

Moleküler Biyoloji Yöntemlerinin Tıbbi Laboratuvarlarda Güncel Kullanımı

Current Use of Molecular Biology Methods in Medical Laboratory

Sinan Tetikoğlu^{1,2,a}, Funda Bilgili-Tetikoğlu^{1,2,b}, Selcen Çelik-Uzuner^{1,c,*}

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Trabzon, 61080, Türkiye.

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 61080, Türkiye.

*Sorumlu yazar e-posta: selcen.celik@ktu.edu.tr

^a<https://orcid.org/0000-0002-7725-6034>

^b<https://orcid.org/0000-0003-3734-4803>

^c<https://orcid.org/0000-0002-9558-7048>

ÖZET

Moleküler biyoloji, temelde DNA, RNA ve proteinlerin hücre içi sentezi, işlenmesi ve yıkımına ilişkin hücrel yollar ile bu süreçleri düzenleyen mekanizmaların bütününi inceleyen bir bilim dalıdır. Organizmanın en küçük birimi olan hücrelerde bulunan bu moleküllerin tespitine yönelik yöntemlerin klinik uygulamalara aktarılmasıyla, hastalıkların tanı, tedavi ve seyri daha hızlı ve duyarlı yöntemlerle belirlenebilir hale gelmiştir. Günümüzde hemen her hastalığın hücrel bir sebebi ve sonucu olduğu bilinmektedir. Moleküler biyoloji teknikleri, hastalıkların moleküler düzeydeki nedenlerinin aydınlatılması, hastalığa özgü biyobelirteçlerin keşfi ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından vazgeçilmez araçlardır. Moleküler tekniklerin gelişen teknolojiyle entegrasyonu, bu yöntemleri tanı ve tedavide önemli bir basamak haline getirmiştir. Bu derleme çalışmasının amacı, tıbbi laboratuvarlarda kullanıma uygun moleküler biyoloji yöntemlerine güncel bakış açısı sunmak, son yıllarda yapılan çalışmalardan örnekler vererek bu alandaki ilerlemeleri vurgulamak ve mevcut moleküler biyoloji yöntemlerini tıbbi laboratuvarlarda kullanıma entegre etmenin önemine dikkat çekmektir. Ayrıca bu derleme; PCR, NGS, FISH, CRISPR, moleküler blotlama, ELISA ve immünboyama gibi moleküler teknolojilerin tıbbi kullanımlarına, hassasiyetlerine ve klinik uygulamalar üzerindeki katkılarına vurgu yapma yönüyle literatüre katkı sağlayarak, tıbbi laboratuvarlar ve moleküler biyoloji alanlarının ortak paydaşlarına değinmiş olacaktır. Ayrıca moleküler biyoloji tekniklerinin tıbbi laboratuvarlarda kullanılması üzerindeki sınırlılıkları ve gelecek beklentileri de tartışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: CRISPR, FISH, Moleküler teknikler, NGS, PCR, Tıbbi laboratuvar

ABSTRACT

Molecular biology is a scientific discipline that primarily investigates the cellular pathways and regulatory mechanisms involved in the synthesis, processing, and degradation of DNA, RNA, and proteins within the cell. The translation of methods used to detect these molecules in cells—the smallest functional units of the organism—into clinical applications has enabled the diagnosis, treatment, and monitoring of diseases through more rapid and sensitive techniques. Today, it is well established that nearly every disease has a cellular cause and consequence. Molecular biology techniques are indispensable tools for elucidating the molecular basis of diseases, discovering disease-specific biomarkers, and developing personalized therapeutic strategies. The integration of molecular techniques with advancing technology has made these methods a critical step in diagnosis and therapy. This review aims to provide an up-to-date perspective on molecular biology techniques suitable for use in medical laboratories, highlight recent advances in the field by presenting examples from recent studies, and emphasize the importance of integrating current molecular biology methods into medical laboratory practice. Additionally, this review seeks to contribute to the literature by discussing the medical applications, sensitivities, and clinical impacts of key molecular technologies such as PCR, NGS, FISH, CRISPR, molecular blotting, ELISA, and immunostaining. Furthermore, the limitations of employing molecular biology techniques in medical laboratories and future expectations for the field will also be addressed, offering a comprehensive evaluation for stakeholders across both molecular biology and medical laboratory sciences.

Keywords: CRISPR, FISH, Medical laboratory, Molecular techniques, NGS, PCR

GİRİŞ

Moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde, salgın hastalıklar, genetik hastalıklar, kanser tedavileri ve aşılama gibi alanlarda tıbbi laboratuvarların tanı ve tedaviye yaklaşması önemli yol kat etmiştir.¹ Hücrelerin yapı taşlarını oluşturan moleküllerin (DNA, RNA ve protein) kullanılmasıyla gerçekleştirilen bu teknikler; hastalıklara daha öznel yaklaşılması, tedaviye yeni bakış açılarının geliştirilmesi ve tanı süresinin kısaltılması gibi yönlerden giderek daha da önem kazanmaktadır. Bu tekniklerin ortaya çıkışı, klasik tıbbi tanı yöntemlerinin duyarlılığını, verimliliğini ve özgünlüğünü artırmıştır. Moleküler teknolojilerdeki süregelen ilerlemeler, tıbbi laboratuvarları artık kişiselleştirilmiş tıbbı doğru evirmektedir.²

Tıbbi Laboratuvarlarda Kullanılan Temel Moleküler Biyoloji Teknikleri

1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), tanı ve teşhisi kapsayan geniş kullanım alanlarıyla tıbbi laboratuvarlarda sık kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinden biridir. Kary Mullis tarafından 1983'te geliştirilen ve 1993'te Nobel Kimya Ödülü'nü alan PCR çok az miktardaki DNA'yı enzimatik olarak milyarlarca kopya haline getiren bir tekniktir.³ PCR işlemi, bir termal ısıtıcı blokta, hedef bir DNA dizisinin primerler yardımıyla sınırlandırılarak, milyarlarca kopyasının saatler içinde üretilmesine imkan tanır.^{2,4} PCR; DNA'nın ısı döngüleri sayesinde üç ana aşamada çoğaltılmasına dayanır: Denatürasyonda (94-98°C); çift sarmal DNA yüksek sıcaklıkta ısıtılarak iki tek zincire ayrılır. Annealing'de (50-65°C); özel olarak tasarlanmış kısa DNA dizileri olan primerler, hedef DNA bölgesine bağlanır. Uzama'da (72°C) ise, Taq polimeraz enzimi, primerlerden itibaren yeni DNA zinciri sentezler. Bu döngü yaklaşık 30-40 kez tekrarlanır ve hedef DNA milyarlarca kopyaya ulaşır.⁵ Amplifiye edilen DNA dizi havuzu sonraki çalışmalarda daha ayrıntılı çalışmalarda kullanılabilir. Böylece, miktarı az dahi olsa istenilen patojen veya mutasyon tespit edilebilir. PCR rutin uygulamalarda, COVID-19, Tüberküloz, HIV ve hepatit gibi mikrobiyal enfeksiyonların taranmasında hızlı ve kapsamlı bir tarama sağlar.⁶ PCR, tıbbi laboratuvarlarda özellikle mikroorganizma tespiti, genetik hastalıkların tanısı, kanser araştırmaları ve bireysel genetik analizlerde yaygın olarak kullanılır. Tıbbi

laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan PCR türleri şunlardır:

1.1. Konvansiyonel PCR (Standart PCR)

Konvansiyonel PCR, belirli bir DNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan en temel PCR türüdür. Bu türde, genetik materyal çoğaltılır ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenir. Mikroorganizma tespiti, mutasyon analizi ve genetik hastalıkların teşhisinde kullanılabilir. Uygulaması basittir ve düşük maliyetlidir. Fakat ürünlerin görüntülenmesi gereklidir, miktar tayini yapamaz.⁵

1.2. QPCR (Quantitative PCR)

QPCR, amplifikasyon ürünlerinin sayısını gerçek zamanlı olarak izleyerek DNA/RNA'nın miktarını belirlemeye olanak tanır. QPCR genellikle gen ekspresyonu analizi ve viral yük tespiti için kullanılır. Virüs yükü belirleme (örneğin HIV, COVID-19), gen ekspresyonu analizi ve kanser araştırmalarında kullanılabilir.⁷ Yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlar, sonuçlar hızla elde edilir. Fakat, teknik olarak karmaşık olabilir, uzmanlık gerektirir ve standart PCR'a göre pahalıdır. Gerçek zamanlı PCR da denilen kantitatif PCR (Q-PCR), istenilen gen veya patojenin varlığını sayısal kat oranında hesaplayarak PCR'ın kalite ve yeterliliğini, tedaviye cevabı daha da artırmaktadır.⁶

1.3. RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

RT-PCR, RNA'nın DNA'ya dönüştürülmesini (ters transkripsiyon) takiben, bu DNA'nın çoğaltılmasını sağlar. Bu yöntem özellikle RNA virüslerinin tespiti için kullanılır. RNA virüslerinin (örneğin grip, HIV, COVID-19) tespiti ve gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılır.⁸

1.4. Multiplex PCR

Multiplex PCR, birden fazla hedef DNA bölgesinin aynı anda çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu, aynı örnek üzerinde birden fazla genetik hedefi hızlı bir şekilde analiz etmek için kullanılır. Çoklu patojenlerin tespiti ve genetik hastalıkların taramasında kullanılır. Birden fazla hedefin aynı anda tespit edilmesi sağladığı için zaman ve maliyet tasarrufu sağlar. Primer tasarımı zorluklar yaşanabilir.⁹

1.5. Nested PCR

Nested PCR, ilk PCR amplifikasyonunun ürününü bir kez daha amplifiye eden ikinci bir PCR reaksiyonu içerir. Bu, daha düşük DNA miktarları ile çalışmayı ve daha yüksek doğruluk sağlamayı mümkün kılar. Düşük DNA konsantrasyonu durumunda tercih edilebilir. Yüksek duyarlılık ve doğruluk sağlar. İki aşamalı işlem gerektirdiği için zaman alıcı olabilir.⁹

1.6. Digital PCR (dPCR)

Digital PCR, numunenin her bir molekülünün ayrı ayrı analiz edilmesini sağlar. Bu, çok hassas ve kesin sonuçlar elde edilmesini sağlar, özellikle düşük miktarda hedef DNA/RNA ile çalışırken etkilidir. Genetik mutasyonların tespitinde, nadir mutasyonların belirlenmesinde ve mikrobiyom analizinde kullanılır. Pahalı ekipman gerektirir ve teknik bilgi gerektirir.¹⁰

1.7. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification)

LAMP, sıcaklık kontrollü bir ortamda DNA çoğaltma işlemi yapar ve genellikle PCR'a alternatif olarak kullanılır. Bu, PCR'ın laboratuvar koşullarında gerektirdiği sıcaklık döngülerini ortadan kaldırır. Sahada yapılan testlerde ve hızlı mikroorganizma tespitinde kullanılır. Daha hızlı ve daha az ekipman gerektirir. Fakat yalnızca belirli uygulamalar için uygundur.¹¹

Tanı ve Tedavide PCR Uygulamaları

PCR tekniği, yaygın salgın hastalıklarının tanımlanması ve tespit edilmesinde moleküler biyoloji, mikrobiyoloji ve biyokimya alanlarında hala altın standarttır. Örneğin 2019 yılından itibaren tüm dünyayı sarsan COVID-19 salgınından sorumlu olan SARS-CoV-2 virüsünün tespitinin dakikalar içinde hızlıca ve en doğru şekilde yapılmasının arkasında şüphesiz PCR testleri ve analizleri vardır. Bu PCR temelli analizler hastalıkların erken tanınmasına aracılık ederek tedavi sürecinin hızlanması ve bulaşıcı hastalıklarda bulaşıcılığın azalması gibi süreçlere katkı sunar. PCR testleri, genetik analizlerde de son derece elzemdir. Özellikle aile öyküsünde kistik fibrozis, orak hücre anemisi ve kanser olan insanlarda mutasyon taramalarıyla hastalıklardan korunma ve erken teşhis sağlanabilmektedir.^{12,13} Hedefli PCR testleri, prenatal tanı ve preimplantasyon genetik tarama gibi uygulamalar için histoloji ve embriyoloji alanında kullanılmaktadır.¹⁴ Tablo 1'de yöntemler ve kullanım amaçları özetlenmektedir. Klasik PCR yöntemine kıyasla geliştirilen yeni PCR tabanlı teknikler, özgüllük, hassasiyet ve çoklu hedef analizi açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Örneğin nested PCR, iki ardışık amplifikasyon adımı ile çalışarak spesifikliği artırır ve yanlış amplifikasyon riskini azaltır. Dijital PCR (dPCR) ise DNA örneğini binlerce küçük reaksiyon bölmesine ayırarak mutlak DNA miktarını son derece hassas bir şekilde ölçmeyi mümkün kılar; özellikle düşük frekanstaki mutasyonların tespitinde büyük üstünlük sağlar. Multiplex PCR yöntemi ise birden fazla hedefin aynı anda çoğaltılmasına izin vererek, zamandan, numuneden ve reaktiften tasarruf sağlar ve kompleks analizlerin etkin bir şekilde

gerçekleştirilmesine olanak tanır. Bu gelişmiş yöntemler, moleküler tanı ve araştırmalarda PCR teknolojisinin uygulama alanlarını önemli ölçüde genişletmiştir.

2. Yeni nesil dizileme (NGS)

Yeni nesil dizileme (NGS), milyonlarca DNA parçasının aynı anda hızlı bir şekilde sıralanmasına olanak sağlayarak, genomun tüm dizisi hakkında bilgi vermektedir. NGS, özellikle 2003 yılında tamamlanan İnsan Genom Projesi'nden sonra genom çalışmalarında devrim yaratacak nitelikte bilgi ortaya çıkaran bir dizileme tekniğidir. Elde edilen genomik veriler genomun yapısı, işleyişi ve bileşenleri hakkında daha kapsamlı bilgilere sahip olmayı sağlamaktadır.¹⁵ Genomun tamamının dizilenmesinin yanında, belirli bir bölgenin dizilenmesine de olanak sağlayan NGS; genetik varyasyonlar, gen ekspresyon profilleri ve epigenetik değişiklikler ile ilgili de ayrıntılı veri sunmaktadır.¹⁶ NGS'nin temel aşamaları; DNA ya da RNA örneğinin (kan, doku, tükürük, idrar, biyopsi) ekstrakte edilmesi, DNA'ların küçük parçalara (fragmentlere) ayrılması ve bu parçalara özel adaptör dizileri eklenmesiyle kütüphane hazırlanması, kütüphanenin dizileme cihazına yüklenmeye hazır hale getirilmesi, opsiyonel olarak amplifikasyon ve son olarak sekanslamadır. Cihaza bağlı olarak farklı teknolojiler kullanılır: Illumina, floresan nükleotidlerle sentez sırasında okuma sağlarken; Ion torrent, pH değişikliğiyle okuma sağlar. Oxford Nanopore ise DNA'nın nano boyutta bir pordan geçişiyle baz tanıma sağlar. Okumalar sonucunda DNA zinciri baz baz okunur, sinyaller dijital verilere dönüştürülür, ardından biyoenformatik analiz yapılır.¹⁷ NGS; temel araştırmalardan, klinik uygulamalara kadar her alanda kullanılabilmekte ve kolaylık sağlamaktadır. Klinik çalışmalarda özellikle hastalıkların erken teşhisinde, mutasyon taramalarında, onkolojide, adli tıpta ve nadir hastalıkların tanımlanmasında kullanılmaktadır.¹⁸

Tanı ve Tedavide NGS Uygulamaları

NGS, onkolojide kanser dokularının ayrıntılı genom profillerinin çıkarılmasında, kopya sayısı varyasyonlarının ve mutasyonların belirlenmesinde önemli bilgiler sağlar.¹⁷ Özellikle kanser biyobelirteçleri olarak da adlandırılan kanser spesifik genlerin (EGFR, BRCA1/2 ve KRAS gibi) ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, kişiye özel hedefli kanser tedavisinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kanser tedavi süreçlerinde test edilen genomik direnç ve instabilitenin belirlenmesini kolaylaştırır.¹⁸ NGS, genetik tanı metotlarıyla belirlenmesi zor olan, hastalıklara ait

bilinmeyen mutasyonların tespit edilmesini sağlar. Çoklu kalıtım modeline sahip nörolojik sendromları, metabolik hastalıkların ve gelişim geriliklerinin genetik mutasyonlarını belirlemede tüm ekzom dizilemesi (WES) ve tüm genom dizilemesi (WGS) kullanılabilir.¹⁸ Son on beş yıl içinde üçüncü nesil dizileme olarak adlandırılan Nanopore dizileme yöntemi keşfedilmiştir.¹⁹ Nanopore sekanslama, tek DNA / RNA moleküllerinden gerçek zamanlı okuma sağlayarak birçok biyomedikal çalışmayı mümkün kılmıştır.^{20,21} İkinci nesil dizileme yöntemlerinden olan NGS'ye göre avantajları bulunmakla birlikte kullanımının daha az yaygın olmasından kaynaklı maliyeti daha yüksek bir tekniktir.

3. Floresan *in situ* hibridizasyon

Floresan *in situ* hibridizasyon (kısaca FISH), bir kromozom üzerindeki belirli bir DNA dizisini tespit etmek ve yerini belirlemek için kullanılan bir moleküler laboratuvar tekniğidir. Bu teknikte, bir bireyin kromozomlarının tam seti bir lama yayılır ve daha sonra hedef bölgeye spesifik olan bir "prob" ile muamele edilir. Prob, floresan boya ile etiketlenmiş küçük bir DNA dizisidir. Floresan boya ile etiketlenen prob, kromozom setinde eşleşen diziyi bulur ve ardından o bölgeye bağlanır. Özel bir floresan mikroskop kullanılarak, floresan probun bağlandığı kromozom ve alt kromozomal konum belirlenebilir.^{22,23} FISH yönteminin basamakları: İncelenecek örnek (metafaz kromozomlar, hücre süspansiyonu ya da doku kesiti) cam lam üzerine sabitlenir. DNA çift sarmalı ısı ile denatüre edilir. Floresan işaretli özel DNA problemleri örneğe uygulanır ve hedef dizilerle eşleşir. Bağlanmayan problemler yıkama ile uzaklaştırılır. Floresan mikroskobu ile problemlerin bağlandığı bölgeler renkli sinyaller olarak görüntülenir.²⁴ FISH tekniğinin tipleri şunlardır: Interfaz FISH, interfaz evresindeki hücrelerde uygulanır. Metafaz FISH, hücre bölünmesi sırasında (metafaz kromozomlar üzerinde) uygulanır. Fiber FISH, DNA'nın lineer hale getirilip uzun dizilerin görüntülenmesidir. Q-FISH, telomer uzunluğunun ölçülmesinde kullanılır. Multicolor FISH (M-FISH), Tüm kromozomlara farklı renkler atanarak kompleks anomalilerin incelenmesinde kullanılır. Hedef gen bölgelerine göre farklı FISH problemleri kullanılabilir. Belirli bir gen ya da kromozom bölgesi için lokus spesifik problemler kullanılır ve tıbbi laboratuvarlarda hastalık geni amplifikasyonu/delesyonu belirlebilir. Kromozom sentromer bölgesi için sentromerik problemler kullanılır, anöploid taramalarında (örneğin 13,18,21) tercih edilir. Kromozom uçları için kullanılan telomerik

problemler özellikle denge bozuklukları hastalıklarının teşhisinde kullanılır. Gen füzyonlarını belirlemek için ise füzyon problemler kullanılır, özellikle kanserde füzyon genlerini belirlemede tercih edilir.²⁵

Tanı ve Tedavide FISH Uygulamaları

FISH, özellikle moleküler genetik laboratuvarlarında kromozomal anomalilerin (anöploidiler, translokasyonlar ve delesyonlar) belirlenmesinde, kromozomal hastalıkların teşhisinde ve erken tanıda yaygın olarak kullanılır. FISH'in bir diğer kullanım alanı onkolojide, kanserli dokulardaki kromozomal anomalilikleri tespit etmektir.^{26,27} Örneğin, kronik miyeloid lösemili (KML) hastaların %90'ından fazlasında görülen, 9 ve 22. kromozomlar arası translokasyondan [t(9; 22) (q34; q11)] kaynaklı oluşan Philadelphia kromozomunun yapısında bulunan BCR-ABL füzyon geninin varlığının belirlenmesinde FISH tekniği yaygın olarak kullanılır. Sonucun pozitif olması durumunda bu füzyon geninin ürünü olan mutant proteinin aktivitesi spesifik tirozin kinaz inhibitörleri ile hastalar reçete edilir.²⁷ Böylece hastalıklar için hedefli tedavilerin seçilmesini sağlar. Benzer şekilde meme kanserlerinde *HER2* geninin amplifikasyonunu değerlendirmek için FISH tekniği kullanılır.^{28,29} *HER2* pozitif meme kanserlerinde, bu sonuç hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin, özellikle trastuzumab gibi *HER2* inhibitörlerinin kullanımını mümkün kılmaktadır. Ayrıca, hormon reseptör pozitifliği saptanan hastalarda hormon tedavisi de uygulanabilmektedir.³⁰ Tablo 1'de yöntemler ve kullanım amaçları özetlenmektedir.

FISH ayrıca prenatal tanı alanında, hızlı ve güvenilir sonuçlar sağlaması nedeniyle büyük öneme sahiptir. Özellikle trizomi 21,13 ve 18 gibi kromozom sayısal bozukluklarının hızlı taramasında kullanılır. Ayrıca X ve Y kromozomlarını da analiz ederek Turner sendromu, Klinefelter sendromu gibi cinsiyet kromozomu anomalilerinin erken tanısına olanak sağlar. Geleneksel kromozom analizleri (karyotipleme) 10-14 gün sürebilirken, FISH ile 24-48 saat içinde ön tanı sağlanabilir. Bu, özellikle gebeliğin erken dönemlerinde aileye hızlı bilgi sunmak açısından kritiktir. Konvansiyonel karyotipleme ile saptanamayan DiGeorge sendromu (22q11 delesyonu) gibi mikrodelsyon sendromlarının tanısında FISH, yüksek hassasiyet sunar. FISH ayrıca prenatal tanı amacıyla elde edilen amniyotik sıvı, koryon villus veya fetal kan örneklerinde doğrudan hücre kültürüne ihtiyaç duymadan uygulanabilir.³¹

FISH'in avantajları; hedefe özgü, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta olması, hem metafaz hem interfaz hücrelerde uygulanabilir olması, kısa sürede sonuç alınabilir (örneğin 24 saat) olması, hücre kültürü gerektirmemesi ve kromozomal yapıların doğrudan görüntülenmesidir. Dezavantajları ise; yalnızca hedeflenen bölgeyi analiz etmesi (genom taraması yapmaz), proba özel test yapılabilmesi (ön hazırlık gerektirir), yüksek maliyetli olabilir, veri miktarı sınırlıdır (NGS ile kıyaslandığında).

4. CRISPR Tabanlı Teknolojiler

CRISPR-Cas, çoğu bakteri ve arkealarda bulunan, onları diğer virüs ve yabancı genetik materyallerden koruyan bağışıklık savunma mekanizmasıdır.^{32,33} Bakterilerin CRISPR dizisinden ürettiği RNA segmentleri gibi, *in vitro* olarak bir hücrenin DNA'sındaki belirli hedef sekansa bağlanan kısa bir "rehber" RNA parçası oluşturulur. Cas9 nükleaz enzimi tarafından tanınan rehber RNA hücrelere aktarıldığında, kılavuz RNA amaçlanan DNA sekansını tanır ve Cas9 enzimi DNA'yı hedeflenen yerde keserek bakterideki süreci yansıtır.^{34,35} CRISPR-Cas9 gen düzenleme teknolojisi, mutasyonları düzelterek veya hastalığa neden olan genleri büyük bir hassasiyet ve verimlilikle bozarak hastalıkların tedavisi için geleceğin umut vaat eden araçlarından biridir.³⁶ Cas9, hastalıklar sırasında meydana gelen genomik değişiklikleri düzenlemede, hastalıkların moleküler teşhisi ve tedavisinde eşsiz gen düzenleme aracıdır.³⁷ Tıbbi laboratuvarlarda CRISPR; gen terapisi, tanı testleri ve yeni moleküler belirteçlerin geliştirilmesi için iyi bir adaydır.³⁴

Tanı ve Tedavide CRISPR Uygulamaları

CRISPR/Cas9, hemolitik hastalıklar, immün yetmezlik bozuklukları, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar, X'e bağlı kromozomal bozukluklar ve kanserler de dahil olmak üzere çok sayıda hastalığı diğer gen düzenleme yaklaşımlarına kıyasla daha yüksek özgüllük ve verimlilikle tedavi etmek için kullanılmıştır. Yüksek hassasiyeti ve verimliliği nedeniyle, CRISPR/Cas9 stratejileri gen spesifik hastalıklarda, delesyon, insersiyon gibi mutasyonlar oluşturarak hastalıkları tedavi edebilir.^{32,38}

SHERLOCK ve DETECTR gibi CRISPR tabanlı teşhis platformları, belirli nükleik asit dizilerini tespit etmek için CRISPR'in hassasiyetinden yararlanır. Bu teknolojiler yüksek hassasiyet sunar ve küçük belirteçlerle dahi nokta atışı teşhis yapabilir. Örneğin, Zika virüsü, HIV ve COVID-19 gibi bulaşıcı mikroorganizmaların hızlı tespiti için CRISPR tabanlı analizler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, kaynak sınırlı

ortamlar için bile oldukça hassas araçlar sunarak moleküler teşhisi daha da kolaylaştırmaktadır.³⁹

Viral enfeksiyonları teşhis etmek için rutin olarak kullanılan RT-qPCR, sekanslama tabanlı yöntemler ve immünolojik yöntemlerin yüksek maliyetini düşürmek, doğru ve hızlı tanılamayı artırmak için CRISPR-Cas teknolojilerinin kullanıldığı tanı testleri kullanılabilir, bu sayede hastalıkların erken tanı ve tedavisi kolaylaşabilir.⁴⁰

CRISPR-Cas9 tekniği, hücreler (*in vitro*) ve hayvanlarda (*in vivo*) çalışmak üzere kalıtsal hastalıklarla ilişkili herhangi bir DNA mutasyonunu düzenlemek için kullanılmaktadır.^{41,42} Ayrıca CRISPR-Cas9; hemofili, β -talasemi, kistik fibroz, Alzheimer, Huntington, Parkinson, Duchenne kas distrofisi, Tay-Sachs ve kırılğan X sendromu gibi çeşitli kalıtsal hastalıklarının tedavilerinin araştırılmasında kullanılabilir.⁴³⁻⁴⁷

Klinik çalışmalara bakıldığında CRISPR teknolojileri genetik olarak tanımlanmış hastalığı olan hastalara yöneliktir (Tablo 1). Bu nedenle, CRISPR Faz çalışmaları sağlıklı gönüllülerden ziyade hedef mutasyonu olan hastalara odaklanacaktır. Faz I klinik denemeleri gerçekleştirilen HG202 ilacı, yaşa bağlı maküler dejenerasyon (AMD) tedavisinde kullanılan ilk CRISPR/Cas13 RNA düzenleme tedavisidir. FDA tarafından onaylanan bu tedavi, VEGF-A mRNA'sını hedef alarak AMD tedavisinde umut verici sonuçlar sunmaktadır.⁴⁸ Faz II klinik denemelerindeki WU-CART-007; Relaps veya tedaviye dirençli T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) ve lenfoblastik lenfoma (LBL) tedavisinde kullanılan anti-CD7 CAR-T tedavisidir.⁴⁹ Casgevy, sickle cell hastalığı (SCD) ve transfüzyon bağımlı beta talasemi (TDT) tedavisinde kullanılan, CRISPR/Cas9 teknolojisiyle geliştirilen ilk gen düzenleme tedavisidir. 2023 yılı sonunda ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır.⁵⁰ Tedavi, hastaların kendi kök hücreleri üzerinde yapılan gen düzenlemeleriyle sağlıklı hemoglobin üretimini teşvik eder. Klinik denemelerde, SCD hastalarının %93.5'inde bir yıl boyunca ağrı krizlerinin yaşanmadığı ve TDT hastalarında kan transfüzyonlarına olan ihtiyacın ortadan kalktığı gözlemlenmiştir.⁵¹

5. Moleküler Blotlama yöntemleri

Blotlama, proteinler veya nükleik asitler gibi makromoleküllerin türevlendirilmiş ince bir kağıt tabakasına veya adsorptif membran matrisine aktarılmasını ifade eder ve bu sayede molekül çok daha kolay ve hızlı şekilde tespit edilebilir. Nitroselüloz,

poliviniliden florür veya naylon gibi membranlara aktarılan molekül sonrasında gümüş boyama gibi uygun renklendiriciyle görüntülenebilir, radyoaktif olarak işaretlenebilir veya antikör muameleleriyle işaretlenebilir.⁵² Moleküler blotlama tekniklerinin başlıca türleri şunlardır:

5.1. Southern Blot (DNA Blotlama)

Southern Blotlama DNA örneklerinin içinde spesifik bir DNA dizisini belirlemek için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Tıbbi laboratuvarlarda hastalardan alınan kan, tükürük veya doku örneklerinin DNA sı izole edilip, agaroz jeli üzerinde elektroforezle ayrılıp, nitroselüloz veya naylon membrana DNA'nın transferi sonrası, aranan gen veya diziye özgü proba hibridizasyon yöntemiyle hedef dizisinin tespitini içermektedir. DNA'daki belirli genetik mutasyonların, delesyon ve amplifikasyonların tespiti Southern blotlama yöntemi ile belirlenebilir, bu haliyle genetik hastalıkların tanısı ve izlenmesi için kullanılabilir. Kanser, kalıtsal hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarının genetik temelleri Southern blot ile araştırılabilir.⁵³ Örneğin Duchenne Musküler Distrofisi (DMD) gibi genetik hastalıkların teşhisinde sorunlu olduğu düşünülen (DMD geni mutasyon tespiti hastalık tanısında kullanılır.) genin yokluğu southern blotlama ile belirlenebilir.⁵⁴ Kanser araştırmalarında ise, kanser spesifik onkogenlerin amplifikasyonu, tumor baskılayıcı genlerin delesyonu yine Southern blot ile tespit edilebilir.⁵⁵

5.2. Northern Blot (RNA Blotlama)

Northern Blotlama RNA örneklerinin içinde spesifik bir RNA dizisini belirlemek için kullanılan bir moleküler biyoloji yöntemidir. Özellikle gen ekspresyonunun incelenmesi çalışmalarında ve RNA virüslerinin tespitinde oldukça başarılı bir yöntemdir. Tıbbi laboratuvarlarda kanser gibi hastalıkların erken tanısında ve tedavi sürecinde belli genlerin transkrip seviyelerine bakılması veya HIV gibi virüslerin RNA'sının tespiti önemli bir parametredir. Bu amaçla hastanın RNA sı izole edilir, southern blotlamaya benzer şekilde agaroz jel elektroforeziyle boyutlarına göre ayrılır. Ayrılan RNA membrana transfer edildikten sonra spesifik bir prob ile hibridize edilerek gen ekspresyonu veya virüs RNA'sı gibi hedef moleküller tespit edilir.⁵⁶

5.3. Western Blot (Protein Blotlama)

Kompleks protein karışımındaki belirlenen proteinin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılan moleküler biyoloji yöntemidir. Western blot, proteomik analizlerde proteinlerin varlığını, miktarını ve boyutlarını belirlemek için kullanılır. Tıbbi

laboratuvarlarda kanserin biyomarkerlerinin tespiti, enfeksiyonların tanısı ve hastalık süreçlerinin izlenmesi için oldukça faydalıdır. Western blot, özellikle otoimmün hastalıkların tanısında, örneğin lupus gibi hastalıklarda vücutta hedef proteinlere karşı oluşan antikorlar tespit edilir. HIV'e karşı gelişen spesifik antikorlarla, HIV varlığı ve hastalık tanısı western blot ile tespit edilebilir. İlk olarak, bir hastadan alınan örnekteki proteinler izole edilir. Proteomlar, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yöntemiyle ayrılır. Bu işlemde, proteinler ağırlıklarına göre ayrılır. Ayrılan proteinler bir membrana transfer edilir. Proteine özgü bir primer antikör ile hibritizasyon yapılır. Antikör-protein kompleksi, enzimatik bir reaksiyon ile görsel olarak tespit edilir.⁵⁷

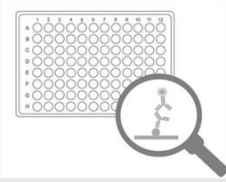
Tanı ve Tedavide Moleküler Blotlama Uygulamaları

DNA, RNA ve protein blotlama teknikleri temelde bir karışım molekül içerisinden aranan belirteç molekülün tespit edilmesi esasına dayanır. Moleküler blotlama yöntemleri, tıbbi laboratuvarlarda genetik, biyokimyasal ve moleküler analizler için sıklıkla kullanılan tekniklerdir. Bu yöntemler, genellikle DNA, RNA veya proteinleri tespit etmek ve analiz etmek amacıyla kullanılır. Tıbbi laboratuvarlarda hastalıkların tanı ve izlenmesinde, genetik bozuklukların belirlenmesinde, enfeksiyonların tespit edilmesinde ve tedavi süreçlerinin takibinde önemli rol oynar. Southern blotlama DMD gibi gen spesifik hastalıklardaki mutasyon veya delesyonları ve kanser spesifik genleri belirlemek için kullanılırken, northern blotlama gen ifadesi değişikliklerini ve RNA virüslerini tespit etmek için kullanılır. Western blotlama ise otoimmün hastalıkların teşhisinde, protein depo hastalıklarının tanı ve ilerlemesini belirlemede kullanılabilir.⁵⁸ Moleküler blotlama yöntemleri (Southern, Northern ve Western blot gibi) hedef DNA, RNA veya proteinlerin tespitinde yüksek özgüllük sunarak özellikle doğrulama amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu teknikler, hedef molekülün varlığının yanı sıra büyüklüğü hakkında da bilgi sağlayarak, kalitatif ve yarı-kantitatif analiz imkanı sunar. Ayrıca, DNA üzerindeki yapısal değişikliklerin veya proteinlerdeki modifikasyonların belirlenmesinde önemli bir araçtır. Ancak, blotlama tekniklerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İşlem basamaklarının çok olması nedeniyle deneyler zaman alıcıdır ve manuel işlem hatası riski artar. Ayrıca, düşük hassasiyet nedeniyle çok düşük miktardaki hedef moleküllerin tespitinde yetersiz kalabilir ve özel problemler veya antikorların kullanımı maliyeti artırabilir. Bazı

uygulamalarda ise yüksek miktarda numune gereksinimi söz konusu olabilir. Bu nedenlerle, blotlama yöntemleri hassasiyet, hız ve pratiklik gerektiren modern moleküler

tekniklere kıyasla bazı sınırlamalara sahiptir. Tablo 1’de yöntemler ve kullanım amaçları özetlenmektedir.

Tablo 1. Tıbbi Laboratuvarlarda kullanılabilen yöntemler

YÖNTEM	UYGULANDIĞI/ UYGULANABİLECEĞİ LABORATUVAR	KULLANIM AMACI
PCR-TABANLI YÖNTEMLER 	- Mikrobiyoloji Laboratuvarı - Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı	- Mikroorganizma tespiti, - Gen ifadesi değişikliklerinin belirlenmesi - Genetik hastalıkların tanısı, - Kanser araştırmaları ve bireysel genetik
NGS 	- Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Genetik Araştırma Laboratuvarları	- Hastalıkların erken teşhisi, - Mutasyon taramaları, - Adli tıp, - Nadir hastalıkların tanımlanması
FISH 	- Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Patoloji Laboratuvarı - Genetik Araştırma Laboratuvarları	Kanser hücrelerinde spesifik amplifikasyon ve translokasyon taraması
CRISPR-TABANLI YÖNTEMLER 	- Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Genetik Araştırma Laboratuvarları	Tek gen hastalıklarının tedavisi
MOLEKÜLER BLOTLAMA-TABANLI YÖNTEMLER 	- Mikrobiyoloji Laboratuvarı - Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Patoloji Laboratuvarı - Genetik Araştırma Laboratuvarları	- Genetik bozuklukların belirlenmesi, Enfeksiyonların tespit edilmesi ve tedavi süreçlerinin takibi, - Gen spesifik hastalıklardaki mutasyonun belirlenmesi, - Kanserlerde spesifik genlerin belirlenmesi, - Gen ifadesi değişikliklerinin belirlenmesi - RNA virüslerinin tespiti
ELISA 	- Mikrobiyoloji Laboratuvarı - Biyokimya Laboratuvarı	- HIV, Hepatit B ve C, COVID-19, Rubella, Sifiliz, Lyme hastalığı gibi enfeksiyon hastalıklarının teşhisi - Romatoid artrit, lupus gibi otoimmün hastalıkların tanı ve tedavisi, - TSH, LH, FSH, hCG gibi hormon düzey ölçümleri ile Fertilite testleri, - PSA (prostat kanseri), CEA (kolon kanseri), CA 125, CA 19-9 (yumurtalık ve pankreas kanseri) gibi tümör biyobelirteçlerinin tespiti, - IgE antikorlarının ölçümüyle alerjenlerin belirlenmesi
İMMÜNBOYAMA 	- Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Patoloji Laboratuvarı	- Kanser tanısı ve sınıflandırılması, - Prognostik belirteçlerin belirlenmesi, - Hedefe yönelik tedavi kararlarının alınması (örn. HER2 pozitifliğinde trastuzumab kullanımı), - İnflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tanısı - Enfeksiyon etkenlerinin lokalizasyonunun (örn. HPV, CMV) belirlenmesi
OMİK TEKNOLOJİLERİ 	- Moleküler/Tıbbi Genetik Laboratuvarı - Biyokimya Laboratuvarı - Patoloji Laboratuvarı	Kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları ile kişiye/hastalığa özgü belirteçlerin tespiti

6. ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analiz), özellikle tıbbi laboratuvarlarda çok yaygın kullanılan, duyarlı ve özgül bir immünolojik test yöntemidir. Proteinler, antijenler, antikorlar, hormonlar gibi biyomoleküllerin kanda, serumda ya da diğer biyolojik örneklerde varlığını ve miktarını saptamak için kullanılır. ELISA, bir enzimle işaretlenmiş antikorun veya antijenin, hedef molekülle (örneğin bir patojen antijeni ya da vücudun ona karşı ürettiği antikor) spesifik olarak bağlanması esasına dayanır. Bu bağlanma sonrası enzim substratıyla reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşur. Oluşan rengin şiddeti, spektrofotometre ile ölçülerek hedef molekülün varlığı ve miktarı belirlenir. Doğrudan (direct), dolaylı (indirect), sandviç ve kompetitif olmak üzere 4 tipi vardır. Doğrudan ELISA da antijen doğrudan yüzeye bağlanır, üzerine enzimle işaretli özgül antikor eklenir, hızlıdır ama özgüllük sınırlı olabilir. Dolaylı ELISA’da antijen sabitlenir, ardından örnekteki birincil antikor bağlanır. Bu antikora karşı ikincil, enzim bağlı bir antikor eklenir. Daha duyarlıdır, sinyali artırır. Sandviç ELISA’da plakaya önce "yakalama" antikoru bağlanır, üzerine örnek (antijen içeren) eklenir. Sonra “algılama” antikoru ve enzimle işaretli ikincil antikor uygulanır. Yüksek özgüllük ve hassasiyet sağlar. Kompetitif ELISA’da örnek ve enzimle işaretli antijen, aynı bağlanma bölgesi için yarışır, antijen seviyesi arttıkça renk şiddeti azalır, özellikle küçük moleküller için kullanılır.⁵⁹

Tanı ve Tedavide ELISA Uygulamaları

ELISA, tıbbi laboratuvarlarda pek çok hastalığın tanısında ve izlenmesinde sık kullanılan bir methodur. HIV (Anti-HIV antikorları), Hepatit B ve C (HBsAg, Anti-HCV), COVID-19 (SARS-CoV-2 antijenleri veya antikorları), Rubella, Sifiliz, Lyme hastalığı gibi enfeksiyon hastalıklarının ve Romatoid artrit, lupus gibi otoimmün hastalıkların tanı ve tedavisinde; TSH, LH, FSH, hCG gibi hormon düzey ölçümleri ile Fertilité testlerinde; PSA (prostat kanseri), CEA (kolon kanseri), CA 125, CA 19-9 (yumurtalık ve pankreas kanseri) gibi tümör biyobelirteçlerinin tespitinde, IgE antikorlarının ölçümüyle alerjenlerin belirlenmesinde kullanılır.^{60,61} ELISA’nın kullanım avantajları; yüksek duyarlılık ve özgüllükte olması, otomatize edilebilir olması ve çok sayıda örnek aynı anda işlenebilir olmasıdır. Dezavantajları ise, uygulama sırasında hata riskinin yüksek olması, bazı çapraz reaksiyonların yanlış pozitif sonuç verebilmesi ve zaman alıcı olabilmesidir.

7. İmmün Boyama

İmmün boyama (immunostaining), hücreler veya dokular içindeki hedef antijen moleküllerinin lokalizasyonunu ve seviyesini antikorlar kullanılarak belirleyen temel bir biyolojik tekniktir. Antikorlar genellikle floresan boya, enzim (örn. peroksidaz), metal tanecik veya başka bir işaretleyici ile bağlanır. Bu sayede boyanan bölgeler mikroskopla görünür hale gelir. İmmün boyama tekniklerinden immünohistokimya (İHC); doku kesitlerinde spesifik proteinlerin lokalizasyonunu saptamak için kullanılır. Antijen–antikor reaksiyonu sonucunda genellikle enzimatik reaksiyon (DAB ile kahverengi boyama) veya floresan işaretleme ile görünür hale gelir.⁶² Klinik patolojide kanserlerin alt tiplerinin belirlenmesi, metastaz kaynağının saptanması ve prognostik belirteçlerin tayininde sık kullanılır. Meme kanserinde ER, PR, HER2 biyobelirteçlerinin ve lenfomalarda CD antijenlerinin (CD20, CD3, vb.) tespitinde kullanılır. İmmünositokimya (ICC) tekniği ise, hücre düzeyinde yapılan immün boyamadır. Doku yerine hücre süspansiyonu ya da sitolojik örnekler kullanılır (örneğin PAP smear ya da vücut sıvıları). Genellikle *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında da kullanılır. İmmüno floresan Boyamada (IF) ise antikorlar, floresan boya (örneğin FITC, Alexa Fluor) ile işaretlenmiştir. Reaksiyon sonrası boyanan hücreler, floresan mikroskobu ile görüntülenir. ANA, anti-dsDNA, ANCA gibi otoantikorların tayininde, Pemfigus, lupus gibi bağ dokusu hastalıklarının tanısında, böbrek biyopsilerinde immün kompleks birikiminin gösterilmesinde kullanılır.⁶³

Tanı ve Tedavide İmmünboyama Uygulamaları

Tıbbi laboratuvarlarda immün boyama (immunostaining), hücrelerde veya doku kesitlerinde belirli proteinlerin (antijenlerin) varlığını ve dağılımını göstermek için kullanılan güçlü bir tekniktir. Genellikle mikroskop altında gözlemlenebilir hale getirmek için antijen-antikor etkileşimi esas alınır. Bu yöntem, tanısal patoloji, araştırma ve hastalıkların moleküler düzeyde anlaşılması açısından oldukça değerlidir. Tıbbi laboratuvarlarda kanser tanısı ve sınıflandırılmasında, prognostik belirteçlerin belirlenmesinde, hedefe yönelik tedavi kararlarında (örn. HER2 pozitifliğinde trastuzumab kullanımı), inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tanısında ve enfeksiyon etkenlerinin lokalizasyonunun (örn. HPV, CMV) belirlenmesinde kullanılır (Tablo 1).^{64,65} İmmünboyamanın avantajları; Protein ekspresyonunun hücre ya da doku düzeyinde lokalizasyonunu vermesi, histopatolojik

değerlendirmeye birlikte yorumlanabilir olması, hem tanısal hem prognostik bilgi sağlamasıdır. Dezavantajları ise, antikor seçimi çok kritiktir, spesifik olmayan boyanma yanlış pozitifliğe neden olabilir, teknik beceri ve tecrübe gerektirir.

8. Omik Teknolojiler

Omik teknolojileri, biyolojik sistemleri yüksek çözünürlüklü ve kapsamlı bir şekilde incelemek için geliştirilmiş bir dizi modern biyoteknolojik yöntemdir. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik dalları, tıbbi laboratuvarlarda hastalıkların tanı, prognoz ve tedavi süreçlerine yönelik önemli veriler sağlar. Omik teknolojileri, genetik, moleküler biyoloji ve biyoinformatik gibi disiplinlerin birleşimini içerir. Omik alanları, çeşitli biyolojik moleküllerin etkileşimlerini ve işlevlerini anlamaya yönelik farklı seviyelerde veri toplar.⁶⁶

8.1. Genomik (Genom Bilimi)

Genomik, bir organizmanın tüm genetik materyalini (DNA) inceler. İnsan genomu, tüm genetik bilginin bulunduğu bir dizilimi içerir ve bu bilgi, hastalıkların genetik temellerini anlamada temel bir kaynaktır. Genomik analiz, genetik mutasyonlar, varyasyonlar ve bireyler arası genetik farklılıkları ortaya koyar.⁶⁷

8.2. Transkriptomik (Gen Ekspresyonu)

Transkriptomik, hücrelerde hangi genlerin aktif olduğunu ve ne kadar ekspresyon gösterdiğini inceleyen bir alandır. Genetik materyalin RNA'ya dönüştürülmesi ve ardından proteinlere çevrilmesi süreci, transkriptomik analizlerle belirlenebilir. Bu, gen ekspresyonunun hastalıkların erken tespiti ve tedaviye yönelik potansiyel biomarkerlerin keşfi açısından kritik öneme sahiptir.⁶⁷

8.3. Proteomik (Protein Bilimi)

Proteomik, bir hücredeki tüm proteinlerin yapısını, fonksiyonlarını ve etkileşimlerini analiz eder. Proteomik, organizmalardaki proteinleri ve proteinlerin nasıl çalıştığını inceleyen bir alandır. Proteinler, hücresel işlevlerin çoğunu yerine getirir ve dolayısıyla hastalıkların patogenezinde önemli bir rol oynar.

- **Proteom Profilleme:** Hücrelerdeki proteinlerin miktarı, yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi sağlayarak, hastalıkları ve biyolojik süreçleri takip etmeyi sağlar. Yüksek verimli teknolojilerle, binlerce proteinin aynı anda analizi yapılabilir.
- **Protein-Protein Etkileşimleri (PPI):** Bu etkileşimlerin incelenmesi, biyolojik süreçlerin ve hastalıkların mekanizmalarını anlamayı sağlar.
- **Hedeflenmiş Protein Analizi:** Özellikle kanser gibi hastalıkların tedavisinde, tedaviye dirençli

proteinlerin hedef alınması önemlidir. Bu nedenle kişiye özel yeni ilaç geliştirme süreçlerinde proteomik çalışmalara başvurulur.⁶⁸

8.4. Metabolomik (Metabolizma Analizi)

Metabolomik, hücre içindeki metabolitleri, yani hücrelerin enerji sağlamak ve biyolojik işlevlerini yerine getirmek için kullandığı küçük molekülleri inceler. Metabolomik analizler, hücre içindeki kimyasal değişimleri ve hastalıkların metabolik profilini izlemek için kullanılır. Kanser, diyabet, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın metabolik işaretçileri, metabolomik teknolojilerle analiz edilebilir. Metabolomik analiz, hastalıkların erken tanısı ve tedaviye yanıt tespitinde kullanılabilir. Ayrıca metabolik yolların incelenmesi, hücresel enerji üretimi, hücre bölünmesi ve hastalıklarla ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlar.^{69,70}

Tanı ve Tedavide Omik Teknolojiler

Omik teknolojileri, kişiselleştirilmiş tıbbın temellerini oluşturmaktadır. Hastaların genetik, protein, metabolik ve mikrobiom profilleri, hastaların tedaviye nasıl yanıt verecekleri ve hangi tedavilerin en etkili olacağı konusunda rehberlik edebilmektedir. Son yıllarda tıbbi uygulamalarda farmakogenomik ve biyomarker geliştirme dikkat çekmektedir. Farmakogenomik, ilaçların genetik yapı ile etkileşimini inceleyerek, hastaların hangi ilaçları daha iyi tolere edeceği ve hangi ilaçların onlara zarar verebileceğini inceleyen alandır. Biyomarker geliştirme ise, hastalıkların erken teşhisi için yeni ve spesifik biyomarkerlerin keşfini takiben, hastalıkların seyrini daha iyi izleme ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri sunan bir alandır.⁷¹

Omik teknolojilerinin tıbbi laboratuvarlarda, kanserin erken tanısı ve tedavisinde kullanılabilir. Kanser hücrelerinin genomik ve proteomik özellikleri analiz edilerek, kanserin moleküler temelleri daha iyi anlaşılabilir. Genetik mutasyonlar ve proteomik analizlerle belirlenen biyomarkerler, kanserin spesifik türlerinin tanınmasını sağlayabilir, hedefe yönelik tedavi yöntemleri geliştirilebilir. Örneğin, kanser tedavisinde kullanılan hedefe yönelik ilaçlar, kanser hücrelerinin genetik profillerine göre şekillendirilmektedir (Tablo 1). Omik teknolojileri ayrıca genetik hastalıkların erken tanısında kullanılabilir. Örneğin, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve Alzheimer gibi hastalıklar, genetik ve metabolomik profille erken evrelerinde teşhis edilebilir. Genomik analizler, bireylerin genetik yatkınlıklarını belirleyerek, hastalıkların önceden tahmin edilmesini mümkün kılmaktadır. Mikrobiyomun genomik ve metabolomik analizi, enfeksiyon

hastalıklarının daha hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına olanak tanır. Mikrobiyom analizleri, bireylerin vücutlarında bulunan bakteri, virüs ve diğer mikroorganizmaların çeşitliliğini ve bunların sağlık üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik önemli veriler sunar. Bu sayede, antibiyotik direnci gibi önemli sorunlar üzerine çalışmalar yapılabilir. Omik teknolojileri, bağışıklık sisteminin işleyişini ve otoimmün hastalıkların mekanizmalarını incelemede de büyük rol oynamaktadır. Bağışıklık hücrelerinin genetik ve proteomik analizleri, hastalıkların erken teşhisini ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlar.^{72,73}

Omik teknolojiler (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi), büyük veri analitiği, biyoinformatik ve yüksek çözünürlüklü analiz cihazları gibi güçlü altyapılar gerektirir. Bununla birlikte, bu teknolojilerin yaygınlaşmasıyla birlikte, veri yönetimi, analiz yöntemleri ve klinik entegrasyon gibi zorluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, omik verilerin doğruluğu ve güvenilirliği, klinik ortamda kullanılabilirliğini etkileyen önemli faktörlerden biridir.⁶⁷ Omik teknolojiler biyolojik sistemlerin bütüncül ve yüksek verili analizini sağlayarak hastalık mekanizmalarının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına olanak tanır. Bu yöntemler, biyobelirteç keşfi, kişiselleştirilmiş tıp ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi alanlarda büyük avantajlar sunar. Ancak, omik teknolojiler yüksek maliyet, büyük veri analizi zorlukları ve biyolojik verilerin yorumlanmasındaki karmaşıklık gibi önemli dezavantajlar da taşır. Ayrıca, elde edilen verilerin klinik uygulamalara entegrasyonu için ileri düzey analiz ve doğrulama süreçleri gerekmektedir.

Gelecekte, omik teknolojilerinin daha taşınabilir ve erişilebilir hale gelmesi beklenmektedir. Kişiselleştirilmiş tıp ve tedavi planlaması, genetik testler ve biyomarkerler sayesinde daha hassas ve etkin bir şekilde yapılabilir. Ayrıca, yapay zeka ve makine öğrenimi gibi teknolojilerin omik verilerle entegrasyonu, hastalıkların daha hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilmesine olanak tanıyacaktır.

Moleküler Biyoloji Yöntemlerinin Tıbbi Laboratuvar Uygulamalarındaki Zorlukları

Geleceğe dair umut vaat eden bir alan olmasına rağmen, klinik laboratuvarlarda moleküler biyoloji yöntemlerinin uygulanmasında bazı zorluklar bulunmaktadır. Bunlar kısaca şu şekilde özetlenebilir:

1. Maliyet ve Erişilebilirlik: Başta yeni nesil dizileme (NGS) olmak üzere çoğu moleküler biyoloji yöntemi ve ekipmanı günümüzde hala yüksek maliyetli ve özel

eğitimli personel gerektirmektedir. Bu sebeple ortalama gelir düzeyine sahip ülkelerde bile bu yöntemlere ulaşım hala sınırlıdır. Üstelik cihazların düzenli bakımı ve kalibrasyonu yapılacak testlerin güvenilirliği için oldukça önem taşımaktadır. Bu da cihazın dışında rutin olarak ekstra maliyet gerektirmektedir.

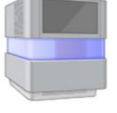
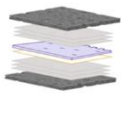
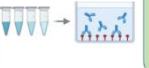
2. Verilerin Yorumlanması ve Standardizasyon:

Moleküler yöntemler sonucunda büyük bir bilgi havuzu elde edilirken, bu verilerin yorumlanması ve analizi karmaşık olabilmektedir. Daha önce belirlenmemiş bir mutasyon tespit edildiğinde klinikte ne denli önemli olabileceği ancak uzman görüşüyle anlaşılabilir. PCR cihazlarının verdiği test sonuçlarının analiz edilmesi, sonuçlandırılması ve raporlanması sonucunda klinikte tanı ve tedaviye uygulanması için standart bir protokol yoktur ve en az birkaç uzmanın bilgi deneyim ve iş yükünü gerektirmektedir. Moleküler tekniklerin klinikte yaygın olarak benimsenememesinin önündeki engellerden biri de budur.

3. Yasalar ve Etik Sınırlılıklar: Moleküler tanı ve tedavilerdeki gelişim hızı yasal düzenlemelerden çok daha hızlı olduğu için, özellikle gen manipülasyonu ve kişiye özel tıp teknolojilerinin uygulanabilirliği ile ilgili kapsamlı, kuşatıcı ve etik yönergelere ihtiyaç vardır. Tıbbi laboratuvarlarda yaygın kullanılan moleküler tekniklerin tek başına tanı ve tedavide kullanımları her zaman mümkün olmayabilir. Bu tekniklerin de bazı kullanım sınırlılıkları mevcuttur (Şekil 1). Örneğin; PCR tekniği NGS'ye göre sınırlı sayıda bölge analiz ederken, maliyet olarak oldukça ucuzdur. NGS'nin uygulaması oldukça zahmetli ve pahalıyken, FISH yoğun emek gerektirir ve uniparental dizomiye tespit edemez. Uniparental dizomi durumunda, kromozom sayısında bir anormallik bulunmaz; birey, belirli bir kromozom çiftinin her iki kopyasını da aynı ebeveynden almıştır. FISH, kromozomların kaynağını (maternal ya da paternal) ayırt edemediği için, kromozom sayısında normal bir görünüm sunduğu sürece uniparental dizomiye tespit edemez. Bu tür genetik değişikliklerin saptanması için daha ileri düzey moleküler teknikler, örneğin mikrosatellit analizi veya SNP array gibi yöntemler gereklidir. CRISPR ise maliyet olarak ucuz ve çalışılması kolay bir teknik olsa da, yeterli klinik çalışma bulunmamasından dolayı yoğun klinik tartışmalar altındadır. Ayrıca, CRISPR-Cas9 bazen hedeflenen DNA dizisi dışında benzer dizileri de kesebilir. Bu durum, genetik düzeyde istenmeyen mutasyonlara neden olabilir. Özellikle insan hücrelerinde bu tür etkiler potansiyel olarak tumor oluşumuna sebep olabilir.

CRISPR sisteminin hücreye güvenli ve etkili bir şekilde taşınması hala büyük bir teknik zorluktur. Vektör olarak

kullanılan virüsler, bağışıklık yanıtlarını tetikleyebilir veya sınırlı sayıda hücreye ulaşabilir.⁷⁴

Moleküler Teknikler	Kullanımları		Avantajları	Dezavantajları
	PCR - Genetik hastalıkların tanısı - Enfeksiyonlarda patojenin belirlenmesi - Kanserde biyobelirteç tespiti - Kanser yatkınlık testi - Prenatal tanı ve pre-implantasyon genetik testler		Avantajları Ekonomik ve protokolü oldukça kolaydır.	Dezavantajları - NGS'ye göre sınırlı sayıda bölge analiz edilebilir. - PCR tekniği, diğer DNA veya RNA kaynaklarından veya çevreden kaynaklanan kontaminasyona karşı oldukça hassastır.
	NGS - Kanserde kişiye özgü biyobelirteçlerin tespiti - Kanser tedavilerine direnç sebebinin tespit edilmesi - Nörolojik ve zihinsel hastalıkların ayrıntılı tespiti		Avantajları - NGS'ye göre sınırlı sayıda bölge analiz edilebilir. - PCR tekniği, diğer DNA veya RNA kaynaklarından veya çevreden kaynaklanan kontaminasyona karşı oldukça hassastır.	Dezavantajları - PCR ve FISH'den daha pahalı ve uygulanması daha zahmetlidir. - Okuma uzunluğu yetersiz kalabilir. Bu okuma uzunluğu sınırlaması, karmaşık tekrarlayan bölgelere sahip genomları dizilerken veya büyük yapısal varyasyonları çözmeye çalışırken zorluklara yol açabilir. - Dizileme başarısı, dizilenecek örneklerin kalitesine oldukça hassastır.
	FISH - Kromozomal hastalıkların tespiti (delesyonlar, anöplodiler, amplifikasyonlar) - Kansere özgü biyobelirteçlerin aranması		Avantajları NGS'den ekonomik ve kolay, ancak PCR'dan daha pahalıdır.	Dezavantajları - Yoğun emek gerektirir. - FISH görüntülerini yorumlamak için deneyimli analistlere ihtiyaç vardır. - Mikroduplikasyonlar mikroddelesyonlardan daha az hassasiyetle tespit edilebilir. - Uniparental dizimiyi tespit edemez
	CRISPR - Tek gen hastalıkları için gen tedavisinin tasarlanması - Kanserden nörolojik hastalıklara kadar gen mutasyonlarının düzeltilmesi		Avantajları Genetik hastalıkların kesin tedavisi için teorikte en etkin yöntemdir.	Dezavantajları - Kullanım şekli ve içeriği açısından yoğun etik tartışmaları mevcuttur. - Yeterli klinik çalışma olmadığından etkileri bilinmemektedir. - Uzun dönemde oluşacak sonuçlar bilinmemektedir.
	BLOTLAMA - DNA, RNA veya proteinlerin tespit edilmesi - Hastalıkların tanı ve izlenmesi, genetik bozuklukların belirlenmesi, - Enfeksiyonların tespit edilmesi ve tedavi süreçlerinin takibi		Avantajları - PCR veya ELISA gibi yöntemlerle elde edilen sonuçların doğrulanmasında kullanılabilir. - Moleküllerin büyüklüğünü (moleküler ağırlığını) belirleme imkanı verir. - Hedef moleküllerin varlığı ve miktarı hakkında bilgi sağlar.	Dezavantajları - Hazırlık, transfer ve tespit aşamaları uzun sürer. - Çok düşük miktardaki hedef moleküllerin tespitinde yeterli hassasiyet gösteremeyebilir. - Çok adımlı protokol nedeniyle deneysel hata olasılığı artar. - Bazı özel problemler veya antikorlar kullanıldığında maliyetli olabilir. - Western blot gibi protein blotlamada yüksek miktarda numune gerekebilir.
	ELISA - Enfeksiyon hastalıklarının ve otoimmün hastalıkların tespiti - Tümör biyobelirteçlerinin tespiti		Avantajları - Yüksek duyarlılık ve özgüllüktedir - Otomatize edilebilir - Çok sayıda örnek aynı anda işlenebilir	Dezavantajları - Uygulama sırasında hata riski yüksektir. - Bazı çapraz reaksiyonların yanlış pozitif sonuç verebilir. - Zaman alıcıdır.
	IMMUN BOYAMA Hücrelerde veya doku kesitlerinde belirli proteinlerin (antijenlerin) varlığının ve dağılımının gösterilmesi		Avantajları - Protein ekspresyonunun hücre ya da doku düzeyinde lokalizasyonunu verebilir. - Histopatolojik değerlendirmeye birlikte yorumlanabilir olmasından dolayı hem tanısal hem prognostik bilgi sağlar.	Dezavantajları - Antikor seçimi çok kritiktir ve spesifik olmayan boyanma yanlış pozitifliğe neden olabilir. - Yorumlanması için teknik beceri ve tecrübe gerektirir.
	OMİK Kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları ile kişiye/hastalığa özgü belirteçlerin tespiti		Avantajları Biyobelirteç keşfi, kişiselleştirilmiş tıp ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gibi alanlarda büyük avantajlar sunar.	Dezavantajları - Yüksek maliyet gerektirir. - Büyük veri analizi zorlukları ve biyolojik verilerin yorumlanmasındaki karmaşıklık gibi önemli dezavantajlar taşır. - Elde edilen verilerin klinik uygulamalara entegrasyonu için ileri düzey analiz ve doğrulama süreçleri gerekmektedir.

Şekil 1. Tıbbi laboratuvarlarda kullanılan/kullanılma potansiyeli olan moleküler tekniklerin avantaj ve dezavantajları

SONUÇ VE GELECEK BEKLENTİLERİ

Teknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte yeni moleküler biyoloji teknikleri keşfedilmekte, bu tekniklerin tıbbi laboratuvarlarda kullanılabilirliği ve uygulanabilirliği artarak devam etmektedir. İnsan iş gücünü en aza indirecek hızlı ve hassas moleküler tanı testlerinin artırılması ile klinikte hastalıkların teşhisi hızlanabilir. Moleküler analiz ve veri standardizasyon işlemlerinin uygun yazılım programlarıyla bilgisayarlara devredilmesi sonucunda; yapay zeka ve makine öğrenimi ile verilerin daha kısa sürede ve doğru yorumlanması sağlanabilir. Aynı zamanda DNA dizileme teknolojilerindeki iyileştirmelerle dizileme maliyeti daha da düşürülebilir, bu sayede moleküler tanıya erişim artırılabilir.

CRISPR'ın güvenliği ve idaresi ile ilgili endişeler devam etmektedir. Kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları heyecan verici ve geniş kapsamlı olduğundan araştırmacılar hala vücudun hasarlı DNA'yı tanıma ve onarma yeteneği üzerindeki etkisini daha iyi anlamaya çalışmaktadır. CRISPR/Cas9 ile kanser hücrelerinde tümörle ilişkili olan genlerinin/mutasyonların doğrudan hedeflenmesi sağlanabilir, bu da tümör büyümesine ve metastatik kapasiteye yol açan genetik değişikliklerin ortadan kaldırılmasına izin verir. Hastaların NGS ile kanser genomik profillerinin elde edilmesi sonrası, kişiye özgü mutasyonların tanımlanması ile kişiye özel CRISPR/Cas9 aracılı ilaçlar tasarlanabilir.⁷⁵

Mikro ölçekli çalışmalarda yeni moleküler biyoloji cihazlarının keşfedilmesi, az ve/veya yetersiz genetik materyalle bile çalışmaların yürütülebilmesine,

hastalıkların teşhisi ve yönetiminin iyileştirilmesine olanak sağlayabilir. Dahası, CRISPR-Cas9 genom düzenleme aracının rutin klinik tanılamaya dahil edilmesi tedavide devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Bu teknoloji daha hedefli ve kişiye özel tedavi stratejilerinin de kapılarını aralamaktadır.

Sonuç olarak, moleküler biyoloji yöntemleri tıbbi laboratuvarlarda vazgeçilmez araçlar haline gelerek tanı, genetik test ve hastalık izlemede devrim yarattı. PCR, NGS, FISH ve CRISPR tabanlı teknolojilerin klinik iş akışlarına entegrasyonu tıbbi tanılarının kesinliğini ve doğruluğunu artırarak hastalara kişiselleştirilmiş sağlık imkanı sunmaktadır. Moleküler tekniklerin uygulanmasında maliyetin yüksekliği, erişim zorluğu ve veri analizinin yetersizliği gibi sınırlılıklar devam etse de moleküler teknolojilerdeki devasa ilerlemeler tıbbi laboratuvarlardaki tanı ve tedavi alanına büyük ivmeler kazandırmayı vaat etmektedir. Sağlık teknolojilerinin devam eden evrimi moleküler tıbbın ilerlemesine ve hasta tedavi süreçlerinin iyileştirilmesine katkılar sağlayacaktır.

Yazarlık katkı beyanı

Konsept ve dizayn: ST, FBT, SCU.

Verilerin elde edilmesinde: ST and FBT.

Verilerin analizi ve yorumlanmasında: ST, FBT, SCU.

Makale yazımında: SCU.

Makale revizyonu ve entelektüel katkı: SCU.

Etik Beyan

Mevcut yazı bir derleme makalesi olduğu için etik kurul onayı gerektirmemektedir.

Yazar çıkar çatışması

Yazar potansiyel çıkar çatışması yoktur.

Fon

Bu derleme için maddi destek alınmamıştır.

REFERENCES

1. Speers DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev.* 2006;27(1):39-51.
2. Arikat S, Saboor M. Evolving role of clinical laboratories in precision medicine: a narrative review. *J Lab Precis Med* 2024;9:17.
3. Delidow BC, Lynch JP, Peluso JJ, White BA. Polymerase chain reaction : basic protocols. *Methods Mol Biol.* 1993;15:1-29.
4. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). Updated March 6, 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; January 2025-. Accessed March 6, 2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663>
5. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques.* 2020;69(4):317-325.
6. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction:

Current techniques, applications, and role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel).* 2022;13(12):2387.

7. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015;439:231-250.
8. Dutta D, Naiyer S, Mansuri S, et al. COVID-19 diagnosis: A comprehensive review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(6):1503.
9. Sugita S, Takase H, Nakano S. Practical use of multiplex and broad-range PCR in ophthalmology. *Jpn J Ophthalmol.* 2021;65(2):155-168.
10. Nyaruaba R, Mwaliko C, Dobnik D, et al. Digital PCR applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: a roadmap for future outbreaks. *Clin Microbiol Rev.* 2022;35(3):e00168-21.
11. Yugovich O, Bunce M, Harbison SA. Point-of-need species identification using non-PCR DNA-based approaches to combat wildlife crime. *Forensic Sci Int Genet.* 2025;78:103278.
12. Lee CL, Chuang CK, Chiu HC, et al. Understanding Genetic Screening: Harnessing Health Information to Prevent Disease Risks. *Int J Med Sci.* 2025;22(4):903-919.
13. Grody WW, Dunkel-Schetter C, Tatsugawa ZH, et al. PCR-based screening for cystic fibrosis carrier mutations in an ethnically diverse pregnant population. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):935-947.
14. Stern HJ. Preimplantation Genetic Diagnosis: Prenatal Testing for Embryos Finally Achieving Its Potential. *J Clin Med.* 2014;3(1):280.
15. Satam H, Joshi K, Mangrolia U, et al. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel).* 2023;12(7):997.
16. Katara A, Chand S, Chaudhary H, Chaudhry V, Chandra H, Dubey RC. Evolution and applications of next generation sequencing and its intricate relations with chromatographic and spectrometric techniques in modern day sciences. *Journal of Chromatography Open.* 2024;5:100121.
17. Ghoreyshi N, Heidari R, Farhadi A, et al. Next-generation sequencing in cancer diagnosis and treatment: clinical applications and future directions. *Discov Oncol.* 2025;16(1):578.
18. Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet.* 2018;19(5):269.
19. Kamps R, Brandão RD, van den Bosch BJ, et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2):308.
20. Wang Y, Yang Q, Wang Z. The evolution of nanopore sequencing. *Front Genet.* 2015;5:449.
21. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021;39(11):1348-1365.
22. Shakoori AR. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. *Chromosome Structure and Aberrations.* 2017;343-367.
23. Jensen E. Technical review: In situ hybridization. *Anat Rec (Hoboken).* 2014;297(8):1349-1353.

24. Harun A, Liu H, Song S, et al. Oligonucleotide Fluorescence In Situ Hybridization: An Efficient Chromosome Painting Method in Plants. *Plants (Basel)*. 2023;12(15):2816.
25. Kudman S, Semaan A, Assaad MA, et al. Optimization of Fluorescence In Situ Hybridization Protocols in the Era of Precision Medicine. *Curr Protoc*. 2024;4(6):e1093.
26. Cui C, Shu W, Li P. Fluorescence In situ Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:89.
27. Mohamed AM, Eid M, Eid O, et al. Generation of Dual-Color FISH probes targeting 9p21, Xp21, and 17p13.1 loci as diagnostic markers for some genetic disorders and cancer in Egypt. *J Genet Eng Biotechnol*. 2025;23(1):100449.
28. Yang T, Kang L, Li D, Song Y. Immunotherapy for HER-2 positive breast cancer. *Front Oncol*. 2023;13:1097983.
29. Tommasi C, Airò G, Praticò F, et al. Hormone Receptor-Positive/HER2-Positive Breast Cancer: Hormone Therapy and Anti-HER2 Treatment: An Update on Treatment Strategies. *J Clin Med*. 2024;13(7):1873.
30. Baez-Navarro X, Groenendijk FH, Oudijk L, et al. HER2-low across solid tumours: different incidences and definitions. *Pathology*. 2025;57(4):403-414.
31. Rose NC, Barrie ES, Malinowski J, et al. Systematic evidence-based review: The application of noninvasive prenatal screening using cell-free DNA in general-risk pregnancies [published correction appears in *Genet Med*. 2022 Sep;24(9):1992].
32. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18:2401-2415.
33. Lone BA, Karna SKL, Ahmad F, Shahi N, Pokharel YR. CRISPR/Cas9 System: A bacterial tailor for genomic engineering. *Genet Res Int*. 2018;2018:3797214.
34. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2016;101(4):213.
35. Jiang Y, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nature Communications* 2017 8:1. 2017;8(1):1-11.
36. Li T, Yang Y, Qi H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):36.
37. Allemailem KS, Almatroodi SA, Almatroudi A, et al. Recent advances in genome-editing technology with CRISPR/Cas9 variants and stimuli-responsive targeting approaches within tumor cells: A future perspective of cancer management. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7052.
38. Khoshandam M, Soltaninejad H, Mousazadeh M, Hamidieh AA, Hosseinkhani S. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes Dis*. 2024;11(1):268-282.
39. Mustafa MI, Makhawi AM. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. *J Clin Microbiol*. 2021;59(3):e00745-20.
40. Ebrahimi S, Khanbabaei H, Abbasi S, et al. CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2022;14(1):3.
41. Tanaka PP, Monteiro CJ, Duarte MJ, et al. The CRISPR-Cas9 system is used to edit the autoimmune regulator gene in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol*. 2025;1471:269-283.
42. Li X, Wang Z, Man X, Dai X, Zhou Q, Zhang S. Research advances CRISPR gene editing technology generated models in the study of epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2025;195:34-44.
43. Fang S, Wang G, Yang LH. [Advances in AAV-CRISPR/Cas9-Mediated Hemophilia A Gene Therapy -- Review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2023;31(6):1890-1893.
44. Lin YT, Seo J, Gao F, et al. APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. *Neuron*. 2018;98(6):1141-1154.e7.
45. Thapar N, Eid MAF, Raj N, Kantas T, Billing HS, Sadhu D. Application of CRISPR/Cas9 in the management of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a review. *Ann Med Surg (Lond)*. 2023;86(1):329-335.
46. Ciafaloni E, Kumar A, Liu K, et al. Age at onset of first signs or symptoms predicts age at loss of ambulation in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy: Data from the MD STARnet. *J Pediatr Rehabil Med*. 2016;9(1):5-11.
47. Ou L, Przybilla MJ, Tăbăran AF, et al. A novel gene editing system to treat both Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Gene Ther*. 2020;27(5):226-236.
48. Kang Y, Li H, Liu Y, Li Z. Regulation of VEGF-A expression and VEGF-A-targeted therapy in malignant tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024;150(5):221.
49. Dourthe ME, Baruchel A. CAR T-cells for acute leukemias in children: current status, challenges, and future directions. *Cancer Metastasis Rev*. 2025;44(2):47.
50. Tariq H, Khurshid F, Khan MH, et al. CRISPR/Cas9 in the treatment of sickle cell disease (SCD) and its comparison with traditional treatment approaches: a review. *Ann Med Surg (Lond)*. 2024;86(10):5938-5946.
51. Weaver SB, Singh D, Wilson KM. Gene Therapies for Sickle Cell Disease. *J Pharm Technol*. 2024;40(5):236-247.
52. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. *Methods Mol Biol*. 2015;1318:87-96.
53. Yu M, Dandri M, Cheng G, Delaney WE 4th, Fletcher SP, Allweiss L. Rapid and Reliable Protein-Free HBV DNA Extraction and Sensitive Branched DNA Southern Blot Assay. *Methods Mol Biol*. 2024;2837:113-124.
54. Liang H, Shao Z, Shi Y, Wang X. Comparison of surgical and non-surgical treatment for scoliosis in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2025;145(1):219.
55. Bao JH, Lu WC, Duan H, et al. Identification of a novel cuproptosis-related gene signature and integrative analyses in patients with lower-grade gliomas. *Front Immunol*. 2022;13:933973.
56. Vo K, Shila S, Sharma Y, et al. Detection of mRNA Transcript Variants. *Genes (Basel)*. 2025;16(3):343.
57. Owen C, Fader KA, Hassanein M. Western blotting: evolution of an old analytical method to a new quantitative tool for biomarker measurements. *Bioanalysis*. 2024;16(5):319-328.

58. He L, Lv Q, Luo J, et al. Heparanase inhibition mitigates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by reducing M2 macrophage polarization. *Immunol Lett.* 2025;274:107006.
59. Matson RS. ELISA-Based Biosensors. *Methods Mol Biol.* 2023;2612:225-238.
60. Kilimci U, Öndeş B, Sunna Ç, Uygun M, Aktaş Uygun D. Development of label-free immunosensors based on AuNPs-fullerene nanocomposites for the determination of cancer antigen 125. *Bioelectrochemistry.* 2025;163:108863.
61. Deshpande N, Suryawanshi PV, Tripathy S. Unveiling the Quest: Crafting an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique to Uncover COVID-19 Antibodies. *Cureus.* 2024;16(8):e66659.
62. Park G, Kim SS, Shim J, Lee SV. Brief guide to immunostaining. *Mol Cells.* 2025;48(1):100157.
63. Han Y, Liu Z, Song C. Fenugreek seed extract combined with acellular nerve allografts promotes peripheral nerve regeneration and neovascularization in sciatic nerve defects. *Regen Ther.* 2025;28:383-393.
64. Gao Y, Bai L, Zhou W, et al. PARP-1-regulated TNF- α expression in the dorsal root ganglia and spinal dorsal horn contributes to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *Brain Behav Immun.* 2020;88:482-496.
65. Burke C, Glynn T, Jahangir C, et al. Exploring the prognostic and predictive potential of bacterial biomarkers in non-gastrointestinal solid tumors. *Expert Rev Mol Diagn.* 2025;25(4):117-128.
66. Youhanna S, Kemas AM, Wright SC, et al. Chemogenomic Screening in a Patient-Derived 3D Fatty Liver Disease Model Reveals the CHRM1-TRPM8 Axis as a Novel Module for Targeted Intervention. *Adv Sci (Weinh).* 2025;12(3):e2407572.
67. Kumar A, Im K, Banjevic M, et al. Whole-genome risk prediction of common diseases in human preimplantation embryos. *Nat Med.* 2022;28(3):513-516.
68. Dakal TC, Dhakar R, Beura A, et al. Emerging methods and techniques for cancer biomarker discovery. *Pathol Res Pract.* 2024;262:155567.
69. Rajesh S, Cox MJ, Runau F. Molecular advances in pancreatic cancer: A genomic, proteomic and metabolomic approach. *World J Gastroenterol.* 2021;27(31):5171-5180.
70. Peter RM, Su X, Kong AN. Application of metabolomics in carcinogenesis and cancer prevention by dietary phytochemicals. *Curr Pharmacol Rep.* 2025;11(1):12.
71. Wang HYC, Donovan EM, Nisbet A, et al. The stability of imaging biomarkers in radiomics: a framework for evaluation. *Phys Med Biol.* 2019;64(16):165012.
72. Abushamma S, Yadete T, Nero N, et al. Definitions, diagnosis, and management of postoperative recurrence in Crohn's disease patients with permanent ileostomy-a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis.* 2025;19(4):jjaf041.
73. Xue M, Ke Y, Ren X, et al. Proteomic analysis of aqueous humor in patients with pathologic myopia. *J Proteomics.* 2021;234:104088.
74. Yang Y, Xu J, Ge S, Lai L. CRISPR/Cas: Advances, limitations, and applications for precision cancer research. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:649896.
75. Selvakumar SC, Preethi KA, Ross K, et al. CRISPR/Cas9 and next generation sequencing in the personalized treatment of Cancer. *Mol Cancer.* 2022;21(1):83.

To Cite: Tetikoglu S, Bilgili-Tetikoglu F, Celik-Uzuner S. Current use of molecular biology methods in medical laboratory. *Farabi Med J.* 2025;4(2):40-53.