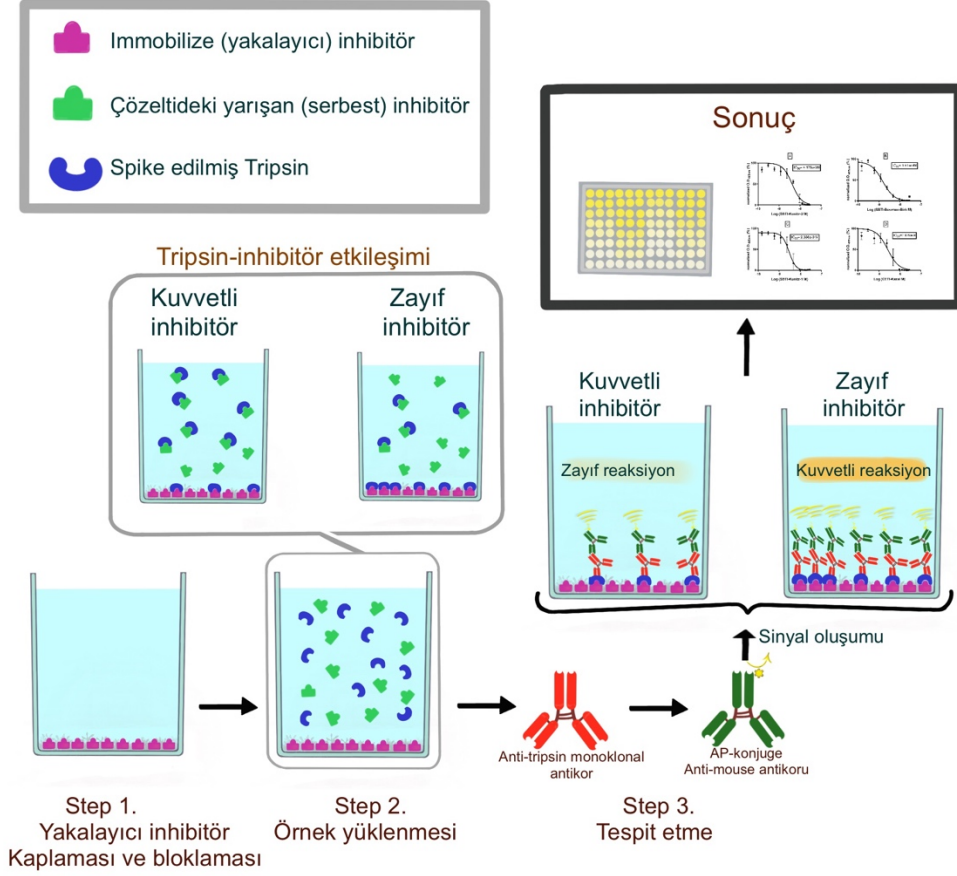
Geliştirilen ELISA kitine ait diğer reaktifler; ekstraksiyon tamponu, substrat tamponu, yıkama solüsyonu, stop solüsyonu, kalibratör amaçlı spot kanlar hazırlandı ve İmmun reaktif Tripsinojen (IRT) ELISA kiti modellemeleri yapıldı. Bu model kitlerin performansı, proje süresince ticari antikorlarla geliştirilen kitlerle ve yenidoğan taramalarında kullanılan ticari olarak satın aldığımız MP IRT ELISA kiti ve ZenTech IRT kiti ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Aşağıda kit geliştirme çalışmalarının aşamaları anlatılmıştır.

3.2.7.1 Sandviç ELISA Kitinde Kullanılacak İnhibitör Seçimi

Bebek kanlarında test edilecek IRT biyomarkırının proteaz olması, ELISA gibi protein esaslı sistemlerde sorun olmaktadır. Gerek analitin içerisindeki tripsin molekülünün aktive olup kit bileşenlerini sindirmesini, gerekse tripsin ile hazırlanan kalibratörlerin kit bileşenlerini sindirmesini engellemek için, inhibitör kullanılması zorunludur. Ticari biyolojik ve kimyasal birçok inhibitör bulunmaktadır. İnhibitör seçiminde ve inhibitörün etkin çalıştığını rutin olarak kontrol edebilmek için, tez çalışmaları dahilinde ELISA temelli yarışmalı inhibitör etkinliği ölçüm metodu (E-CTIA) geliştirildi [66].

E-CTIA, yarışmalı ELISA yönteminde [67] immobilize antikor yerine immobilize tripsin inhibitörü kullanılacak şekilde modifiye edilerek geliştirildi. Biri çözeltide serbest (yarışan inhibitör) diğeri ELISA plağında immobilize tripsin inhibitörünün (yakalayıcı inhibitör), çözeltide serbest olan tripsine bağlanmak için yarışması metodun temelini oluşturur. Yarışan inhibitör, kuvvetli olması durumunda daha zayıf olan inhibitöre kıyasla daha çok serbest tripsine bağlanacak ve yıkama aşamasında ELISA plağından atılacaktır. ELISA plak yüzeyindeki yakalayıcı inhibitör tarafından bağlanan tripsin molekülleri işaretli anti tripsin antikorları ile tespit edilerek sinyal oluşturarak ölçülür (Şekil 3. 4). Yöntemin çalışabilirliğini göstermek için öncelikle farklı inhibitörler kullanılarak alınan sonuçlar kıyaslandı. Sonrasında ise en düşük konsantrasyonlarda en yüksek verimi elde etmek amacıyla yöntem parametreleri optimize edildi.



Şekil 3. 4 E-CTIA yönteminin akış şeması

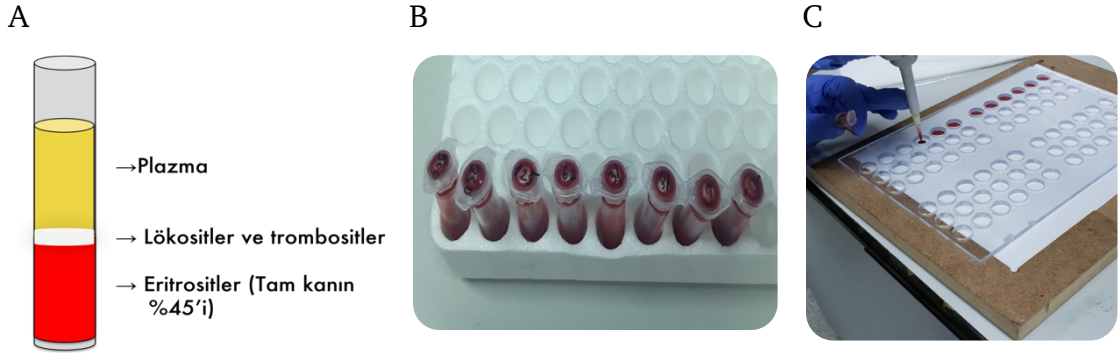
Farklı yakalayıcı inhibitör etkisinin belirlenmesi için Tripsin inhibitörleri (Tavuk yumurtası akından elde edilmiş, Sigma, T9253; Soya fasülyesi tripsin inhibitörleri, Sigma T9003; Sigma T9128, Sigma T9777), ELISA plakları PBS içerisinde 2 $\mu\text{g/mL}$ tripsin inhibitörü (100 μL /kuyu) ile gece boyu (+4°C) inkübasyon yapılarak kaplandı ve ardından plak yıkanıp, PBS içerisinde %1 Casein, %1,5 PVP ile bloklandı (37°C, 1 saat). Tekrar yıkama yapıldıktan sonra, inhibitör çözeltileri, 1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki tripsin çözeltisiyle toplam reaksiyon hacmi 100 μL olacak şekilde titre edilerek plak kuyularına yüklenip 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Yıkamanın ardından, ELISA plağındaki yakalayıcı inhibitöre bağlanan tripsin molekülleri, MAM-6G7 anti-trypsin antikoru ile tespit edilip, alkalın fosfataz işaretli goat anti-mouse IgG ile p-nitrophenyl phosphate (PNPP, Sigma A4744) substratı kullanılarak sinyal oluşumu sağlandı. Oluşan sinyal 405 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

Farklı yakalayıcı inhibitörlerle alınan sonuçlar değerlendirildikten sonra, uygun yakalayıcı inhibitörün belirlenmesi ve uygun tripsin konsantrasyonunun belirlenmesi için tripsin optimizasyon çalışması yapıldı. Bu optimizasyon çalışmasında, inhibitör yarıştırması yapılmadan yakalayıcı inhibitöre bağlanan tripsine karşı oluşan sinyalin yoğunluğu, doğrusallığı ve tekrar edilebilirliği test edildi.

Optimum şartlarda testin tekrarlanması ardından inhibisyon kapasitesi en yüksek olan belirlenerek ELISA kit içerisinde kullanılmasına karar verildi. Geliştirilen bu yöntemin kit üretimi sürecinde farklı zamanlarda veya firmalardan alınan inhibitörlerin karşılaştırılmasında kullanılabileceği planlandı.

3.2.7.2 Sandviç ELISA Kitinde Kullanılacak Spot Kalibratörlerin Hazırlanması

Geliştirilen sandviç ELISA kitinde test edilecek örneklerin içindeki IRT miktarının belirlenebilmesi için bilinen miktarlarda IRT içeren kalibratörler ELISA kitinde test edilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmalıdır. Kit yenidoğan bebeklerde kistik fibroz taramasına yönelik olması ve bebeklerden alınacak kan örneklerinin membrana emdirilmiş olması sebebiyle ELISA kitinde kullanılacak kalibratörler de örneğe benzer koşullar içerisinde bulunmalıdır. Çalışmada bebek kanı kullanılamayacağı için yetişkin gönüllü vericiden alınan tam kan kullanıldı. Sağlıklı yetişkin insan kanında IRT seviyesi 115-350 ng/ml olarak literatürde bulunmaktadır [68], [69]. IRT gibi diğer serum bileşenleri de bebek kanında yetişkin kanına nispeten çok daha az miktarlarda bulunmaktadır. IRT proteini ve diğer serum bileşenlerini uzaklaştırmak için santrifüj işlemi uygulanarak tam kandan eritrositler ayrılıp kalibratör hazırlanması için kullanıldı (Şekil 3. 5A). Uygulanan protokol aşağıda detaylandırıldığı gibi uygulandı.



Şekil 3. 5 Sandviç ELISA kitinde kullanılacak spot standartların hazırlanması

Gönüllü vericiden alınan 10 ml kan santrifüj edildi, serum kısmı uzaklaştırıldı ve konsantre eritrosit süspansiyonu elde edildi. %5 BSA içeren PBS içinde Recombinant Trypsin-2 Human antijeni 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 250 ng/mL, 125 ng/mL, 52 ng/mL, 26 ng/ml ve 0 ng/ml olacak şekilde farklı tüplere 0,5 ml dağıtıldı. Antijen içeren karışım üzerine eritrosit süspansiyonundan 0,5 ml ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışım sonunda %50 hematokrit elde edildi. Elde edilen farklı antijen konsantrasyonuna sahip kanlar S&S #903 filtre kağıdına emdirilerek kurumaya bırakıldı (Şekil 3.5.B ve Şekil 3.5.C). Gece boyu kuruduktan sonra nem çekici silika boncuklarla birlikte kilitli poşetler içinde -20°C'ye kaldırıldı [69].

3.2.7.3 Sandviç ELISA Sisteminde Kullanılacak Antikorların Seçimi

Sandviç ELISA sistemi geliştirme çalışmalarında bu tez çalışmasında geliştirilen 7G2, 13C9, 6D1, 7A11, 1E4, 11F9, 4B2, 10B10 ve 7E10 antikorlarının yanı sıra, proje süresince geliştirilen 2C1, 3E7 ve 6G7 antikorları da kullanıldı. Uygun antikor çiftinin belirlenmesi için önce PBS içerisinde hazırlanan 4 µg/mL konsantrasyonundaki antikor çözeltileri 100'er µL/kuyu olacak şekilde ELISA plak kuyularına yüklendi (400ng/kuyu) ve +4 °C'de gece boyu inkübe edildi. Üç kez PBS-T tamponu ile yıkanan plaklar bloklama için %2 BSA, %0,5 sodyum kazeinat içeren PBS ile 300 µL/kuyu olacak şekilde 1 saat 37 °C'de inkübe edildi ve inkübasyonun ardından PBS-T tamponuyla 3 kez daha yıkandı.

İmmünizasyon çalışmalarında da kullanılan rekombinant human IRT2 antijeni RayBiotech (228-13214-3) ve insan pankreasından elde edilmiş Tripsin 1

(RayBiotech, 268-10896-1) antijeniyle sıralı seyreltilerek hazırlanan farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Bebeklerden alınıp membrana emdirilen kan örneğinden kesilen spotta yaklaşık 3 μ L kan bulunmaktadır. Bu sebeple hazırlanan antijen çözeltilerinden kuyu başına 3 μ L+97 μ L PBS olacak şekilde ELISA plağının kuyularına eklenip 1 saat 37 °C’de inkübe edildi ve ardından PBS-tween tamponuyla 3 kez yıkandı.

HRP ve Biotin konjugatlar farklı kaplamalar kullanılmış kuyular üzerine 1:1000 seyreltilerek farklı kaplama-konjugat kombinasyonları oluşturuldu. TMB substrat çözeltisi eklenip 15 dk inkübe edildikten sonra 2 M H₂SO₄ çözeltisinden kuyulara 100’er μ L eklenerek reaksiyon durdurulup 450 nm dalga boyunda okumaları alındı. 1000 ng IRT için 0,5 üzerinde absorbans veren çiftler optimizasyon çalışmalarında ve tanı kitinde kullanılmaya uygun çiftler olarak belirlendi.

3.2.8 Sandviç ELISA Sistemi Geliştirilmesi

Geliştirilen IRT antikorlarından sandviç ELISA sistemine uygun olan antikorlar ile optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu kapsamda; geliştirilen sistemlerin ve spot kan kalibratörlerinin verimi ticari kit ve ticari kalibratörler kullanılarak karşılaştırıldı. Optimizasyon çalışmaları kapsamında, geliştirdiğimiz spot kan kalibratörlerinin ticari kitler ile karşılaştırılması, inkübasyon süre ve koşullarının optimize edilmesi, ELISA sisteminde kullanılacak tampon içeriklerinin optimizasyonu yapıldı.

Piyasada bulunan yenidoğan IRT kitleri IRT1 formuna spesifik olduğu ve IRT2 antijeninin tanımadığı için, geliştirilen MAM-IRT2 ELISA sisteminin ticari kitlerle kıyaslaması yapılamadı. Bu sebeple bu bölümde sadece IRT1 ve ticari kitlerin kıyaslama çalışmaları yapıldı.

Çalışmalarda geliştirilen ve kullanılan spot kan kalibratörlerinin içerdiği IRT konsantrasyonu, spot kan kalibratörler hazırlanırken içine eklenen IRT miktarı esas alınarak hesaplanmıştı. Hazırlanma sürecinde oluşan hata payı ve spot-kan ile yapılan testten kaynaklanan hata payı sebebiyle bu değerlerin kullanılmasının güvenilirliği düşüktür. Bu sebeple, MAM-4B2 kaplama ve MAM-2C1-HRP işaretli

antikorlarıyla oluşturulan çiftler öncelikle ticari MP Biomedicals ve Zentech yenidoğan IRT test kitlerinin içerisinde bulunan spot kan kalibratörleriyle test edilip, kitlerin birbiriyle uyumu karşılaştırıldı.

Zentech yenidoğan IRT test kitinin spot kan kalibratör değerleri 0, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng IRT/mL; MP Biomedicals IRT test kitinin ise 0, 15.6, 51.4, 100, 208, 451 ve 1008 ng IRT/mL olarak prospektüslerinde belirtilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen spot kalibratörlerin teorik IRT konsantrasyonları ise 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 ng IRT/mL'dir.

3.2.8.1 Elüsyon Tamponun ve Spot İnkübasyon Koşullarının Optimizasyonu

KF erken tanı tarama programında yeni doğan bebeğin topuğundan membrana damlatılıp kurutulan kan örneği kullanılır. Membranda kurutulmuş kan örneğinden IRT proteinin çözünerek sulu faza geçmesi tanı kitinin en kritik aşamalarındandır. Membrandan geri kazanımı yapılamayan IRT, KF pozitif bebeklerin tespit edilememesine yani “yalancı negatif” sonuçlara sebep olur. Bunun engellenmesi için, spot kan örneklerinin çözüleceği tampon (elüsyon tamponu) IRT'yi çözecek ve moleküler stabilitesini bozmayacak en uygun şartlarda olmalıdır.

Bu kapsamda, elüsyon tamponunun çözücülüğüne etki eden parametreler (tuz, tween20 konsantrasyonu ve inkübasyon koşulları optimize edildi. Çalışmalarda iki farklı deterjan konsantrasyonu (%0,15 ve %0,1), 3 farklı tuz konsantrasyonu (100 mM, 150 mM ve 300 mM NaCl) ve 3 farklı gece boyu inkübasyon koşulu (oda sıcaklığı, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde ve +4°C'de inkübasyon) IRT1 ve IRT2 kitlerine eş zamanlı uygulanarak sonuçları kaydedildi.

3.2.8.2 Geliştirilen ELISA Sistemlerinde Floresans Substrat Kullanılması ve Kimyasal Spesifikasyonlarının Belirlenmesi

Geliştirilen ELISA sistemlerinde, TMB substrat yerine, floresans substrat kullanıldı ve absorbans okumalar floresans yöntemle yapıldı. Bu substrat kullanıldığında

kolorimetrik ölçüm yani oluşan renk ölçümü yapılmaz bu sebeple kirlilikten kaynaklanan hatalar önlenir. Ayrıca, kolorimetrik yönteme kıyasla daha yüksek yanıtlar ölçülebildiği için güvenilir ölçüm aralığı genişler ve ölçüm hassasiyeti 10-1000 kat kadar artabilir [70].

Bu amaçla, optimize edilen koşullarda bütün aşamalar aynen uygulanıp, substrat aşamasında 100'er µL HPPA tamponu ELISA plak kuyulara konarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve ardından florimetrik ölçüm yapıldı (Eksitasyon 325nm, Emisyon 420nm).

3.2.8.3 IRT1 ve IRT2 Antijenlerinin Tek ELISA Sisteminde Tespit Etme Çalışmaları

Tez çalışmasının esas amaçlarından biri IRT formlarının KF erken tanısındaki önemini ortaya koymak olduğu için, her iki formunun da önemli olması ihtimaline karşı, iki formu tek bir testte tespit etmek de önemlidir.

IRT 1 ve IRT 2 miktarını tek bir testte ölçmek avantajlı olabileceği için, IRT1 ve IRT2 kit antikor çiftlerinin birlikte kullanılmasıyla her iki antijeni tanıyan ELISA sisteminin tasarlanması amaçlandı. Bunun için optimize edilen antikor konsantrasyonlarının toplamı tek bir kuyuya kaplama yapılarak (100ng MAM-11F9 + 200ng MAM-4B2/kuyu kaplama) ve konjugatları (MAM2C1-HRP+MAM-6G7-HRP, 1:500 ve 1:4000 optimize edilen seyreltme oranlarıyla) birlikte kullanılarak yapıldı.

3.2.9 Saha Örnekleriyle Çalışmalar, ELISA Kitlerinin Aşamalı Değerlendirilmesi ve Verimliliklerinin İncelenmesi

Tez çalışmaları dahilinde, TÜBİTAK MAM GMBE ve firma proje ortaklığı desteğiyle, ticari olarak temin edilen IRT antijenlerini kullanarak spot kan kalibratörlerinin hazırlanması, IRT için sandviç ELISA temelli kit tasarımı ve kit optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Laboratuvar çalışmalarında seçilmiş olan antikor çiftleri kullanılarak hazırlanan IRT sandviç ELISA modelleri, Ankara Halk Sağlığı

Genel Müdürlüğü (HSGM) Yenidoğan Ünitesinde, numune kağıtları üzerine alınmış yenidoğan kan spotları kullanılarak test edildi. Böylece saha çalışmalarında yerli antikorlarla geliştirilmiş olan IRT sandviç ELISA modelleri, HSGM tarafından kullanılan kitlerle karşılaştırıldı. Geliştirilen ELISA modellerinin yenidoğan KF taramalarında çalışılabilirliği, aşamalı değerlendirilmesi ve verimliliklerinin incelenmesi çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda Türkiye'nin birçok yerinden Kistik Fibrozis tanısı almış bebek spot kan numuneleri ve rutin tarama yapılan kan emdirilmiş Whatman filtre (#903) kağıdında toplanmış kan spotları IRT testi için oluşturduğumuz MAM-IRT1, MAM-IRT2 ve IRT 1- IRT2'yi aynı anda tespit edebilen MAM-IRTmix sandviç ELISA modelleri ile test edildi. Yenidoğan tarama akışı Şekil 3. 6'da özetlenmektedir.



Şekil 3. 6 Yenidoğan kanlarının, HSGM bünyesinde, Kistik Fibrozis hastalığı açısından taranmasının şematik gösterimi

Saha çalışmalarında yerli antikorlarla geliştirilmiş olan prototip IRT kitleri, HSGM tarafından kullanılan kitlerle karşılaştırıldı ve geliştirilen kitlerin yenidoğan kan örneklerinde çalışılabilirliği gösterildi. Tez çalışmaları dâhilinde, TÜBİTAK MAM GMBE ve firma proje ortaklığı ile geliştirilmiş 3 IRT ELISA kiti ile 3 saha çalışması yapıldı. Yapılan 3 saha çalışmasında toplam 15 KF tanısı konan bebek kan spotu ve 831 rutin tarama örneği çalışıldı. 2. ve 3. Saha çalışmalarında ter testi

yapılamadığından 49 adet IRT tarama pozitif kan spotu test edildi. Elde edilen sonuçlar kullanılarak kit performansları değerlendirildi.

4.1 IRT Antijenine Spesifik Antikor Geliştirme Çalışmaları

Bu bölüm; immünizasyon çalışmalarında kullanılan IRT1 ve IRT2 antijenlerinin karakterizasyonu, immünojen hazırlanması, immünizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi, monoklonal antikor geliştirme çalışmaları, elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyonu ve saflaştırılmasına ait deney sonuçlarını kapsamaktadır.

İmmünizasyon çalışmalarında aşağıdaki antijenler kullanıldı;

IRT2 immünizasyonları için; rekombinant İmmün Reaktif Tripsin 2 (IRT2) antijeni RayBiotech (228-13214-3) firmasından satın alındı.

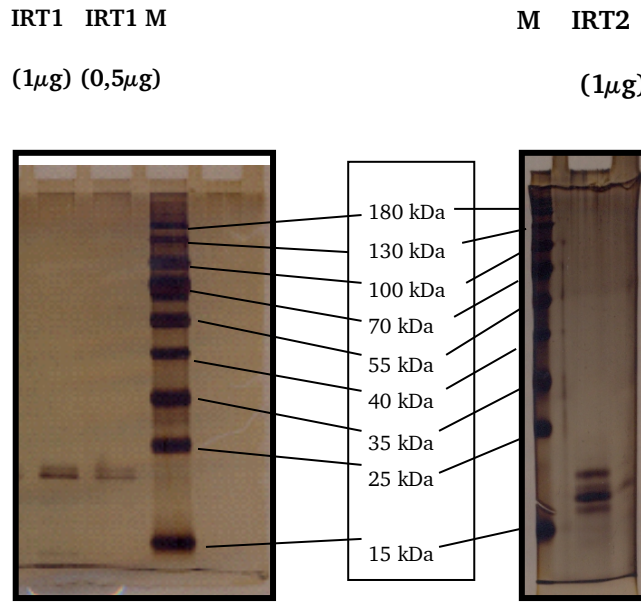
IRT1 immünizasyonları için ise; Human Tripsin 1 Recombinant proteini (MCLAB, HTR1-200) kullanıldı ayrıca insan pankreasından elde edilmiş Tripsin 1 RayBiotech firmasında temin edildi (268-10896-1). Antijen özellikleri ve stabilitesi ticari olarak temin edildikten hemen sonra incelendi.

Antijenin otokatalitik bir proteaz olması ve termal koşullardan etkilenme potansiyeli nedeniyle stabilitesinin korunması amacıyla IRT antijenleri temininden hemen sonra 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olacak şekilde küçük miktarlarda hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

4.1.1 IRT Antijenlerinin Karakterizasyonu

İmmünizasyonlara başlamadan önce, ticari olarak temin edilen antijenlerin literatürde belirtilen mevcut protein yapı ve özelliklerini görebilmek amacı ile %15 lik SDS PAGE analizi yapıldı.

Jel üzerinde yürütülen protein bantları gümüş boyama ile boyandı, IRT antijenine ait protein bantları markır bantları (Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder) ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 4. 1). Şekillerde görüldüğü gibi yaklaşık 24 kDa ağırlığındaki IRT1 antijeni literatüre uygun olarak beklendiği yerde gözlemlendi. IRT2 antijenin ise birkaç bant ve daha küçük kDa ağırlığında gözükmesinin sebebi ise daha kolay kendi kendine aktive olup kendi kendini sindirme yeteneğinden kaynakladığı üretici firma tarafından doğrulandı.



Şekil 4. 1 IRT1 (solda) ve IRT2 (sağda) proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü. (M:Thermo prestained protein marker 26616)

4.1.2 İmmün Yanıtın ELISA ile Ölçülmesi

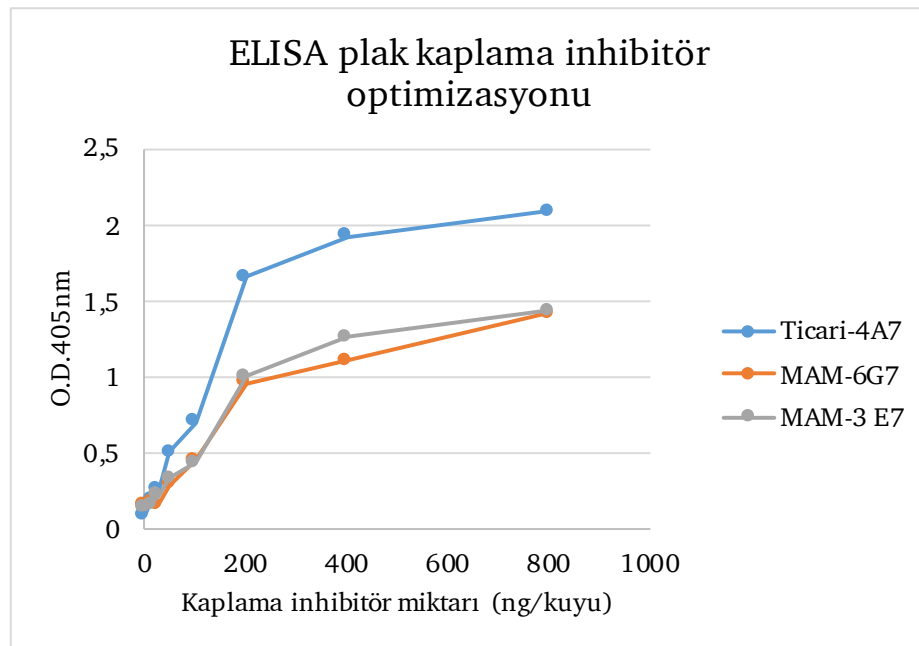
Fare immün yanıtlarının kontrol edilmesi için iki farklı ELISA yöntemi kullanıldı; Dolaylı ELISA testi ve bu tez çalışmaları dahilinde geliştirilen tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA testi.

Tez kapsamında kullanılan bazı antikorların (ticari ve çalışmada geliştirilen antikorlar) dolaylı ELISA'da verimli çalışmasına rağmen, kit çalışmalarında kullanılan sandviç ELISA sistemlerinde aynı verimde çalışmadığı görüldü. Bu kapsamda, proteolitik özelliği olan IRT antijenlerinin konformasyonel değişikliğe

uğradığı düşünülerek farklı bir yaklaşım ile ELISA plaklara IRT bağlama yeteneği olan inhibitörlerin kaplanması ve sonrasında IRT'nin plaklara kaplanması esaslı “inhibitör-yakalayıcı ELISA sistemi” geliştirildi.

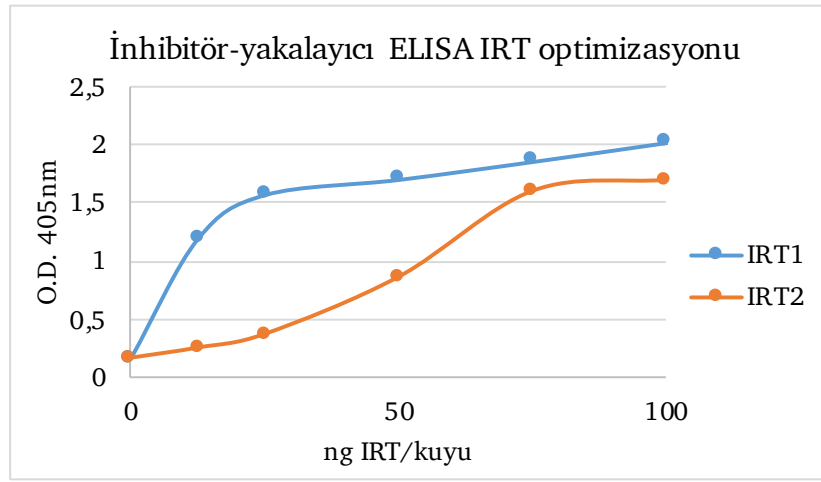
Tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA testinin geliştirilmesinde ilk etapta proje dahilinde önceki çalışmalarda geliştirilmiş antikolar kullanılarak ELISA plak kaplama çalışmalarında inhibitör ve tripsin miktarının kaplama konsantrasyonlarının belirlenmesi çalışmaları yapıldı.

İnhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminde kullanılacak en uygun inhibitör konsantrasyonunun belirlenebilmesi için 100 ng IRT2'nin ticari 4A7 MAb ve proje süresinde geliştirilen anti IRT2 MAM-6G7 ve MAM3E7 MAb kullanılarak farklı inhibitör (sığır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü) konsantrasyonlarında optimizasyon çalışması yapıldı. Şekil 4. 2'deki sonuçlar incelendiğinde, 200 ng/kuyu inhibitör kaplama konsantrasyon yanıtlarının antikoların doygunluğa ulaşması açısından en optimum koşul olduğu gözlemlendi.



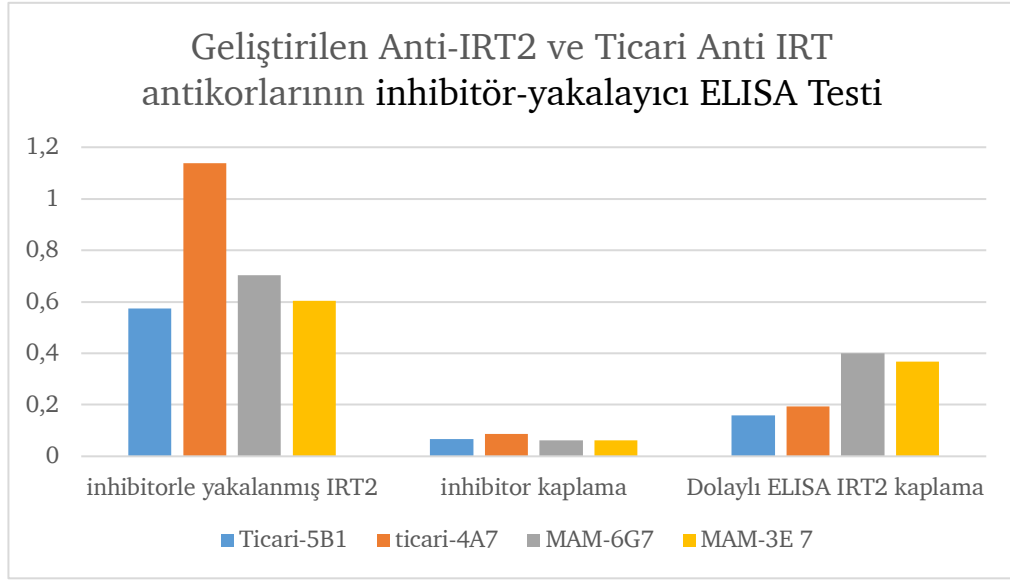
Şekil 4. 2 ELISA plak kaplamada kullanılan inhibitörün (sığır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü) miktar optimizasyon çalışması

Taramalarda kullanılacak inhibitör-yakalayıcı ELISA sisteminde, en uygun IRT1 ve IRT2 konsantrasyonlarının belirlenmesi için farklı miktarlardaki IRT1 ve IRT2 antijenlerinin, inhibitör-yakalayıcı ELISA sisteminde verdikleri yanıtlar incelendi. Bu optimizasyon çalışmasında Anti-IRT antikoru olarak ticari-4A7 MAb kullanıldı. Şekil 4. 3'deki sonuçlara göre, inhibitor-yakalayıcı ELISA sisteminde kullanılacak ELISA plak IRT miktarları; IRT2 formu için 100 ng/kuyu, IRT1 formu için ise 20 ng/kuyu değerlerinin uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 4. 3 İnhibitör-yakalayıcı ELISA yönteminde inhibitör (sığır pankreasından elde edilmiş tripsin inhibitörü) üzerine bağlanacak IRT miktarının optimizasyonu

Ticari ve önceki çalışmalarda geliştirilmiş antikorlar, optimize edilen koşullarda, tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA ile test edilerek sonuçlar dolaylı ELISA ile alınan sonuçlar ile karşılaştırıldı (Şekil 4. 4).



Şekil 4. 4 Geliştirilen Anti-IRT2 ve Ticari Anti IRT antikorlarının İnhibitör-yakalayıcı ELISA test sonuçları

Sonuç olarak, inhibitör varlığındaki IRT molekülü ile daha yüksek yanıtlar elde edildi, sadece inhibitör kaplı plakta ise herhangi bir çapraz yanıt gözlenmedi.

Geliştirilen bu inhibitör-yakalayıcı ELISA test yöntemi gerek füzyon taramalarında alternatif tarama yöntemi olarak kullanılacak gerekse ELISA kit çalışmalarına uygun anti-IRT antikorlarının seçiminde önemli bir rol oynayacaktır. Bu sebeple özellikle IRT1 ile yapılan hibrid tarama ve fare serum antikor titrelerinin ölçülmesi çalışmalarında inhibitör-yakalayıcı ELISA yöntemi kullanıldı.

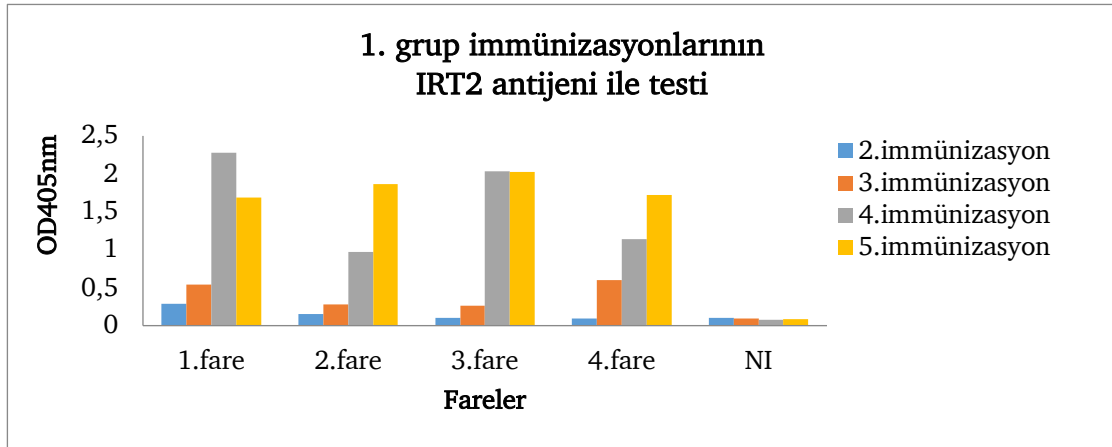
4.1.3 Fare İmmünizasyonları

Farelerde IRT spesifik immün yanıt oluşturmak amacıyla yapılan immünizasyon grupları Tablo 4. 1’de özetlenmiştir. Bu çalışmada IRT1 ve IRT2 molekülünün ortak bölgelerini tanıyan antikor üretmek amacıyla IRT1 ve IRT2 antijenlerinin birlikte kullanıldığı bir immünizasyon grubu oluşturuldu (Grup 4). IRT yanıtların kontrolü için 10 gün aralıklarla her gruptaki hayvanların kanları kuyruklarından alındı. Sodyum sitrat çözeltisi içerisinde alınan kan örnekleri, santrifüj edildikten sonra serumlar antikor aktivitesi yönünden test edildi.

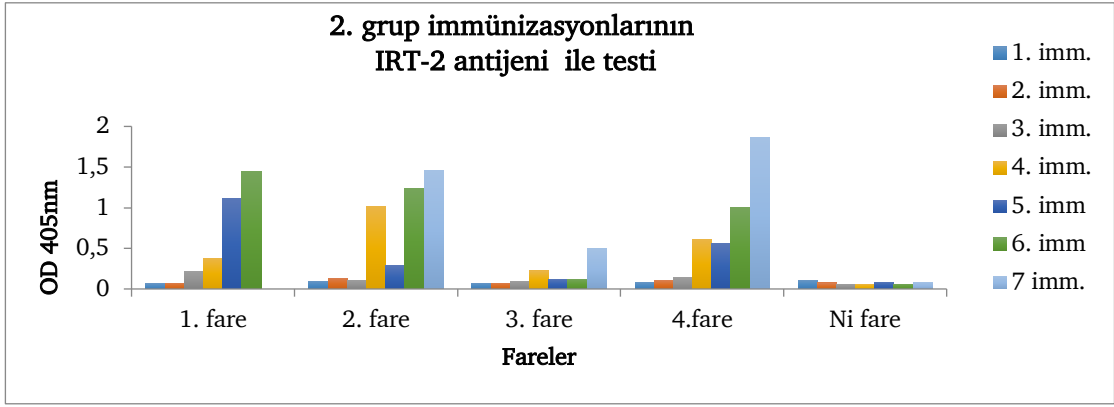
Tablo 4. 1 Fare immünizasyon grupları

İmmünizasyon grupları	Antijen	Antijen Miktarı	Fare Sayısı
1. Grup	IRT2	50 µg	4
2. Grup	IRT2	50 µg	4
3. Grup	IRT2 ve IRT1	25 µg IRT2 ve 75 µg IRT1	3
4. Grup	IRT2	50 µg	3

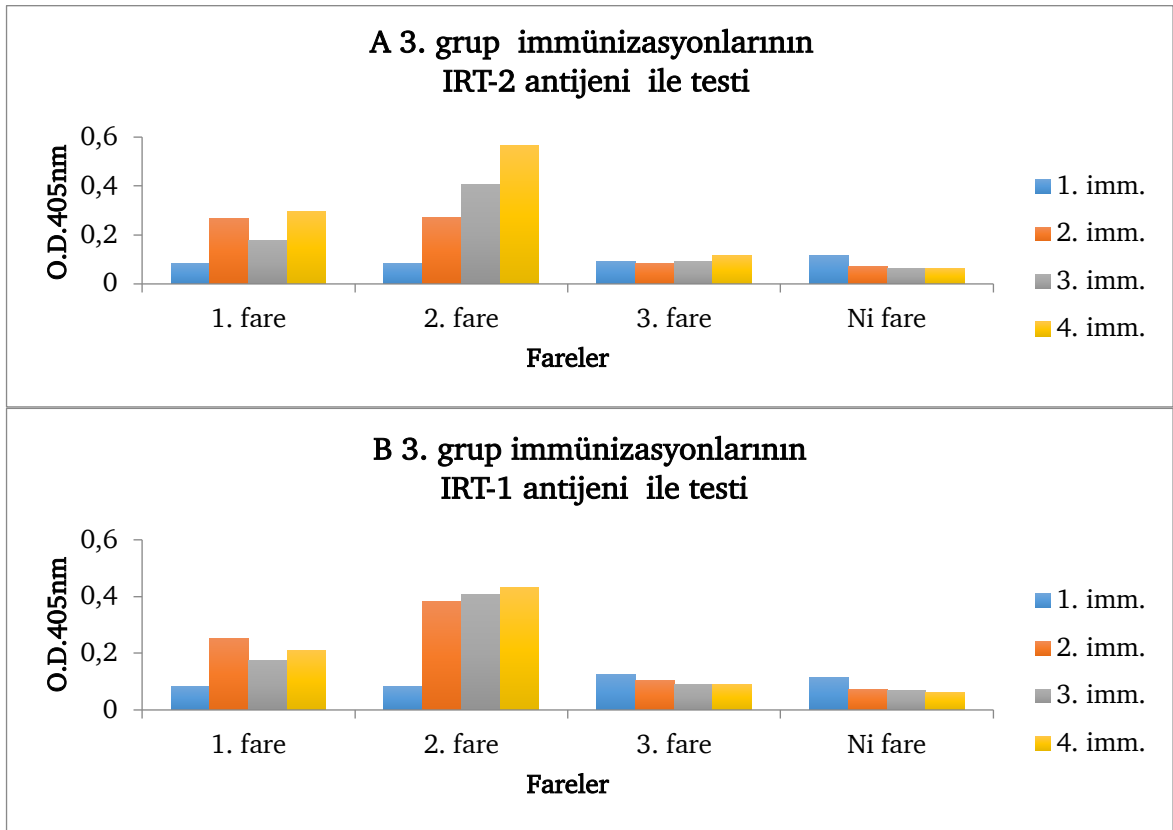
Gerçekleştirilen immünizasyonlar sonrası farklı gruplara ait farelerin, IRT antijenlerine karşı immün yanıtları Şekil 4. 5 (1.grup), Şekil 4. 6 (2. grup), Şekil 4.7 (3. grup), ve Şekil 4.8 (4. grup)'da gösterilmiştir. Her gruptaki farelerin serumlarının 1:1000 dilüsyonu ile gerçekleştirilen dolaylı ELISA sonuçları (3. ve 4. grup tripsin inhibitor-yakalayıcı ELISA ile test edildi) grafiklerde verilmiştir.



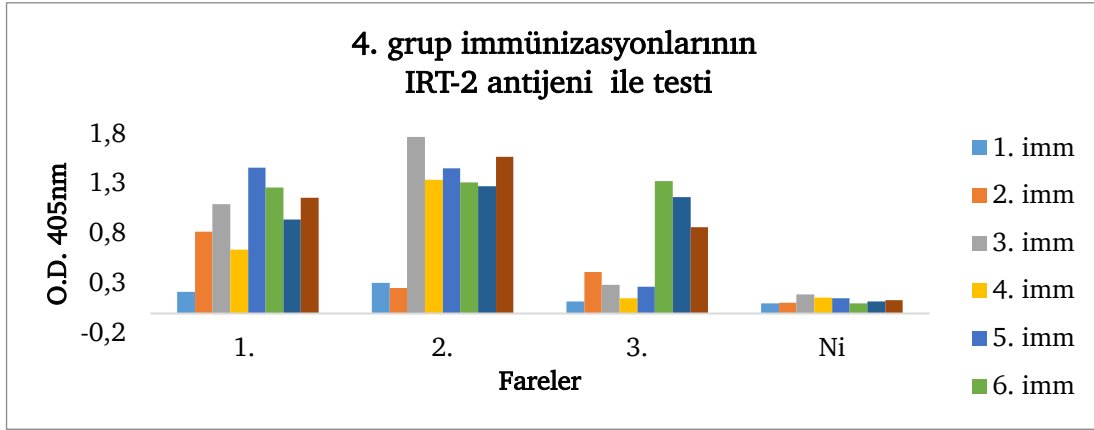
Şekil 4. 5 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin (1. Immünizasyon grubu) ELISA sonuçları. Fare serumları 1:1000 dilüsyonda test edildi (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)



Şekil 4. 6 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin (2. Immünizasyon grubu) ELISA sonuçları. Fare serumları 1:1000 dilüsyonda test edildi (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)



Şekil 4. 7 25 µg IRT2 ve 75 µg MCLAB IRT1antijeni ile immünize edilen farelerin (3. immünizasyon grubu) ELISA sonuçları. Fare serumları 1:1000 dilüsyonda test edildi. (A) 100ng/kuyu IRT2 antijenine karşı test edilen ELISA sonuçları (B) 20ng/kuyu IRT1 antijenine karşı test edilen ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)



Şekil 4. 8 50 μ g IRT2 ile immünize edilen farelerin (4.immünizasyon grubu) tripsin inhibitör-yakalayıcı ELISA sonuçları. Fare serumları 1:1000 dilüsyonda ,100ng/kuyu IRT2 (Raybiotech) antijenine karşı test edildi. (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3. fare: NK, Ni: Hiç immünize edilmemiş fare)

Bu sonuçlara göre, farelerin yaşları da göz önüne alınarak IRT antijenine en yüksek yanıt veren fareler sırasıyla füzyon işlemine alındı.

4.1.4 Füzyon Çalışmaları

IRT2 ve IRT1-IRT2 antijenlerinin ikisiyle birden yani karışık bağışıklanan fareler arasından, bu antijenlere en yüksek immün yanıt veren 10 adet fareyle füzyon çalışması gerçekleştirildi. Füzyon çalışmaları öncesinde, B hücrelerinin antikor üretmelerini harekete geçirmek, özellikle afinitesi ve özgüllüğü daha yüksek monoklonal antikorlar oluşturmak üzere füzyondan 3 gün önce IRT antijenleri adjuvantsız bir şekilde farenin el-ayak avucu içi, periton içine ve damardan olmak üzere aynı anda vücudun farklı bölgelerini sistemik olarak uyarmak üzere rapel doz (son immünizasyon) uygulaması yapıldı ve bu fareler ile füzyon çalışmaları gerçekleşti. Füzyon çalışmalarına ait sayısal veriler ve elde edilen sonuçlar Tablo 4. 2'de verilmektedir.

Tablo 4. 2 Yapılan Füzyon Çalışmalarının Sayısal Verileri

Füzyon No	Fare	Antijen	Dalak hücresi sayısı (BALB- C)	F0 sayısı	Dalak/ F0 oranı	Test edilen hibrit sayısı	Antikor aktivitesine sahip hücre sayısı	IRT2'ye spesifik MAb üreten hücre sayısı
1	1.grup 3. fare	IRT2	350. 10 ⁶	80.106	1/4	0*	0	0
2	1.grup 1. fare	IRT2	256. 10 ⁶	81. 10 ⁶	1/3	1201	14	2
3	1.grup 2. fare	IRT2	385. 10 ⁶	88. 10 ⁶	1/4	256	9	0
4	1.grup 4. fare	IRT2	530. 10 ⁶	131. 10 ⁶	1/4	683	22	3
5	2. grup 1. fare	IRT2	256. 10 ⁶	81. 10 ⁶	1/3	0*	0	0
6	2. grup 2. fare	IRT2	354. 10 ⁶	170. 10 ⁶	1/3	712	0	0
7	2.grup 3. fare	IRT2	340. 10 ⁶	211. 10 ⁶	1/2	427	4	0
8	3.grup 1. fare	IRT2 ve mclab IRT1	219. 10 ⁶	66. 10 ⁶	1/3	515	9	3
9	3.grup 2. fare	IRT2 ve mclab IRT1	198. 10 ⁶	66. 10 ⁶	1/3	228	4	0
10	4.grup 1. fare	IRT2	200. 10 ⁶	66. 10 ⁶	1/3	228	4	1

*Kontaminasyon sebebi ile sonlandırıldı.

Birinci ve beşinci füzyon çalışmasında; füzyon çalışması sürecinde hücreler kontrol edildiğinde bakteri kontaminasyonu saptandı ve bu nedenle füzyon devam ettirilemedi.

İkinci füzyon çalışmasında; 1201 adet hibridoma klonu elde edildi, ilk etapta 14 adet hibridoma hücresinde antikor yanıtı gözlemlenirken, ilerleyen ELISA kontrol testlerinde bir kısmının çapraz reaksiyon verdiği bir kısmında antikor aktivitesini kaybettiği tespit edildi. Sadece 2 adet hibrit hücrenin (MAM-13C9, MAM-7G2) IRT antijenine karşı antikor yanıtını sürdürdüğü ve IRT 2 antijenine spesifik yanıt verdiği belirlendi. Bu hücrelerle ileri çalışmalar yapılarak alt klonlama, geniş ölçek üretim çalışmaları ve saflaştırılma çalışmaları yapılmıştır.

Üçüncü füzyon çalışmasında; 256 hibridoma klonu elde edildi, ilk ELISA testlerinde bu klonlar arasında 9 adet antikor aktivitesi gösteren hibrit hücre bulundu. Tekrarlanan antikor aktivite ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, bu füzyon çalışmasından elde edilen hibrit hücrelere ait antikorların IRT2'ye özgün olmadıkları belirlendiği için füzyon çalışmaları diğer farelerle sürdürüldü.

Dördüncü füzyon çalışmasında; 683 klon elde edildi, ancak ilk etapta antikor yanıtı gözlenen 22 adet hibridoma hücresinde, ilerleyen aktivite kontrol ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, 4 hibrit hücrenin (MAM-1E4, MAM-6D1 ve MAM-7A11) IRT'ye karşı spesifik olduğu görüldü. Bu hücrelerle ileri çalışmalar yapılarak alt klonlama, geniş ölçek üretim çalışmaları ve saflaştırılma çalışmaları yapılmıştır.

Altıncı füzyon çalışmasında; 712 klon elde edildi, yapılan füzyon tarama ELISA çalışmalarında antikor aktivitesi gösteren hücre tespit edilemedi. Füzyon çalışması sonlandırıldı.

Yedinci füzyon çalışmasında; 427 klon elde edildi, ilk ELISA testlerinde bu klonlar arasında 4 adet antikor aktivitesi gösteren hibrit hücresi bulundu. Tekrarlanan aktivite kontrol ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, bu hibrit hücrelerinin yanıtlarının kaybettiği görüldü. Füzyon sonlandırıldı.

Sekizinci füzyon çalışmasında; Karışık immünizasyon yapılan fare ile gerçekleştirilen bu füzyondan 515 klon elde edildi, antikor yanıtı gözlenen 9 adet hibridoma hücresinde, ilerleyen aktivite kontrol ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, 3 klonda (MAM-4B2, MAM-11F9 ve MAM-10B10) aktivite gözlemlendi. MAM-4B2 klonunun IRT1, MAM-11F9 klonunun IRT2 ve MAM-10B10 klonunun IRT1 yanıtının yüksek olduğu belirlendi.

Dokuzuncu füzyon çalışmasında; karışık immünizasyon yapılan fare ile gerçekleştirilen bu füzyondan ise 228 klon elde edildi, ilk ELISA testlerinde bu klonlar arasında 4 adet antikor aktivitesi gösteren hibrit hücresi bulundu. Tekrarlanan aktivite kontrol ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, bu hibrit hücrelerinin yanıtlarının kaybettiği görüldü. Füzyon sonlandırıldı.

Onuncu füzyon çalışmasında; 256 klon elde edildi, ilk ELISA testlerinde bu klonlar arasında 4 adet antikor aktivitesi gösteren hibrit hücresi bulundu. Tekrarlanan aktivite kontrol ve çapraz test kontrol ELISA çalışmalarında, bu hibrit hücrelerinin bir tanesinde (MAM-7E10) IRT spesifik yanıt olduğu görüldü.

9 adet hibrit hücrenin (MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM-MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10, MAM-7E10) IRT antijenine karşı antikor yanıtını sürdürdüğü belirlendi. Bu hücrelerle sürdürülen ileri çalışmalar “3.2.5. Hibridoma Kültürlerinin Takibi ve IRT Spesifik Antikor Üreten Hücre Hatlarının seçimi” başlığı altında açıklandı.

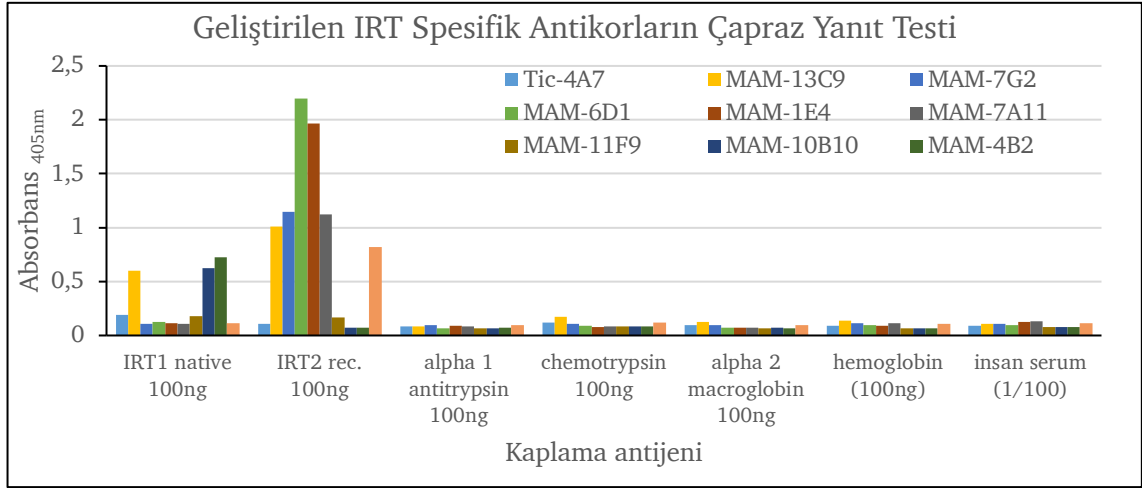
4.1.5 IRT Spesifik Hibridoma Hücre Hatlarının Seçimi ve Alt Klonlama Çalışmaları

Füzyon çalışmalarında, IRT antijenine karşı antikor yanıtı geliştiren 9 adet hücrenin (MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM-MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10, MAM-7E10) ileri çalışmaları kapsamında aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.1.5.1 IRT Spesifik Hibridoma Hücre Hatlarının Seçimi (Çapraz Reaksiyon Testi)

Füzyonlar sonrasında IRT antijenlerine bağlanan antikörleri üreten hibrid hücrelerin antikör aktiviteleri indirekt (dolaylı) ELISA ve inhibitör ELISA ile belirlendi. Tekrarlanan ELISA tarama testleri sonucunda MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10, MAM-7E10 isimli hibrid klonlarının IRT antijenine karşı spesifik antikör ürettiği belirlendi.

Geliştirilmesi planlanan monoklonal antikör esaslı teşhis kitinde, topuk kanından alınan numune, analizlerde test materyali olarak kullanılacağı için, geliştirilen antikörlerin numunede (kan) bulunabilecek proteinlere karşı non-spesifik yanıt vermemesi, antikör seçiminde önemli bir parametredir. Bu sebeple, bu çalışmada elde ettiğimiz MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 monoklonal antikörlerinin ELISA plaklarındaki farklı protein kaplamalarına karşı oluşturduğu yanıtlar test edildi. Şekil 4. 9'da gösterilen ELISA sonucuna göre, MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 antikörlerinin, 100ng alpha 1 antitrypsin, 100ng chemotrypsin, 100ng Alpha 2 macroglobulin, 100ng Hemoglobin, 1:100 oranında seyreltilmiş insan serumu ile çapraz reaksiyonlarına bakıldı. ELISA sonucuna göre, MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 antikörlerinin diğer proteinlere karşı çapraz reaksiyon vermediği görüldü.



Şekil 4. 9 Anti-IRT antikorlarının çapraz reaksiyonlarının ELISA sonucu

ELISA testlerinde IRT antijenine spesifik antikor ürettiği belirlenen 9 hücreyi ayrı ayrı, tek klondan oluşan hibritlere dönüştürmek amacı ile alt klonlama (sınırlı seyreltme) işlemi uygulandı. Elde edilen monoklonal hücre hatlarının büyük ölçek üretimi yapılarak üst sıvıları, antikor karakterizasyon ve saflaştırma çalışmalarında kullanıldı.

4.1.6 IRT Spesifik Antikorların Karakterizasyon ve Saflaştırılması Çalışmaları

Uygun saflaştırma yönteminin belirlenmesi için geliştirilen MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 Anti-IRT2 antikorlarının immünoglobulin tipleri Roche IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping antikor alt tipi belirleme kiti ile belirlendi (Tablo 4. 3).

Tablo 4. 3 Anti-IRT antikorları ve immunglobulin tipleri

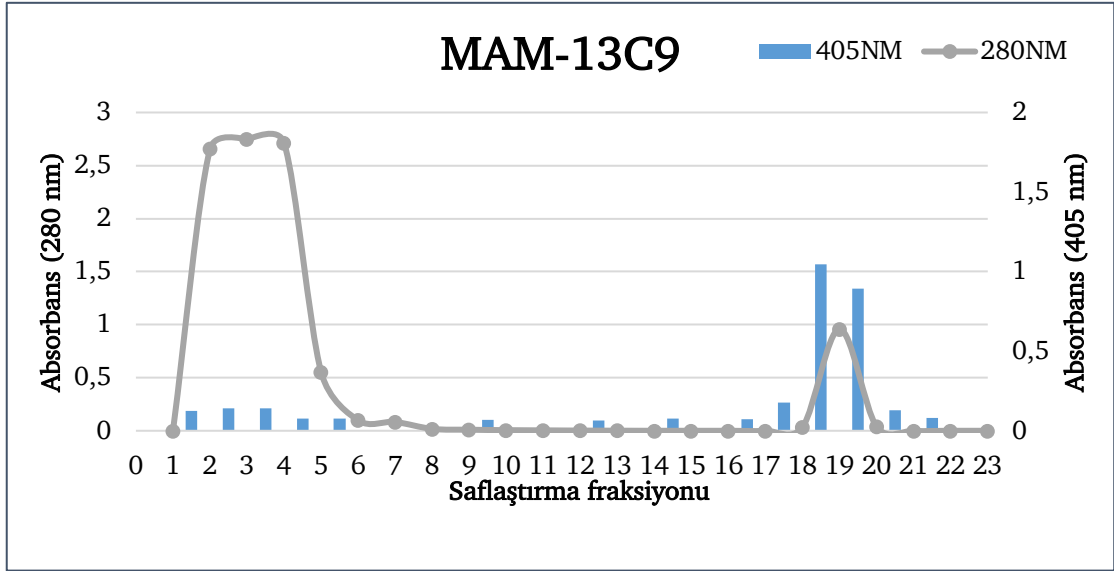
Anti-IRT Antikorları	Immunglobulin Tipi
MAM-13C9	IgG1, κ
MAM-7G2	IgG2a, κ
MAM-6D1	IgG1, κ
MAM-1E4	IgG1, κ
MAM-7A11	IgG1, κ
MAM-11F9	IgG1, κ
MAM-10B10	IgG1, κ
MAM-4B2	IgG1, κ
MAM-7E10	IgG1, κ

4.1.6.1 Anti-IRT Monoklonal Antikorumun Saflaştırılması

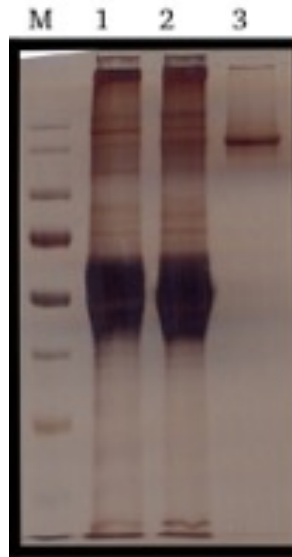
Geliştirilen 9 adet anti-IRT monoklonal antikorun (MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10) saflaştırma çalışmaları yapıldı. Bu bölümde toplanan kültür sıvıları ile yapılan saflaştırma çalışmaları aşamaları sunulmaktadır.

- **İmmünoaffinite Kromatografisi ile Saflaştırma**

Amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak konsantre hale getirilen hücre üst sıvısında bulunan proteinler, PBS içerisinde çözülerek immünoaffinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Elde edilen fraksiyonlarda bulunan protein miktarı 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik sistemde belirlendi. Ardından kolon sonrası toplanan örnekler dolaylı-ELISA tekniği (veya inhibitör yakalayıcı ELISA) ile test edilerek IRT proteinlerine karşı aktivite gösteren fraksiyonlar belirlendi. MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 antikorlarının saflaştırma sonrası yapılan ELISA sonuçları (405 nm) ve UV absorpsiyon kromatogramları (280 nm) ve SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4. 10, Şekil 4. 11’de gösterilmektedir. Bütün antikorların sonuçları ise Ekler bölümünde bulunmadır (Şekil A. 1, Şekil A. 2, Şekil A. 3, Şekil A. 4, Şekil A. 5, Şekil A. 6 ve Şekil A. 7).



Şekil 4. 10 Anti-IRT MAM-13C9 Monoklonal antikorunun Protein A immunokromatografi saflaştırma sonuçları



Şekil 4. 11 Anti-IRT MAM-13C9 Monoklonal antikorunun saflaştırma fraksiyonlarının SDS-PAGE jel görüntüsü. M:Markır, 1: Saflaştırma sonrası kolona tutunmayan fraksiyon, 2:Saflaştırma öncesi örnek, 3: Saf antikor

4.1.6.2 Anti-IRT Monoklonal Antikorların Lineer Epitop Analizi

Tasarlanan ELISA modelinde kullanılacak antikor çiftlerinin belirlenmesinde ve kullanılan tamponların optimizasyonunda kolaylık sağlaması ve ayrıca geliştirilen antikorların tek başına ticari değerlerini de arttırabileceği için epitop analizi yapıldı.

IRT'ye ait peptit dizilerine karşı dolaylı ELISA kullanılarak, bu çalışmada geliştirilen antikorlar ve Ticari IRT antikorları test edildi. IRT1 ve IRT2 antijenlerinin kaplandığı kuyular pozitif kontrol, hiçbir antijenin bulunmadığı PBS tamponu ile kaplanan kuyuların ise negatif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada; 67 peptit dizisine karşı ölçülen yanıtlar Şekil A. 8'deki grafiklerde düzenlendi.

Lineer epitop ELISA analizi sonucunda, bu çalışmada geliştirilen antikorlar ve ticari IRT antikorlarından peptit dizilerine karşı reaksiyon gösterenler Tablo 4. 4'de gösterilmektedir.

Tablo 4. 4 Lineer epitop analiz sonucunda Anti-IRT Antikorlar ve yanıt verdikleri peptitler

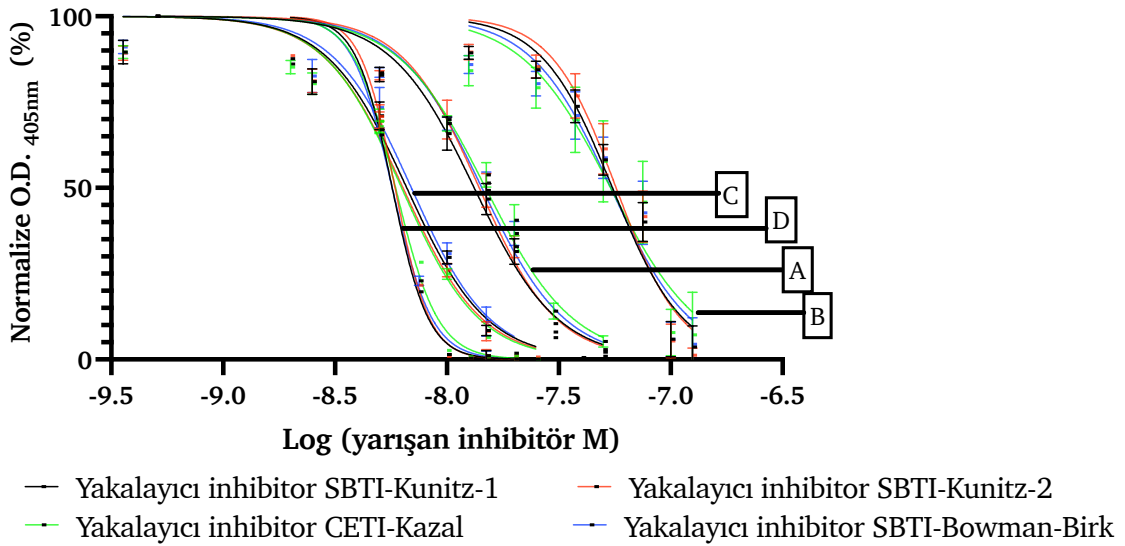
Antikorlar	Yanıt verdikleri peptit numarası ve ait olduğu IRT çeşidi		
MAM-7A11	37(IRT2)	10 (IRT1-IRT2 ortak)	-
MAM-7G2	5 (IRT2)	11 (IRT1-IRT2 ortak)	37 (IRT2)
MAM-13C9	11 (IRT1-IRT2 ortak)	25 (IRT2)	37 (IRT2)
4A7 (ticari)	37/38 (IRT2)	48 (IRT1)	66 (IRT1)

Epitop analizi sonuçları incelendiğinde; diğer antikorların bağlandığı epitoplar, lineer epitop analizi ile belirlenemediği için bu antikorların konformasyonel epitoplara spesifik antikorlar olduğu düşünüldü. Bunun sebebinin, tripsin molekül yapısında bulunan beta barrel yapısının lineer epitoplardan ziyade kompleks antijenik bölgeleri oluşturmasından kaynaklandığı düşünüldü.

4.2 ELISA Temelli Kit Geliştirme Çalışmaları

4.2.1 ELISA Kitinde Kullanılacak İnhibitörün E-CTIA ile Belirlenmesi

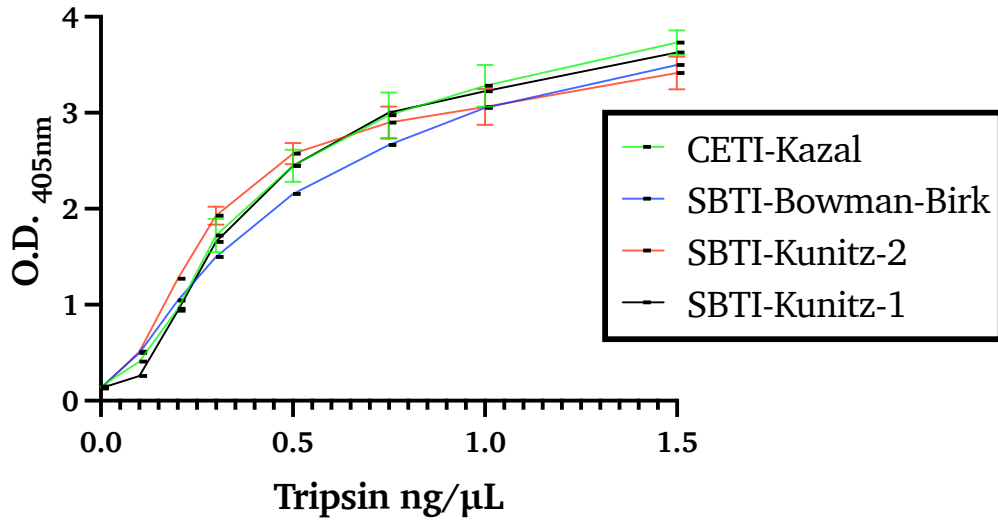
Bu yöntemde, yarışan inhibitör içeren numuneler, tripsin antijeni içeren solüsyonlarda seri olarak seyreltildi ve daha sonra yakalama inhibitörünün immobilize edildiği kuyulara yüklendi. İnhibitörlerin (hem numunede bulunan yarışan inhibitör hem de ELISA plakasında immobilize edilmiş inhibitör) tripsine bağlanmak için yarışmasının ardından; yarışan inhibitöre bağlananlar yıkama ile ELISA plağından uzaklaştırıldı. Yakalayıcı-inhibitöre bağlanan tripsin molekülleri ise ELISA protokolündeki gibi anti-tripsin antikoru ile tespit edildi. Elde edilen sonuçlar inhibisyon doygunluk eğrileri farklı yakalayıcı-inhibitörün elde edilen sonuca etkisi incelendi (Şekil 4. 12 A-D).



Şekil 4. 12 Farklı yakalayıcı inhibitörlerle uygulanan E-CTIA ile elde edilen doygunluk eğrileri. A: Yarışan inhibitör SBTI-Kunitz-2; B: Yarışan inhibitör SBTI-Bowman-Birk; C: Yarışan inhibitör SBTI-Kunitz-1; D: Yarışan inhibitör CETI-Kazal

Şekil 4. 12 grafiği incelendiğinde, farklı yakalayıcı inhibitörlerle yapılan ölçümlerin grafiklerin çakıştığı görüldü, bu da yakalayıcı inhibitörün belirgin bir etkisi olmadığından kaynaklandığı düşünüldü. Yarışan inhibitörlerin IC_{50} değerlerinin belirgin bir şekilde farklı tespit edilebildiği görüldü.

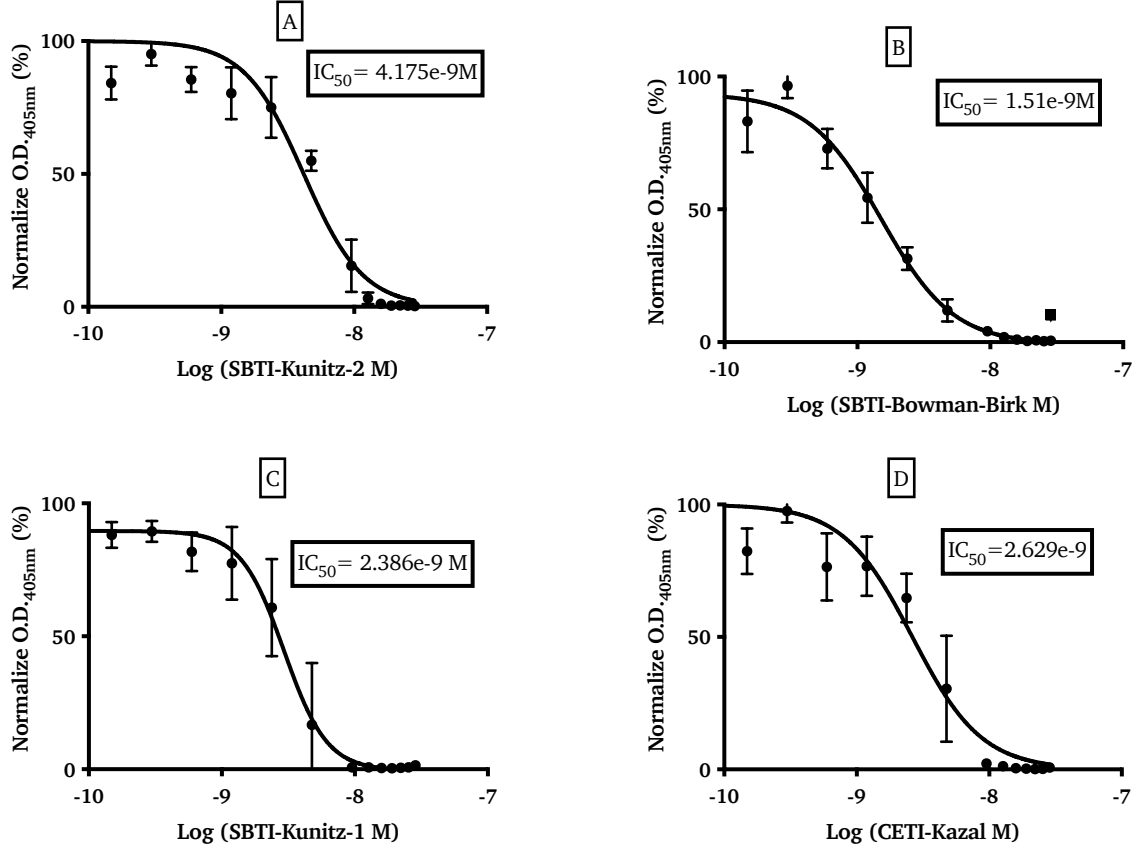
Yakalayıcı inhibitörün belirgin bir fark yaratmadığı görüldüğü için, metodun optimizasyonunda, ölçüme uygun sinyal yoğunluğu ve tekrar edilebilirliği olan en düşük miktar tripsin konsantrasyonunun ve yakalayıcı-inhibitörün seçilmesine karar verildi. Bunun için inhibitör-yakalayıcı ELISA’da değişen tripsin konsantrasyonlarına karşı ölçülen sinyaller (O.D._{405nm}) karşılaştırıldı (Şekil 4. 13).



Şekil 4. 13 İnhibitör-yakalayıcı ELISA’da farklı tripsin konsantrasyonuna karşı elde edilen O.D._{405nm} sinyal grafiği

Şekil 4. 13’deki sonuçlar incelendiğinde, yaklaşık 1,5-2 aralığındaki sinyal yoğunluğuna denk gelen 0.3 $\mu\text{g/mL}$ tripsin konsantrasyonu ve diğerlerine kıyasla daha yüksek yanıt ve daha düşük hata aralığı göstermesi sebebi ile SBTI-Kunitz-inhibitörü yakalayıcı inhibitor olarak seçildi.

Optimum şartlarda yapılan E-CTIA sonucunda elde edilen verilerle inhibisyon eğrileri ($\log[\text{inhibitör konsantrasyonu}]$ –normalize edilmiş sinyal) Graphpad Prism 9 programında çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı (Şekil 4. 14).

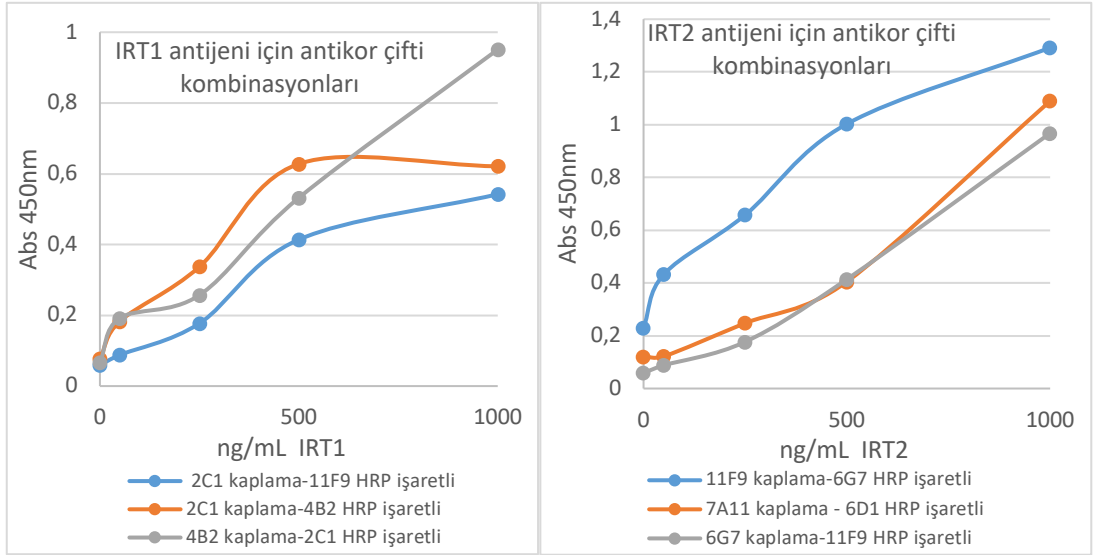


Şekil 4. 14 E-CTIA ile elde edilen inhibisyon eğrileri ve hesaplanan IC₅₀. A: SBTI-Kunitz-2, B: SBTI-Bowman-Birk, C: SBTI-Kunitz-1, D: CETI-Kazal

4.2.2 Sandviç ELISA Sisteminde Kullanılacak Antikorların Seçimi

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 antikorları ve proje süresince geliştirilen 2C1, 3E7 ve 6G7 antikorları ve ile bu antikorların HRP ve biyotin konjugatları, IRT1 ve IRT2 sandviç ELISA kitleri için uygun antikor çiftlerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı.

Bu 12 antikor ve konjugatlarıyla oluşturulan antikor çiftleri, IRT1 ve IRT2 antijenleriyle test edilerek reaksiyon görülen kombinasyonların sonuçları değerlendirildi ve optimizasyon çalışması yapılmaya uygun görülenler belirlendi (Şekil 4. 15).



Şekil 4. 15 Sandviç ELISA antikor çifti seçimi ELISA sonucu

Bu sonuçlara göre IRT1 antijeni için daha doğrusal sonuçlar verdiği görünen 4B2 kaplama-2C1 HRP işaretli antikor çifti optimizasyon çalışmaları için uygun bulundu. IRT2 antijeni için ise, MAM-7A11 kaplama- MAM-6D1 HRP antikor çifti daha doğrusal sonuç verdiği için, ile MAM-11F9 kaplama- MAM-6G7 HRP işaretli antikor çifti ise yüksek absorbans yanıtı verdiği için seçilerek optimizasyon çalışmalarının yapılmasına karar verildi.

4.2.3 Sandviç ELISA Sisteminin Optimizasyon Çalışmaları

IRT1 ve IRT2 tespiti için sandviç ELISA modeli geliştirilmesi için seçilen antikor çiftleri ile kaplama ve konjugat miktar belirlenmesi, kaplama/konjugat solüsyonların içerikleri ve inkübasyon gibi parametreler için optimum koşulların belirlenmesi kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları alt başlıklarda detaylandırıldı.

4.2.3.1 ELISA Plak Kaplama ve İşaretli Antikor Miktar Optimizasyonu

Kistik fibroz yenidoğan taramalarında uygulanan protokollerin genelinde cut-off değeri 70-90 ng/mL aralığında belirlenmiştir. Bu sebeple bu aralığı kapsayan güvenilir ölçüm aralığına sahip kit geliştirmek önemlidir. IRT1 ve IRT2

antijenlerinin tespiti için seçilen artikor çiftlerinin bu aralıkta nasıl çalıştığını gözlemlemek ve optimize etmek için aşağıdaki çalışmalar yapıldı.

Öncelikle MAM-7A11 ELISA plak kaplama-MAM-6D1 HRP antikor çiftinin optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı kaplama ve konjugat seyreltmesi kombinasyonları yapıldı. Gerçekleştirilen sandviç ELISA sonuçları Tablo 4. 5'deki gibi düzenlendi.

Tablo 4. 5 7A11 kaplama-6D1 konjugat ELISA modelinin optimizasyon çalışması

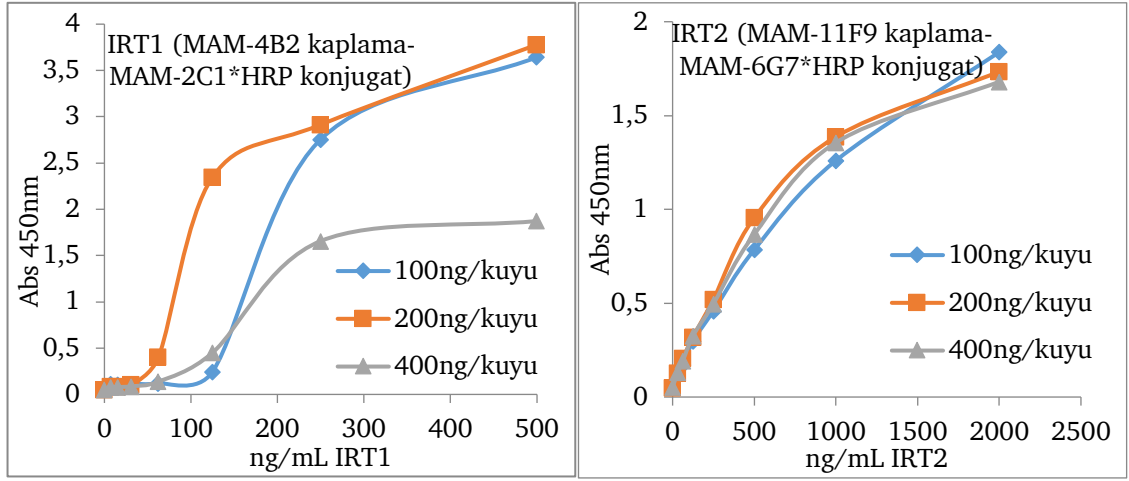
MAM-7A11 kaplama ng/kuyu→	200		400		600		800	
MAM-6D1-HRP seyreltme oranı →	1/750	1/1500	1/750	1/1500	1/750	1/1500	1/750	1/1500
IRT2 ng/mL ↓								
1333	0,837	0,511	1,102	0,515	1,351	0,577	1,495	0,715
1000	0,525	0,277	0,711	0,357	0,787	0,428	0,965	0,304
500	0,374	0,255	0,449	0,3	0,507	0,315	0,558	0,303
250	0,203	0,154	0,246	0,167	0,268	0,176	0,319	0,172
125	0,155	0,12	0,167	0,13	0,195	0,127	0,233	0,141
62	0,141	0,109	0,138	0,112	0,16	0,11	0,179	0,114
31	0,158	0,114	0,14	0,111	0,161	0,107	0,186	0,119
0	0,143	0,116	0,143	0,116	0,157	0,104	0,15	0,124

Not: Yeşil bölge tespit etmek istediğimiz IRT2 konsantrasyonunu (500-0ng/mL), Kırmızı çizgi ise cut-off değerinin bulunduğu aralığı göstermektedir.

Bu sonuca göre, MAM-7A11 plak kaplama- MAM-6D1-HRP antikor çifti kombinasyonun, 250 ng/mL değerinin altındaki IRT2 miktarını belirlemede başarısız olduğu görülmüş ve bu antikor çiftiyle ilgili çalışmalara devam edilmemiştir.

IRT1 antijeni için MAM-4B2 plak kaplama- MAM-2C1 HRP işaretli antikor çifti ve IRT2 için MAM-11F9 plak kaplama- MAM-6G7 HRP işaretli antikor çifti çalışmaları ise paralel yapıldı.

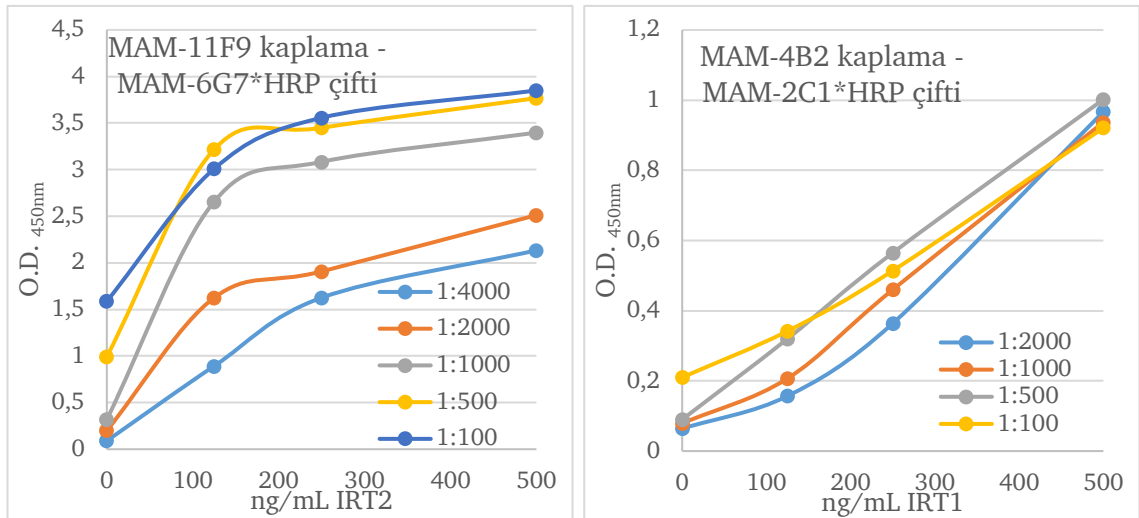
Öncelikle farklı kaplama antikor konsantrasyonlarının etkisinin incelenmesi için MAM-4B2 ve 11F9 antikorları 100, 200, 400 ng/kuyu olacak şekilde plaklara kaplandı ve ELISA protokolü uygulandı. Sonuçlar Şekil 4. 16'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 16 MAM-4B2 plak kaplama-MAM-2C1*HRP çifti ve MAM-11F9 kaplama-MAM-6G7*HRP çifti antikor kaplama optimizasyon çalışması

Bu ELISA çalışması sonucunda; MAM-11F9 plak kaplamasının 100ng/kuyu olarak yapılmasına MAM-4B2 plak kaplamasının da 200 ng/kuyu olmasına karar verildi.

Kaplama optimizasyonunun ardından, sandviç sistemin tespit edici kısmı olan optimum konjugat seyreltme miktarlarının belirlenebilmesi için, optimize edilen miktarlarda antikor ELISA plağına kaplanarak 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 ve 1:4000 (sadece MAM-6G7 HRP konjugatı için gerekli görüldü) konjugat dilusyon seyreltmeleri yapılarak gerçekleştirilen ELISA testine ait sonuçlar Şekil 4. 17'deki grafiklerdeki gibi elde edildi.



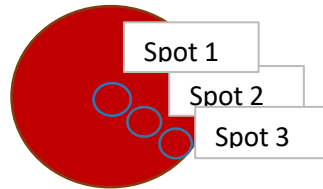
Şekil 4. 17 MAM-11F9-MAM-6G7*HRP ve MAM-4B2-MAM-2C1*HRP antikor çiftleri için kaplama ve konjugat miktar optimizasyonu

Bu çalışma sonucuna göre 2C1-HRP konjugatının 1:500 oranında, 6G7-HRP konjugatının ise 1:4000 seyreltilerek kullanılmasına karar verildi.

4.2.3.2 Spotlara Emdirilmiş Antijenin Geri Kazanım Testi

Optimum kaplama konsantrasyonu ve konjugat dilüsyon oranının belirlenmesinden sonra, optimizasyonların devam çalışmalarında IRT eklenerek hazırlanmış kan spotlarının kullanılması için hazırlanan spotların etkinliği test edildi. Bunun için hazırlanan IRT ile kirletilmiş (spike) kuru kan kalibratörünün 3 farklı noktasından (merkez-spot1, ara bölge-spot2 ve kenar-spot3,) örnekleme yapılarak (Şekil 4.15) IRT antijen ile hazırlanan çözelti kalibratör test edilip kıyaslandı. Sonuçlar Tablo 4. 6, Tablo 4. 7’da gösterilmektedir.

Optimum kaplama konsantrasyonu ve konjugat dilüsyon oranının belirlenmesinden sonra, optimizasyonların devam çalışmalarında IRT eklenerek hazırlanmış bu kan spotlarının kullanılması için hazırlanan spotların etkinliğinin test edildi. Bunun için hazırlanan IRT ekli kuru kan kalibratörünün 3 farklı noktasından (merkez-spot1, ara bölge-spot2 ve kenar-spot3, Şekil 4. 18) örnekleme yapıldı ve çözelti halinde hazırlanan kalibratör IRT antijen ile test edilip kıyaslandı. Sonuçlar Tablo 4. 6 ve Tablo 4. 7’da gösterilmektedir.



Şekil 4. 18 Kuru kan kalibratörünün 3 farklı noktasından örnek alınması

Tablo 4. 6 MAM-4B2 kaplama - MAM-2C1*HRP kitinin çözelti ve spot kalibratör kıyaslama sonuçları

IRT1 ng/mL	spot 1	spot 2	spot 3	IRT1 çözelti halinde
500	0,914	0,885	0,965	3,256
250	0,403	0,353	0,399	1,397
125	0,252	0,198	0,21	0,549
62,5	0,22	0,157	0,158	0,209
31,25	0,19	0,14	0,14	0,122
0	0,112	0,094	0,123	0,082

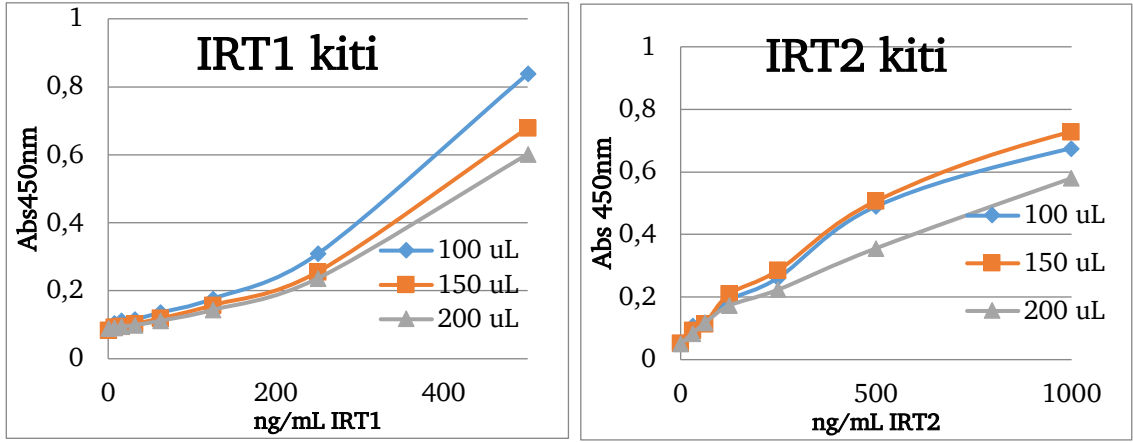
Tablo 4. 7 MAM-11F9 kaplama - MAM-6G7 kitinin çözelti ve spot kalibratör kıyaslama sonuçları

IRT2 ng/mL	spot 1	spot 2	spot 3	IRT2 çözelti halinde
2000	0,74	0,763	0,75	0,907
1000	0,545	0,543	0,555	0,755
500	0,333	0,353	0,363	0,54
250	0,199	0,199	0,261	0,348
125	0,139	0,219	0,123	0,219
62,5	0,094	0,102	0,105	0,139
31,25	0,079	0,079	0,085	0,093
0	0,056	0,053	0,053	0,048

Bu sonuçlara göre IRT1'in çözelti haline göre membrandan geri kazanımının oldukça az olduğu, IRT2'nin ise nispeten daha iyi geri kazanımının olduğu gözlemlendi. Bu sebeple gerikazanımın optimum yapılması için farklı elüsyon koşullarının denenmesine karar verildi.

4.2.3.3 Elüsyon Tampon Miktarı Optimizasyonu

Bu kapsamda öncelikle Elüsyon tampon miktarı optimizasyonu yapıldı. Ticari kitlerde 100-150-200µL gibi farklı hacimlerle yapılan elüsyon bugüne kadar kendi kitlerimizde 200µL olarak kullanılmıştı. Bu çalışmada 100, 150 ve 200µL'lik elüsyon tamponlarının ELISA sonucuna etkisi incelendi. Bu çalışma için optimize edilen kaplama konsantrasyonu, konjugat seyreltme oranı kullanıldı, sonuçlar Şekil 4. 19'daki grafiklerde gösterilmektedir.



Şekil 4. 19 MAM-4B2 plak kaplama-MAM-2C1*HRP çifti ve MAM-11F9 elüsyon tampon hacim optimizasyon çalışması

Bu çalışmaya göre 100 µL Elüsyon tamponuna eklenen standart IRT1 spotlarının daha iyi çalıştığı gözlemlendi. IRT 2 için ise 150 µL ile 100 µL'nin benzer sonuç verdiği görüldü. Bu sebeple her iki kit için de 100 µL elüsyon hacmi ile devam edilmesine karar verildi.

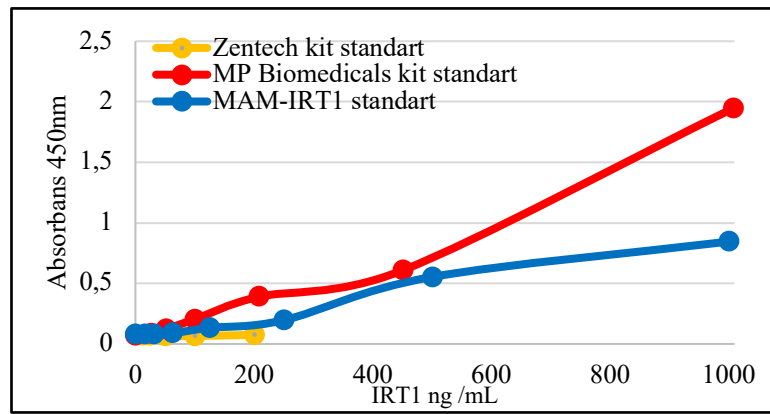
4.2.3.4 Geliştirilen Sandviç Sistemlerinin ve Spot Kan Kalibratörlerinin Ticari Kitler ile Karşılaştırılması

Piyasada bulunan yenidoğan IRT kitleri IRT1 formuna spesifik olduğu ve IRT2 antijenini tanımadığı için, geliştirilen IRT2 ELISA sistemi MAM-7G2, MAM-13C9, MAM-6D1, MAM-7A11, MAM- MAM-1E4, MAM-11F9, MAM-4B2, MAM-10B10 ve MAM-7E10 için hazırlanan kan spotlarının ticari kitlerle kıyaslaması yapılamamıştır. Bu kapsamda sadece IRT1 kan spotlarının ticari kitlerde kıyaslama çalışmaları yapıldı.

Çalışmalarda geliştirilen ve kullanılan spot kan kalibratörlerinin içerdiği IRT konsantrasyonu, spot kan kalibratörler hazırlanırken içine eklenen IRT miktarı esas alınarak hesaplanmıştı. Hazırlanma sürecinde oluşan hata payı, spot-kan ile yapılan testten kaynaklanan hata payı sebebiyle, bu değerlerin kullanılmasının güvenilirliği düşüktür. Bu sebeple, IRT1 kitinin olan MAM-4B2 kaplama ve MAM-2C1-HRP işaretli antikorlar ile oluşturulan sandviç modelde, öncelikle ticari MP Biomedicals ve Zentech yenidoğan IRT test kitlerinin içerisinde bulunan spot kan

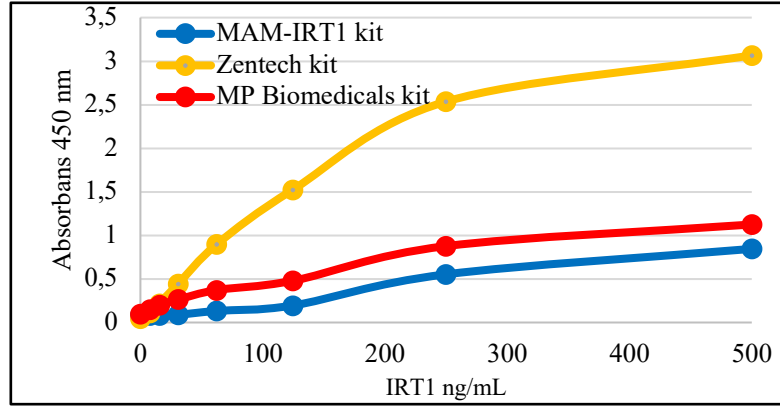
kalibratörleri kullanılarak, ticari spotların bizim sistemde çalışabilirliği test edilip, kitlerin birbiriyle uyumu karşılaştırıldı.

Zentech yenidoğan IRT test kitinin spot kan kalibratör değerleri 0, 12.5, 25, 50, 100 ve 200 ng IRT/mL; MP Biomedicals IRT test kitinin ise 0, 15.6, 51.4, 100, 208, 451 ve 1008 ng IRT/mL olarak prospektüslerinde belirtilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen spot kalibratörlerin teorik IRT konsantrasyonları ise 0, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 ng IRT/mL'dir. Yapılan ELISA sonucu Şekil 4. 20'deki grafikte gösterilmektedir.



Şekil 4. 20 MP Biomedicals ve Zentech yenidoğan IRT test kitlerinin içerisinde bulunan spot kan kalibratörleriyle IRT1 test kitinin (MAM-4B2 kaplama – MAM-2C1*HRP çifti) çalışabilirlik testi

Grafiğe göre, MAM-IRT1 kitinin Zentech yenidoğan test kalibratörlerinin içerdiği IRT antijenini tanımadığı görüldü. Bunun sebebinin Zentech yenidoğan test kalibratörlerinin mutant bir IRT proteini içermesinden kaynaklandığı düşünüldü. MP Biomedicals IRT test kitinin kalibratörlerin sonuçlarıyla kıyaslama yapıldığında; benzer konsantrasyonda IRT içeren spotların yanıtları arasında fark gözlemlendi ve geliştirilen spotların teorik belirlenen değerlerden daha düşük konsantrasyonda IRT içerebileceği düşünüldü. Bu sebeple geliştirilen spot kalibratörlerin ticari kitlerde test edilerek yanıtları incelendi (Şekil 4. 21).

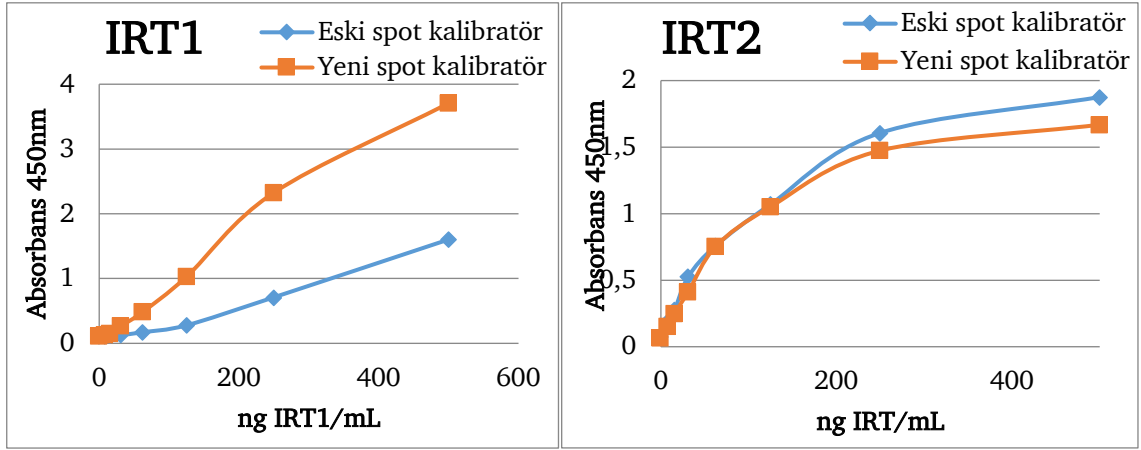


Şekil 4. 21 Tez kapsamında hazırlanan IRT1-spot kan kalibratörün farklı ELISA sistemlerinde karşılaştırılması

Şekil 4. 21'deki sonuçlar incelendiğinde Zentech kit'inin sonuçlarının çok yüksek, MP Biomedicals kitinin sonuçlarının daha düşük kendi IRT1 kitimizin sonuçlarının ise en düşük olduğu gözlemlendi. Ticari kitlerin kendi arasında da büyük fark olması sebebiyle Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'nin (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) Yenidoğan taramalarında kalite güvence programı kapsamında yıllık yayınladığı raporlar incelendi [71]–[73]. Bu raporlarda Zentech kitinin CDC referans konsantrasyonuna göre yüksek konsantrasyonda tespit ettiği, MP Biomedicals kitinin ise CDC referans konsantrasyonuna göre düşük sonuçlar gösterdiğinin tespit edildiği görüldü. Bu raporlar ve elde edilen sonuçlara göre, MAM-IRT1 kitinin performansının yeterli olmadığı fakat analitik performans değerlendirmesinin CDC kurumu tarafından istediğimiz ve gönderilen standart örnekler kullanılarak yapılmasının daha doğru olduğuna karar verildi. Ayrıca, spot kan kalibratörlerin tekrar hazırlanmasına karar verildi.

4.2.3.5 IRT Spot Standartlarının Optimizasyonu

Spot kan kalibratörlerinin zamanla aktivitesini kaybetme ihtimali göz önüne alınarak, 3.2.7.2.'nolu bölümde detaylı anlatıldığı gibi hazırlanan spot kan standartlarında farklı miktarda inhibitör kullanıldı. Yeni hazırlanan spot kan kalibratörleri, eski spot kan kalibratörleriyle birlikte test edilerek karşılaştırıldı (Şekil 4. 22)



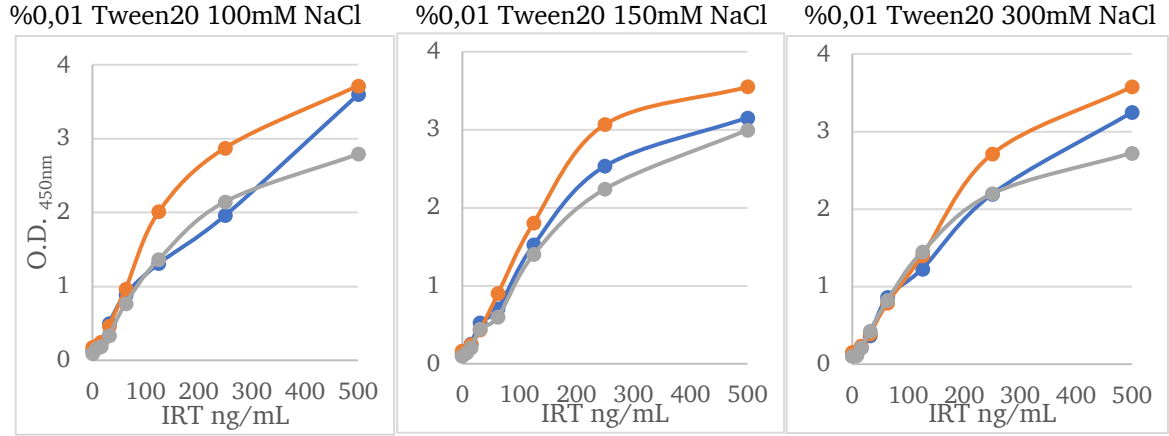
Şekil 4. 22 Yeni ve eski spot kan kalibratörlerinin ELISA sonucu

ELISA sonucuna göre, IRT1 eski spot kan kalibratörlerinin IRT yanıtı yaklaşık %50 oranında düşüş gösterirken, IRT2 spot kan kalibratörlerinin yanıtlarında belirgin bir azalma gözlenmedi.

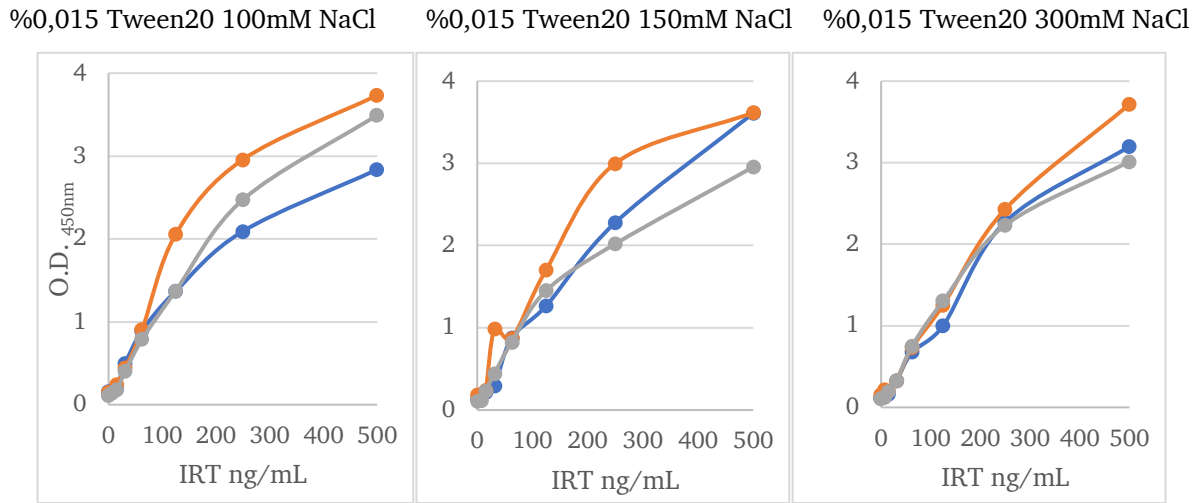
4.2.3.6 Elüsyon Tamponunun ve Spot İnkübasyon Koşullarının Optimizasyonu

KF erken tanı tarama programında yeni doğan bebeğin topuğundan membrana damlatılıp kurutulan kan örneği kullanılır. Membranda kurutulmuş kan örneğinden IRT proteinin çözünerek sulu faza geçmesi tanı kitinin en kritik aşamalarındandır. Membrandan geri kazanımı yapılamayan IRT, KF pozitif bebeklerin tespit edilememesine yani “yalancı negatif” sonuçlara sebep olur. Bunun engellenmesi için, spot kan örneklerinin çözüleceği tampon (elüsyon tamponu) IRT’yi çekecek ve moleküler stabilitesini bozmayacak en uygun şartlarda olmalıdır.

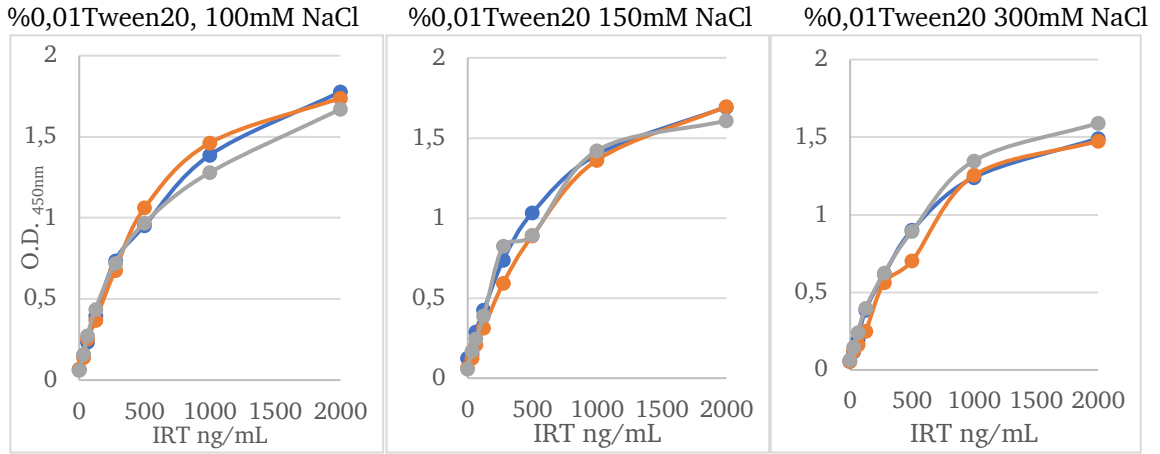
Bu kapsamda, elüsyon tamponunun çözücülüğüne etki eden parametreler (tuz, tween20 konsantrasyonu ve inkübasyon koşulları) optimize edildi. Çalışmalarda iki farklı deterjan konsantrasyonu (% 0,15 ve % 0,1), 3 farklı tuz konsantrasyonu (100 mM, 150 mM ve 300 mM NaCl) ve 3 farklı gece boyu inkübasyon koşulu (oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde, oda sıcaklığında ve +4°C’de inkübasyon) MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitlerine eş zamanlı uygulanarak sonuçları Şekil 4. 23, Şekil 4. 24, Şekil 4. 25 ve Şekil 4. 26 daki grafiklerde gösterildi.



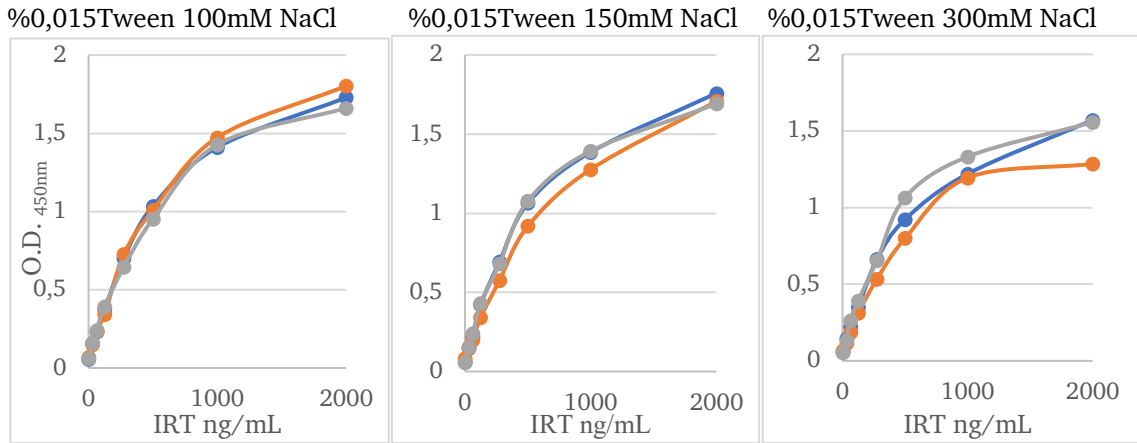
Şekil 4. 23 MAM-IRT1 kiti, %0,01 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu. (Mavi: oda sıcaklığı geceboyu; Turuncu: Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gece boyu; Gri: +4°C gece boyu inkübasyon)



Şekil 4. 24 MAM-IRT1 kiti, %0,015 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu. (Mavi: oda sıcaklığı geceboyu; Turuncu: Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gece boyu; Gri: +4°C gece boyu inkübasyon)



Şekil 4. 25 MAM-IRT2 kiti, %0,01 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu. (Mavi: oda sıcaklığı geceboyu; Turuncu: Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gece boyu; Gri: +4°C gece boyu inkübasyon)



Şekil 4. 26 IRT2 kiti, %0,015 tween20 içeren konjugat tamponunda, tuz konsantrasyonu ve inkübasyon koşullarının optimizasyonu. (Mavi: oda sıcaklığı geceboyu; Turuncu: Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gece boyu; Gri: +4°C gece boyu inkübasyon)

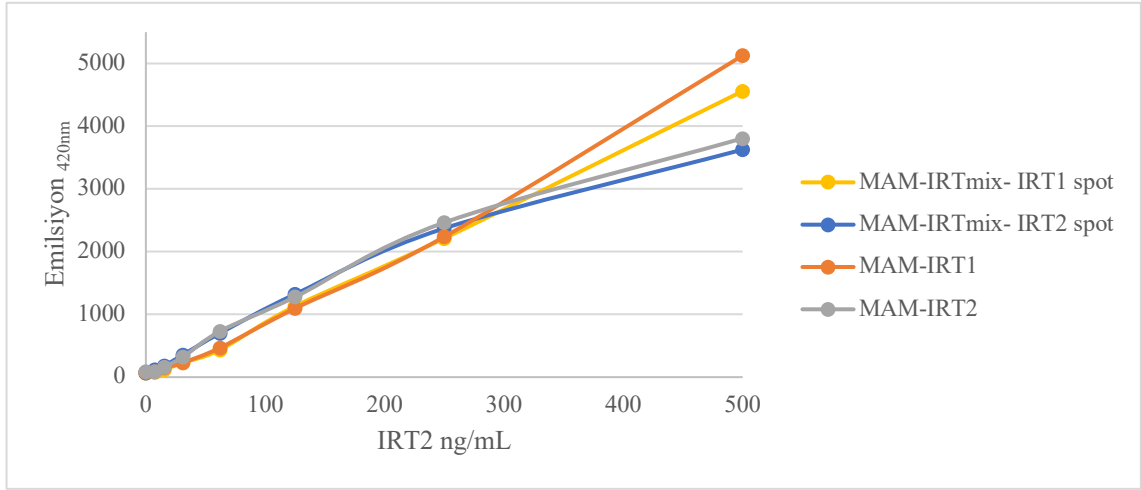
Şekil 4. 23, Şekil 4. 24, Şekil 4. 25 ve Şekil 4. 26'daki grafikler incelendiğinde en yüksek absorbanslara sahip olması sebebiyle 100mM NaCl konsantrasyonu seçildi ve özellikle IRT2 için farklı inkübasyon koşullarına göre değişim göstermediğinden daha stabil koşul oluşturduğu düşünülen %0,015 Tween20 konsantrasyonu optimum elüsyon tamponu içeriği olarak seçildi. İnkübasyon koşulları ise IRT1 için gece boyu çalkalayıcı, IRT2 için ise +4°C'de gece boyu inkübasyonunun kullanılmasına karar verildi.

MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitlerinin performansının daha da arttırılması ve substrat kaynaklı hatanın daha az olması için kolorimetrik ölçüm yerine daha yüksek hassasiyet sağlayan florimetrik ölçüm metodunun kullanılmasına karar verildi. Bunun için TMB kolorimetrik substratının yerine florimetrik HPPA substratı kullanıldı.

4.2.4 IRT1 ve IRT2 Antijenlerini Aynı ELISA Sisteminde Tespit Etme Çalışmaları

Tez çalışmasının esas amaçlarından biri olan IRT formlarının KF erken tanısındaki önemini ortaya koymak olduğu için, her iki formunun da önemli olması ihtimaline karşı, iki formu (IRT1 ve IRT2) tek bir testte tespit etmek önemlidir.

IRT1 ve IRT2 formlarını tek bir test içerisinde ölçmek avantajlı olabileceği için, MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kit antikor çiftlerinin birlikte kullanılmasıyla her iki antijeni tanıyan ELISA sisteminin tasarlanması amaçlandı. Bunun için optimize edilen antikor konsantrasyonlarının toplamı tek bir kuyuya kaplama yapılarak (100ng 11F9 + 200ng 4B2/kuyu kaplama) ve konjugatları (2C1-HRP+6G7-HRP, 1:500 ve 1:4000 optimize edilen seyreltme oranlarıyla) birlikte kullanılarak sandviç ELISA çalışması yapıldı ve sonuçlar eş zamanlı yapılan MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kit sonuçlarıyla kıyaslandı (Şekil 4. 27).

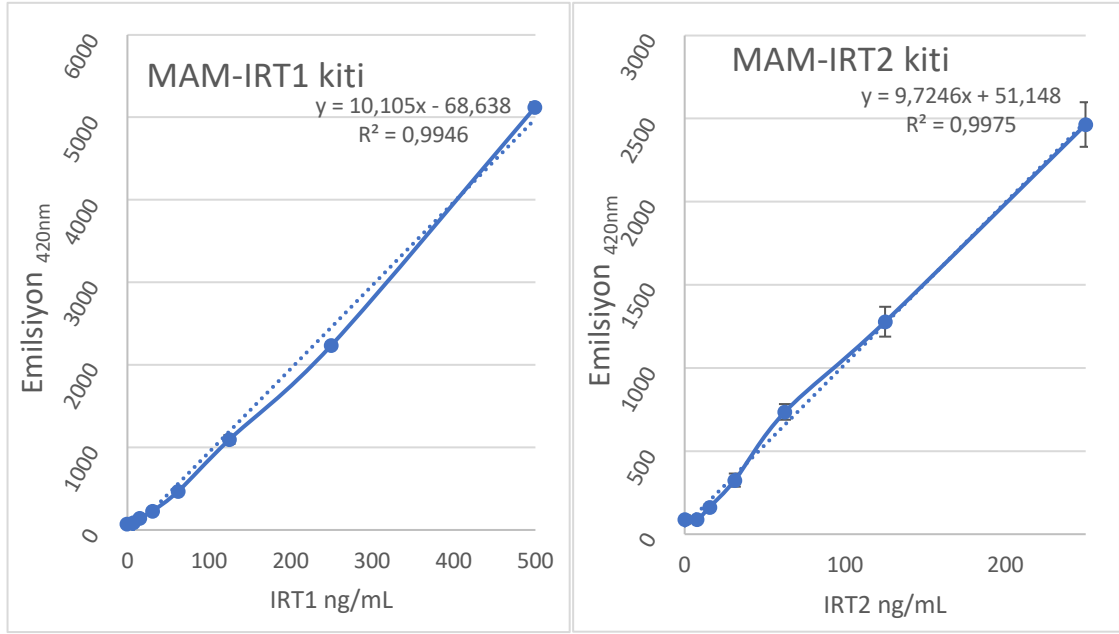


Şekil 4. 27 MAM-IRTmix kitinin MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitleriyle kıyaslama ELISA'sı

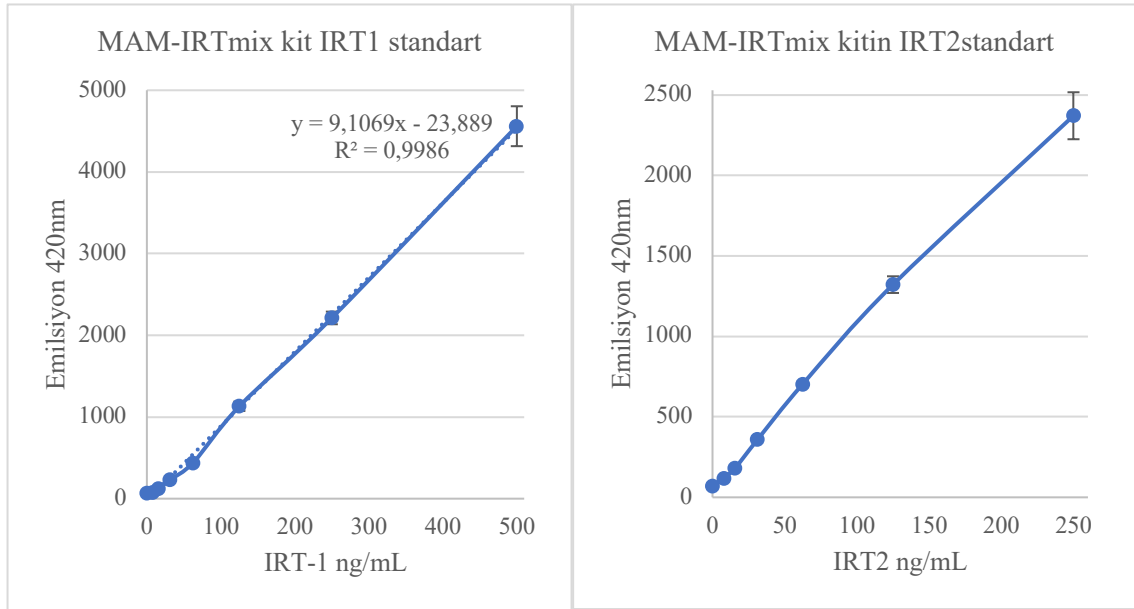
Şekil 4. 27'deki grafik incelendiğinde; MAM-IRTmix kitinin IRT1 antijenine karşı MAM-IRT1 kitiyle benzer yanıtlar verdiği görüldü. Aynı şekilde IRT2 antijenine karşı MAM-IRT2 kitiyle benzer sonuçlar göstermesi sebebiyle kitlerin birbiriyle uyumlu olduğu gösterildi. MAM-IRTmix kitinin bebek kan spot testlerinde kullanılması için tek bir form IRT içeren kalibratör kullanılması gerekmektedir. Bu sebeple, gerek piyasadaki kitlerin IRT1 formuna yönelik olması gerek CDC tarafından sağlanan IRT spot standartlarının IRT1 formunu içermesi sebebiyle MAM-IRTmix kitinde kalibratör olarak IRT1 spot kan kalibratörlerinin saha çalışmalarında kullanılmasına karar verildi.

4.3 ELISA Kitlerinin Analitik Duyarlılıklarının Tespiti

Avrupa Birliği Resmi Gazetesi tarafından yayınlanan, 2002/364 / EC sayılı Komisyon kararında belirtilen in vitro diagnostik tıbbi cihazların ortak teknik özellik maddeleri ve 2009/108/EC karar değişikliklerine uygun olarak IRT1, IRT2 ve IRT-mix kitlerinin analitik duyarlılıkları belirlendi. Komisyon kararında analitik duyarlılık parametreleri olarak tanımlanan tespit limiti (LOD) ve tayin limitinin (LOQ) belirlenebilmesi için optimize edilen ELISA protokolü her numune için 3 tekrarlı olarak çalışıldı. IRTmix kiti hem IRT1 hem de IRT2 spot kan kalibratörleriyle ayrı ayrı test edildi. Sonuçlar grafiğe dökülerek eğri denklemleri ve R2 değerleri grafik üzerinde belirlendi (Şekil 4. 28, Şekil 4. 29).



Şekil 4. 28 MAM-IRT1 ve MAM-IRT2 kitinin IRT1 ve IRT2 spot kan kalibratörleriyle 3 tekrarlı gerçekleştirilen ELISA sonuç grafikleri, eğri denklemleri ve R2 değerleri



Şekil 4. 29 MAM-IRTmix kitinin IRT1 ve IRT2 spot kan kalibratörleriyle yapılan 3 tekrarlı ELISA sonuç grafikleri, eğri denklemleri ve R2 değerleri

Elde edilen veriler ile Excel programının veri analiz özelliği kullanılarak lineer regresyon hesaplamaları yapıldı, LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Tablo 4. 8). Hesaplanan LOD, LOQ ve R² değerleri Tablo 4. 9'de sunuldu.

Tablo 4. 8 LOD ve LOQ değerlerinin hesaplamasında kullanılan formüller

Denklem	$Y = ax + b$
Eğim	a
Y ekseninin kesim noktası	b
Yapılan test sayısı	N
b'nin Standart hatası (SE)	Excel programında Data analiz-Regresyon hesaplayıcısı kullanılarak yapıldı.
b'nin standart sapması (SD)	$SE(b) \times \sqrt{N}$
LOD	$= \frac{3.3 \times (SD(b))}{\text{eğim}}$
LOQ	$= \frac{10 \times (SD(b))}{\text{eğim}}$

Tablo 4. 9 Kitlerin (r^2), deteksiyon limiti (LOD) ve nicelik limiti (LOQ) değerleri

	MAM-IRT1 kiti	MAM-IRT2 kiti	MAM-IRTmix (IRT1)	MAM-IRTmix (IRT2)
LOQ	61,498	24,435	31,268	26,113
LOD	20,294	8,064	10,319	8,617
R^2	0,995	0,997	0,999	0,997

Tablo 4. 9'deki veriler incelendiğinde, hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinin KF tarama testlerinde kullanılan ölçüm aralığına ve literatürdeki cut-off değerlerine (0-200 ng/mL IRT1, cut-off:90 ng/mL; IRT2 için literatür bilgisi bulunmamaktadır.) uyumlu olduğu görülmüştür. R^2 değerinin 1'e yakınlığı analizin güvenilirliğini göstermektedir. $R^2 > 0,99$ limitine göre elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; kitlerin güvenilirliğinin uygun olduğu görülmüştür.

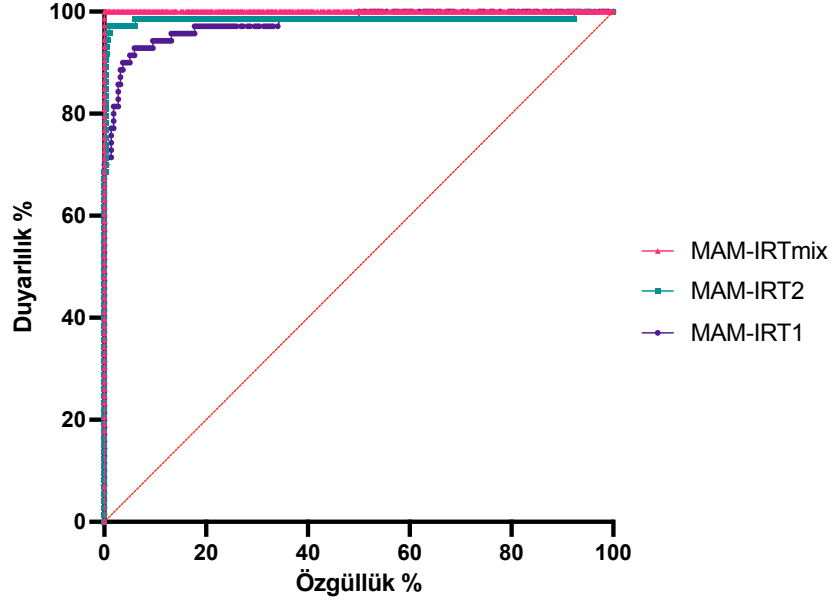
4.4 Saha Örnekleriyle Çalışmalar ve ELISA Kitlerinin Aşamalı Değerlendirilmesi, Verimliliklerinin İncelenmesi

Tez çalışmaları dâhilinde, TÜBİTAK MAM GMBE ve firma proje ortaklığı ile, geliştirilmiş olan 3 adet IRT ELISA kiti ile 3 saha çalışması yapıldı. Yapılan 3 saha çalışmasında toplam 15 KF'li bebek (ter testi ile tanısı konan) kan spotu ve 831 rutin tarama örneği ile çalışıldı. 2. ve 3. Saha çalışmalarında ter testi yapılamadığından HSGM tarafından temin edilen 53 adet IRT yenidoğan tarama pozitif kan spotu test edildi. Geliştirilen kitler ve test edilen numunelerin sayısal bilgileri Tablo 4. 10'da özetlendi. MAM-IRT1, MAM-IRT2 ve MAM-IRTmix kitleri ile elde edilen sonuçlar HSGM tarafından ölçülen sonuçlarla ve birbirleriyle karşılaştırılarak kitlerin performansları değerlendirildi.

Tablo 4. 10 Geliştirilen kitler ve bu kitlerle test edilen numunelerin sayısal bilgileri

IRT KİT	SANDVIÇ MODEL		Test edilen bebek spot kan örneği		
	PLAK KAPLAMA	KONJUGAT	Rutin tarama	KF pozitif (Ter testi pozitif)	Yenidoğan Tarama pozitif
MAM-IRT1	MAM-4B2	MAM-2C1	654	18	53
MAM-IRT2	MAM-11F9	MAM-6G7	831	18	53
MAM-IRTmix	MAM-11F9 MAM-4B2	MAM-6G7 MAM-2C1	538	0	25

Geliştirilen IRT kitlerinin değerlendirilmesi için; MAM-IRT kitleriyle elde edilen sonuçlar ile ROC analizi yapıldı. ROC analizinde pozitif ve negatif elde edilen sonuçların altın standart test ile doğrulanması gerekmektedir. Tarama sonucunda negatif çıkan bebeklere ter testi yapılmadığı için, yanlış negatif sonuçların değerlendirilmesi mümkün değildir. HSGM tarafından ölçülen sonuçlarla yapılan ROC analizi ile tez çalışmaları kapsamında geliştirilen kitlerin ne kadar uyumlu olduğu karşılaştırıldı. Elde edilen duyarlılık % ve özgüllük değerleri kullanılarak ROC grafiği çizildi (Şekil 4. 30), ROC istatistik değerleri Tablo 4. 11'deki gibi özetlendi.



Şekil 4. 30 ROC grafiği

Tablo 4. 11 ROC Analizi istatistik sonuçları

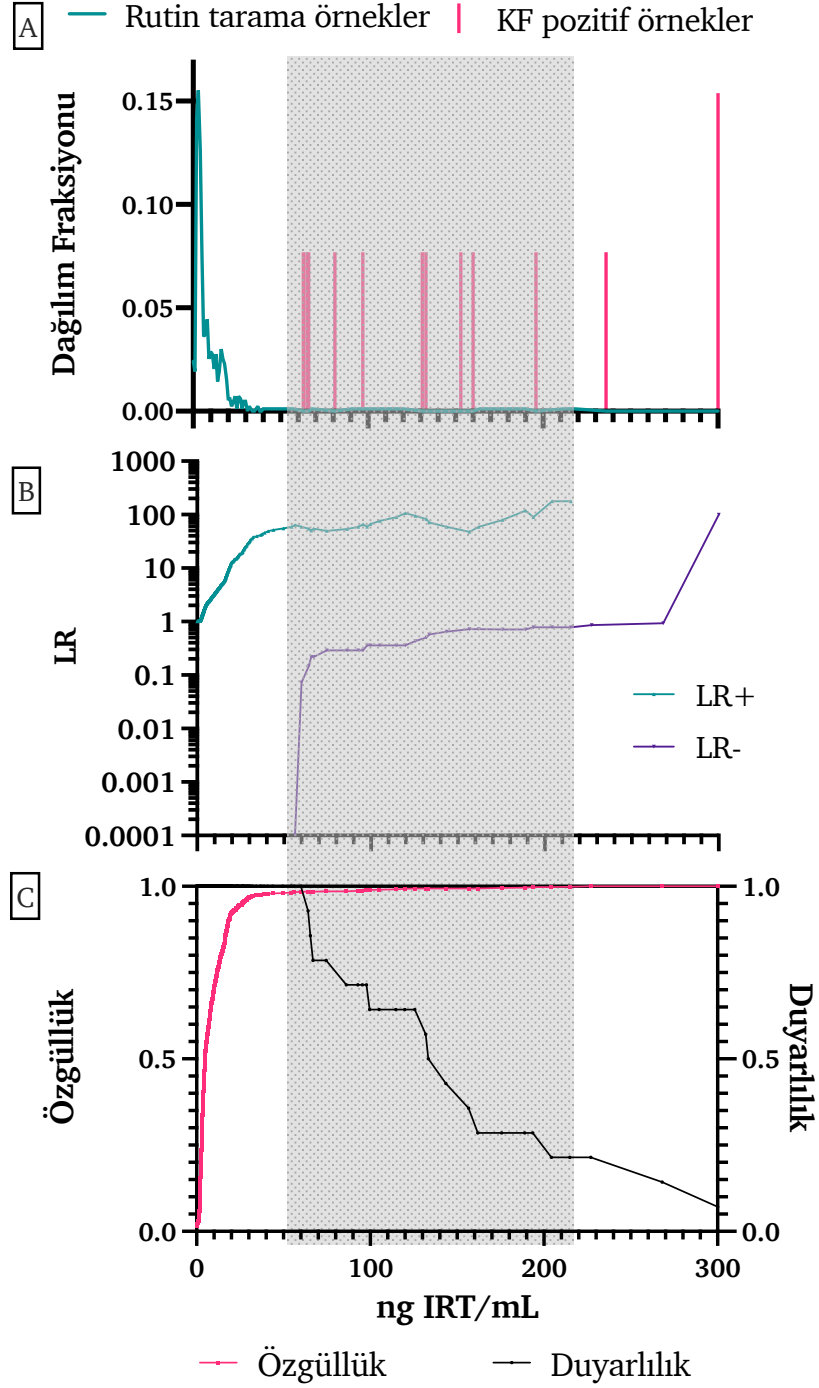
	MAM-IRT1	MAM-IRT2	MAM-IRTmix
Eğri altındaki alan (AUC)	0,9764	0,9855	1,000
Standart hata	0,009590	0,01260	0,000
95% Güven aralığı	0,9576 to 0,9952	0,9608 to 1,000	1,000 to 1,000
P değeri	<0,0001	<0,0001	<0,0001

ROC analiz sonucuna göre, MAM-IRTmix kitinin, HSGM tarafından kullanılan IRT kiti ile duyarlılık ve özgüllük bakımından elde edilen 1.000 AUC değeri, %100 uyumlu olduğunu göstermektedir. Tarama programlarında kullanılan kitin IRT1 formuna yönelik olması sebebiyle %100 uyumlu olması beklenen MAM-IRT1 kiti için hesaplanan 0,9764 AUC değeri; MAM-IRT1 kitinin klinik performansının nispeten daha düşük olduğunu göstermektedir.

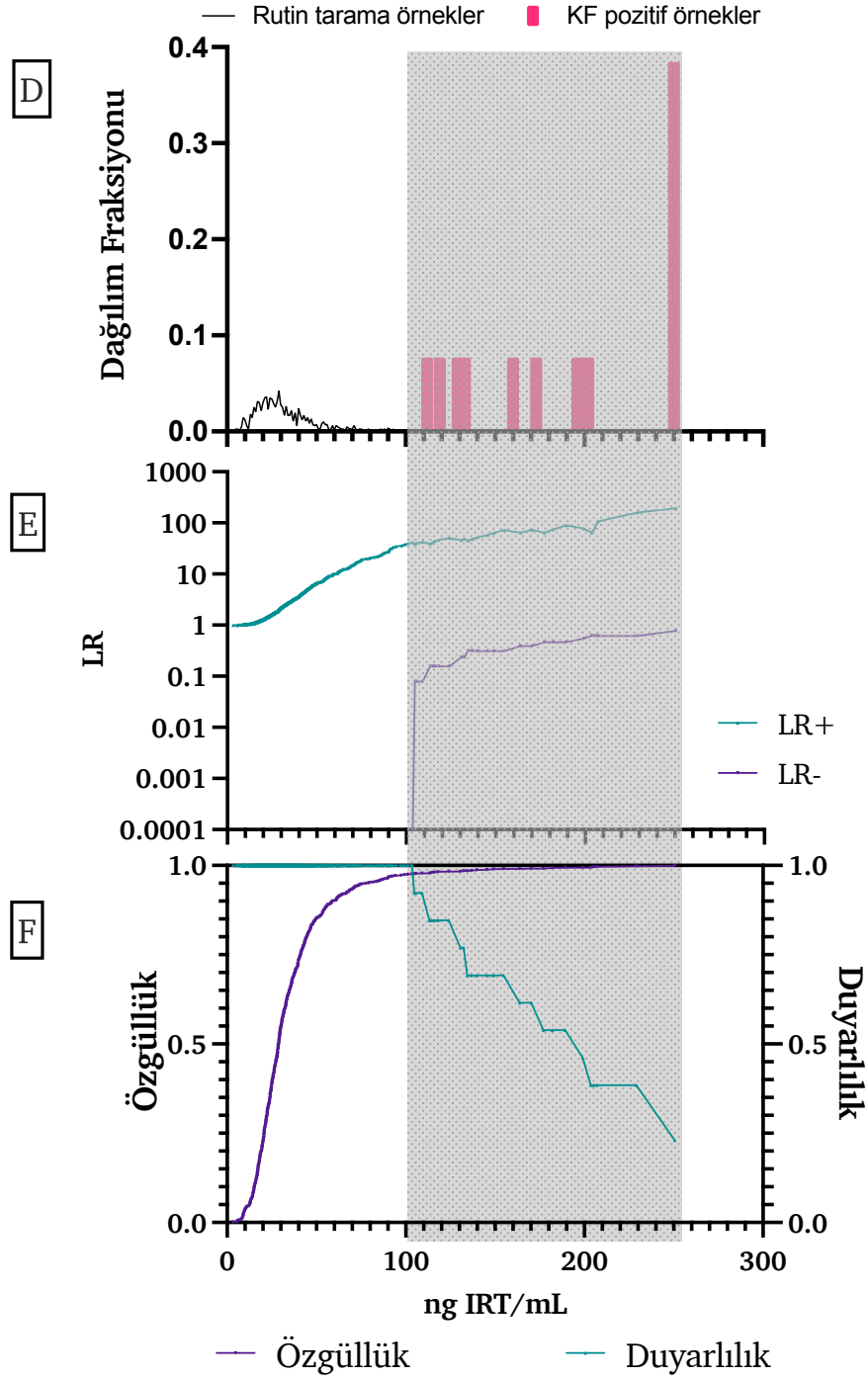
MAM-IRT2 kiti için hesaplanan 0,9855 AUC değeri ise MAM-IRT2 kitinin HSGM tarafından kullanılan IRT tarama kitine göre %98,55 uyumlu olduğunu göstermektedir. MAM-IRT2 kiti genel kullanılan yöntemden farklı bir IRT formuna

yönelik geliştirilmiş bir kit olması sebebiyle %100 uyumlu çıkmamasının sebebi daha seçici bir yöntem olmasından kaynaklanabilir. Bu sebeple, altın standart yönteminin bulunmadığı veya uygulanamadığı durumlarda kullanılan Bayes istatistik yöntemi ile MAM-IRT2 sonuçları analiz edildi ve HSGM sonuçları ile karşılaştırıldı. Bunun için yenidoğan taraması yapılan ve KF tanı sonucu bilinmeyen 831 yenidoğan kan örneğinde IRT miktarlarının örneklerdeki dağılım grafiği çizildi (Şekil 4. 31-A). ROC analizinden IRT değerlerine karşılık gelen pozitif olma olasılığı (Positive likelihood ratio, LR+), negatif olma olasılığı (Negative likelihood ratio, LR-) eğrileri çizildi (Şekil 4. 31-B) ve grafik üzerinde “min LR-” ve “max LR+” aralığı gri bölge olarak belirlendi. Şekil 4. 31-C’de IRT konsantrasyonuna karşılık Özgüllük-Duyarlılık grafiği çizilerek belirlenen gri bölge grafik üzerinde gösterildi.

Karşılaştırmak için HSGM tarafından ölçülen IRT miktarlarının örneklerdeki dağılım grafiği çizildi (Şekil 4. 32-D). ROC analizinden IRT değerlerine karşılık gelen pozitif olma olasılığı (Positive likelihood ratio, LR+), negatif olma olasılığı (Negative likelihood ratio, LR-) eğrileri çizildi (Şekil 4. 32-E) ve grafik üzerinde “min LR-” ve “max LR+” aralığı gri bölge olarak belirlendi. Şekil 4. 32-F’de IRT konsantrasyonuna karşılık Özgüllük-Duyarlılık grafiği çizilerek belirlenen gri bölge grafik üzerinde gösterildi.



Şekil 4. 31 MAM-IRT2 kiti rutin tarama örnekleriyle ve KF pozitif örneklerle yapılan gri bölge belirleme çalışması. A: histogramları sonuçları; B: MAM-IRT2 kitinin gri bölgesi $LR+ = 154$ ve $LR- = 0.001$; C: MAM-IRT2 duyarlılık özgüllük grafiği



Şekil 4. 32 HSGM rutin tarama ve KF pozitif IRT test sonuçlarıyla yapılan gri bölge belirleme çalışması. D: histogramları sonuçları. E: HSGM'nün sonuçları için hesaplanan gri bölge $LR+ = 192$ ve $LR- = 0.001$; F: HSGM duyarlılık özgüllük grafiği

Grafikler üzerinde gösterilen gri alanlar, yanlış negatif ve yanlış pozitif örneklerin bulunma ihtimallerinin yüksek olduğu alanı göstermektedir. IRT2 seviyeleri

ölçülen 831 örnekteki konsantrasyonlarına göre gri alan ve dışındaki bölgelerde bulunan örneklerin istatistikleri Tablo 4. 2’de düzenlendi.

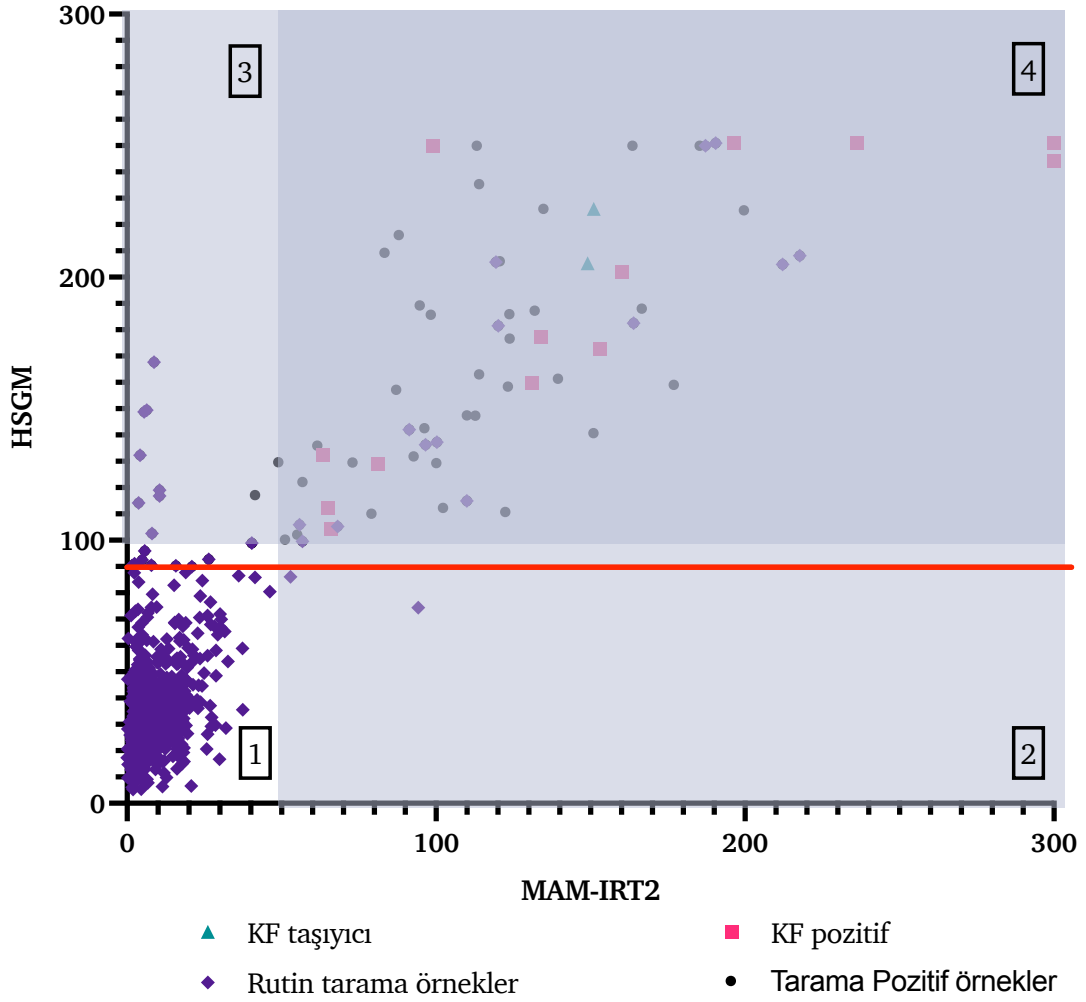
Tablo 4. 12 Gri alan ve dışındaki bölgelerde ölçülen IRT konsantrasyonların istatistikleri

Bölge	IRT testi	IRT konsantrasyonu	Fraksiyon	%	Örnek Sayısı
Negatif	MAM-IRT2	<50 ng/mL	0,981	98,1	815
	THSK	<100 ng/mL	0,972	97,2	808
Gri bölge	MAM-IRT2	>60 ng/mL	0,019	1,9	16
	THSK	>100 ng/mL	0,028	2,8	23
Cut-off üstü	THSK	90ng/mL	0,0373	3,73	28

831 rutin tarama örneğinin incelenmesi KF gibi bir nadir hastalık için az olsa da IRT2 değerlerinin istatistiksel dağılımını görmek açısından uygun görülebilir. Ülkemizde yapılan KF tarama testinde genel uygulama olarak IRT testi cut-off üstü olan her örnek tekrar örnekleme yapılarak IRT testi ile tekrar test edilir. Yani kullanılan cut-off gri bölgenin alt sınırındır. Tablo 4.11’deki sonuçlar incelendiğinde, hesaplanan gri bölge rutinde HSGM tarafından elde edilen sonuçlarda %97,2’lik kısmı negatif grupta yer aldı ve %2,8 kısım ise gri bölgede tespit edildi. HSGM’nün kendi uyguladığı cut-off değeri üstünde ise %3,7’lik bölge tarama pozitif olarak değerlendirildi. MAM-IRT2 kitinde ise; %98,1’lik kısım negatif olarak değerlendirilirken, %1,9’luk kısım gri bölge olarak değerlendirildi. HSGM tarafından uygulanan cut-off gri bölge altında %97’lik dilimi, HSGM tarafından kullanılan kit ile %93,1’lik dilimi ayırdığı görüldü. Gri bölgenin MAM-IRT2 kitinde %2,77’lik bir kısmı, HSGM’de ise %4,69’luk bölgeyi kapsadığı görüldü. Bu sonuçlara göre; test edilen rutin tarama örneklerinden en yüksek sayıda örneği HSGM’nin uyguladığı cut-off ile belirlendi. Tabi ki HSGM’nin kullandığı cut-off daha az yanlış negatif sonuç elde etmek için yaptıkları tüm geçmiş tarama sonuçlarını inceleyerek elde edilmiş cut-off değeridir. Literatürde farklı tarama programlarında kullanılan cut-off değerleri 70-100 ng/mL IRT arasında olduğu belirtilmiştir [62]. Bu değişkenliğin kaynağı kısmen kullanılan kitlerin farklılığı olabileceği gibi, araştırmalarda gözlemlendiği gibi farklı etnik

kökenlere, bebeklerin beslenmesine göre sağlıklı bebeklerde bulunan IRT değerinin değişkenlik göstermesi de olabilir [42].

IRT testinin yenidoğan tarama testi olarak kullanılması; yenidoğan bebeklerin KF negatif yaklaşık %98-99'luk kısmının ayrılması, geri kalan %1-2'lik kısımda kalan bebeklerin tekrar teste çağrılıp test tekrar edilmesi ve sonrasında daha pahalı ya da uygulanması zor testlerin uygulanarak tanı konmasını sağlamaktır. Bu sebeple, tarama testiyle daha çok doğru negatif elde etmek; fazladan yapılacak testlerin sebep olacağı maddi ve manevi yükün azalmasında önemlidir. Tarama testinde MAM-IRT2 testiyle daha az rutin tarama örneğinin gri bölgede elde edilmesinin, IRT2 formunun KF tanısında daha spesifik olup olmadığına karar verebilmek için, test edilen bütün bebek kanlarının, MAM-IRT2 kit sonuçları ve HSGM tarafından ölçülen IRT sonuçları ile korelasyon çalışması yapılarak karşılaştırıldı (Şekil 4. 33).



Şekil 4. 33 MAM-IRT2 kit sonuçları ve HSGM tarafından ölçülen IRT sonuçları ile korelasyon çalışması. 1. bölge: her iki yöntem ile tarama negatif bulunan bölge; 2. bölge MAM-IRT2 kitiyle tarama pozitif bulunan örnekler; 3. bölge HSGM tarafından pozitif bulunan örnek; Koyu gri bölge (4. bölge) her iki yöntem ile tarama pozitif bulunan bölge

Şekil 4. 33'deki grafik incelendiğinde; 3. bölgede bulunan örneklerde çok düşük miktarda IRT2 tespit edilmiştir. KF'lu bebeklerde hastalık sebebiyle oluşan pankreatitis kandaki IRT1 ve IRT2 seviyesini yükselttiği bilindiği için, 3. bölgedeki bebeklerin yanlış pozitif olabileceği düşünülebilir. Normalde KF yenidoğan taraması kapsamında bu bebeklere ter testi uygulanarak tanı KF hastası olup olmadığı belirleniyordu, fakat ter testinin SGK kapsamı dışına çıkması sebebiyle bu bebeklerin kesin durumu tarama programında belirlenemedi.

2. bölgede elde edilen iki sonuç literatürde kullanılan cut-off değerleri (70-100ng/mL [62]) aralığında olduğu için bu bebeklerin daha detaylı incelenmesi, sonuçların yanlış negatif (HSGM sonucuna göre) veya yanlış pozitif (MAM-IRT2 kiti sonucuna göre) olup olmadığının belirlenmesi için gereklidir. Fakat bu işlem tez çalışması kapsamı dışında kalmaktadır.

Şekil 4. 33'deki grafik üzerinden hesaplanan r değerleri hesaplandı (Tablo 4. 13). Sonuçlar incelendiğinde; KF pozitif olan örneklerin HSGM ve MAM-IRT2 sonuçlarının ilişkili olduğu, yenidoğan tarama pozitif ve rutin tarama örneklerinden elde edilen sonuçların ise zayıf ilişkili olduğu görüldü.

Tablo 4. 13 Korelasyon çalışması r değerleri tablo

	MAM-IRT2
KF Pozitif	0,8048 (n= 14)
Yenidoğan tarama Pozitif (HSGM sonucuna göre)	0, 6087 (n=84*)
Rutin tarama	0,4678 (n=800)

*53 tarama pozitif örnek + 31 rutin tarama içerisinde tarama pozitif çıkan örnekler

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

KF yenidoğan tarama programı ve bu amaçla uygulanan IRT testi 1980’li yıllarda kullanılmaya başlanmış, günümüzde birçok ülkenin yenidoğan tarama programına girmiş ve ülkemizde de 2015 yılında uygulanmaya başlamıştır. Ülkemizde KF yenidoğan taramalarının başlatılmasıyla hazırlığı ve ön çalışmaları başlayan TÜBİTAK’ın 115S124 numaralı SBAG projesi kapsamında gerçekleştirilen bu tez çalışmasının esas amacı, yenidoğan bebeklerde KF hastalığı açısından zorunlu tarama testleri arasına giren IRT tarama kitinin geliştirilmesi ve yerli olarak üretilmesine öncü olmaktır. Bu amacın yanı sıra, uygulanmaya başladığından beri hala geliştirilmekte olan kistik fibroz yenidoğan tarama programlarındaki farklı bakış açılarının değerlendirilebilmesi için farklı IRT formlarını (IRT1 ve IRT2) tanıyan kit modelleri geliştirmek ve mevcut taramada kullanılan kit ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede, hem literatürde az sayıda bulunan çalışmalara katkıda bulunmak, hem de ülkemiz için en ekonomik ve etkin tarama protokolünün geliştirilmesi için katkısağlamaktır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışma sonuçları ve literatür karşılaştırmaları, geliştirilen ürünler ve kullanım alanları, geliştirilen ürünlerin maliyet analizi ve yerli üretimin ekonomiye katkısı bu bölümde aşağıdaki başlıklar altında tartışılmıştır.

5.1 Tez Çalışması Kapsamında Geliştirilen Ürünler ve Kullanım Alanları

Tez çalışmaları kapsamında IRT molekülünün IRT1 ve IRT2 formlarına spesifik 10 adet antikor ve KF yenidoğan tarama programlarında kullanılmak üzere 3 adet kit modeli geliştirildi. Geliştirilen antikorların tanıdığı IRT formları ve bu antikorların kullanılabilirliğinin test edildiği yöntemler Tablo 5. 1’de özetlendi.

Tablo 5. 1 Geliştirilen antikorların tanıdığı IRT formları ve bu antikorların kullanılabilirdiğinin test edildiği yöntemler

Monoklonal Antikor adı	Ig tipi	IRT1				IRT2				IRT3	
		Sandviç ELISA	Dolaylı ELISA	İnhibitör-yakalayıcı ELISA	Western Blot	Sandviç ELISA	Dolaylı ELISA	İnhibitör-yakalayıcı ELISA	Western Blot	Sandviç ELISA	Dolaylı ELISA
MAM-7G2	IgG2a, κ	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
MAM-13C9	IgG1, κ	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
MAM-6D1	IgG1, κ	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MAM-7A11	IgG1, κ	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
MAM-1E4	IgG1, κ	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MAM-10B10	IgG1, κ	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
MAM-11F9	IgG1, κ	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
MAM-4B2	IgG1, κ	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
MAM-7E10	IgG1, κ	+	-	-	N.A.	+	+	+	N.A.	N.A.	-

Not: Sandviç ELISA için 0.2-3ng/kuyu, dolaylı ELISA için 100ng/kuyu antijen konsantrasyonlarında test edildi.

5.2 Geliştirilen IRT Kit Modellerinin Maliyet Analizi ve Ekonomik Katma Değerinin İncelenmesi

Geliştirilen IRT kit modellerinin tanı kiti olarak satışa sunulabilmesi için gerekli olan tekrar edilebilirlik ve özgünlük testleri, laboratuvar optimizasyonu, saha testleri ve raf ömrü çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Geliştirilen kit modellerinin analiz performanslarının belirlenmesi ve ticari ürüne dönüştürülmesi için yapılan bu çalışmalar yetersiz kalmaktadır. KF'un nadir hastalık olması sebebiyle, analiz performanslarının belirlenebilmesi için yapılacak olan saha çalışmalarında her bir kit modeli için 10.000 test olmak üzere, toplamda en az 30.000 test yapılması öngörülmektedir. Bu kapsamda gerekli olan malzeme ve üretim maliyet bedelleri dikkate alınarak yapılan hesaplamalar iş paketleri üzerinden Tablo 5. 2'de sunulmaktadır. Burada verilen toplam rakam, 3 model kit için yapılacak saha çalışmasında kullanılacak ELISA kitlerinin üretimine yönelik olarak gerçekleştirilecek iş paketlerinin maliyetini içermektedir.

Tablo 5. 2 ELISA kitlerinin üretimine yönelik maliyet analizi (2019 Dolar kuruna göre hesaplandı)

İş Paketleri	Genel Maliyet (TL)
Monoklonal antikorların lab ölçek üretimi, saflaştırma, enzim/biotin ile işaretleme işlemleri	5500
Antikor Karakterizasyon, kontrol ve optimizasyon işlemleri (ELISA, SDS Page, İmmunblotting, kaplama ve konjugat optimizasyonları, kit raf ömrü çalışmaları)	16.000
Standart spot üretimi işlemleri (Antijen ve karakterizasyon işlemleri, kan ve membran örneklerinin hazırlanması)	13.900
ELISA kit bileşenleri (ELISA plakları, kaplama, bloklama, stabilizatör, substrat kimyasalları ve çeşitli tampon kimyasalları)	68.000
TOPLAM	103.400

Hedeflenen ürünün eldesi için çalışmada kullanılacak miktara bağlı olarak, hücre kültüründe tek kullanımlık malzemeler, diğer kimyasallar ve tüm sarf giderlerinin toplamı 103.400 TL olarak belirlenmiştir. Burada altyapı, cihaz maliyetleri, bakım-onarım ve personel ihtiyacı gibi kalemlerin hiçbiri dikkate alınmamıştır. Buna göre 1 plaklı ELISA analiz (96 test) kitinin değeri; 172,33 TL olarak hesaplanmış, test başına maliyet 1,96 TL olarak belirlenmiştir. Sunulan üretim maliyetleri başlangıç olarak optimizasyon, validasyon ve verifikasyon adımlarının tümünü içermektedir. Kullanılacak sarf miktarları perakende alım fiyatları üzerinden hesaplanmıştır. Seri üretime yönelik olarak, büyük ölçek üretimde yüksek miktar alımlarda maliyet bedellerinin %20-30 kadar düşmesi beklenmektedir. Tablo 5.3'te de görüldüğü üzere, yurtdışı satış bedelleri verilen IRT kitlerinde test başına maliyet yaklaşık 21 TL'dir, bu bedel yerli üretimin 10.7 katıdır.

Ürünlerin üretim maliyetleri ve satış bedelleri arasındaki fark ekonomik katma değerini ortaya koymaktadır. Bu katma değer biyoteknolojik ürünlerde hammaddenin yerli kaynak teminiyle arttırılabilmektedir. Ülkemizde biyoteknolojik ürün üretiminde kullanılan birçok malzeme (kullanılan antikorlar, antijenler, tek kullanımlık steril hücre malzemeleri, ELISA plakları, bazı enzim ve işaretler ve kimyasallar) tümüyle yurtdışından temin edilmekte bu da ciddi bir ekonomik kayıp ve dezavantaj yaratmaktadır. Tez çalışması kapsamında yerli üretim maliyetinin düşük olmasındaki en önemli nokta, kitlerin üretiminde kritik

hammadde olan monoklonal antikorların tarafımızca geliştirilerek üretilmesidir. Bu nedenle en büyük harcama kalemini oluşturabilecek antikorların yerli üretimi ile maliyetin düşmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanında standart (kalibratör) eldesinde kullanılabilecek rekombinant (IRT1 ve IRT2) proteinlerin de yerli üretimi toplam maliyete olumlu etki yaratabilecektir.

Tablo 5.3 KF analiz kitlerinin piyasa fiyatları

Kit marka-model	Yöntem	Yurtdışından alınan teklif fiyatı (Vergiler ve nakliyat hariç)	Fiyat /test
MAM-IRT1 MAM-IRT2 MAM-IRTmix	Sandwich ELISA- IR1/ IRT2 / IRTmix (kolorimetrik/fluorometrik)	44.7 € / 50 USD 344.66 TL (2x96 test)	1.95 TL
MP BIOMEDICALS (France)-7596307	Sandwich ELISA - IRT1 (kolorimetrik)	240 USD / 1848 TL* (2x96 test)	21 TL
ZenTech (E-KR-192/ E-KR-480)	Sandwich ELISA (kolorimetrik) -IRT1	250 Euro /1925 TL (2X96 test)	21.9 TL
DRG (Germany) (EIA-1278 (Vers. 2.1))	Sandwich ELISA (kolorimetrik)- IRT	230 Euro /1771 TL (2x96 test)	20,13 TL
IBL (Germany)-RE53275/RE53279	Sandwich ELISA - IRT 1 and IRT 2 (Luminescence Immunoassay)	Fiyat henüz alınamadı.	-
Labsystem (Neonatal IRT FEIA)	Sandwich ELISA (fluorometrik enzim immunoassay) - IRT1	Fiyat verilmedi	-

* Aynı ürün için arge projesi kapsamında, yurt içi bir firma aracılığı ile (19.10.2018'de) yapılan satın alma işlemleri sonucunda 475 € kit bedeli ödenmiştir. Bu fiyat yurtdışı satış bedelinin yaklaşık 2 katıdır. Aracı firmanın kar oranı, gümrük ve diğer tüm vergiler eklendiğinde satın alma maliyeti oldukça yükselmektedir.

Emsal IRT tarama kitlerinin test fiyatı büyük ölçek satış durumunda da 10-20 TL arasında olabilmektedir. Bizim öngördüğümüz IRT kit maliyeti test başına 2 TL civarındadır ve böylece en az test başına 8 TL fark oluşmaktadır. Bu fark, Türkiye içinde yılda 1300.000 IRT testi göz önüne alınırsa yılda yaklaşık 10 milyon TL ekonomik kazanç anlamına gelecektir. İlgili ürünlerin ihracatı gerçekleştiğinde ise 100 milyon TL satış öngörülebilir.

5.3 Tez Çalışması Kapsamında Elde Edilen Sonuçlar ve Literatürle Karşılaştırması

Tez çalışması kapsamında; KF yenidoğan taramalarında kullanılmak üzere geliştirilen kit modelleri kimyasal spesifikasyonları belirlendikten sonra, Ankara HSGM merkezinde yapılan saha çalışmalarında bebek topuk kan spotları test edilerek klinik performansı test edildi. MAM-IRT1 kiti saha çalışmalarında düşük performans gösterdi (yüksek yanlış pozitif, düşük spesifite). IRT1 ve IRT2 formlarını tek bir ELISA sisteminde tespit etmek amacıyla tez çalışmasının son döneminde geliştirilen MAM-IRTmix kiti ile MAM1 ve MAM-IRT2 kitine kıyasla daha az bebek spot kan örneği test edildi. Ayrıca, ter testi uygulanamaması sebebiyle KF pozitif bebek spot kan örnekleri tespit edilemediği için; MAM-IRTmix ile KF pozitif örnek test edilemedi. Hem az sayıda numune test edilmesi hem de KF pozitif örnek test edilemediği için, kit performansı tam anlamıyla irdelenemese de test edilen 538 rutin tarama ve 25 tarama pozitif bebek topuk kan spotu ile elde edilen sonuçlar HSGM'nün IRT sonuçlarıyla %100 uyumlu bulundu.

MAM-IRT2 ELISA modeli ise HSGM'nün sonuçlarıyla daha az uyumlu çıkmıştır. Uyumsuzluk; HSGM tarafından tarama pozitif bulunan örneklerin MAM-IRT2 kiti ile tarama negatif olarak belirlenmesinden kaynaklanmaktadır. Kullanılan tarama programında, tarama pozitif bir örneğin gerçek pozitif olma ihtimali yaklaşık %10 olduğu için, daha düşük sayıda yanlış pozitif sonuç elde edilebilecek bir yöntem daha avantajlıdır. HSGM'nün ve MAM-IRT2 sonuçlarının korelasyonuna bakıldığında; KF pozitif örneklerin sonuçlarının ilişkili olması, literatürdeki “KF”lu bebekler IRT1 ve IRT2 seviyeleri doğumdan sonraki ilk haftalarda yüksek seyreder” bilgisini desteklemektedir [37]. KF yenidoğan tarama negatif bebeklerden elde edilen HSGM-MAM-IRT2 korelasyonunun düşük ilişkili olması, normal bebeklerde IRT miktarlarının farklı seviyelerde bulunduğunu desteklemektedir. Tarama pozitif KF pozitif sonuçların IRT2 değerleri HSGM tarafından uygulanan klasik yöntemle ölçülen IRT sonuçlarıyla ilişkili çıkması ise bu veriyi desteklemektedir.

Tarama pozitif sonuçların farklılık göstermesi klasik yöntemle ve IRT2 kiti ile belirlenen tarama pozitif bebeklerin incelenmesi KF tarama programının geliştirilmesi için önemlidir. Literatürde, IRT1 ve IRT2 değerleri KF'lu bebeklerde doğumdan sonraki haftalarda yüksek seviyede bulunduğu bilgisi bulunmaktadır. Bu sebeple klasik yöntemle ölçülen IRT1 miktarının veya IRT2 kiti ile ölçülen IRT2 miktarının düşük olduğu durumlar için KF negatif olması ihtimali yüksektir. Fakat Yüksek veya düşük IRT konsantrasyonlarının sınırlarını yani cut-off belirlemek kilit noktadır. Uygulanan KF yenidoğan tarama protokollerinde belirlenen bir IRT konsantrasyonu kullanılabileceği gibi, yenidoğan bebeklerin belli bir yüzdesinin (%1-2) yüksek kabul edildiği floating cut-off değerleri de kullanılabilir. Floating cut-off mevsimsel ısı ve nem değişikliklerine [74] bağlı örneklerde meydana gelen IRT değişimlerinin tarama sonuçlarını etkilemesinin önüne geçmek için etkilidir. Fakat IRT1 değerlerinin etnik köken [70], [75]–[77], beslenme çeşiti (anne sütü/ek gıda)[42] gibi hastalık dışı sebeplerle yüksek seviyelerde bulunması; floating veya sabit cut-off değeri kullanımında, görece düşük seviyedeki KF pozitif bebeklerin tespit edilememesine veya yanlış pozitif oranının artmasına sebep olmaktadır.

IRT2'nin normal bireylerde IRT1'e kıyasla daha düşük seviyelerde bulunması; KF'li bireylerde IRT1'e yakın konsantrasyonlarda bulunduğu bilgisi literatürde bulunmaktadır [37]. Buna ek olarak, literatürde IRT2 seviyesinin yükseldiği durumlar genellikle hastalık alakalı durumlardır [39], [78]. Bu sebepler göz önüne alınarak, IRT2'nin de KF yenidoğan taramalarında kullanılması ile yenidoğan tarama programının daha etkin çalışacağı öne sürülmüştür [37]. Literatürde IRT2 nin markır olarak kullanıldığı çok az çalışma vardır [37], [79]. Bu tez çalışmasında alınan sonuçlarda, IRT2'nin IRT1'e kıyasla daha düşük seviyelerde bulunduğu ve KF'lu bebeklerde IRT1 ile benzer seviyeler yükseldiği görüldü.

Sağlıklı bir toplum ve kaliteli bir yaşam için hastalıkların erken teşhisi hayati önem taşımaktadır. Ülkemizde kit üretiminin istenen düzeyin çok gerisinde olması dışa bağımlılık yaratmakta ve tanı kitlerinin temini konusunda halen çok büyük kaynak

yurtdışına aktarılmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında ülkemizde tıbbi tanı kitlerinin geliştirilmesi için gerekli olan bilimsel ve teknolojik potansiyelin harekete geçirilmesine önemli katkı sağlamıştır.

5.4 Öneriler

MAM-IRT1 sandviç ELISA modelinin daha yüksek performan gösterebilmesi için ürün geliştirme çalışmaları devam etmelidir.

MAM-IRT2 sandviç modeli, yenidoğan taramalarına yönelik geliştirilmiş ve piyasada muadili olmayan bir üründür. MAM-IRT2 sandviç ELISA modelinin pilot ölçekte (10.000-100.000 örnek) yenidoğan taramasında test edilmesi, klinik performansını ve işleyişini görmekte faydalı olacaktır. Bunun yapılabilmesi için, yani IRT1 veya IRT2 formunun ayrı ayrı tespit edilmesi ve limit dışı tespit edilen bebeklerin ter testi ile KF tanısının konması gerekmektedir.

MAM-IRTmix, IRT1 ve IRT2 formlarına yönelik iki farklı kaplama antikoru ve 2 farklı antikor-enzim konjugatı içeren bir sandviç ELISA modeli olduğu için, KF pozitif ve KF negatif olduğu bilinen bebek kan spotları ile test edilerek etkinliğinin irdelenmesi önemlidir. Elde edilen bilgiler ışığında iki formun aynı anda tespit edilmesinin yenidoğan taramalarında kullanımının göstereceği faydayı ortaya koyacaktır.

-
- [1] T. MacKenzie vd., “Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: Survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry”, *Ann. Intern. Med.*, 2014, doi: 10.7326/M13-0636.
- [2] Cystic Fibrosis Foundation, “Cystif Fibrosis Patient Registry 2018 Annual Data Report”, *Lung*, 2018, [Çevrimiçi]. Available at: <http://www.cff.org/UploadedFiles/research/ClinicalResearch/Patient-Registry-Report-2009.pdf>.
- [3] G. R. Cutting, “Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application”, *Nature Reviews Genetics*. 2015, doi: 10.1038/nrg3849.
- [4] A. DH, “Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study”, *Am. J. Dis. Child.*, 1938.
- [5] P. B. Davis, “Cystic fibrosis since 1938”, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006, doi: 10.1164/rccm.200505-840OE.
- [6] J. S. Elborn, D. J. Shale, ve J. R. Britton, “Cystic fibrosis: Current survival and population estimates to the year 2000”, *Thorax*, 1991, doi: 10.1136/thx.46.12.881.
- [7] P. R. Burgel vd., “Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries”, *Eur. Respir. J.*, 2015, doi: 10.1183/09031936.00196314.
- [8] P. A. di Sant’Agnese, R. C. Darling, G. A. Perera, ve E. Shea, “Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease”, *Am. J. Med.*, 1953, doi: 10.1016/0002-9343(53)90169-7.
- [9] L. E. GIBSON ve R. E. COOKE, “A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis.”, *Pediatrics*, 1959.
- [10] A. F. Heeley ve D. Watson, “Cystic fibrosis - its biochemical detection”, *Clinical Chemistry*. 1983, doi: 10.1093/clinchem/29.12.2011.

- [11] J. R. Crossle, R. B. Elliot, ve P. A. Smith, "DRIED-BLOOD SPOT SCREENING FOR CYSTIC FIBROSIS IN THE NEWBORN", *Lancet*, 1979, doi: 10.1016/S0140-6736(79)90825-0.
- [12] S. J. Mayell vd., "A European consensus for the evaluation and management of infants with an equivocal diagnosis following newborn screening for cystic fibrosis", *J. Cyst. Fibros.*, 2009, doi: 10.1016/j.jcf.2008.09.005.
- [13] C. Castellani vd., "European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening", *Journal of Cystic Fibrosis*. 2009, doi: 10.1016/j.jcf.2009.01.004.
- [14] E. J. Sims vd., "Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost of illness retrospective cohort study", *Lancet*, 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)60565-0.
- [15] H. Levy ve P. M. Farrell, "New challenges in the diagnosis and management of cystic fibrosis", *Journal of Pediatrics*. 2015, doi: 10.1016/j.jpeds.2015.03.042.
- [16] G. Lightbody vd., "Review of applications of high-throughput sequencing in personalized medicine: Barriers and facilitators of future progress in research and clinical application", *Briefings in Bioinformatics*. 2019, doi: 10.1093/bib/bby051.
- [17] R. Busch, "On the history of cystic fibrosis.", *Acta Universitatis Carolinae. Medica*. 1990.
- [18] C. U. LOWE, C. D. MAY, ve S. C. REED, "Fibrosis of the pancreas in infants and children; a statistical study of clinical and hereditary features", *Am. J. Dis. Child.*, 1949, doi: 10.1001/archpedi.1949.02030050362008.
- [19] P. M. Quinton, "Chloride impermeability in cystic fibrosis", *Nature*, 1983, doi: 10.1038/301421a0.
- [20] J. R. Riordan vd., "Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA", *Science (80-.)*., 1989, doi:

10.1126/science.2475911.

- [21] M. A. Mall ve D. Hartl, “CFTR: Cystic fibrosis and beyond”, *Eur. Respir. J.*, 2014, doi: 10.1183/09031936.00228013.
- [22] S. Naehrig, C. M. Chao, ve L. Naehrlich, “Cystic fibrosis - Diagnosis and treatment”, *Dtsch. Arztebl. Int.*, 2017, doi: 10.3238/arztebl.2017.0564.
- [23] G. Researchers, *CYSTIC FIBROSIS, A BIBLIOGRAPHY AND DICTIONARY FOR PHYSICIANS, PATIENTS, AND GENOME RESEARCHERS.* .
- [24] F. Ratjen, S. C. Bell, S. M. Rowe, C. H. Goss, A. L. Quittner, ve A. Bush, “Cystic fibrosis”, *Nature reviews. Disease primers.* 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.10.
- [25] G. R. Oates ve M. S. Schechter, “Socioeconomic status and health outcomes: cystic fibrosis as a model”, *Expert Review of Respiratory Medicine.* 2016, doi: 10.1080/17476348.2016.1196140.
- [26] J. M. Rommens vd., “Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping”, *Science (80-.)*., 1989, doi: 10.1126/science.2772657.
- [27] B. S. Kerem vd., “Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis”, *Science (80-.)*., 1989, doi: 10.1126/science.2570460.
- [28] M. Mijnders, B. Kleizen, ve I. Braakman, “Correcting CFTR folding defects by small-molecule correctors to cure cystic fibrosis”, *Current Opinion in Pharmacology.* 2017, doi: 10.1016/j.coph.2017.09.014.
- [29] B. Farkas vd., “Discovering the chloride pathway in the CFTR channel”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2020, doi: 10.1007/s00018-019-03211-4.
- [30] “CFTR2 Variant List History”. <https://cftr2.org/resources>.
- [31] S. Corriveau, J. Sykes, ve A. L. Stephenson, “Cystic fibrosis survival: the changing epidemiology”, *Current opinion in pulmonary medicine.* 2018, doi: 10.1097/MCP.0000000000000520.

- [32] G. Travert, M. Heeley, ve A. Heeley, “History of newborn screening for cystic fibrosis - The early years”, *International Journal of Neonatal Screening*. 2020, doi: 10.3390/ijns6010008.
- [33] A. La Pean, M. H. Farrell, K. L. Eskra, ve P. M. Farrell, “Effects of Immediate Telephone Follow-Up with Providers on Sweat Chloride Test Timing after Cystic Fibrosis Newborn Screening Identifies a Single Mutation”, *J. Pediatr.*, c. 162, sayı 3, ss. 522–529, 2013, doi: 10.1016/j.jpeds.2012.08.055.
- [34] M. Schmidt vd., “Strategies for newborn screening for cystic fibrosis: A systematic review of health economic evaluations”, *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018, doi: 10.1016/j.jcf.2018.03.002.
- [35] M. J. Coffey vd., “Differences in Outcomes between Early and Late Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Newborn Screening Era”, *J. Pediatr.*, 2017, doi: 10.1016/j.jpeds.2016.10.045.
- [36] N. E. Çullas İlarslan, G. Özcan, D. N. Yıldırım, F. Günay, ve N. Çobanoğlu, “Kistik fibrozis yenidoğan taraması sonrası yönlendirilen bebeklerin değerlendirilmesi: dört yıllık tek merkez deneyimi”, *Turkish J. Pediatr. Dis.*, 2019, doi: 10.12956/tchd.533602.
- [37] B. A. Lindau-Shepard ve K. A. Pass, “Newborn screening for cystic fibrosis by use of a multiplex immunoassay”, *Clin. Chem.*, 2010, doi: 10.1373/clinchem.2009.132480.
- [38] S. F. Russo ve E. T. Wahl, “Autocatalytic activation of trypsinogen by trypsin”, *Journal of Chemical Education*. 1987, doi: 10.1021/ed064p83.
- [39] O. Itkonen, “Human trypsinogens in the pancreas and in cancer”, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2010, doi: 10.3109/00365511003615317.
- [40] B. L. Therrell, W. H. Hannon, G. Hoffman, J. Ojodu, ve P. M. Farrell, “Immunoreactive trypsinogen (IRT) as a biomarker for cystic fibrosis: Challenges in newborn dried blood spot screening”, 2012, doi:

10.1016/j.ymgme.2012.02.013.

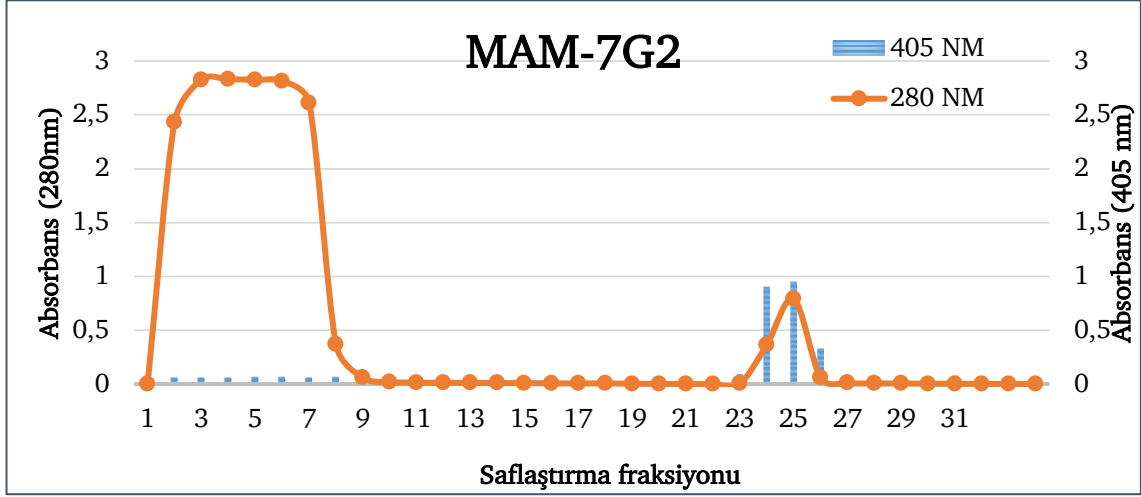
- [41] P. R. Durie, K. J. Gaskin, M. C. Geokas, M. O'Rourke, ve C. Largman, "Plasma immunoreactive anionic pancreatic trypsin in cystic fibrosis", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 1982, doi: 10.1097/00005176-198201030-00010.
- [42] E. Cortés, A. M. Roldán, A. Palazón-Bru, M. M. Rizo-Baeza, H. Manero, ve V. F. Gil-Guillén, "Differences in immunoreactive trypsin values between type of feeding and ethnicity in neonatal cystic fibrosis screening: a cross-sectional study", *Orphanet J. Rare Dis.*, 2014, doi: 10.1186/s13023-014-0166-9.
- [43] A. Singh, S. Chaudhary, A. Agarwal, ve A. S. Verma, "Antibodies", *Animal Biotechnology*. Elsevier, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-416002-6.00015-8.
- [44] A. Dasgupta, "Immunoassay Design and Mechanism of Biotin Interference", *Biotin and Other Interferences in Immunoassays*. Elsevier, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-816429-7.00001-0.
- [45] D. M. Webster, A. H. Henry, ve A. R. Rees, "Antibody-antigen interactions", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, c. 4, sayı 1, ss. 123–129, 1994, doi: 10.1016/S0959-440X(94)90070-1.
- [46] A. B. Kapingidza, K. Kowal, ve M. Chruszcz, "Antigen–Antibody Complexes", içinde *Subcellular Biochemistry*, 2020.
- [47] M. A. Partridge, Y. Chai, H. Zhou, ve T. K. Hei, "High-throughput antibody-based assays to identify and quantify radiation-responsive protein biomarkers", *Int. J. Radiat. Biol.*, c. 86, sayı 4, 2010, doi: 10.3109/09553000903564034.
- [48] "Overview of ELISA in Relation to Other Disciplines". 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-254-4_1.
- [49] "Systems in ELISA". 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-254-4_2.
- [50] S. J. Stewart, "Monoclonal antibody production", içinde *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, 2000.

- [51] M. D. Kellogg, “Measurement of Biological Materials”, içinde *Clinical and Translational Science: Principles of Human Research: Second Edition*, 2017.
- [52] A. C. Grodzki ve E. Berenstein, “Antibody Purification: Ammonium Sulfate Fractionation or Gel Filtration”. 2010, doi: 10.1007/978-1-59745-324-0_3.
- [53] J. B. Fishman ve E. A. Berg, “Antibody Purification and Storage”, *Cold Spring Harb. Protoc.*, c. 2019, sayı 5, 2019, doi: 10.1101/pdb.top099101.
- [54] S. Hober, K. Nord, ve M. Linhult, “Protein A chromatography for antibody purification”, *J. Chromatogr. B*, c. 848, sayı 1, 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.030.
- [55] Z. Grabarek ve J. Gergely, “Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters”, *Anal. Biochem.*, c. 185, sayı 1, 1990, doi: 10.1016/0003-2697(90)90267-D.
- [56] S. E. Winston, S. A. Fuller, M. J. Eveleigh, ve J. G. R. Hurrell, “Conjugation of Enzymes to Antibodies”, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, c. 50, sayı 1, 2000, doi: 10.1002/0471142727.mb1101s50.
- [57] J. W. GODING, “Nature of Antigens”, *Monoclonal Antibodies*. Elsevier, ss. 50–71, 1996, doi: 10.1016/B978-012287023-1/50052-3.
- [58] R. (EU) 2017/746 O. T. EUROPEAN ve P. A. O. T. COUNCIL, *On in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU*. .
- [59] A. Dirican, “TANI TESTİ PERFORMANSLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE KIYASLANMASI”, *Cerrahpaşa Tıp Derg.*, c. 32, sayı 1, 2014.
- [60] J. N. Mandrekar, “Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment”, *J. Thorac. Oncol.*, c. 5, sayı 9, 2010, doi: 10.1097/JTO.0b013e3181ec173d.
- [61] L. D. Broemeling, “Bayesian Methods for Medical Test Accuracy”, *Diagnostics*, c. 1, sayı 1, 2011, doi: 10.3390/diagnostics1010001.
- [62] O. Sommerburg vd., “Final results of the southwest German pilot study on

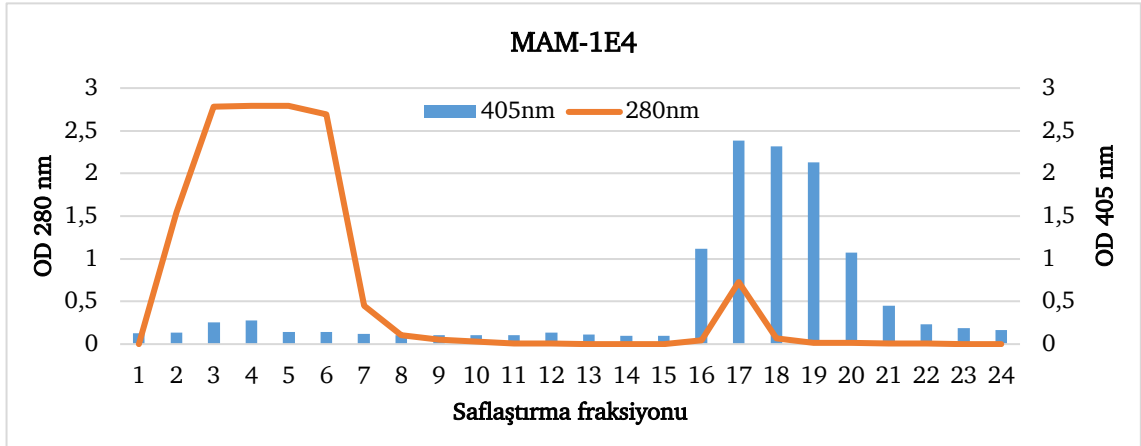
- cystic fibrosis newborn screening – Evaluation of an IRT/PAP protocol with IRT-dependent safety net”, *J. Cyst. Fibros.*, 2021, doi: 10.1016/j.jcf.2021.10.007.
- [63] K. M. Johnson, “Using Bayes’ rule in diagnostic testing: A graphical explanation”, *Diagnosis*, c. 4, sayı 3. 2017, doi: 10.1515/dx-2017-0011.
- [64] J. Coste ve J. Pouchot, “A grey zone for quantitative diagnostic and screening tests”, *Int. J. Epidemiol.*, c. 32, sayı 2, 2003, doi: 10.1093/ije/dyg054.
- [65] P. Y. CHEN ve P. M. POPOVICH, “CORRELATION: PARAMETRIC AND NONPARAMETRIC MEASURES”, *Correlation*. 2011, doi: 10.4135/9781412983808.n1.
- [66] B. Ergenoğlu vd., “ELISA-based competitive trypsin inhibition assay”, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, c. 35, sayı 1, 2021, doi: 10.1080/13102818.2021.1977697.
- [67] J. Crowther, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, içinde *Molecular Biomethods Handbook: Second Edition*, 2008.
- [68] E. Elias, T. Wood, ve M. Redshaw, “DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF CHANGES IN CIRCULATING CONCENTRATIONS OF IMMUNOREACTIVE TRYPSIN”, *Lancet*, c. 310, sayı 8028, 1977, doi: 10.1016/S0140-6736(77)90066-6.
- [69] L. Li, Y. Zhou, C. J. Bell, M. C. Earley, W. H. Hannon, ve J. V. Mei, “Development and characterization of dried blood spot materials for the measurement of immunoreactive trypsinogen”, *J. Med. Screen.*, c. 13, sayı 2, 2006, doi: 10.1258/096914106777589623.
- [70] T. K. CHRISTOPOULOS ve E. P. DIAMANDIS, “FLUORESCENCE IMMUNOASSAYS”, *Immunoassay*. Elsevier, ss. 309–335, 1996, doi: 10.1016/B978-012214730-2/50015-7.
- [71] “Newborn Screening Quality Assurance Program 2018 Annual Summary

- Report, Volume 36”, 2018. [Çevrimiçi]. Available at: https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/NSQAP_Annual_Summary_2018-508.pdf.
- [72] “Newborn Screening Quality Assurance Program 2019 Annual Summary Report, Volume 37”, 2019. [Çevrimiçi]. Available at: https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsqap/NSQAP_Annual_Summary_2019-508.pdf.
- [73] “Newborn Screening Quality Assurance Program 2020 Annual Summary Report, Volume 38”, 2020.
- [74] S. L. Martiniano, K. Croak, G. Bonn, M. K. Sontag, ve S. D. Sagel, “Improving outcomes for Colorado’s IRT-IRT-DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm by implementing floating cutoffs”, *Mol. Genet. Metab.*, c. 134, sayı 1–2, 2021, doi: 10.1016/j.ymgme.2021.08.005.
- [75] S. Dluholucký ve M. Knapková, “The first results of extended newborn screening in Slovakia-differences between the majority and the Roma ethnic group”, *Int. J. Neonatal Screen.*, c. 3, sayı 3, 2017, doi: 10.3390/ijns3030025.
- [76] A. E. Başaran, A. Başaran, D. F. Kocacik Uygun, Ö. Alper, D. Acican, ve A. Bingöl, “Initial regional evaluation of the cystic fibrosis newborn screening program: Data from the mediterranean coast of Turkey”, *Turkish J. Med. Sci.*, c. 49, sayı 6, 2019, doi: 10.3906/sag-1904-198.
- [77] R. Giusti vd., “Elevated IRT levels in African-American infants: Implications for newborn screening in an ethnically diverse population”, *Pediatr. Pulmonol.*, c. 43, sayı 7, 2008, doi: 10.1002/ppul.20824.
- [78] K. Cederqvist vd., “Pulmonary trypsin-2 in the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants”, *Pediatrics*, c. 112, sayı 3 I, 2003, doi: 10.1542/peds.112.3.570.
- [79] G. Morejón García vd., “Generation and characterization of murine

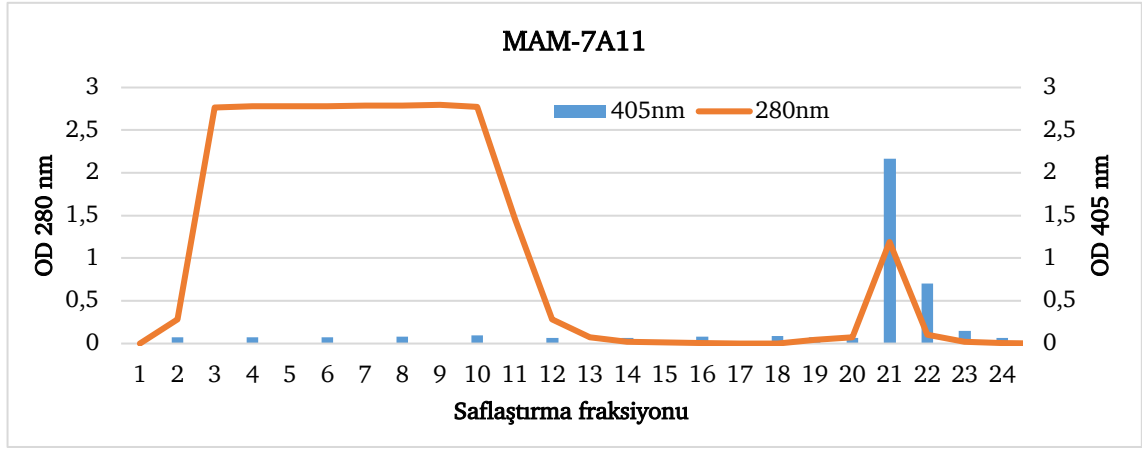
monoclonal antibodies against immunoreactive trypsinogen for newborn screening of cystic fibrosis”, *Anal. Biochem.*, c. 591, 2020, doi: 10.1016/j.ab.2019.113569.



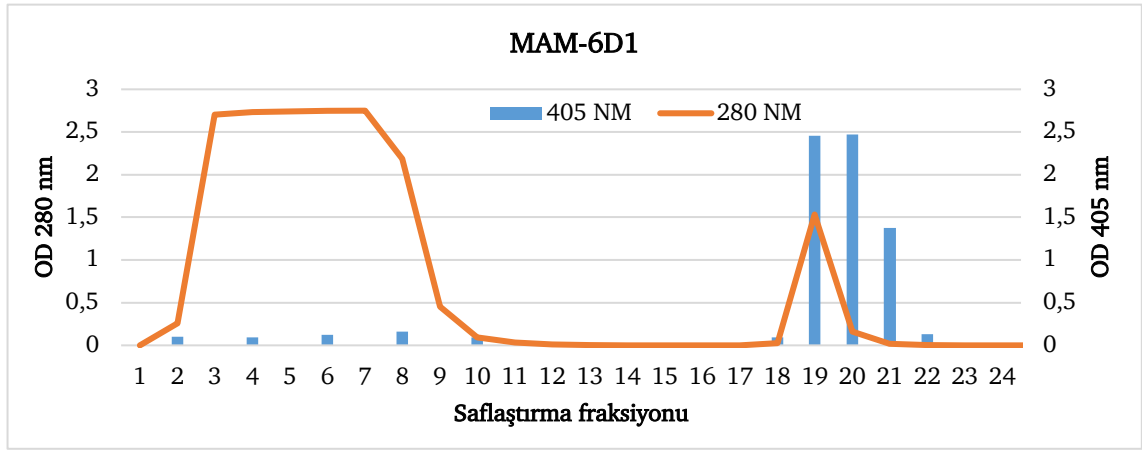
Şekil A. 1 Anti-IRT MAM-7G2 Monoklonal antikorunun Protein A immunokromatografi saflaştırma sonuçları



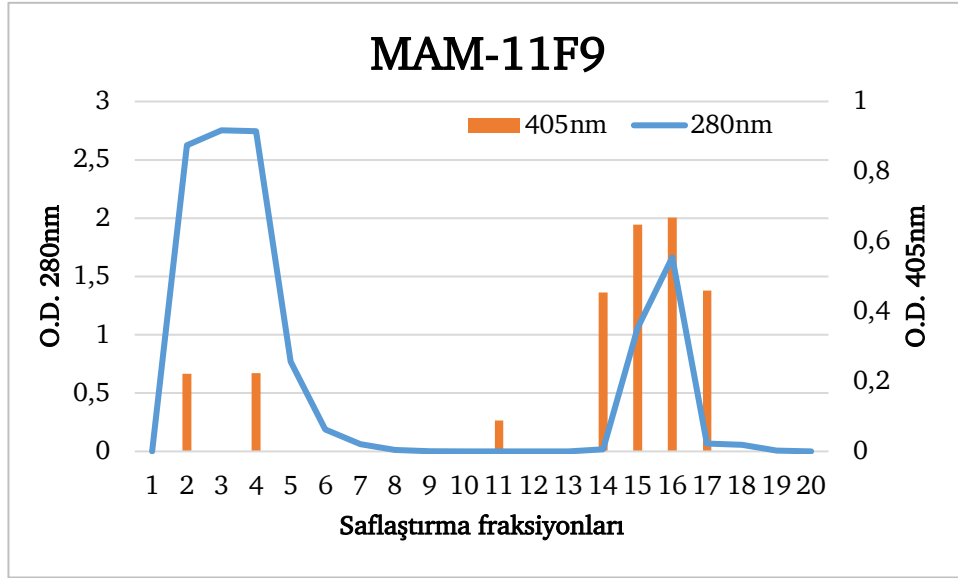
Şekil A. 2 Anti-IRT MAM-1E4 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları



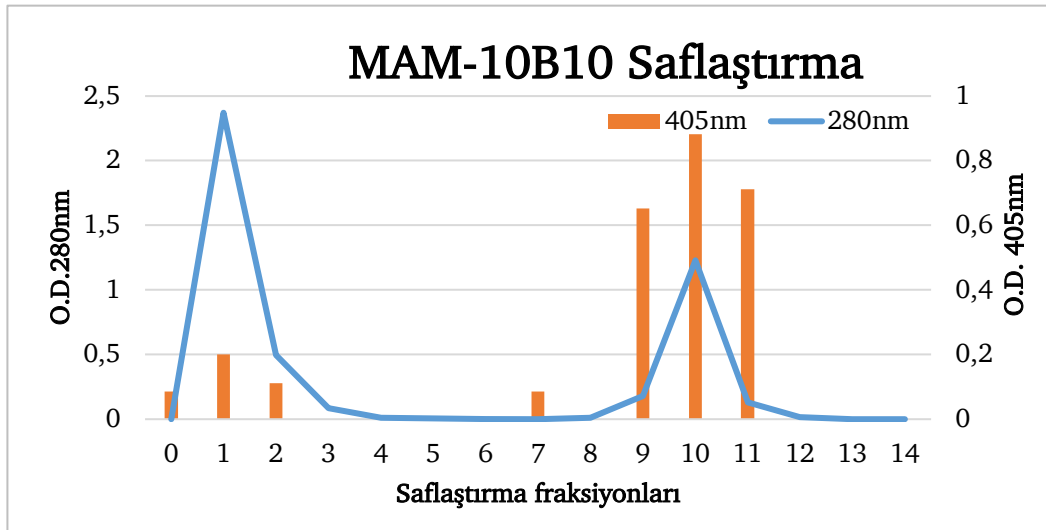
şekil A. 3 Anti-IRT MAM-7A11 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi safıştırma sonuçları



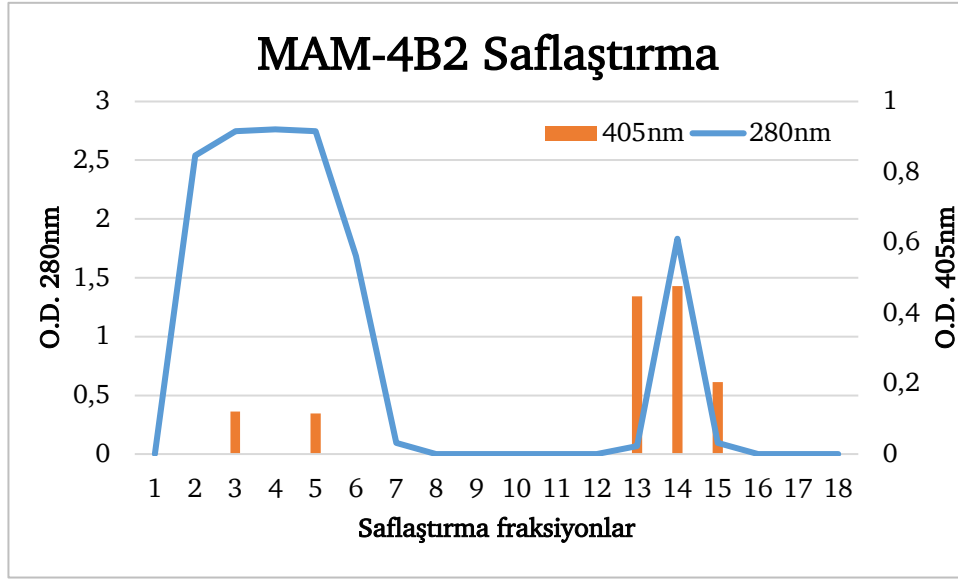
şekil A. 4 Anti-IRT MAM-6D1 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi safıştırma sonuçları



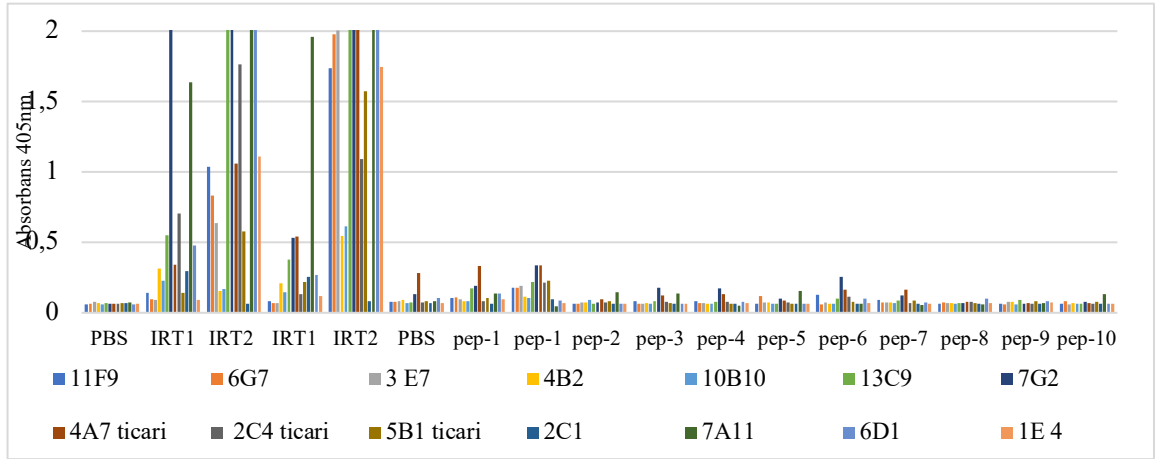
Şekil A. 5 Anti-IRT MAM-11F9 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları



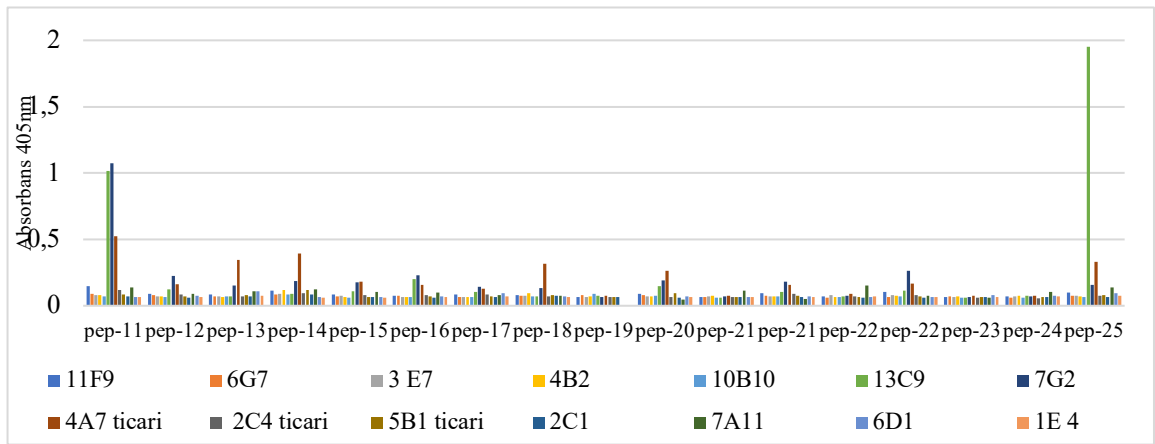
Şekil A. 6 Anti-IRT MAM-10B10 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları



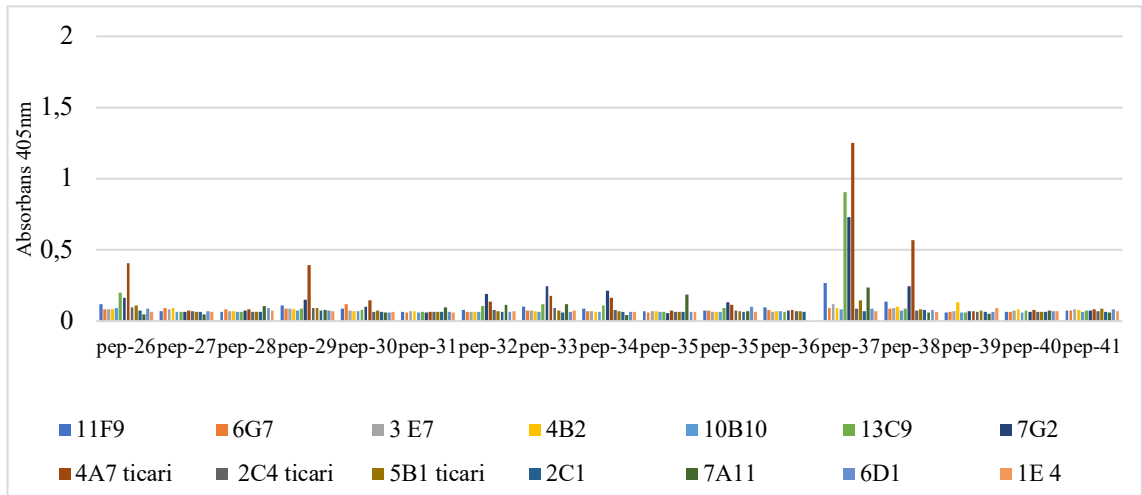
Şekil A. 7 Anti-IRT MAM-4B2 Monoklonal antikorunun Protein A afinite kromatografi saflaştırma sonuçları



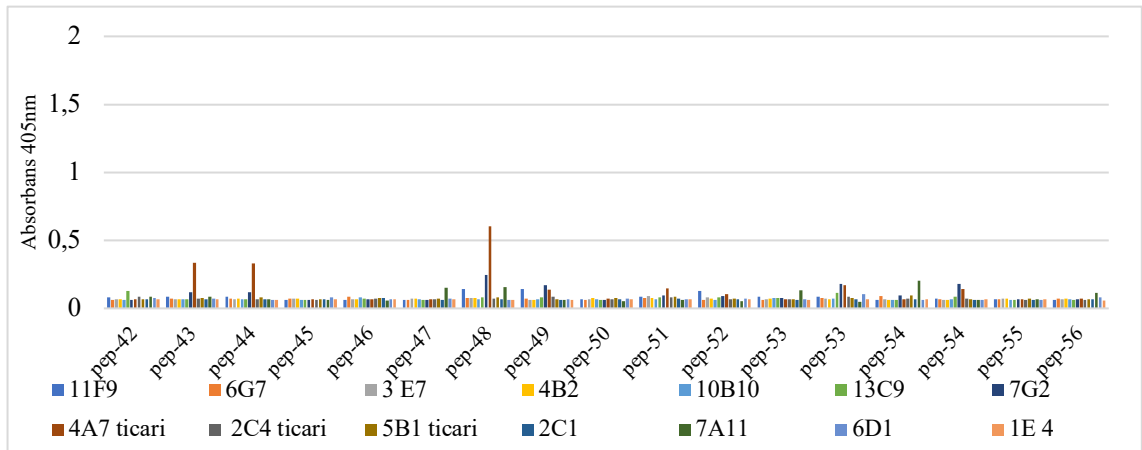
Şekil A. 8 Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları



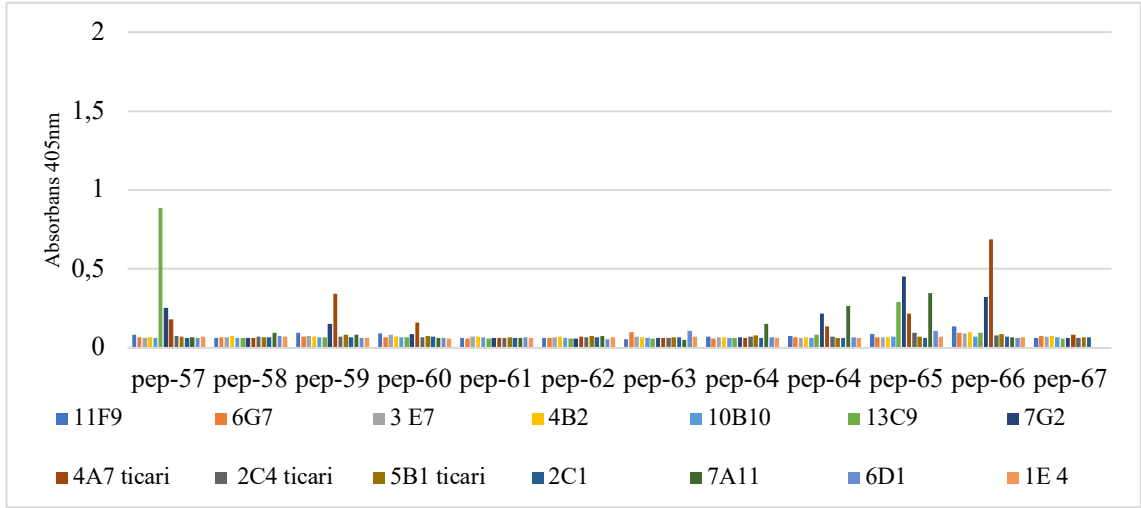
Şekil A.8 Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları (Devamı)



Şekil B.8 Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları (Devamı)



Şekil B.8 Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları (Devamı)



Şekil A.8 Anti-IRT antikorlarının lineer epitop belirleme sonuçları (Devamı)



Sayı : 16563500-111- 187
Konu : Etik Kurul Başvuru Sonuç Raporu

25/ 12 / 2014

Sayın Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

TÜBİTAK Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na (HADYEK) sunmuş olduğunuz, "Yeni Doğan Taramalarında Kistik Fibrozisin Erken Tanısı İçin Immunreaktif Tripsinojen (IRT) ve Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) ELISA Kitlerinin Geliştirilmesi" başlıklı projenize ait TÜBİTAK-HADYEK başvurunuz 25 /12 /2014 tarihinde görüşülmüştür.

Görüşme sonunda Kurulumuz başvurunuzun uygun olduğuna karar vermiştir.

Bilgilerinize rica ederiz.

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL
HADYEK Başkanı
(Proje elemanı, katılmadı)

Vet.Hek. Dr. Hivda ÜLBEĞİ POLAT
HADYEK Bşk. Vekili

Doç. Dr. Behin ERDAĞ (Üye)

Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK (Üye)

Fazilet ŞAHİN (Sivil Üye)

Dr. Fatma Betül GÜLOĞLU (Üye)

Av. Ayşe Dilek ERGÜLER (Sivil Üye)

Dr. Yükeel ÇETİN (Üye)

Dr. Soner AKSU (Üye)

Bu etik kurul raporu TÜBİTAK MAM Birimlerinde yapılacak hayvan deneyleri için geçerlidir.



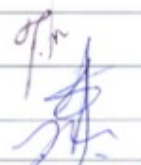
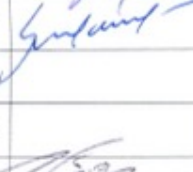
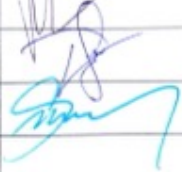
MARMARA ARAŞTIRMA MERKEZİ
P.K. 21, 41470 Gebze Kocaeli T 0 262 617 20 00 F 0 262 641 23 09 www.mam.gov.tr



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BASVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2014.8346	70787436-050.06.04-
	PROJE ADI	Yeni doğan taramalarında kistik fibrozisin erken tanısı için immüneaktif tripsinojen (IRT) ve pankreatitle ilişkili protein (PAP) ELISA kitlerinin geliştirilmesi	
	SORUMLU ARASTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç.Dr. Fatma YÜCEL	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih	09.01.2015
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gereke, amacı, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımlar, bütçe vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ÜYELER							
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / Etik Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi		Toplantıya katılım		İmza
Prof.Dr. Haner DİRENKENELİ	Romatoloji	MÜ Tıp Fakültesi/ Başkan	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGÜN	Dermatoloji	MÜ Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	HAYIR	
Prof.Dr. Semra S. ZIDAŞ	Egzersiz	MÜ Egzersiz Fak./Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	MÜ Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Elif AYDINER KARAKOÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Tijen DEMİR	Halk Sağlığı	Açbadem Üniv. Tıp Fak.	Var	Yok	Evet	Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	MÜ Tıp Fakültesi/Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Av. Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var	Yok	Evet	Hayır	

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. 2019 (Sözlü sunum, Uluslararası)

“Importance of Isoforms of Immunoreactive Trypsin in Newborn Screening for Cystic Fibrosis.” Bengü Ergenoğlu, Esin Akçael, Ş.Şeyda Pirinççi, Aliihsan Manav, Erdal Ataç, Fatıma Yücel.

21-23 March, 2019. MECFC Congress- Istanbul/Turkey.

2. 2018 (Sözlü sunum, Uluslararası)

“Novel Trypsin 2 Inhibitor Efficiency Assay”

Bengü Ergenoğlu, Özlem Ertekin, Şerife Şeyda Pirinççi, Ilkay Göksu Polat, Gökür Gizem Dinç, Melahat Bağirova, Esin Akçael, Fatıma Yücel.

Proteases, Inhibitors and Biological Control. FEBS 8-12 September, 2018. Portorož/ Slovenia.

3. 2017 (Poster sunumu, Uluslararası)

“Development of Monoclonal Antibodies for the detection of Immunoreactive Trypsin for use in diagnosis of Cystic Fibrosis.”

Bengü Ergenoğlu, İlham Bahhar, Tuğçe Nur Eralp, Şeyda Pirinççi, Özlem Ertekin, Esin Akçael, Fatıma Yücel.

42th FEBS Congress Book, 10-14. 09/2017, Jerusalem / Israel.

Makaleler

1. Bengü Ergenoğlu, Özlem Ertekin, Şerife Şeyda Pirinççi Gökür, Gökür Gizem Dinç, Esin Akçael, Melahat Bağirova & Fatıma Yücel (2021) ELISA-based competitive trypsin inhibition assay, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35:1, 1385-1392, DOI: 10.1080/13102818.2021.1977697

Projeler

1. TÜBİTAK'ın 115S124 numaralı projesi