

Gaucher Hastalığının Tanısında Fonksiyonel Konjugat Sisteminin Potansiyelinin Araştırılması

Murat EKREMOĞLU¹, Cevahir ALTINKAYNAK^{2,a}

¹İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Avanos Meslek Yüksek Okulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Nevşehir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Organik-inorganik hibrit nano sentez yöntemi sayesinde spesifik antikorlarla fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat yapıların farklı şartlar altında sentezlenmesi, oluşan yapılarının aydınlatılması, özelliklerinin karakterize edilmesi ve bu yapılar kullanılarak iz miktarda tanısı zor olan Gaucher hastalığına spesifik hedef moleküllere bağlanmasının ELISA test sistemi ile görüntülenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: β -glukoserebrozidaza spesifik poliklonal antikor Anti-GBA 3 bağlayıcı antikor olarak seçildi, Sandwich ELISA metodu ile 12,5-400 ng/mL konsantrasyon aralığında β -Glucosidase enzimi standart olarak kullanıldı. Üzerine Antikor-enzim-inorganik hibrit konjugat ilave edilerek, test görünür hale getirildi. Böylece örnekteki β -Glucosidase düzeyi oluşturulan kombinasyon ile yakalanabilmiştir.

Bulgular: Geleneksel sandwich ELISA yönteminde Anti-GBA 1 konjugatı yüksek yanıt verirken hibrit sistemde Ab 1 (10 μ l)-HRP-inorganik hibrit konjugat daha yüksek yanıt vermiştir. Klasik yöntem için Lineer analitik performans $R^2 > 0.99$ ve LOQ değeri 10 ng/mL olarak belirlenirken hibrit konjugat sisteminde ise $R^2 > 0.99$ ve LOQ değeri 12,5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Geleneksel ELISA yöntemi ile karşılaştırıldığında, hibrit sistem HRP enziminin konjugata tek aşamalı olarak bağlanmasını sağlar ve sonuçta ortaya çıkan konjugat yapısının yüksek yakalama yeteneği ve katalitik aktivite kazandığını gösterir.

Anahtar Sözcükler: Gaucher, β -glukoserebrozidaz, β -Glucosidase, ELISA, Hibrit Konjugat.

ABSTRACT

Investigation of the Potential of the Functional Conjugate System in the Diagnosis of Gaucher Disease

Objective: It is aimed to synthesize hybrid conjugate structures functionalized with specific antibodies under different conditions by using organic-inorganic hybrid synthesis method, to elucidate the resulting structures, to characterize their properties, and to monitor the binding of these structures to target molecules specific to Gaucher disease, which is difficult to diagnose with the ELISA test system.

Material and Method: β -glucocerebrosidase specific polyclonal antibody (Anti-GBA 3) was chosen as the binding antibody, β -Glucosidase enzyme was used as standard with the Sandwich ELISA method in the concentration range of 12.5-400 ng/mL. The test was made visible by adding antibody-enzyme-inorganic hybrid conjugate. Thus, the level of β -Glucosidase in the sample could be captured with the combination created.

Results: While Anti-GBA 1 conjugate gave a high response in the conventional sandwich ELISA method, Ab 1 (10 μ l)-HRP-inorganic hybrid conjugate gave a higher response in the hybrid system. In the classical method, the linear analytical performance is determined as $R^2 > 0.99$ and the LOQ value is set at 10 ng/mL, whereas in the hybrid conjugate system, $R^2 > 0.99$ and the LOQ value is determined as 12.5 ng/mL.

Conclusion: Compared to the traditional ELISA method, the hybrid system allows for the one-step binding of the HRP enzyme to the conjugate, resulting in a conjugate structure with enhanced capture capability and catalytic activity.

Keywords: Gaucher, β -glucocerebrosidase, β -Glucosidase, ELISA, Hybrid Conjugate.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Ekremoğlu M, Altinkaynak C. Gaucher Hastalığının Tanısında Fonksiyonel Konjugat Sisteminin Potansiyelinin Araştırılması. Fırat Tıp Dergisi 2025; 30(2): 71-77.

How to cite this article: Ekremoğlu M, Altinkaynak C. Investigation of the Potential of the Functional Conjugate System in the Diagnosis of Gaucher Disease. Firat Med J 2025; 30(2): 71-77.

ORCID IDs: M.E. 0000-0002-8355-7052, C.A. 0000-0003-0082-8521.

Nadir kalıtsal hastalıklardan olan *Lizozomal Depo Hastalıkları* (LSD'ler); lizozomal fonksiyon için kritik noktalarda görev alan proteinlerdeki mutasyonların neden olduğu bir metabolik bozukluk sınıfıdır ve tüm dünyadaki prevalansının 5000 doğumda 1 olduğu tahmin edilmektedir (1, 2). Lizozomal depo hastalıkları; makromoleküllerin bozulmasından ve geri dönüşümünden sorumlu bir veya daha fazla fonksiyonel lizozomal enzimin yokluğu veya eksikliği ile karakterize edilen 50'den fazla farklı nadir kalıtsal metabolik ve nörodejeneratif hastalık grubunu oluşturmaktadır (3, 4).

Oluşan kusurlar endozomal veya lizozomal sistem içinde biriken spesifik makromoleküllerin tamamen bozulmasını ve geri dönüşümünü önler, sonuç olarak, bozulmamış veya kısmen bozulmuş makromoleküller (proteinler, polisakkaritler, lipitler, vb.) çeşitli lizozomlarda aşamalı olarak birikir (1). Bu durum hücre genişlemesine yol açarak; normal hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve sonuçta, hücre ölümü, merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere yaygın olarak birden fazla organı ve dokuyu etkileyen ilerleyici Tay-Sachs, Gaucher, Fabry, Metakromatik lökodistrofi, Krabbe, Niemann-Pick, vb gibi sistemik bir hastalıklara neden olur

^aYazışma Adresi: Cevahir ALTINKAYNAK, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Avanos Meslek Yüksek Okulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Nevşehir, Türkiye
Tel: 0384 511 5676
Geliş Tarihi/Received: 15.11.2023

(4). Gaucher hastalığı; sfingolipidoz sınıfından hastalıklardır, genellikle otozomal resesif bir şekilde aktarılırlar (5). β -glukoserebrosidaz (GBA) enzim eksikliği ile karakterize, 1:100000 görülme sıklığına sahip karaciğer, dalak, akciğer gibi bazı organlarda, kemik iliğinde ve bazen de beyinde aşırı yağ birikimine neden olan genetik bir hastalıktır (5, 6).

Tüm dünyada bu hastalıkların tanısı ve tedavisi zordur (1). Bilgi ve bilinç eksikliği nedeniyle LSD hastalıklarından muzdarip çocukların tanı ve tedaviye erişimi gecikmektedir ve bu nedenle %30'u 5 yaşından önce ölmektedir. Lizozomal depo hastalıklarında bazı klinik ve patolojik bulgular hastalıkların tanısında kullanılmakla birlikte (7), kesin tanı periferik kandan veya dokudan enzim düzey ölçümü veya mutasyon analiz sonuçlarına göre konulabilmektedir (8). Mutasyon analizi enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonların PCR kitleri yardımıyla tespit edilmesini sağlar (1, 4, 7), bu teknik enzimin üretilip üretilmediği hususuna yanıt verir. Ancak son ürün olan enzim varlığının ölçümü hastalık tanısı için daha önemlidir. Çünkü enzim yeterli düzeyde üretilmemiş veya düzgün katlanmalarla fonksiyonel halde ortama verilmemiş olabilir. Bu nedenle Gaucher hastalığı için enzim düzey tespiti daha doğru bir yaklaşımdır (9, 10). Laboratuvarında enzim düzey ölçümleri ticari Enzimle-İşaretli İmmüno-sorbent Test (ELISA) kitleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu teknik günümüzde kantitatif analiz alanında sıkça kullanılan hassas, seçici, basit ve çok sayıda numuneyi hızlı ve aynı anda analiz edebilen immüno-diagnostik bir tekniktir (11, 12). Tekniğin pratik uygulamalarında enzim-substrat etkileşimi, enzimatik aktivite, inkübasyon koşulları, yalancı pozitif ve konjugat gibi bir dizi değişken parametre analizin sonucunu etkilemektedir (13). Tüm faktörler arasında enzimle işaretli antikor (konjugat) tekniğin en kritik reaktifidir (12, 14). Glutaraldehit ve periyodat oksidasyonu gibi geleneksel tekniklerle enzim işaretlenmiş antikorların hassasiyeti nispeten düşük duyarlılığa sahiptir (12, 13). Bu durum hedefe yönelik analizlerde sürekli yeni tekniklerin veya reaktiflerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Örneğin; biyotin-streptavidin (avidin) konjugat sistemi sinyali güçlendirmek için biyotinlenmiş protein kullanılmaktadır (15), immune-PCR yöntemi ise iz miktarda analit tayini için hem ELISA hem de PCR teknolojisinin avantajlarını birleştirerek sinyali güçlendirmektedir (16, 17). Bunun yanında enzim bazlı amplifikasyonda analitin hassas tayini için nanopartikül temelli sistemler biyomolekül tayinlerine yeni bir boyut kazandırmıştır (13). Örneğin; Speroni ve ark.(18) yaptıkları çalışmada antikor kaplı manyetik mikropartikülleri ELISA test sisteminde kullanarak gıdalardaki alerjen maddelerin hassas tespitini gerçekleştirmişlerdir. Tong ve ark. yaptıkları (13) çalışmada demir oksit nanopartikül işaretli immüno-sorbent testini (ILISA) geliştirmişlerdir. Demir oksit nanopartikül temelli problemler (IONP) goat antikor ile konjuge edilmiş ve fare IgG'ine yüzey adsorpsiyonu ile bağlanarak tayin edilmiştir. Enzim-yüklü nanomateryal ile işaretlenmiş antikorlar yüksek enzim kapasitesine sahiptir ve analizlerde dikkate değer

sinyal amplifikasyonu oluşturmaktadır (12, 19, 20). Bununla birlikte antikorla fonksiyonelleştirilmiş nanopartiküllerin hazırlanması sırasında geleneksel immobilizasyon yöntemleri kullanılmakta bu da çoğu zaman enzimin stabilitesinde artışa neden olurken aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır (12, 13). Geleneksel immobilizasyon çalışmalarında immobilize edilen enzimlerin serbest enzime göre enzimatik aktivitelerinin azalması biyo katalitik sistemlerin uygulamalarını sınırlamaktadır (21-23). Bu nedenle, geliştirilmiş enzimatik etkinliğe sahip enzimlerin hazırlanması için basit, verimli ve ucuz yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, farklı bir yöntemle organik-inorganik hibrit nano yapılar sentezlenerek protein temelli biyomalzemelerin kararlılıklarının ve kullanım alanlarının artırılması hedeflenmektedir. İlk defa 2012 yılında farklı bir yöntemle organik-inorganik hibrit nano yapılar sentezlenmiş, enzimlerin aktiviteleri, kararlılıkları ve kullanım alanları artırılmıştır. Rapor edilen yöntemde inorganik bileşen olarak Cu^{2+} iyonu ve organik bileşen olarak çeşitli protein ve enzimler (laktalbumin, lakkaz, vb) kullanılarak nano yapraklardan oluşan çiçek benzeri şekillere sahip organik-inorganik hibrit nano yapıların oluşumu ve mekanizması açıklanmıştır (24). Elde edilen hibrit yapılar mikrometre boyutlarında olmalarına rağmen, nano boyutlu yapraklardan oluşmaları nedeniyle ilk defa bu grup tarafından "nanoflowers" olarak adlandırılmıştır. Geleneksel immobilizasyon teknikleri ile karşılaştırıldığında enzim-inorganik hibrit nano yapıların enzimatik aktivitesi ve kararlılığı serbest enzimlere ve diğer immobilizasyon teknikleri uygulanan enzimlere göre dikkat çekici ölçüde artış göstermektedir (25).

Bu çalışmada ilk defa nadir hastalıklar arasında en sık görülen Gaucher hastalığının taramasına yönelik antikorla fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat sistemleri ELISA test sisteminde kullanılmıştır. Hibrit yapı için optimum sentez koşulu belirlenerek düzgün dağılımlı çiçek morfoloji tespit edilmiştir. Optimum şartlarda elde edilen hibrit konjugatların morfolojisi SEM ile görüntülenmiş, karakterizasyonları ise EDX, XRD ve FTIR analizleri ile yapılmıştır. ELISA test sisteminde ise Sandviç ELISA metodu kullanılmıştır. β -Glucosidase eksikliğinin tespitinde kullanılması muhtemel ticari ürünler ile test sistemi oluşturulmuş optimum çalışma koşulları belirlenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hibrit konjugat (Antikor-HRP-inorganik hibrit yapı) sentezinde, HRP enzimi (0,02 mg/mL) ve hastalık spesifik antijenlere özgü protein yapıları sekonder antikorlar ayrı ayrı/çoklu sistemler halinde enzimi organik bileşen olarak, inorganik bileşen olarak bakır (II) iyonu kullanılmıştır. Bu amaçla; 0.8 mM konsantrasyonda metal çözeltisi belirli derişimlerde sekonder antikor ve HRP enzimi içeren fosfat tampon

çözeltisine (pH 7.4) ilave edilir. Oluşan çözelti hızlıca vorteks edilir ve oda sıcaklığında 3 gün boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonrası, reaksiyon kabında oluşan mavi renkli çökelek, hibrit konjugatın oluştuğunu gösterir. Oluşan ürün santrifüj edilir ve birkaç kez saf su ile yıkandıktan sonra etüvde kurutulur ve daha sonraki uygulamalar için saklanır.

Sentezlenen hibrit materyallerin morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (FESEM ZEISS GEMINI 500) kullanılarak konfirme edilmiştir. Hibrit malzemenin elementel içeriği EDX (Enerji dağılımlı X-ışınları analizi) analizi, malzemenin kristal yapısı XRD ve kimyasal yapısı ise IR spektrometresi analizi ile aydınlatılmıştır.

Plastik kuyucuklar; hedef molekül içeren (hastalık spesifik antikor), 1:1000 oranında protein/plak PBS, pH 6,8 kaplama solüsyonu ile her kuyuda 100 µl hacim olacak şekilde kaplandı. Plak üzeri seal ile kapatıldı ve +4 °C' de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün plak +4 °C' den çıkarıldı, 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama tamponuyla (PBS-%0,5 Tween 20) 100 µl/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkandı. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutuldu. 100 µl/kuyu olacak şekilde 1X blocking reagent-Surmodics ile bloklama yapıldı. Süre bitiminde PBS içinde %5 skim milk hazırlandı ve 200 µl/kuyu olacak şekilde kuyulara ilave edildi, 1 h inkübasyon sonrası farklı aralıklarda standart (β-Glucosidase (Sigma)) ilave edildi. 30 dk ila 1 saat 37 °C' de veya oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. Süre bitiminde plak içi aspire edildi. Ardından hibrit konjugatın farklı konsantrasyon aralığında fosfat tampon içerisinde stok çözeltileri hazırlandı ve 100 µl/kuyu olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı. Çalkalayıcı üzerinde inkübasyon süresi bitiminde yıkama tamponu ile 100 µl/kuyu olacak şekilde 3 defa yıkandı. Plak içi havlu kâğıda hızlıca vurularak kurutuldu. TMB Substrat 100 µl/kuyu olacak şekilde ilave edildi, 10-15 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinden 50 µl/kuyu olacak şekilde ilave edildi ve 450 nm'de okuma yapıldı. ELISA yöntemlerinde "cut off" değerinden yüksek olan durumlar pozitif yanıt olarak değerlendirilmiştir. Cut off değeri aşağıdaki eşitlikte olduğu gibi belirlenmiştir. Cut off = Ortalama negatif kontrol + (Standart sapma negatif kontrol)².

BULGULAR

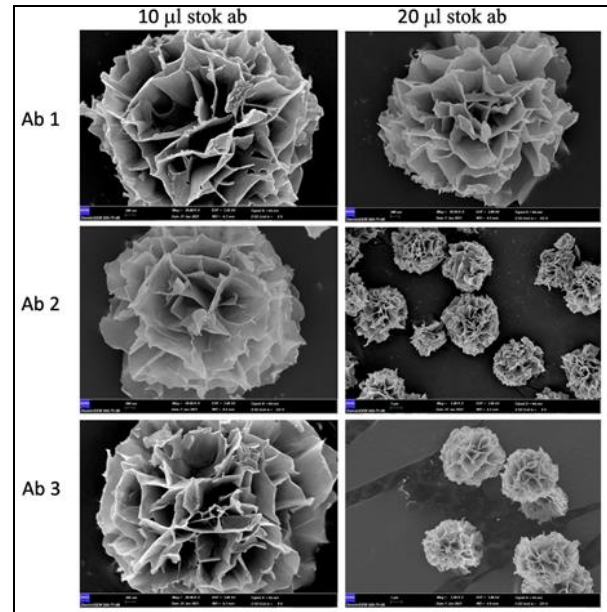
Antikor-HRP-inorganik hibrit yapı sentezinde, HRP enzimi ve Gaucher hastalığına spesifik antijenlere özgü protein yapılı sekonder antikorlar organik bileşen olarak, inorganik bileşen olarak da bakır (II) iyonu kullanılarak sentez yapılmıştır. Hibrit konjugat sentezinde kullanılan antikor türleri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. ELISA test sisteminde kullanılan antikor tür/marka ve stok konsantrasyonları.

Kod	Açıklama-stok solüsyonlar
Ab 1	Anti-human IgG (Fab)-HRP (1:40000)
Ab 2	Protein G-HRP (1:100000)
Ab 3	Goat anti-human IgG (Y)-HRP (1:1000)
Anti-GBA 1	Monoklonal anti-GBA (0,5 mg/ml) SAB140385, Sigma
Anti-GBA 2	Anti-GBA (0.1 mg/ml) %40 Glycerol içeri- sinde HPA006667, Sigma
Anti-GBA 3	Anti-GBA antibody (1:1000)1 FNab03369, Finetest

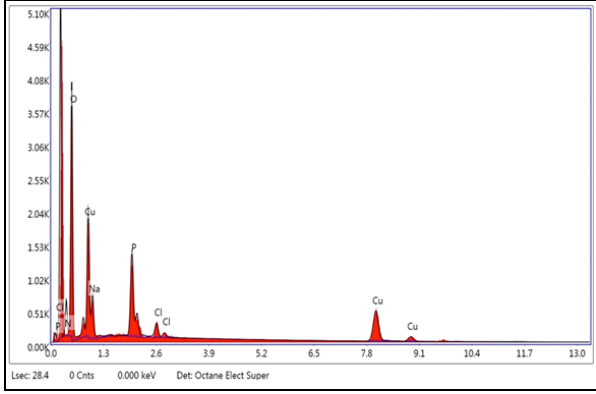
¹Bu antikor sadece plak kaplamada kullanılmıştır.

Bu antikorlar aynı zamanda ELISA test sisteminin oluşturulmasında da kullanılmıştır. Geleneksel yöntem ve hibrit konjugatın karşılaştırması yapılmadan önce malzemenin morfolojisi incelendi. Hibrit konjugatın sentez şartları bileşenlerin konsantrasyonu (sekonder antikor, enzim, metal iyonu vb.) oluşan yapıların morfolojisini çok etkilemektedir. Antikor-HRP-inorganik hibrit yapı sentezinde Ab 1, Ab 2 ve Ab 3 ayrı ayrı ve her birinden iki farklı konsantrasyon (10 ve 20 µl stok solüsyon) olacak şekilde hibrit yapı sentezlenmiş olup morfolojileri SEM ile görüntülenmiştir. Şekil 1'de hibrit yapıların SEM görüntüleri verilmiştir.



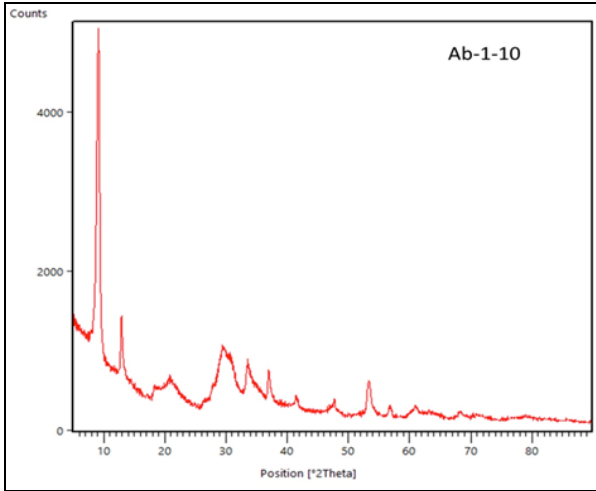
Şekil 1. Antikor-HRP-inorganik hibrit konjugat yapıların SEM görüntüsü.

Şekil 1'de yer alan SEM görüntülerinde yapraklar merkezden köken almış ve yaklaşık 3,6-6,0 µm boyutunda çiçek morfoloji elde edilmiştir. Hibrit konjugatın Cu, P, C, O ve N gibi elementlerin ağırlık ve atom yüzdeleri belirlemek için EDX analizi yapıldı. Spektrum şekil 2'de gösterilmiştir.



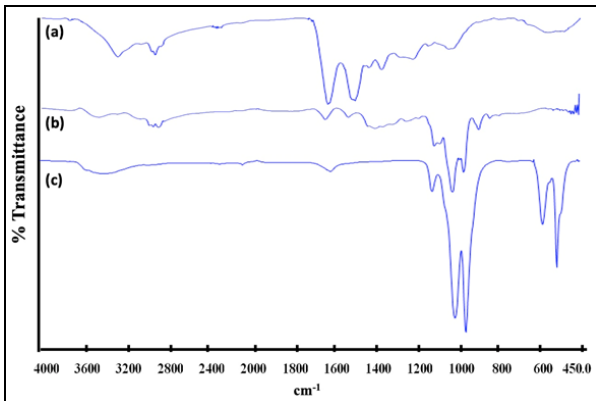
Şekil 2. Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatın EDX spektrumu.

Toz difraksiyon spektrumunda ise Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatın pik pozisyonları ve yoğunlukları verilmiştir. Şekil 3'de görüldüğü üzere piklerin kırınımaları JCPDS kart numarası 00-022-0548 olan $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kristal modeli ile iyi uyum sağlamıştır.



Şekil 3. Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatın XRD spektrumu (JCPDS card no: 00-022-0548, $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$).

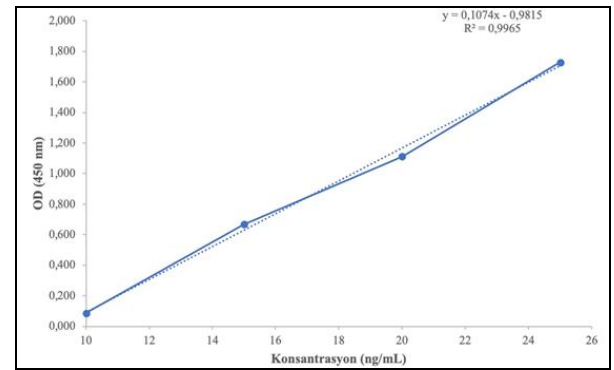
Serbest HRP, serbest Ab 1 ve Antikor-HRP-inorganik hibrit konjugatın kimyasal yapıları FTIR spektrumları ile karşılaştırıldı (Şekil 4).



Şekil 4. (a) Serbest HRP (b) Serbest Ab 1 ve (c) Antikor-HRP-inorganik hibrit konjugatın FTIR spektrumları.

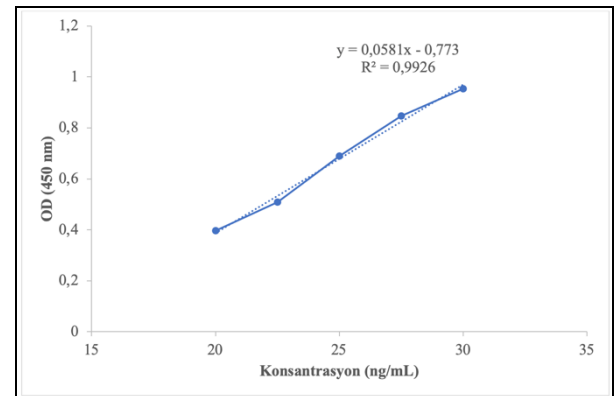
FTIR spektrumunda Antikor-HRP-inorganik hibrit konjugat serbest HRP ve serbest Ab 1 bulunan tüm pikleri içermiştir. Bu sonuçlar karboksil/amino grupları ile bakır iyonu arasındaki koordinasyonu göstermiş ve hibrit yapının iyi kristalleştiğini kanıtlamıştır.

ELISA test sisteminin oluşturulması amacıyla tablo 1'de yer alan antikorlar kullanılarak çok sayıda parametre ELISA'da test edilmiş olup optimum sonuç alınan deneysel koşullar ile ilgili etkili sonuçlar paylaşılmıştır. Yapılan denemelerde plak Anti-GBA 3 antikor (1:1000) ile kaplandıktan sonra bloklama ajanı (1X stabilcoat) ile 1 h inkübe edilmiştir. Bloklama sonrası 10-25 ng/mL aralığında β -Glucosidase (standart) ilave edilip, 1h sonunda HRP işaretli Anti-GBA 1 antikor (1:100) eklenmiştir, 15 dk inkübasyon sonrası şekil 5'de gösterilen tipik standart eğri elde edilmiştir.



Şekil 5. 10 ile 25 ng/mL arasındaki antijen konsantrasyonu aralığını kapsayan ELISA için standart eğri.

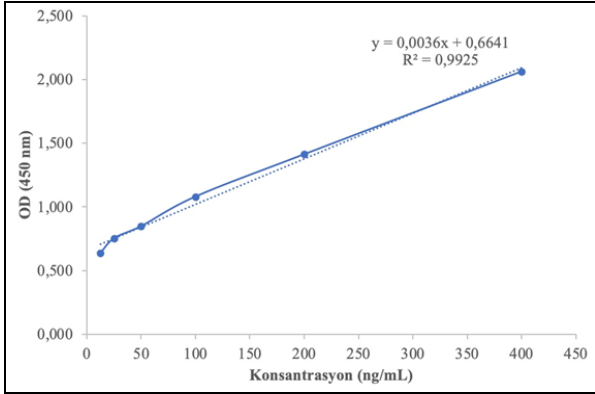
Elde edilen sonuçlara göre bloklama işleminde değişikliğe gidilmiştir. Plak kaplaması aynı kalacak şekilde (Anti-GBA 3 antikor, 1:1000), bloklamada 1X stabilcoat ajanı sonrası PBS içinde %5 skim milk ile 1 h inkübasyon gerçekleştirilmiş. 20-30 ng/mL aralığında standart aralığı oluşturulmuştur, 30 dk sonucunda HRP işaretli Anti-GBA 1 antikor (1:200) eklenmiş, 30 dk inkübasyon sonrası şekil 6'da gösterilen tipik standart eğri elde edilmiştir.



Şekil 6. 20 ile 30 ng/mL arasındaki antijen konsantrasyonu aralığını kapsayan ELISA için standart eğri.

Artan R^2 değeri protein/plak konsantrasyonu ve bloklama sistemine karar vermemizi sağlamıştır. Aynı ko-

şullarda Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugat sistemi çalışılmış olup 12,5-400 ng/mL aralığında standartlar ilave edilmiştir. 1 h inkübasyon sonrası konjugat olarak 2 µg/mL konsantrasyonda Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugat ilave edilmiş ve 30 dk çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Standart işlemler sonrası şekil 7’de gösterilen tipik standart eğri elde edilmiştir.



Şekil 7. 12,5-400 ng/mL arasındaki antijen konsantrasyonu aralığını kapsayan ELISA için standart eğri.

Hibrit sistemde konjugat (Ab 1(10 µl)-HRP-inorganik hibrit yapı) klasik ELISA sistemine göre daha yüksek yanıt vermiştir. Klasik yöntem için Lineer analitik performans $R^2 > 0.99$ ve LOQ değeri 10 ng/mL olarak belirlenmiştir. Hibrit konjugat sisteminde ise $R^2 > 0.99$ ve LOQ değeri 12,5 ng/mL olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Protein moleküllerinin metal iyonları ile kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Bu yöntem de çiçek görünümlü morfolojiye sahip hibrit yapılar, fosfat tamponu ile metal iyonlarının oluşturduğu yapıyla proteinlerin kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Yöntemde ilk olarak birincil metal fosfat kristalleri oluşur (23, 25). Bu aşamada protein molekülleri baskın olarak metal iyonları ile özellikle protein omurgasındaki amin gruplarının koordinasyonu sayesinde kompleksler oluştururlar. Oluşan bu kompleksler metal fosfat birincil kristallerin çekirdeklenme alanlarını oluşturur (24). İkincil büyüme aşamasında, protein molekülleri ve primer kristaller iri topraklar oluşturur. Metal fosfat kristallerinin kinetik olarak kontrolü agregatların yüzeyindeki bireysel metal bağlayıcı bölgelerden kaynaklanır ve bu ayrı ayrı yaprakların oluşmasına neden olur. Son aşamada anizotropik büyümeyle dallı ve çiçek görünümlü morfolojiye sahip bir yapı oluşur. Önerilen bu büyüme sürecinde, protein yaprak skafoldların oluşturulması için metal fosfat kristalleri çekirdeklenmeyi indükler ve yaprakları birbirine bağlamak için bir “tutkal” olarak görev yapar. Nano boyuttaki bu yaprak şekilli yapılar bir araya gelerek birbirine bağlanırlar ve hibrit yapıları oluştururlar (26). Bu türden materyaller son yıllarda kolay üretimleri,

artmış yüzey-hacim oranı, gelişmiş enzimatik aktivite ve stabilitelerinden dolayı araştırmacılar tarafından geniş çaplı ilgi görmüştür (27).

Bu çalışmada ilk defa nadir hastalıklar arasında en sık görülen Gaucher hastalığının taramasına yönelik antikörle fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat sistemleri ELISA test sisteminde kullanılmıştır. Hibrit yapı için optimum sentez koşulu belirlenerek düzgün dağılımlı çiçek morfoloji tespit edilmiştir. SEM görüntülerinde yapraklar merkezden köken almış ve yaklaşık 3,6-6,0 µm boyutlarında çiçek morfoloji elde edilmiştir. Sentezde kullanılan antikör ve enzim miktarındaki farklılık hibrit yapının boyutunda önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Antikör ve enzim içeren hibrit yapıların nano boyutlu çok sayıda yapraklardan oluşması ile yüzey alanı artmaktadır. Sentezlenen bu yapıların karakterizasyonları gerçekleştirilmiş veeş zamanlı olarak hibrit yapıların ELISA test sistemindeki kullanılabilirlikleri de araştırılmıştır. Yapılan çok sayıda test sonucunda ELISA sisteminde en yüksek ve anlamlı sonucu veren Ab 1 (10µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatın karakterizasyon analiz sonuçlarına çalışmada yer verilmiştir. Sentezlenen hibrit konjugat antikör ve metal fosfat nanokristalleri olmak üzere iki ana bileşen içermektedir. Hibrit konjugatın EDX spektrumunda N ve Cu, P, C, O pikleri sırasıyla antikör ve $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nanokristallerinden kaynaklanmaktadır. EDX spektrumunda yer alan Cl elementinin varlığı ise fosfat tamponundan kaynaklanmıştır. Ab 1 (10µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatın pik pozisyonları ve yoğunlukları JCPDS kart numarası 00-022-0548 olan $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kristal modeli ile iyi uyum sağladığını göstermiştir. FTIR spektrumunda serbest formda $\sim 570 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$ ’de gözlenen O=P-O grubu frekansı hibrit edilmiş yapıda $\sim 550\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ ’deki frekanslarına kayma göstermiştir. Serbest antikorda yer alan peptit bağının C=O titreşimi, N-H bükülmesi ve C-N titreşimi ile amit I bandı $\sim 1656 \text{ cm}^{-1}$ ve amid II bandı ise $\sim 1546 \text{ cm}^{-1}$ ’da pik vermiştir. $\sim 990 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1075 \text{ cm}^{-1}$ ve $\sim 1146 \text{ cm}^{-1}$ ’deki bantlar P=O grubuna spesifiktir. $-\text{NH}_2$ grubunun titreşim bandı serbest HRP enziminde $\sim 1634 \text{ cm}^{-1}$ iken hibrit yapıda kayma göstererek $\sim 1400\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$ titreşim aralığında görünmektedir. $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında yer alan bantlar $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarına aittir, serbest HRP ve antikör molekülünde bu bantlar şiddetli iken hibrit yapıda daha zayıf olarak görülmüştür. Veriler oluşturulan ELISA sisteminin analitik duyarlılığının yüksek olduğunu göstermiştir. Hibrit konjugat sistemi ile daha ucuz ve kolay ulaşılabilen bir sekonder antikör olan Anti-human IgG (Fab) HRP’nin kullanıldığı geleneksel test sistemine yakın hassasiyette sonuç vermiştir.

Zhang ve ark. (28) benzer yöntemle yaptıkları çalışmada ractopamine antikoru (RAC_{anti}) kullanarak $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ -protein hibrit nanokompozitleri sentezlemişlerdir. $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2 @ \text{RAC}_{\text{anti}}$ nanokompozitler, ractopenin (RAC) tespiti için kullanılan elektrokimyasal bir biyosensörün hassas tabakası olarak kullanılmıştır. Sentezlenen $\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ benzeri nano çiçeklerin yüksek kimyasal aktivite ve mükemmel elektrokimyasal per-

formans sergilediği gösterilmiştir. Liu ve ark. (29) ise yaptıkları çalışmada Streptavidin (SA)-HRP enzimini içeren hibrit yapıyı iki farklı fonksiyonda kullanabilmek amacı ile organik-inorganik hibrit yapı sentez yöntemini kullanarak sentezlemişlerdir. Sentezlenen SA-HRP-Cu₃(PO₄)₂ hibrit nano çiçekler biyoanalizde serbest form ile karşılaştırıldığında yüksek katalitik aktivite, stabilite ve dayanıklılık göstermiştir. Çift fonksiyonlu hibrit nano çiçekler enzim bağlı immün-sorbent analizde alfa-fetoprotein (AFP) için 78 pg/mL tespit limitine sahip ultra duyarlı bir sensör oluşturmak için kullanılmıştır. Ye ve ark. (30) ise yaptıkları çalışmada inorganik mineral posnjakit (Cu₄(SO₄)(OH)₆·H₂O) yapısını streptavidin ve HRP için nano taşıyıcı görevi görmesini sağlayarak insektisidal kristalin (Cry) protein Cry1Ab'nin tespiti için lineer aralık 0.1-40 ng mL⁻¹ ve tespit limiti ise 63 pg mL⁻¹ olan immün analizde sinyal etiketi olarak kullanmışlardır.

Zeinhom ve ark. (31) yaptıkları çalışmada tespit antikor-HRP enzim ve inorganik nano çiçek içeren nanokompozit ile streptavidin manyetik boncuklar ve biyotin etiketli antikor yakalama platformu olarak kullanarak *S. Enteritidis* ile inoküle edilmiş süt, peynir ve su örneklerinde *S. Enteritidis* tespit edebilen görsel renk üreten bir test sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen test suda 1.0 CFU mL⁻¹, süt ve peynirde ise 1.0 CFU/g algılama limiti ile *S. Enteritidis*'i tespit edebilmiştir.

Wei ve ark. (12) ilk kez hibrit protein-inorganik nano çiçeğe enzim, antikor ve Cu₃(PO₄)₂'yi üçlü bir şekilde immobilizasyonunu sağlamışlardır. Çalışmada çift fonksiyon kazanan yapının antikor kısmı, karşılık gelen antijeni özgül bir şekilde yakalama yeteneğini korumuştur. Bunun yanında nano çiçek, artan enzimatik aktivite ve stabiliteye sahip olarak sinyali güçlendirmiştir. Elde edilen antikor-enzim-inorganik nano çiçek, önce *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) tespiti için enzim-işaretleli antikor olarak enzim bağlı immünosorban testinde uygulandı. Tespit limiti 60 CFU L⁽⁻¹⁾ olarak belirlenmiştir.

Yin ve ark. (32) ise yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus*'un tespiti için bir biyolojik hibrit nano yöntem geliştirmişlerdir. Metodun merkezinde bir spesifik hücre duvar bağlama domain (CBD) ile HRP enzimi ve Cu₃(PO₄)₂ inorganik hibrit nano çiçek sentezlemede kullanılmıştır. Plak anti-*S. Aureus* poliklonal antikor ile kaplanmıştır üzerine CBD-HRP-Cu₃(PO₄)₂ organik-inorganik hibrit nano çiçek ilave edilmiştir. HRP enziminin aktivasyonu için TMB eklenmiştir. Yöntemin, 10¹ ila 10⁶ koloni oluşturan birim (CFU)/mL aralığında lineer olarak 6 CFU/mL' ye kadar olan tespit sınırlarıyla *S. aureus*'u özgül olarak tespit etme kapasitesi kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada ise ilk defa Gaucher hastalığının tanısında fonksiyonel konjugat sistemi kullanılmıştır. Geleneksel sandviç ELISA sisteminde Anti-GBA 1 konjugatı yüksek yanıt verirken fonksiyonel konjugat sisteminde Ab 1 (10 µl)-HRP-inorganik hibrit konjugatı daha yüksek yanıt vermiştir. Klasik yöntem için Lineer analitik performans R² >0.99 ve LOQ değeri 10 ng/mL olarak belirlenirken hibrit konjugat sisteminde ise R² >0.99 ve LOQ değeri 12,5 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bulgular, fonksiyonelleştirilmiş hibrit konjugat sisteminin yüksek antijen bağlama kapasitesiyle çalıştığını ve tespit limitinin ticari ELISA sistemlerine yakın olduğunu ortaya koymuştur. Çalışma sonuçları tekrarlanabilirlik ve stabilite ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç duymakla birlikte organik-inorganik hibrit nano çiçek teknolojisi inovatif biyomühendislik yaklaşımları ile diagnostik alanda geleneksel ELISA sistemine yeni bir alan yaratarak işaretlenmesi zor antikorların tek basamakta HRP enzimi ile birleştirilerek test sistemlerine dahil edilebileceği potansiyelini göstermiştir. Bu yaklaşım, biyosensör, biyotıp ve biyokatalitik süreçlere kadar çeşitli uygulamalar için umut vaat edici olarak belirlenmiştir.

\\ “Bu çalışma Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BBAP20F14 proje kodu ile desteklenmiştir.” \\

KAYNAKLAR

- Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage disease. TINS 2011; 34, 8: 401-10.
- Pastores GM, Hughes DA Non-neuronopathic lysosomal storage disorders: Disease spectrum and treatments. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2015; 29: 173-82.
- Wilcox WR Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. J Pediatr 2004; 144: 3-14.
- Lampe C, Bellettato CM, Karabul N, Scarpa M. Mucopolysaccharidoses and Other Lysosomal Storage Diseases. Rheum Dis Clin N Am 2013; 39: 431-55.
- Bellettato CM, Hubert L, Scarpa M, Wangler M.F. Inborn errors of metabolism involving complex molecules. Pediatr Clin N Am 2018; 65: 353-73.
- Kuku İ, Kaya E, Yıldız R, Harputluoğlu H, Aydoğdu İ, Gürakan F. Gaucher Hastalığı: iki olgu sunumu. İç Hast Der 2002; 9-4: 158-61.

7. Gelmez Beker D, Aliyazıcıoğlu Y, Lizozomal Depo Hastalıklarının Tanı ve Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. OMÜ Tıp Dergisi 2002; 19: 78-82.
8. Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliği, Madde 4.2.10 Lizozomal hastalıklar için tedavi ilkeleri.
9. Kingma SDK, Bodamer OA, Wijburg F.A. Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders; challenges of screening. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2015; 29: 145-57.
10. Solomon M, Muro S. Lysosomal Enzyme Replacement Therapies: Historical Development, Clinical Outcomes, and Future Perspectives. Adv Drug Deliv Rev 2017; 118: 109-34.
11. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8: 871-4.
12. Wei T, Du D, Zhu MJ, Lin Y, Dai Z. An Improved Ultrasensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Hydrangea-Like Antibody-Enzyme-Inorganic Three-in-One Nanocomposites. ACS Appl Mater Interfaces 2016; 8: 6329-35.
13. Tong S, Ren B, Zheng Z, Shen H, Bao G. Tiny Grains Give Huge Gains: Nanocrystal-Based Signal Amplification for Biomolecule Detection. ACS Nano 2013; 25: 5142-50.
14. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics, Br J Hosp Med 2016; 77: 98-101.
15. Chu YW, Wang BY, Lin HS et al. Layer by Layer Assembly of Biotinylated Protein Networks for Signal Amplification. Chem Commun 2013; 49: 2397-9.
16. Zhang W, Bielaszewska M, Pulz M et al. New Immuno-PCR Assay for Detection of Low Concentrations of Shiga Toxin 2 and Its Variants. J Clin Microbiol 2008; 46: 1292-7.
17. Bu D, Zhuang H, Yang G, Ping X. A real-time immuno-PCR assay for the detection of tetrabromobisphenol A. Anal Methods 2015; 7: 99-106.
18. Speroni F, Elviri L, Careri M, Mangia A. Magnetic particles functionalized with PAMAM-dendrimers and antibodies: a new system for an ELISA method able to detect Ara h3/4 peanut allergen in foods. Anal Bioanal Chem 2010; 397: 3035-3042.
19. Lin H, Liu Y, Huo J et al. Modified Enzyme-linked Immunosorbent Assay Strategy Using Graphene Oxide Sheets and Gold Nanoparticles Functionalized with Different Antibody Types. Anal Chem 2013; 85: 6228-32.
20. Qu ZY, Xu H, Xu P et al. Ultrasensitive ELISA Using Enzyme-Loaded Nanospherical Brushes as Labels. Anal Chem 2014; 86: 9367-71.
21. Wang LB, Wang YC, He R et al. A new nanobiocatalytic system based on allosteric effect with dramatically enhanced enzymatic performance. J Am Chem Soc 2013; 135: 1272-5.
22. Netto CGC, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes, J Mol Catal B Enzym 2013; 85: 71-92.
23. Altınkaynak C, Yilmaz I, Koksall Z, Özdemir H, Ocsoy I, Özdemir N. Preparation of lactoperoxidase incorporated hybrid nanoflower and its excellent activity and stability. Int J Biol Macromol 2016; 84: 402-9.
24. Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers, Nat Nanotechnol 2012; 7: 428-32.
25. Altınkaynak C, Tavlasoglu S, Ozdemir N, Ocsoy I. A new generation approach in enzyme immobilization: organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. Enzyme Microb Technol 2016; 93: 105-12.
26. Lee SW, Cheon SA, Kim MI et al. Organic-inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. J Nanobiotechnol 2015; 13: 54.
27. Subramani IS, Perumal VP, Gopinath SCB, Phan & Norani KS, Mohamed M. Organic-Inorganic Hybrid Nanoflower Production and Analytical Utilization: Fundamental to Cutting-Edge Technologies. Crit Rev Anal Chem 2022; 52: 1488-510.
28. Zhang Z, Zhang Y, Song R et al. Manganese (II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. Sens Actuators B Chem 2015; 211: 310-7.
29. Liu Y, Chen J, Du M, Wang X, Ji X, He Z. The preparation of dual-functional hybrid nanoflower and its application in the ultrasensitive detection of disease-related biomarker. Biosens Bioelectron 2017; 92: 68-73.
30. Ye R, Xu H, Gu J, Chen H. Bioinspired synthesis of protein-posnjakite organic-inorganic nanobiohybrid for biosensing applications. Anal Chim Acta 2021; 25: 31-6.
31. Zeinhom MMA, Wang Y, Sheng L et al. Smart phone based immunosensor coupled with nanoflower signal amplification for rapid detection of Salmonella Enteritidis in milk, cheese and water. Sens Actuators B Chem 2018; 261: 75-82.
32. Yin W, Zhu L, Tang Q, Ma Y, Chou SH, He J. Bio-hybrid nanoarchitectonics of nanoflower-based ELISA method for the detection of Staphylococcus aureus. Sens Actuators B Chem 2022; 366: 132005.