

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİPOZOM YAPILI MODEL VİRÜS TESPİTİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR
TASARIM SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

FÜSUN KAZANCI

HAZİRAN 2025

ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NANOLİPOZOM YAPILI MODEL VİRÜS TESPİTİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR
TASARIM SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

NANOTEKNOLOJİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Füsun KAZANCI

DANIŞMAN: Prof. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

ZONGULDAK

Haziran 2025

KABUL:

Fusun KAZANCI tarafından hazırlanan “Nanolipozom Yapılı Model Virüs Tespiti İçin Yeni Bir Biyosensör Tasarım Sisteminin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 19/06/2025

Danışman: Prof. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

Üye: Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

Üye: Doç. Dr. Tolga ACUN

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Üye: Doç. Dr. Sema ALLI

Düzce Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Damla ÇETİN ALTINDAL

Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım./....../20....

Prof. Dr. Fikret GÖLGELEYEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”

Füsun KAZANCI

ÖZET

Doktora Tezi

NANOLİPOZOM YAPILI MODEL VİRÜS TESPİTİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIM SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Fusun KAZANCI

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. R. Seda TİĞLİ AYDIN

Haziran 2025, 129 sayfa

Sunulan tez çalışmasında, SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini taşıyan RNA yüklü nanolipozomlar kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal temelli bir immünosensör sisteminin performans özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Çalışmanın temel amacı, biyomimetik bir SARS-CoV-2 model sistemi oluşturmak ve bu model üzerinden spesifik antijen-antikor etkileşimine dayalı güvenilir bir tespit mekanizması geliştirmektir.

Nanolipozomlar, ince film hidrasyonu yöntemiyle hazırlanmış; RNA'nın eklenme aşamasına göre iki farklı protokol uygulanmıştır: (i) RNA, film oluşmadan önce lipid karışımına eklenmiş; (ii) ya da film oluşumu sonrası hidrasyon aşamasında çözeltiye dahil edilmiştir. Her iki yöntemde de 1:10 ve 1:20 RNA: lipid oranları denenmiş ve sonuçlar kapsülleme verimliliği ile stabilite açısından karşılaştırılmıştır. Boyut küçültme amacıyla ekstrüzyon işlemi 11 ve 21 döngü şeklinde uygulanmış; son aşamada Spike-S1 proteini, EDC/NHS aracılığıyla kovalent bağlama yöntemiyle nanolipozom yüzeyine immobilize edilmiştir.

ÖZET (devam ediyor)

Biyomimetik özellikte hazırlanan nanolipozomlar, immünosensör sisteminde hedef molekülü tanımak üzere sisteme dahil edilmiştir. Yüzey modifikasyonu kitosan ile gerçekleştirilmiş ve Spike antikorları bu yüzeye sabitlenerek elektrokimyasal sensöre spesifik tanıma özelliği kazandırılmıştır. Nanolipozomlarla etkileşim sonrasında elde edilen amperometrik sinyaller, kare dalga voltametrisi tekniği aracılığıyla analiz edilmiştir.

Analitik performans değerlendirmeleri sonucunda, geliştirilen sensörün 53 pM–8 nM aralığında doğrusal yanıt verdiği, 3.79 pM gibi oldukça düşük bir tespit sınırına sahip olduğu ve 55.47 $\mu\text{A nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ölçüm duyarlılığı ile yüksek hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik testlerinde elde edilen %0.33'lük düşük varyasyon oranı, sensörün ölçümlerde kararlılık ve doğruluk sağladığını ortaya koymuştur.

Elde edilen bulgular, optimize edilen nanolipozomal formülasyonların ve antijen sabitleme stratejilerinin, elektrokimyasal sensör sistemine etkin biçimde dahil edilerek yüksek seçicilikte bir biyotanıma sistemi oluşturduğunu göstermektedir. Karmaşık materyallere ihtiyaç duyulmaksızın, özgün, maliyet etkin ve yüksek performanslı bir immünosensör platformu ortaya konmuştur. Elde edilen bulgular, bu sistemin ileri düzey tanı uygulamalarında klinik örneklerle kullanımına yönelik güçlü bir temel oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Nanolipozom, biyosensör

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

REVIEW OF A NEW BIOSENSOR DESIGN SYSTEM FOR NANOLIPOSOME STRUCTURED MODEL VIRUS DETECTION

Füsun KAZANCI

**Zonguldak Bülent Ecevit University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanotechnology Engineering**

Thesis Advisor: Prof. Dr. R. Seda TİĞLİ AYDIN

Haziran 2025, 129 pages

In the presented thesis study, the performance characteristics of an electrochemical immunosensor system developed using RNA-loaded nanoliposomes carrying the SARS-CoV-2 Spike-S1 protein were comprehensively investigated. The main objective of the study was to construct a biomimetic SARS-CoV-2 model system and, based on this model, to develop a reliable detection mechanism through specific antigen-antibody interaction.

Nanoliposomes were prepared using the thin-film hydration method, and two different protocols were applied depending on the stage of RNA incorporation: (i) RNA was added to the lipid mixture prior to film formation; (ii) alternatively, RNA was introduced into the solution during the hydration phase after the film was formed. In both methods, RNA:lipid molar ratios of 1:10 and 1:20 were tested, and the outcomes were comparatively evaluated in terms of encapsulation efficiency and structural stability. To reduce particle size, extrusion was performed in 11 and 21 cycles. In the final stage, the Spike-S1 protein was immobilized

ABSTRACT (continued)

onto the surface of the nanoliposomes via covalent bonding using EDC/NHS chemistry. The biomimetic nanoliposomes were incorporated into the immunosensor system as bio-recognition elements for target identification. The electrode surface was modified with a chitosan matrix, and SARS-CoV-2 spike antibodies were immobilized onto this surface to impart specific recognition capability to the electrochemical sensor. Following interaction with the nanoliposomes, the resulting amperometric signals were analyzed using square wave voltammetry (SWV).

Analytical performance evaluations demonstrated that the developed sensor exhibited a linear response within the range of 53 pM to 8 nM, a remarkably low limit of detection (LOD) of 3.79 pM, and a high sensitivity of 55.47 $\mu\text{A nM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Repeatability tests yielded a low variation rate of 0.33%, indicating strong consistency and reliability in measurements.

The findings confirm that the optimized nanoliposomal formulations and antigen immobilization strategies were effectively integrated into the electrochemical sensor system, resulting in a highly selective biosensing platform. Without the need for complex materials, a unique, cost-effective, and high-performance immunosensor platform was successfully developed. These results provide a solid foundation for the potential use of the system in advanced diagnostic applications involving clinical samples.

Keywords: Nanoliposome, biosensor

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi, ilham ve desteğiyle yolumu aydınlatan, akademik duruşu ve insanlığıyla her zaman örnek aldığım, bilimsel rehberliği ve her konuda desteği ile bu süreci güçlü kılan Prof. Dr. R. Seda TIĞLI AYDIN'a

Biyosensör deneylerimin yürütülmesi sürecinde bilgi ve tecrübesiyle yolumu açan, ihtiyaç duyduğum her an yanımda olarak çalışmama büyük katkı sağlayan, desteğini esirgemeyen ve çalışma süresince laboratuvar imkanlarını kullanımıma açan Doç. Dr. Muhammet Samet KILIÇ'a;

Tez sürecim boyunca laboratuvar olanaklarını kullanmama imkân tanıyan; özellikle RNA kapsülleme sürecine dair biyolojik yaklaşımlar konusundaki bilgi ve görüşleriyle çalışmama önemli katkılar sunan Doç. Dr. Tolga ACUN'a

Süreç boyunca her adımında yanımda olan, güç veren, sevgisi ve sonsuz desteğiyle en zor anlarımı kolaylaştıran canım eşim Dr. Oğuzhan KAZANCI'ya

Varlıklarıyla yaşamıma anlam katan, bu yolculuğun en sessiz ama en derin ilham kaynakları olan canım çocuklarım Hira ve Oğuz Kağan'a,

Ve son olarak; her zaman arkamda duran, koşulsuz sevgileriyle, hayatımın her döneminde ışığım ve sığınağım olan canım annem İnci ÖZ'e ve babam Mithat ÖZ'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL:.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER	5
2.1. LİPOZOMLAR	5
2.1.1. Lipozomların Yapısal Bileşenleri	7
2.1.1.1. Fosfolipitler	7
2.1.1.2. Kolesterol	7
2.1.2. Lipozomların Fiziksel Özellikleri	8
2.2. NANOLİPOZOM	11
2.2.1. Nanolipozomların Oluşum Mekanizmaları	12
2.3. LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASINDA GELENEKSEL YÖNTEMLER	13
2.3.1. İnce Film Hidratasyon (TFH) Yöntemi (Bangham Yöntemi)	14
2.3.2. Deterjan Giderme Yöntemi	15
2.3.3. Solvent Enjeksiyon Yöntemi	16
2.3.3.1. Etanol Enjeksiyon Yöntemi	17
2.3.3.2. Eter Enjeksiyon Yöntemi	18
2.3.4. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemiyle Lipozom Üretimi	19

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
2.3.5. Boyut Küçültme ve Sonraki İşlem Basamakları	22
2.3.5.1. Sonikasyon	22
2.3.5.2. Homojenizasyon.....	23
2.3.5.3. Ekstrüzyon.....	24
2.4. COVID-19.....	26
2.4.1. Korona Virüslerin Genel Özellikleri, Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri.....	26
2.4.2. Tanı Yöntemleri	28
2.4.2.1. Nükleik Asit Tabanlı Tanı Yöntemleri.....	29
2.4.2.2. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR).....	30
2.4.2.3. İzotermal Amplifikasyon Teknikleri (RT-LAMP, TMA, RCA).....	31
2.4.2.4. CRISPR Tabanlı Tanı Yöntemleri	32
2.4.2.5. İmmünolojik Testler	33
2.4.2.6. Biyosensör Tabanlı Tanı Yöntemleri	35
2.4.2.7. Görüntüleme ve Destekleyici Tanı Yöntemleri	36
2.4.2.8. Point-of-Care (POC) ve Entegre Sistemler	38
2.4.2.9. Lab-on-a-Chip (LoC) Sistemleri	39
2.4.2.10. Kartuş Tabanlı Sistemler: CBNAAT ve TrueNAT	39
2.5. BİYOSENSÖR.....	40
2.5.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	43
2.5.2. Amperometrik Sensörler	44
2.5.3. Potansiyometrik Sensörler	45
2.5.4. İmpedimetrik Sensörler.....	46
2.5.5. Voltametrik Biyosensör Teknikleri: LSV, CV, DPV ve SWV	47
2.5.6. Kapasitif Biyosensörler.....	50
2.5.7. Konduktometrik Biyosensörler	51
2.6. BİYOSENSÖRLERE BİYOMOLEKÜLLERİN İMMOBİLİZASYONU.....	51
2.7. BİYOSENSÖRLERİN TEMEL BİLEŞENLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİBİ.....	54
2.8 BİYOSENSÖRLERİN ÖNÜNDEKİ BÜYÜK ZORLUK VE GELECEK BEKLENTİLERİ	56
2.9. SARS-CoV-2 TESPİTİNE İLİŞKİN BİYOSENSÖR ÇALIŞMALARI.....	58

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

BÖLÜM 3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	63
3.1. UYGULANAN DENEYSEL ADIMLARA GENEL BAKIŞ	63
3.2. LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI.....	65
3.2.1. Sonikasyon Metodu	65
3.2.2. İnce Film Hidrasyonu ve Sonikasyon Metodu.....	66
3.2.3. İnce Film Oluşumu ve Homojenizasyon Metodu	68
3.2.4. Ekstrüzyon Metodu	69
3.3. RNA KAPSÜLLÜ LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI	71
3.4. LİPOZOMLARIN VE RNA YÜKLÜ LİPOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU	75
3.5. SARS-CoV-2 SPIKE-S1 PROTEİNİ IMMOBİLİZE EDİLMİŞ NANOLİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI	77
3.6. SARS-CoV-2 SPIKE-S1 PROTEİNİ IMMOBİLİZE EDİLMİŞ NANOLİPOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU	80
3.7. BİYOSENSÖR	82
3.7.1. Biyosensör Elektrodunun Hazırlanması.....	83
BÖLÜM 4 BULGULAR VE TARTIŞMA	87
4.1. FARKLI LİPOZOM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ.....	87
4.1.1. Ön Boyutlandırma Yöntemleriyle Hazırlanan Lipozomlar (L1, L2, L3)	87
4.1.2. İnce Film Hidrasyonu Sonrası Ekstrüzyon Uygulanan Formülasyonlar (L4 ve L5)	91
4.1.3. RNA Kapsüllenen Lipozomların Hazırlanması (RL1, RL2, RL3, RL4).....	94
4.1.4. SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini immobilize edilmiş nanolipozomlar (SARS-CoV-2NL)	99
4.2. BİYOSENSÖR ELEKTRODUNUN ELEKTROKİMYASAL YÜZEY KARAKTERİZASYONU	103
4.2.1. CV Analiziyle Biyosensör Yüzeyinin Karakterizasyonu	104
4.2.2. SWV Analiziyle Biyosensör Yüzeyinin Karakterizasyonu	105

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

4.3. İMMÜNOSENSÖRÜN ANALİTİK PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	106
4.4. LİTERATÜRDE RAPORLANAN SARS-CoV-2 TESPİTİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRME ...	109
4.5. KONTROL DENEYLERİ VE ETKİLEŞİM ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....	112
 BÖLÜM 5 TEMEL DEĞERLENDİRMELER.....	115
 KAYNAKLAR.....	119
 ÖZGEÇMİŞ	129

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Lipozomun yapısı	6
Şekil 2.2 Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların sematik görüntüsü.	9
Şekil 2.3 Fosfolipid moleküllerinin lipozoma dönüşümü.....	11
Şekil 2.4 İnce film hidrasyon yöntemiyle lipozom hazırlanmasının temel aşamalarının sematik gösterimi	15
Şekil 2.5 Lipit ve deterjan karışımlarında kendi kendine birleşme süreci.....	16
Şekil 2.6 Etanol enjeksiyon yönteminin ana aşamalarının sematik gösterimi.....	18
Şekil 2.7 Ters faz buharlaştırma yönteminin ana aşamalarının sematik gösterimi.	20
Şekil 2.8 Ultrasonik sonikatör sisteminin sematik diyagramı (su banyosu tipi).....	23
Şekil 2.9 Yüksek hızda homojenizasyon tekniği	24
Şekil 2.10 Ekstrüzyon tekniğinin sematik gösterimi.	25
Şekil 2.11 SARS-CoV-2 virüsü ve yapısal proteinleri.....	28
Şekil 2.12 COVID 19 enfeksiyonunun etkili tanısı için mevcut klinik, tanı ve araştırma stratejilerine genel bakış	29
Şekil 2.13 Biyosensörün temel kavramları ve sınıflandırılmasının sematik gösterimi.....	41
Şekil 2.14 Biyosensör sınıflandırılmasının sematik gösterimi	42
Şekil 2.15 Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması.	44
Şekil 2.16 Voltametriye yaygın olarak kullanılan uyarma sinyalleri	48
Şekil 2.17 Biyosensörlerde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri. (A) kovalent bağlama; (B) adsorpsiyon; (C) çapraz bağlama; (D) enkapsülasyon; (E) tutuklama.	53
Şekil 2.18 Elektrokimyasal hücre ve üçlü elektrot sisteminin sematik gösterimi	55
Şekil 2.19 Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan elektrotlar.....	56
Şekil 3.1 Geliştirilen biyosensör platformunun genel çalışma prensibini özetleyen sematik gösterimi.....	66
Şekil 3.2 Küvet tipi sonikatör.	67
Şekil 3.3 Homojenizasyon işlemi esnasındaki genel görünüm.	70
Şekil 3.4 Ekstrüzyon işleminde kullanılan ekstruder cihazının görünümü.	71
Şekil 3.5 Float-A-Lyzer® G2 diyaliz ünitesi	73

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
Şekil 3.6 %1 (w/v) agaroz jel üzerinde, elektroforez işleminin yürütülmesi esnasında çekilen görsel.	75
Şekil 3.7 Jel görüntüleme cihazı.	76
Şekil 3.8 SARS-CoV-2'yi taklit eden nanolipozomların üretim sürecine ait deneysel aşamaların şematik olarak gösterimi.	79
Şekil 3.9 Tez çalışmasında kullanılan üçlü elektrot sistemi.	84
Şekil 3.10 Film kaplı elektrodun inkübe edilme aşaması.	86
Şekil 3.11 SWV düzeneği.	87
Şekil 4.1 Sonikasyon, yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) (n = 3). (L1).	90
Şekil 4.2 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren optik mikroskop (a) ve SEM (b) görüntüleri (L1).	91
Şekil 4.3 İnce film oluşumu ve sonikasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) (n = 3). (L2).	91
Şekil 4.4 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren SEM görüntüleri. (L2).	91
Şekil 4.5 İnce film olumu ve homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) (n = 3) (L3).	92
Şekil 4.6 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren SEM görüntüleri (L3).	92
Şekil 4.7 11 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (PDI: poli dispersiyon indeksi) (n = 3).(L4)	94
Şekil 4.8 21 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (PDI: polidispersite indeksi) (n = 3). (L5)	95
Şekil 4.9 11 döngü ve altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllenmiş lipozomların parçacık boyutu dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (1:10 (v/v) RNA: lipid) (PDI: poli dispersiyon indeksi) (n = 3).(RL1)	97
Şekil 4.10 21 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllenmiş lipozomların parçacık boyutu dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (1:10 (v/v) RNA: lipid) (PDI: poli dispersiyon indeksi) (n = 3). (RL2)	98
Şekil 4.11 İnce film oluşturma ve 21 döngüde ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllü lipozomların ince film hidrasyonundan sonra RNA muamelesi ile elde edilen (1:20 (v/v) RNA: lipid) partikül boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri (PDI: polidispersif indeks) (n = 3). (RL3)	99
Şekil 4.12 İnce film oluşturma ve 21 döngüde ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllü lipozomların ince film hidrasyonundan önce RNA muamelesi ile elde edilen (1:20 (v/v) RNA: lipid) partikül boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri (PDI: polidispersif indeks) (n = 3). (RL4)	100
Şekil 4.13 SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozomun morfolojisini gösteren TEM görüntüsü.	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.14 SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozomda RNA'nın varlığını ve başarılı RNA kapsüllenmesini gösteren agaroz jel elektroforezi (1: RNA kapsüllenmiş lipozom, 2: RNA 3: Kontrol (nanolipozom) 4: Marker (DNA merdiveni).....	104
Şekil 4.15 Nanolipozom, RNA, SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozom (nanolipozom-antijen) ve SARS-CoV-2 Spike S1 proteini (antijen) için ATR-FTIR spektrumları.....	105
Şekil 4.16 Üretim sürecinde GC elektrot yüzeyinin 10 mM pH 7.40 PBS içinde adım adım CV karakterizasyonu.....	106
Şekil 4.17 Üretim sürecinde GC elektrot yüzeyinin 10 mM pH 7.40 PBS içinde adım adım SWV karakterizasyonu.....	107
Şekil 4.18 SARS-CoV-2 NL konsantrasyonunun artırılmasıyla elde edilen immünosensör tepkimesi.	109
Şekil 4.19 SARS-CoV-2 NL konsantrasyonunun artırılmasıyla elde edilen immünosensörün kalibrasyon eğrisi.	110
Şekil 4.20 10 µM BSA çözeltisi (B) ve 100 kat seyreltilmiş insan serumunun (C), GC/kitosan/SARS-CoV-2 spike antikoru/SARS-CoV-2 NL elektrodu üzerindeki girişim etkisi.....	115



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Lipozomların farklı oluşum yöntemleri kullanılarak elde edilen özellikleri.	21
Çizelge 4.1 Çeşitli üretim yöntemleri altında kapsülleme verimliliğine sahip nanolipozomların ve RNA kapsüllü nanolipozomların DLS sonuçları.....	89
Çizelge 4.2 SARS-CoV-2 virüsünün elektrokimyasal tespiti için analitik parametrelerin özeti.....	112





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KISALTMALAR

ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
CBNAAT	: Cartridge Based Nucleic Acid Amplification Test
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı 2019
CV	: Döngüsel Voltametri
DLS	: Dinamik Işık Saçılması
DPV	: Diferansiyel Darbe Voltametrisi
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) Karbodiimid Hidroklorür
EE	: Kapsülleme Verimliliği
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
FET	: Alan Etkili Transistör
GA	: Glutaraldehit
GC	: Camsı Karbon Elektrot
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LOQ	: Düşük Tayin Limiti
LoD	: Limit of Detection
LSV	: Doğrusal Taramalı Voltametri
LUV	: Büyük Tek Katmanlı Veziküller
MLV	: Çok Katmanlı Veziküller
MVV	: Çok Veziküllü Veziküller
PC	: Fosfatidilkolin
PDI	: Polidispersite İndeksi
PE	: Fosfatidiletanolamin
PI	: Fosfatidilinositol
PG	: Fosfatidilgliserol
POC	: Point of Care
PS	: Fosfatidilserin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam ediyor)

qRT-PCR	: Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBD	: Reseptör Bağlanma Alanı
RCA	: Rolling Circle Amplification
RT-LAMP	: Ters Transkripsiyon - Döngüye Bağlı İzotermal Amplifikasyon
SARS-CoV-2	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
SARS-CoV-2 NL	: SARS-CoV-2'yi Taklit Eden Nanoyapılar
Sulfo-NHS	: N-hidroksisülfosüksinimid
SUV	: Küçük Tek Katmanlı Veziküller
SWV	: Kare Dalga Voltametrisi
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TFH	: Thin Film Hydration
TMA	: Transkripsiyon Mediyeli Amplifikasyon

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) kaynaklı olan COVID-19 hastalığı, dünya genelinde yeni salgınlara neden olma potansiyelini halen taşımaktadır. Yapılan güncel çalışmalar, SARS-CoV-2'nin farklı mutasyonlarla ülkeler arasında hızla yayıldığını ortaya koymakta; bu nedenle enfekte bireylerin erken tanısı, salgının etkin biçimde kontrol altına alınması açısından kritik önem arz etmektedir [1,2].

COVID-19'un tanısında günümüzde sıklıkla; kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), viral proteinlere yönelik antijen testleri, IgM ve IgG antikorlarını hedefleyen serolojik analizler ile göğüs bölgesi için bilgisayarlı tomografi (BT) gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır. Ancak bu tekniklerin klinik uygulamaları, halen çeşitli zorluklar ve sınırlamalar barındırmaktadır [2,3]. Örneğin, RT-PCR tabanlı moleküler tanı yöntemlerinde örnek hazırlama süreci hem zahmetli hem de oldukça zaman alıcıdır; bu durum, doğru tanı konulmasını önemli ölçüde zorlaştırmaktadır. Buna ek olarak, düşük düzeyde ekstraksiyon verimi yetersiz sinyallere yol açarak yanlış negatif sonuç riskini artırabilmektedir [4]. Enzim bağlantılı immünosorbent test (ELISA) kitleri yüksek hassasiyetleri ve hızlı sonuç vermeleriyle öne çıkmasına rağmen; maliyetlerinin yüksek olması ve uzman personel gerektirmesi, bu yöntemin yaygın kullanımını sınırlamaktadır [3]. Bu doğrultuda, düşük maliyetli, hızlı, güvenilir ve aynı zamanda yüksek hassasiyet ile seçicilik sunan biyosensörlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar dünya genelinde mevcut tanı yöntemlerine alternatif oluşturabilecek yeni yaklaşımlar üzerinde yoğun şekilde çalışmaktadır.

Lateral akış esasına dayanan hızlı antijen testleri, mevcut tanı yöntemlerinin bazı kısıtlamalarını aşarak, özel ekipman ya da laboratuvar ortamına ihtiyaç duymadan düşük maliyetli ve seri üretime uygun çözümler sunmaktadır. Bu tür testler, insan antikorları ya da nükleik asitler yerine doğrudan viral proteinleri hedef alır ve bu yönüyle, SARS-CoV-2 ve varyantlarına özgü monoklonal antikor ancak benzer yapıya sahip diğer kimyasallarla oluşabilecek çapraz tepkimeler, testlerin özgüllüğünü azaltabilmektedir. Ayrıca kolorimetrik okuma sisteminin sınırlı hassasiyeti, yanlış pozitif sonuçlara

yol açma riskini artırmaktadır [5]. Öte yandan, ürünlerin taşınması ve saklanması gerekliliği olan soğuk zincir koşulları hem ürün kalitesini hem de kullanıcı açısından pratikliği olumsuz etkileyen bir diğer önemli sınırlamadır [6]. Tüm bu etkenler göz önünde bulundurulduğunda, virüs tespitinde kullanılabilecek düşük maliyetli, hassas ve kullanıcı dostu yeni nesil biyosensör ve algılama sistemlerinin geliştirilmesine olan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

Literatürde yer alan birçok çalışma, biyosensör tabanlı tanı yaklaşımlarının viral enfeksiyonların tespitinde; düşük maliyet, yüksek doğruluk, seçicilik ve etkin tanılama kapasitesi sunduğunu göstermektedir [3,7,8]. Özellikle insan koronavirüsleri gibi viral ajanların belirlenmesinde, elektrokimyasal temelli immünosensörler; üstün hassasiyet, kolay uygulanabilirlik, sağlam performans ve düşük tespit limitleri gibi avantajları sayesinde en uygun biyosensör platformları arasında öne çıkmaktadır [3].

SARS-CoV virüsünün tespiti amacıyla geliştirilen ilk elektrokimyasal immünosensör, 2009 yılında Ishikawa ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada, antijen–antikor etkileşimine dayalı olarak oluşan iletkenlik değişimini analiz konsantrasyonu ile ilişkilendiren FET (alan etkili transistör) tabanlı bir sensör sistemi geliştirilmiştir. Biyotanımlayıcı molekül olarak, SARS-CoV virüsüne özgü nükleokapsid (N) proteini tercih edilmiştir. Ayrıca, geleneksel antikorlar yerine, hedefe bağlanma yeteneği yüksek olan antikor benzeri proteinler (AMP'ler) kullanılmıştır. Literatürde, bu platformun etiketli reaktiflere ihtiyaç duyulmaksızın, sub-nanomolar seviyelerde N proteinini hızlı ve etkili biçimde tespit edebildiği raporlanmıştır [9].

2019 yılında Layqah ve Eissa tarafından, Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) tespiti amacıyla ilk amperometrik immünosensör geliştirilmiştir. Çalışmada antijen olarak MERS-CoV'a özgü Spike S1 proteini kullanılmıştır. İmmünosensörün temel çalışma prensibi, örneğe sabit miktarda antikor eklenmesiyle, serbest haldeki virüs ve elektrot yüzeyine immobilize edilen rekombinant S1 proteini arasında oluşan bağlanma dengesine dayanmaktadır. Karbon elektrot üzerine immobilize edilen MERS-CoV ve insan koronavirüsü (HCoV) antijenleri, kare dalga voltametri (SWV) tekniğiyle analiz edilmiştir. Geliştirilen sensör, MERS-CoV için 0.001–100 ng/mL ve HCoV için 0.01–10.000 ng/mL aralığında doğrusal yanıt göstermiştir. MERS-CoV tespiti için belirlenen sınır değerler sırasıyla 0.4 ve 1.0 pg/mL olarak bildirilmiş; bu değerlerin, ELISA yöntemine kıyasla (1 ng/mL) oldukça düşük olduğu ve sensörün yüksek hassasiyet sunduğu ifade edilmiştir [10].

Bugüne kadar COVID-19 tespiti için afinite temelli biyosensörlere dair sınırlı sayıda çalışma bildirilmiştir. Yakın zamanda, Qiu ve arkadaşları [10], SARS-CoV ve SARS-CoV-2'den elde edilen RT-PCR bilgilerini kullanarak DNA reseptörleri ile işlevselleştirilmiş ilk SARS-CoV-2 biyosensörünü geliştirmiştir. Bu çalışmada, hibritleşme süreci; plazmonik fototermal (PPT) etkisi ve lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) içeren çift işlevli bir plazmonik sistem ile tek bir çip üzerinde analiz edilmiştir. Geliştirilen sensör, 0.1 pM–1 mM arasında doğrusal yanıt göstermiş ve 0.22 pM tespit sınırına ulaşmıştır [11].

Baek ve arkadaşları (2020), SARS-CoV-2 tespiti için yeni bir FET temelli biyosensör geliştirmiştir. Çalışmada, SARS-CoV-2 Spike antikorunun grafen yüzeyine başarıyla immobilize edildiği ve 1 fg/mL gibi çok düşük konsantrasyonlarda antijen tespit edilebildiği bildirilmiştir. Bu değerin, ELISA yöntemiyle bildirilen değerlerden çok daha düşük olduğu ve cihazın klinik örneklerde ön işleme gerek kalmaksızın kullanılabileceği ifade edilmiştir [1].

SARS-CoV-2 S1 antijeninin tespiti için geliştirilen başka bir biyosensör, karbon nanotüp kaplı FET sistemi kullanarak, tükürük örneklerinde antijenin dijital COVID-19'un tespiti amacıyla geliştirilen afinite temelli biyosensörlere yönelik çalışmalar, literatürde sınırlı sayıda yer almaktadır. Bu alandaki önemli örneklerden biri, Qiu ve çalışma arkadaşları tarafından sunulmuştur [11].

Araştırmacılar, SARS-CoV ve SARS-CoV-2'ye ait RT-PCR verilerinden yararlanarak, DNA reseptörleriyle işlevselleştirilmiş ilk SARS-CoV-2 biyosensörünü geliştirmiştir. Hibritleşme süreci, aynı çip üzerinde plazmonik fototermal (PPT) etkisi ve lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) fenomeni ile eş zamanlı olarak izlenmiştir. Yapılan analizlerde, sensörün 0.1 pM–1 mM konsantrasyon aralığında doğrusal yanıt verdiği ve 0.22 pM tespit sınırına ulaşabildiği gösterilmiştir [11]. Benzer şekilde, geliştirilen bir diğer sistem, SARS-CoV-2 S1 antijenini 0.1 fg/mL–5.0 pg/mL aralığında algılayabilmiş ve 4.12 fg/mL düzeyine kadar yüksek duyarlılık sergilemiştir [12].

Başka bir çalışmada, SARS-CoV-2 Spike S1 proteininin immobilizasyonu için indiyum kalay oksit (ITO) zar içeren bir immünosensör geliştirilmiş ve yüksek antijen seçiciliği ile duyarlılıkta elektriksel değişimlerin başarılı biçimde ölçülebildiği bildirilmiştir [13].

Yukarıda özetlenen farklı virüs tanı sistemlerinde algılama süreçleri çeşitli deneysel protokoller doğrultusunda yürütülmüştür. Ancak COVID-19'a yönelik mevcut biyotanı uygulamalarının sayıca sınırlı olduğu ve bu alanda; yüksek duyarlılık, güvenilir tekrar edilebilirlik ve düşük maliyet gibi temel

kriterleri karşılayan yeni nesil biyosensör tasarımılarına duyulan ihtiyacın sürdüğü açıkça ortaya konmaktadır.

Bu çalışma, elektrokimyasal teknikler kullanılarak virüs tespitine yönelik fonksiyonel nanoyapıların geliştirilmesine dair literatürde sunulan kapsamlı bilimsel veriler temel alınarak tasarlanmıştır [14,15]. SARS-CoV-2, tek iplikli pozitif polariteli RNA genomu taşıyan; lipit tabaka ile çevrili, başta Spike-S1 antijeni olmak üzere çeşitli yapısal proteinleri içeren partiküler bir virüs yapısına sahiptir [16].

Bu doğrultuda, SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini immobilize edilmiş ve RNA kapsüllü nanolipozom yapıları sentezlenmiş; literatürde bilindiğı kadarıyla ilk kez bu yapılar, virüsü taklit eden nano boyutlu platformlar olarak kullanılmıştır. Elde edilen bu model sistem, sabit bir potansiyel altında belirli bir süre boyunca akım değişimlerini izleyebilen amperometrik bir immünosensör aracılığıyla değerlendirilmiştir. Sensörden alınan akım yanıtları, doğrudan hedef analitin konsantrasyonuna bağılı olarak değişim göstermiştir.

Biyosensör sisteminin prob yapısı, SARS-CoV-2 Spike antikorunun cam karbon elektrot (GC) yüzeyine kaplanmış kitosan filmi üzerine immobilize edilmesiyle oluşturulmuştur. Cam karbon elektrotun seçilmesinde; geniş potansiyel aralığında çalışma kapasitesi, yüksek elektriksel iletkenlik ve kimyasal stabilite gibi avantajlar etkili olmuştur [17].

Elektrokimyasal sistemin tanı sürecindeki performansı değerlendirilmiş ve bu doğrultuda çalışmanın temel amacı, SARS-CoV-2'yi taklit eden nanolipozomlara karşı özgül bir biyosensör yaklaşımının amperometrik yanıtlarını incelemek olmuştur. Uygulanan yöntem, yalnızca SARS-CoV-2 benzeri yapıları tanımlamakla kalmamış; aynı zamanda elektrokimyasal temelli immünosensör teknolojisi kapsamında yenilikçi bir amperometrik biyosensör stratejisi sunmuştur. Bu yönüyle geliştirilen sistemin, yalnızca mevcut pandemi koşullarında değil, gelecekte ortaya çıkabilecek benzer viral hastalıkların tespiti açısından da kullanılabilir nitelikte olduğu öngörülmektedir.

BÖLÜM 2

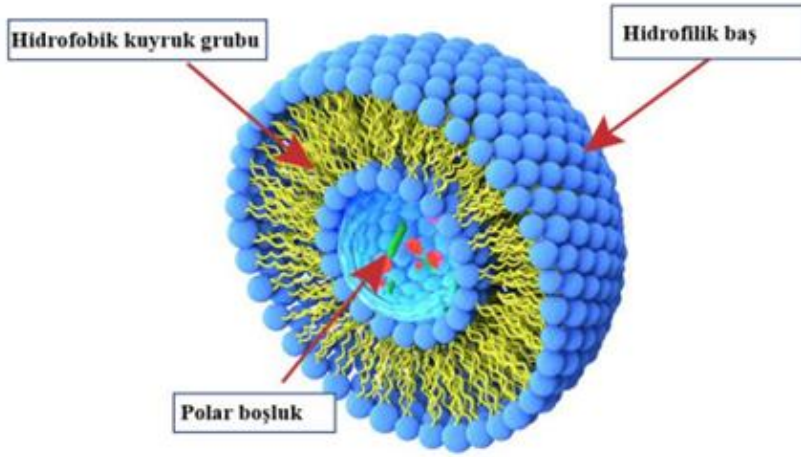
GENEL BİLGİLER

2.1. LİPOZOMLAR

Lipozomlar, ilk olarak İngiliz Hematolog Dr. Alec D. Bangham tarafından Babraham Enstitüsü'nde 1964'te yayımlanan çalışmada tanımlanmıştır. Lipozom ismi iki Yunanca kelimeden türemiştir: 'Lipos' yağ anlamına ve 'Soma' beden anlamına gelmektedir.

Lipozomlar, genellikle bir ya da birden fazla lipid çift tabakasının birbirini çevrelemesiyle oluşan mikroskobik veziküllerdir ve çapları yaklaşık 25 ila 1000 nanometre arasında değişebilir. Lipozomlar, su dolu bir hacmin tamamıyla lipid molekülünden yapılmış bir zarla çevrili olan basit mikroskobik veziküllerdir, şeklinde tanımlanabilir [18].

Lipozom oluşturmak için çeşitli amfipatik moleküller kullanılır. Lipozomlar, doğal hücre zarlarını taklit eden yapılar olarak genellikle saf lipidler ya da lipid karışımlarıyla kendiliğinden oluşur. Şekil 2.1, bu süreçte meydana gelen temel örgütlenmeyi şematik olarak göstermekte olup, bunun sonucunda unilamellar veziküller ortaya çıkar. Lipozomlar genel olarak fosfolipit yapıdaki bileşikler olup gösterildiği gibi sulu sistemlerde fosfolipitlerin kendiliğinden hızlı biçimde modifikasyonu ile suyu çevreleyerek oluşturdukları küresel sistemlerdir. Yapı ve içerik bakımından hücre zarı ile benzerlik gösteren bu sistemler termodinamik açıdan kararlı olup amfifilik/amfipatik veziküllerdir. Eşit sayıda sulu bölmeyi çevreleyen bir veya daha fazla fosfolipid tabakasından oluşan veziküler yapılar olup, kolloidaldirler. Yumurta sarısı, soya fasulyesi ve kolesterol gibi yapılarda bol miktarda bulunan fosfolipidler, hücre zarının ana bileşenleri olmalarından dolayı biyouyumluluk özelliğine sahiptir [18]. Şekil 2.1 lipozomun 3 boyutlu görünümü gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Lipozomun yapısı [14]

Lipozomlar, ilaçların ve aktif bileşiklerin biyomedikal ve nanotıp uygulamalarında daha etkili bir şekilde taşınması için çok yönlü nanoplatformlar olarak kullanılmaktadır. Lipozomlar, lipid bileşimi, boyut, yapı ve morfoloji, yüzey yükü gibi kolayca kontrol edilebilen özelliklere sahiptir ve yüzeylerinin polimerler veya ligandlarla işlevselleştirilme olasılığı bulunmaktadır. Özellikle ilgi çekici olan, lipozomal sistemlerin hem hidrofilik hem de lipofilik aktif bileşikleri, ayrıca karbonhidratlar, proteinler ve peptitler, DNA veya görüntüleme bileşikleri gibi çeşitli biyomolekülleri kapsülleme yeteneğidir. Lipozomların yapısı; biyolojik dokulardaki çevresel koşullara bağlı olarak, yapısal özelliklerini ve stabilitelerini belirleyen yumuşak etkileşimler ve kendiliğinden gerçekleşen birleşme süreçleriyle şekillenmektedir [18].

Lipozomun başlıca avantajları aşağıda listelenmiştir:

- Sahip oldukları hidrofilik ve lipofilik bölgeler sayesinde hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların taşınmasına olanak sağlarlar;
- Enkapsüle ettikleri etken maddenin çözünürlüğünü geliştirerek etkinliğini artırır;
- Enkapsüle ettikleri etken maddelerin depolama koşulları altında ve hastada uygulanmaları sonrasında kimyasal (pH) ve biyolojik (RES, enzimatik aktivite) stabilitelerini sağlarlar;
- Enkapsüle edilmiş etkin maddelerin spesifik olmayan yan etkilerinin ve toksisitesinin azaltılması ile etkililik ve terapötik endeksin geliştirilmesini sağlarlar;
- Yüksek derecede biyogeçimliliğe sahip olduklarından dolayı düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahiptirler;

- Oral, intravenöz, intramüsküler, subkütan, topikal, nazal, pulmoner ve oküler gibi pek çok yoldan uygulanabilirler;
- Yapılarındaki biyobozunur ve toksik olmayan malzemeler nedeniyle biyouyumluluk gösterirler;
- Pegilasyon, spesifik ligand bağlama gibi yüzey modifikasyonları sayesinde aktif veya pasif hedeflendirme imkanı sağlarlar;
- Uzun ve kontrollü salım yapabilirler ve bu sayede taşıdıkları etken maddenin kan plazma konsantrasyonunu istenilen süre boyunca istenilen seviyede tutabilirler. [19]

2.1.1. Lipozomların Yapısal Bileşenleri

2.1.1.1. Fosfolipitler

Fosfolipitler, biyolojik zarların temel yapı taşları arasında yer alır. Canlı hücrelerin zar yapılarında iki ana fosfolipit grubu öne çıkar: sfingolipitler ve fosfogliseritler. Bu fosfolipitler içinde en yaygın olanı ise fosfatidilkolindir. Fosfatidilkolin, su ya da sulu çözeltilerde kendi başına çözünürlük göstermez. Moleküller, su ortamında uzun hidrokarbon zincirleri ile su arasındaki olumsuz etkileşimleri azaltmak için düzlemsel çift katmanlar oluşturarak birbirlerine paralel şekilde dizilirler [20].

Lipozom hazırlarken en çok kullanılan bileşenlerin başında gliserol yapısına sahip fosfolipitler gelir. Bu fosfolipitler, hücre zarında bulunan lipidlerin büyük bir kısmını, yani ağırlık olarak %50'den fazlasını oluşturur. Temel yapıları fosfatidik asitten türetilmiştir. En bilinen örnekler arasında lesitin olarak da bilinen fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS), fosfatidilinositol (PI) ve fosfatidilgliserol (PG) bulunur. Lipozom için kullanılan doğal fosfolipitler ayrıca soya fasulyesi, kolza (kanola) tohumu, buğday tohumu (ruşeymi), ayçiçeği, keten tohumu gibi bitkisel kaynaklardan ve yumurta sarısı, süt gibi hayvansal kaynaklardan elde edilebilmektedir [20].

2.1.1.2. Kolesterol

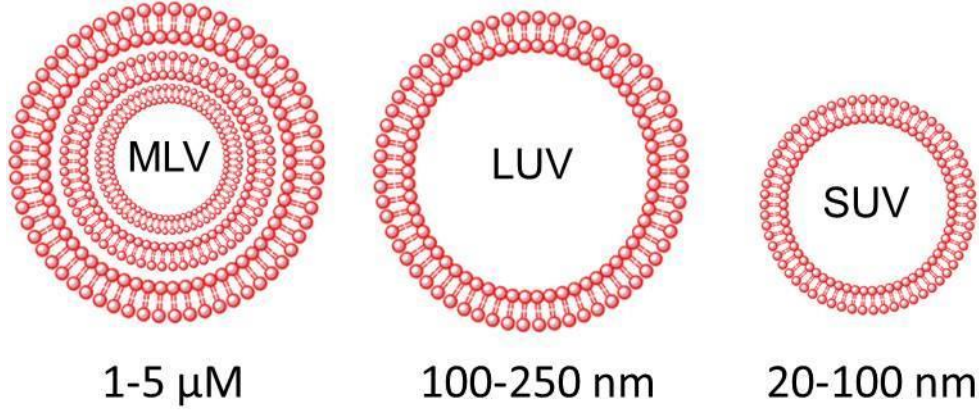
Lipozomların yapısal özelliklerini belirleyen önemli bileşenlerden biri olan kolesterol, membran akışkanlığı ve rijitliğini doğrudan etkileyen kritik bir rol oynar. Kolesterol molekülü

kendi başına çift tabakalı bir zar yapısı oluşturma yeteneğine sahip değildir. Ancak, fosfolipitlerle birlikte kullanıldığında, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, bu lipidlerin oluşturduğu membran yapısına entegre olur ve zarın fiziksel özelliklerini önemli ölçüde değiştirir. Genellikle kolesterolün fosfatidilkolin gibi başlıca fosfolipitlere oranı molar bazda ifade edilir ve bu oran 1:1 veya daha yüksek olacak şekilde, örneğin 2:1 molar orana kadar çıkabilir. Bu yüksek oranlar, kolesterolün zar içine etkin bir şekilde dahil olabildiğini ve fosfolipitlerle güçlü bir etkileşim kurduğunu göstermektedir [20].

Kolesterol, lipozomal membrana spesifik bir konumlanma şekliyle katılır: Molekölün hidroksil grubu suyla temas eden zar yüzeyine yönelirken, uzun alifatik kuyruğu ise çift tabakanın merkezinde bulunan hidrokarbon zincirlerine paralel bir şekilde yerleşir. Bu düzenlenme biçimi, kolesterolün hem polar hem de apolar bölgelerle etkileşim kurmasına olanak tanır. Bu da membran içerisindeki stabilitesini artırır. Fosfolipit temelli lipozomlarda kolesterolün çözünürlüğünün oldukça yüksek olması, esas olarak hidrofobik etkileşimlerin yanı sıra fosfolipitlerin baş gruplarıyla kurduğu özgül etkileşimlere bağlanmaktadır. Bu özellikler, kolesterolün zarın yapısal bütünlüğünü koruma ve geçirgenliğini düzenleme görevlerinde etkin olmasını sağlar [20].

2.1.2. Lipozomların Fiziksel Özellikleri

Lipozomlar çift katmanlı yapı oluşturma özelliğine sahip amfifilik polar lipidlerin su gibi polar bir ortamda dağılması sonucunda oluşan yapılardır. Sıklıkla küre sekillilerdir ve bir veya birden fazla amfifilik membranların çiftli katmanlar halinde bir araya gelmesiyle oluşurlar. Tek bir lipid çift tabakasından oluşan lipozomlar, büyüklüklerine göre sınıflandırılır. Çapı 20-100 nanometre olanlar küçük tek katmanlı veziküller (SUV), 100-250 nanometre aralığında olanlar ise büyük tek katmanlı veziküller (LUV) olarak adlandırılır. Birden fazla lipid çift tabakası içeren yapılar ise iki şekilde tanımlanır: Eğer bu tabakalar birbirini takip eden düzenli halkalar şeklindeyse bunlara çok katmanlı veziküller (MLV), farklı boyutlarda birden fazla kesecik daha büyük bir çift tabaka içinde yer alıyorsa bunlara çok veziküllü veziküller (MVV) denir. Şekil 2.2’de lipozomların tek ve çok katmanlı şematik görüntüsü verilmiştir [21].



Şekil 2.2 Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların sematik görüntüsü.

Çapı 300 nanometreden büyük olan lipozomlar, ışığı güçlü bir şekilde dağıttıkları için gözle kolaylıkla fark edilebilecek şekilde süt beyazı veya bulutlu bir görünüm sergiler. Buna karşılık, 300 nanometreden daha küçük boyuttaki lipozomları içeren çözeltiler genellikle berrak ya da hafifçe mavimsi ve yarı saydam bir görünüme sahiptir. Bu farklılık, lipozomların ışıkla etkileşim düzeyine bağlıdır ve parçacık boyutunun bir göstergesidir [21].

Lipozomların fiziksel stabilitesi açısından parçacık boyutu oldukça önemli bir parametredir. Hem üretimden hemen sonraki süreçte hem de depolama süresi boyunca boyutta meydana gelen değişiklikler, sistemin kararlılığı hakkında önemli bilgiler verir. Bu nedenle, lipozomların belirli bir boyutta kalması, formülasyonun istenen özellikleri koruyabilmesi açısından kritik bir rol oynar.

Lipozomlar, biyolojik ve farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan, çift katmanlı fosfolipit yapısına sahip yapılardır. Bu yapılar, hem hidrofilik hem de hidrofobik ajanları taşıyabilme özellikleri sayesinde çok yönlüdür. Lipozom çeşitleri, oluşturulma yöntemlerine ve karakteristik özelliklerine göre farklılık göstermektedir.

Multilamellar Veziküller (MLV), genellikle ince film hidrasyonu ve ardından yeniden hidratasyon işlemiyle elde edilir. Bu üretim yöntemi, düşük enerji ihtiyacıyla ön plana çıkar ve teknik olarak oldukça basit adımlardan oluşur. MLV'lerin hazırlanması sırasında karmaşık ekipmanlara gerek duyulmaması, yöntemi hem ekonomik hem de pratik hale getirir. Aynı zamanda bu yapılar, yüksek oranda madde kapsülleyebilme yetenekleri sayesinde etkin taşıyıcı

sistemler olarak değerlendirilir. Ayrıca, uygun koşullarda saklandıklarında uzun süreli stabilite gösterebilirler; bu da depolama açısından önemli bir avantajdır [21].

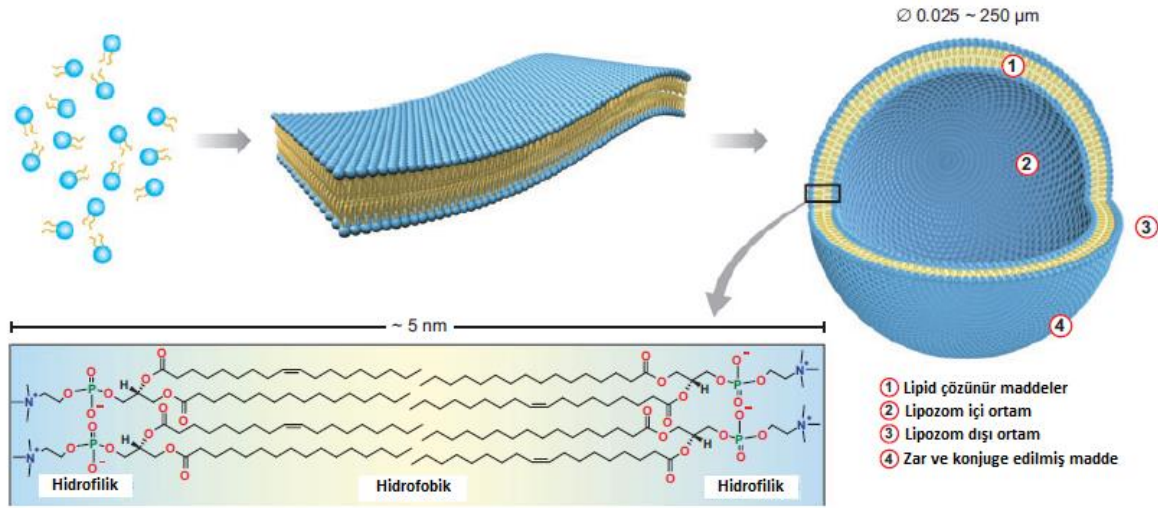
Büyük Tek Katmanlı Veziküller (LUV), genellikle Multilamellar Veziküller'in (MLV) çeşitli fiziksel işlemlerle boyutlandırılması sonucunda elde edilir. Bu işlemler arasında membran ekstrüzyonu, ultrasonik uygulamalar veya yüksek basınçla yapılan homojenizasyon teknikleri yer alır. LUV üretiminde yüksek enerjiye ihtiyaç duyulmaz; bu da süreci daha uygulanabilir kılar. Küçük Tek Katmanlı Veziküller'e (SUV) göre, LUV'ler daha kararlı bir yapıya sahiptir ve depolama süresince bu stabiliteyi daha iyi koruyabilirler. Ayrıca, içerik kapsülleme kapasiteleri oldukça yüksektir; bu da onları ilaç taşıma sistemleri açısından verimli bir seçenek haline getirir [21].

Küçük Tek Katmanlı Veziküller (SUV), genellikle MLV ya da LUV yapıların çeşitli fiziksel işlemlerle küçültülmesi yoluyla elde edilir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemler arasında membran ekstrüzyonu, uç tipi veya banyo tipi ultrasonikasyon, diyaliz ve yüksek basınç homojenizasyonu yer alır. Uygulanan bu teknikler sayesinde daha küçük boyutlarda ve yapısal olarak homojen lipozomlar oluşturulabilir. Elde edilen SUV'ler, özellikle tekdüze boyut dağılımı ve kararlı morfolojik yapılarıyla dikkat çeker [21].

Lipozomların yapısal olarak incelendiğinde, merkezlerinde su içeren bir boşluk yer alırken, çevresini saran lipid çift tabaka ise hidrofobik bir özellik taşır. Lipid moleküllerinin suyu seven (polar) baş kısımları, lipozomun hem iç hem de dış yüzeyine yönelmiş halde bulunur. Buna karşılık, suyu sevmeyen (apolar) kuyruk kısımları ise karşılıklı olarak çift katman içinde bir araya gelir ve böylece dış ortamla doğrudan temastan kaçınırlar. Bu düzenlenme sayesinde, suya duyarlı apolar bölgeler koruma altında kalırken, hidrofilik uçlar doğrudan sulu ortama maruz bırakılır. Sonuç olarak, lipozomların iç boşluğu, hazırlandıkları ortamla benzer bileşimi taşıyabilir ve bu alan suyla çözünebilen (hidrofilik) maddelerin kapsüllenmesine olanak tanır.

Öte yandan, lipid çift tabakasının ortasında kalan hidrofobik bölgeler, yağda çözünen (lipofilik) bileşiklerin taşınması için uygun bir ortam sağlar. Bu çift işlevli yapı, lipozomları hem suda çözünebilen hem de yağda çözünebilen maddeleri taşıyabilen etkili ilaç taşıyıcı sistemler haline getirir. Bu çift kapsülasyon sistemi, lipozomların aynı anda hem hidrofilik hem de hidrofobik ajanları taşıyabilmesini sağlamaktadır. Böylelikle lipozomlar, hem biyolojik hem de farmasötik uygulamalarda çok yönlü ve etkili bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmektedir [21].

Şekil 2.3’de bireysel fosfolipid moleküllerinden çift katmanlı zar levhalarına doğru gerçekleşen temel kendiliğinden organizasyon süreci, ardından lipozomlara dönüşümü gösterilmiştir. Tek bir çift katman genellikle yaklaşık 5 nm kalınlığında olup, düzenli bir şekilde sıralanmış bireysel lipid moleküllerinden oluşur. Bu moleküllerin hidrofobik kuyrukları birbirine yönelirken, hidrofilik baş grupları iç ve dış sulu ortamlarına doğru yönelir. Lipid moleküllerinin yapısal özelliklerinin yanı sıra, lipozomların genel özellikleri ve fonksiyonelliği, büyük ölçüde boyutları ve şemada vurgulanan dört farklı bölgenin kompozisyonuyla belirlenir. Çift katmanlı zarlar ve lipozomlar hazırlamak için çeşitli doğal ve sentetik lipid molekülleri kullanılabilir [22].



Şekil 2.3 Fosfolipid moleküllerinin lipozoma dönüşümü [22]

2.2. NANOLİPOZOM

Nanolipozomlar, lipozomların nano boyutlara indirgenmiş özel bir formudur. Yapısal olarak klasik lipozomlarla birçok fizikokimyasal benzerlik taşısalar da, küçük boyutları sayesinde nanotaşıyıcı sistemlerin sunduğu önemli avantajları da beraberinde getirirler. Özellikle daha geniş yüzey alanına sahip olmaları, biyolojik bariyerleri geçme kapasitelerini artırırken; hücre içine daha etkili nüfuz etmeleri ve kontrollü salım sağlamaları açısından da dikkat çekerler [23].

Nanolipozomlar, fosfolipitlerden oluşan ve doğal hücre zarını taklit eden nanometre ölçeğinde çift katmanlı yapılar olarak tanımlanır. İlk olarak 1960'larda keşfedilen lipozomların, nanolipozom formunda optimize edilmesi, onları birçok biyolojik ve tıbbi uygulama için daha

etkili hale getirmiştir. Boyutlarının küçültülmesiyle biyoyararlanımları artırılmış, hedeflenebilirlikleri geliştirilmiş ve stabilite sorunları büyük ölçüde giderilmiştir. Bu yapılar, biyolojik membranlarla uyumlu olmaları sayesinde biyoteknoloji, ilaç taşıma, aşı geliştirme ve biyosensör tasarımı gibi birçok alanda geniş uygulama potansiyeline sahiptir. Nanolipozomların esnek yapısı, yüzeylerinin çeşitli kimyasal ve biyolojik ajanlarla modifiye edilmesine olanak tanır. Böylece spesifik bir hedefe yönelik fonksiyonel hale getirilebilirler.

Nanolipozomlar, hidrofilik çekirdekleri ve hidrofobik zar yapıları sayesinde hem suda çözünebilir (hidrofilik) hem de çözünmeyen (hidrofobik) molekülleri taşıma yeteneğine sahiptir. Bu çift yönlü taşıma kabiliyeti, onları ilaç taşımacılığı ve biyobelirteç tespitinde benzersiz bir araç haline getirir. Nanolipozomlar, içeriklerine zarar vermeden molekülleri stabilize edebilir, kontrollü salınım sağlayabilir ve hedef doku veya hücrelere ulaştırabilir.

Nanolipozomlar, fosfolipitlerin sulu bir ortamda kendiliğinden organize olarak çift katmanlı zarlar oluşturmasıyla meydana gelir. Bu yapı, doğal hücre zarının mimarisini taklit eder ve biyolojik sistemlerle güçlü bir biyoyumluluk gösterir. Nanolipozomların yapı ve özellikleri, onları biyomedikal ve endüstriyel uygulamalar için son derece kullanışlı hale getirir.

Nanolipozomlar, çift katmanlı lipit zarlardan oluşur. Bu yapılar, fosfolipitlerin hidrofilik baş gruplarının suya doğru yönelmesi ve hidrofobik kuyruklarının içe dönerek suyu dışlaması sonucu oluşur. İç bölgesi, suyu ve hidrofilik molekülleri barındırırken, zar kısmı hidrofobik 0moleküllerin enkapsülasyonuna olanak tanır. Nanolipozomlar genellikle 20 ile 100 nanometre arasında değişen oldukça küçük boyutlara sahiptir. Bu nano ölçekli yapıları sayesinde, doku ve hücreler arasındaki dar boşluklardan kolaylıkla geçerek hedeflenen biyolojik bölgelere daha etkin biçimde ulaşabilirler. Ayrıca, yüzeylerine belirli biyomoleküller ya da polimerler eklenerek işlevsel özellikler kazandırılabilir. Bu sayede, hem taşıyıcı sistem olarak etkinlikleri artırılır hem de hedefe yönelik taşıma kapasitesi geliştirilmiş olur [23].

2.2.1. Nanolipozomların Oluşum Mekanizmaları

Nanolipozomların oluşum mekanizması, hidratlanmış fosfolipit moleküllerinin Van-der Waals ve hidrofobik/hidrofilik etkileşimler yoluyla oluşturduğu iki tabakalı veziküller şeklinde açıklanabilir. Suda çözünen fosfolipitler hidrofilik kısımlar dışarı hidrofobik kısımlar birbirine, bakacak şekilde ikili düz katmanlar oluştururlar. Lipozomlar oluşan ikili lipit katmanlarının

parçalanıp kürecikler halinde kapanması ile oluşurlar. Nanolipozom oluşumu kendiliğinden gerçekleşen bir süreç değildir ve bir enerji bariyerini aşmak için yeterli enerjinin sağlanması gerekir. Mekanik çalkalama, ısıtma, sonikasyon ve homojenizasyon gibi işlemler sisteme enerji sağlamak için kullanılabilir [23].

Fosfolipitler suda çözündüklerinde hidrofobik uçlar birbirine, hidrofilikler dışarı bakacak şekilde ikili düz katmanlar oluşturlar. Lipozomlar bu ikili lipit katmanlarının parçalanıp kürecikler halinde kapanması ile oluşurlar. Bu oluşum spontan olarak gerçekleşmez, yani lipozomların oluşması için sisteme enerji uygulamak gerekir. Lipozomlu sistemin, önceki haline kıyasla serbest enerjisi daha yüksektir. Lipozomlar bu nedenle termodinamik açıdan stabil yapılar değildirler. Oluşturulmak istenen lipozoma göre koyulması gereken enerji miktarı belirgin şekilde değişir.

Örneğin MLV'ler suya eklenen fosfolipitlerin hafif karıştırılması ile oluşabilirken, LUV ve SUV üretmek için sisteme önemli miktarda enerji vermek gerekmektedir. Verilen bu enerji ile ilkin oluşan MLV ve MVV ler tek çift katmanlı (bi-layer) yapılara dönüştürülür. Genellikle lipozomlar, emülsiyonlar gibi, fiziksel stabilitelerin belirli bir süre koruyabilirler. Buna “kinetik olarak stabil” denilmektedir. Zaman içinde partiküller birleşir ve partikül boyutu artar. Emülsiyonlara olan bu benzerlikleri hazırlanma biçimlerinde de kendini gösterir. Lipozomlar; mekanik yöntemler ile oluşturulabilecekleri gibi, mekanik olmayan metotlarla da oluşturulabilirler. Aşağıdakilipozomların bu üretim bu metotlardan bazıları daha detaylı incelenecektir [23].

2.3. LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASINDA GELENEKSEL YÖNTEMLER

Lipozomlar, fosfolipidlerin çift tabakalı yapılar oluşturarak sulu ortamlarda kendiliğinden organize olmasıyla elde edilen veziküler sistemlerdir. İlaç taşıma, gen aktarımı ve biyosensör uygulamaları gibi birçok alanda kullanılabilmeleri, bu yapıların kontrollü biçimde üretimini önemli hale getirmiştir. Lipozomların hazırlanmasında geliştirilen ilk teknikler, düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve laboratuvar ortamında yaygın olarak kullanılabilen geleneksel yöntemlerdir. En yaygın geleneksel teknikler arasında ince film hidrasyon, Deterjan Giderme Yöntemi, Solvent Enjeksiyon Yöntemi, Ters Aşama Buharlaştırma Yöntemiyle Lipozom Üretimi bulunmaktadır [24].

2.3.1. İnce Film Hidratasyon (TFH) Yöntemi (Bangham Yöntemi)

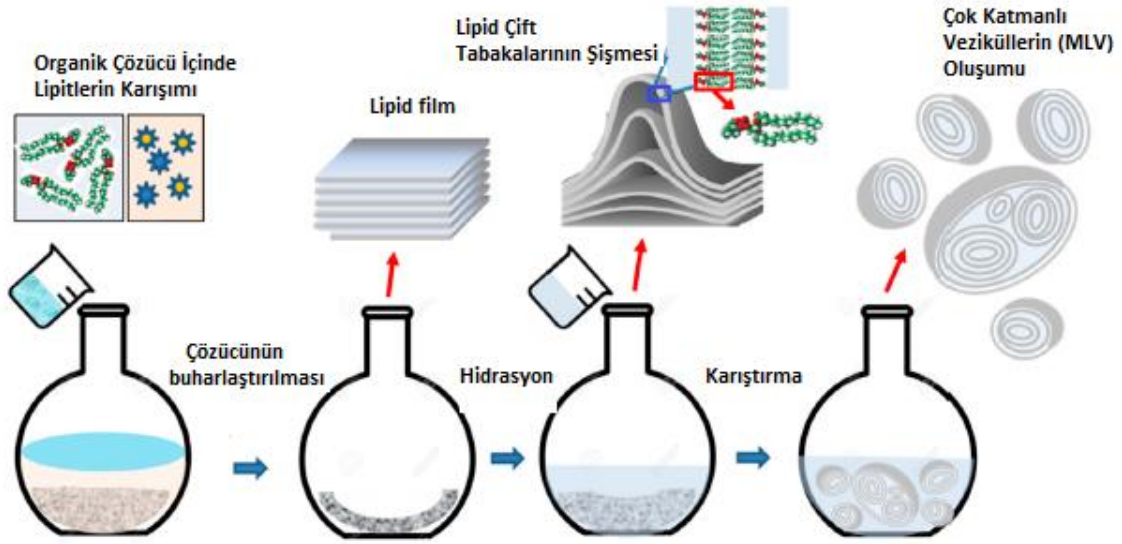
Lipozom üretiminde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir ve 1965 yılında Bangham ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, lipidlerin bir organik çözücü içinde çözülmesini, ardından ince bir lipid filmi oluşturulmasını ve bu filmin sulu bir faz ile yeniden hidratasyonunu temel alır. Yöntem, kontrollü ilaç salımı, gen terapisi ve biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılır ve basitliği nedeniyle özellikle laboratuvar ölçeğinde tercih edilir.

İnce film hidratasyon yönteminde, fosfolipidler ve diğer lipid bileşenleri (örneğin, kolesterol), kloroform, metanol veya bu ikisinin karışımı gibi uygun bir organik çözücü içinde çözülür. Hazırlanan homojen lipid çözeltisi, düşük basınç altında bir döner buharlaştırıcı kullanılarak cam bir yüzey üzerinde ince bir film oluşturacak şekilde buharlaştırılır. Bu işlem sırasında çözücünün tamamen uzaklaştırılması sağlanır ve cam yüzeyde homojen iç içe geçmiş çift katmanlardan oluşan kuru ve ince bir lipid filmi elde edilir. Lipid filminin düzgünlüğü, lipozomların yapısal bütünlüğü ve kapsülleme verimi açısından kritik öneme sahiptir.

Lipid filmi, önceden ısıtılmış tampon çözeltisi (örneğin, fosfat tampon salin) ile yeniden hidratasyona tabi tutulur. Bu süreçte lipidler şişer ve su alarak hidratlanır ve sonuç olarak, boyut ve lamellar yapı bakımından oldukça heterojen bir çok katmanlı vezikül (MLV) süspansiyonu oluşur. Karıştırma, vortex veya ısı uygulamaları, hidratasyonun etkinliğini artırabilir. Ancak, bu aşamada oluşan lipozomların boyutları genellikle heterojendir ve geniş bir dağılıma sahiptir. Daha küçük ve homojen boyutlu lipozomlar elde etmek için, ultrasonikasyon, ekstrüzyon veya yüksek basınç homojenizasyon gibi ek işlemler gerekebilir.

Bu yöntemin avantajlarından biri, lipid bileşiminin ve konsantrasyonunun kolayca ayarlanabilmesidir. Bu durum, hidrofobik ve hidrofilik ajanların aynı anda kapsüllenmesine olanak tanır. Ayrıca, yöntem basit ekipmanlarla uygulanabilir ve geniş bir formülasyon yelpazesine uyum sağlar. Bununla birlikte, yöntemin sınırlamaları da bulunmaktadır. Oluşan lipozomların genellikle geniş bir boyut aralığına sahip olması, ek işleme ihtiyaç duyulmasına neden olur. Ayrıca, enerji ve zaman açısından maliyetli olabilen bu yöntemin endüstriyel ölçeklendirme potansiyeli sınırlıdır.

İnce film hidrasyon yöntemi, biyomedikal ve biyoteknolojik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. TFH (Thin Film Hydration) yöntemi ile birçok lipofilik ilaç molekülü, aynı zamanda hedeflenmiş proteinler, RNA gibi hidrofilik bileşenler kapsüllenerek lipozomal nanoformülasyonlar geliştirilmiştir. Sonuç olarak, Bangham yöntemi, basitliği, esnekliği ve geniş kullanım potansiyeli nedeniyle lipozom üretiminde temel bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, homojen boyutlu lipozom popülasyonlarının elde edilmesi ve endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğin artırılması için optimizasyon gereklidir [25]. Şekil 2.4’de ince film hidrasyon yöntemiyle lipozom hazırlanmasının temel aşamaları şematik şekle gösterilmiştir.



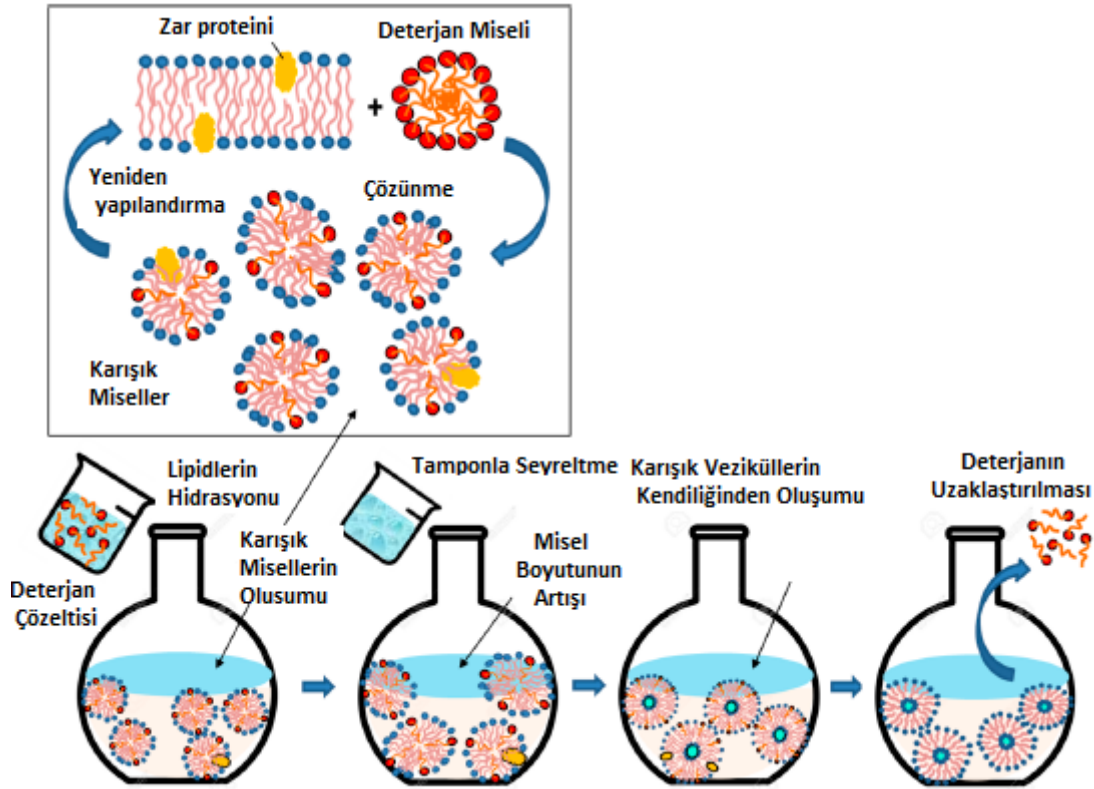
Şekil 2.4 İnce film hidrasyon yöntemiyle lipozom hazırlanmasının temel aşamalarının şematik gösterimi [24].

2.3.2. Deterjan Giderme Yöntemi

Deterjan giderme yöntemi, lipozom üretiminde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve fosfolipidler ile deterjanların karışık miseller oluşturmasıyla başlar. Karışımın deterjanının kademeli olarak uzaklaştırılmasıyla, miseller lipit bakımından zenginleşir ve tek katmanlı veziküllere dönüşür. Bu yöntem, genellikle yüksek kritik misel konsantrasyonuna (CMC) sahip sodyum kolat, Triton X-100 gibi deterjanlarla uygulanır. Seyreltme, diyaliz ve jel kromatografisi gibi farklı teknikler deterjanı uzaklaştırmak için kullanılır.

Deterjan giderme yöntemi, fosfolipidlerin silindirik yapısı ve deterjanların konik geometrisi arasındaki moleküler farklılıklara dayanır. Deterjan uzaklaştırıldığında, karışık miseller kendiliğinden veziküllere dönüşür. Yöntemin avantajları arasında lipozomların biyolojik aktivitelerini koruması, homojen ürün elde edilmesi ve parçacık boyutunun kontrol edilebilmesi yer alır. Ancak, deterjan kalıntılarının varlığı ve düşük kapsülleme verimi gibi dezavantajlar da bulunmaktadır.

Bu yöntem, proteolipozomların oluşturulması gibi biyolojik membranlarla etkileşimli sistemlerde sıklıkla tercih edilir. Lipozom üretiminde hassas ve kontrollü bir yaklaşım sunarak biyomembran araştırmalarında ve farmasötik uygulamalarda önemli bir araçtır [26]. Şekil 2.5’de lipid ve deterjan karışımlarında kendi kendine birleşme süreci gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Lipid ve deterjan karışımlarında kendi kendine birleşme süreci [24].

2.3.3. Solvent Enjeksiyon Yöntemi

Solvent enjeksiyon yöntemleri, lipidlerin organik bir çözücü içinde çözülerek sulu bir faza enjekte edilmesine dayanan bir lipozom üretim yöntemidir. Bu süreçte kullanılan ana çözücüler

genellikle etanol ve eterdir. Lipidlerin organik fazdan sulu faza aktarılması sırasında, kendiliğinden bir araya gelme mekanizmasıyla lipozomlar oluşur [26].

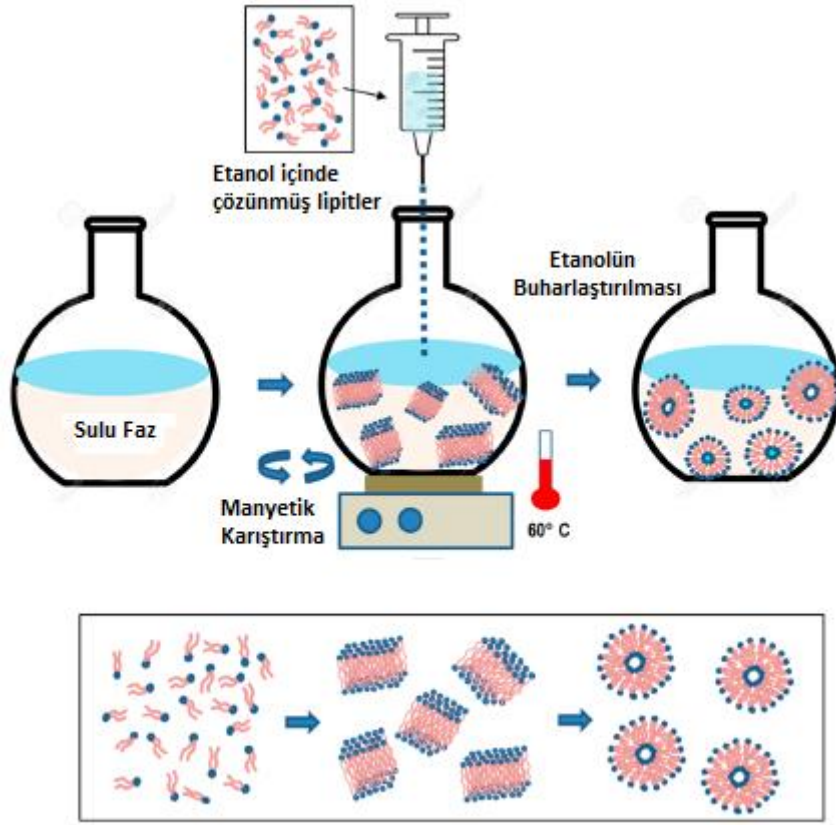
2.3.3.1. Etanol Enjeksiyon Yöntemi

Etanol enjeksiyon yönteminde, etanolde çözünmüş fosfolipitler, önceden ısıtılmış damıtılmış suya (veya TRIS-HCl tamponuna) hızlı bir şekilde enjekte edilir. Etanolün, sulu çözeltide kritik bir derişimin altına düşmesi, çözünmüş lipidlerin kendiliğinden bir araya gelmesini kolaylaştırır. Etanolün hızlı şekilde seyrelmesi, lipid moleküllerinin çökmesini destekler ve ardından iki katmanlı düz yapılar oluşur; bu yapılar sulu fazı kapsüller. Son aşamada, etanolün uzaklaştırılması (buharlaştırma) ile lipid parçacıkları birbirine kaynaşır ve kapalı tek katmanlı veziküller meydana gelir. Şekil 2.6'da etanol enjeksiyon yönteminin başlıca aşamaları şematik olarak gösterilmiştir.

Eklenen etanol hacmi, lipozom oluşumu açısından kritik bir faktördür: Eğer etanol toplam formülasyon hacminin %7,5'ini geçmezse, homojen küçük unilamellar veziküller (SUV) oluşur. Buna karşılık, etanol büyük miktarda tampon çözeltisine hızla enjekte edilirse, heterojen çok katmanlı vezikül (MLV) popülasyonları oluşur.

Etanolün kalıntısı, diyaliz membranı ile uzaklaştırılabilir. Ayrıca, azot gazı basıncı altında bir filtrasyon tüpü kullanılarak örnek konsantrasyonu sağlanabilir. Bu yöntemle hem LUV (büyük unilamellar veziküller) hem de SUV (küçük unilamellar veziküller) kendiliğinden oluşabilir. Son olarak, etanol, azot gazı altında düşük basınçta ve 40 °C sıcaklıkta çalışan bir döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) ile uzaklaştırılabilir [24]. Etanol buharlaşması, lipid parçalarının füzyonunu ve kapalı tek katmanlı veziküllerin oluşumunu destekler.

Etanol enjeksiyon yöntemi, yüksek kapsülleme verimi, basitliği ve ölçeklendirilebilirliğiyle öne çıkar. Ancak kalan etanolün tamamen uzaklaştırılmasının zorluğu ve düşük homojenlik gibi dezavantajlar taşır. İlaç taşınması için yapılan uygulamalarda, bu yöntemle üretilen lipozomlar akciğer hücrelerine hedefleme ve kontrollü salım gibi özellikler göstermiştir [26].



Şekil 2.6 Etanol enjeksiyon yönteminin ana aşamalarının şematik gösterimi [24].

2.3.3.2. Eter Enjeksiyon Yöntemi

Eter enjeksiyon yönteminde, lipidler eter (veya dietil eter/metanol karışımı) içinde çözündürülür ve ardından içerisine kapsüllenmesi istenen bileşenlerin bulunduğu sulu faza yavaşça enjekte edilir. Bu sulu faz, 55–65 °C sıcaklık aralığında ısıtılır; böylece, lipozomal üründen organik çözücünün buharlaştırılması kolaylaşır.

Organik çözücünün ardından düşük basınç altında uzaklaştırılması, LUV'lerin (büyük tek katmanlı veziküllerin) oluşumunu destekler. Lipitlerin eter çözeltisinin su fazına enjeksiyonu, eterin buharlaşması ile SUV'lerin (küçük tek katmanlı veziküllerin) oluşmasına yol açar (bu işlem eter buharlaştırma yöntemi olarak da adlandırılır) [24].

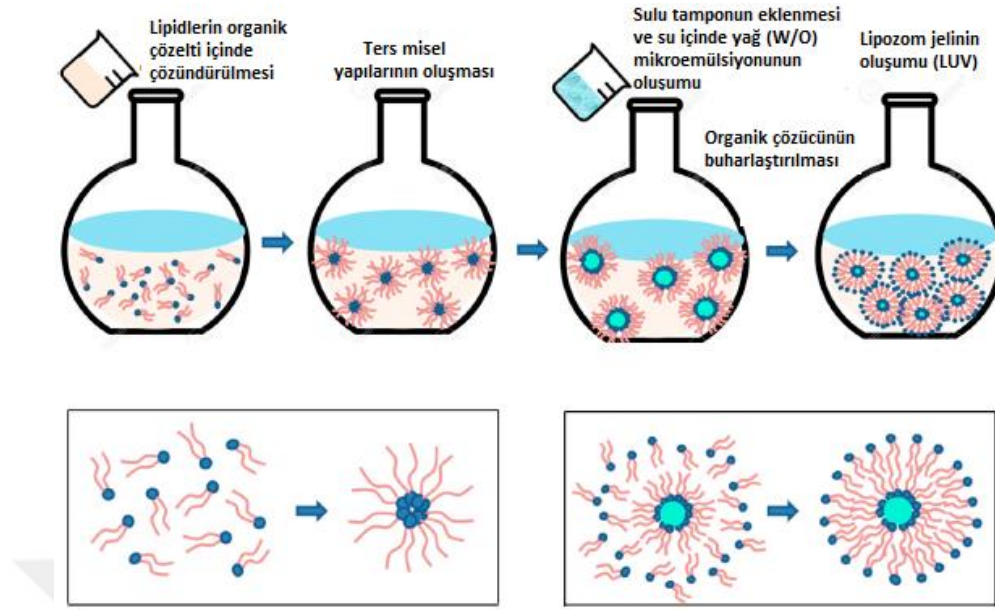
Bu yöntemin etanol enjeksiyonuna kıyasla bir avantajı, organik çözücünün nihai üründen daha verimli şekilde uzaklaştırılabilmesidir. Bu durum, daha konsantre lipozom çözeltilerinin ve yüksek kapsülleme verimliliğine sahip formülasyonların elde edilmesini sağlar.

Sonuç olarak, solvent enjeksiyon yöntemleri, özellikle ilaç taşınması ve biyomedikal uygulamalar için çeşitli avantajlar sunmaktadır. Etanol enjeksiyon yöntemi, akciğer hedefli nanotaşıyıcılar geliştirme ve romatoid artrit gibi hastalıklar için etkili ilaç kapsülleme platformları sunarken, eter enjeksiyon yöntemi yüksek verimli ve kontrollü salım sağlayan lipozomların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ancak her iki yöntemin de belirli uygulama sınırlamaları bulunmaktadır ve lipozomların nihai özellikleri, kullanılan çözücüye ve işlem parametrelerine bağlıdır [26].

2.3.4. Ters Faz Buharlaştırma Yöntemiyle Lipozom Üretimi

Bu yöntemde, lipitler bir organik çözücüde çözündürülür. Kullanılan çözücüler arasında dietil eter ve kloroform (1:1 v/v karışımı), dietil eter/izopropil eter veya kloroform/metanol (2:1 v/v) yer alır. Bu ortam, ters (inverted) misel oluşumunu destekler. Ardından, belirli bir miktarda sulu faz (tampon çözelti) sisteme eklenir. Lipitler, su ve yağ arayüzeyinde yeniden dizilerek su içinde yağ (W/O) mikroemülsiyonu oluşturur. Bu W/O mikroemülsiyon, mekanik karıştırma veya sonikasyon gibi yöntemlerle emülsifiye edilerek homojen bir dağılım sağlanır. Lipozom verimliliğini artırmak amacıyla genellikle fosfatlı tuz (salin) veya sitrat- Na_2HPO_4 tamponları sulu faza eklenir. Ardışık olarak, düşük basınç altında döner buharlaştırma (rotary evaporasyon) ile organik çözücü uzaklaştırılır ve viskoz bir jel oluşana kadar işlem devam eder. Organik çözücünün yavaş yavaş uzaklaştırılması, ters misellerin bozulmasını ve ardından LUV'lerin (büyük tek katmanlı veziküllerin) oluşmasını sağlar. Belirli bir kritik noktada, bu jel çökerken; çözeltideki fazla fosfolipitler, kalan su damlacıklarının etrafına dizilerek lipit çift katmanları oluşturur ve lipozomlar meydana gelir. Bu yöntemin önemli bir avantajı, mikroemülsiyonlar sayesinde çok yüksek miktarda su fazının kapsüllenebilmesidir optimum koşullarda kapsülleme verimi %65'e kadar çıkabilir.

Yöntemin avantajları arasında yüksek kapsülleme verimi, kontrollü lipozom oluşumu ve terapötik/tanılayıcı ajanların birleştirilmesi yer alır. Ancak kalıntı çözücünün varlığı, ölçeklendirme zorlukları ve hassas moleküllerin organik çözücülere maruz kalması nedeniyle biyolojik aktivitenin kaybolma riski gibi dezavantajlar taşır. Proteinlerin denatürasyonu ve DNA ipliklerinin zarar görmesi gibi konformasyonel değişiklikler de bu yöntemin sınırlamalarındandır. Şekil 2.7'de ters faz buharlaştırma yönteminin ana aşamalarının şematik gösterimi [25].



Şekil 2.7 Ters faz buharlaştırma yönteminin ana aşamalarının şematik gösterimi.[24]

Özetle, yukarıda belirtilen tüm faktörlerin ve parametrelerin tasarımı ve mühendisliği lipidlerin kimyasal doğası ve baş grup yükü, alkil hidrofobik zincirlerin uzunluğu ve doygunluk derecesi, geçiş sıcaklığı (T_c) ve lipozom yüzeyinin PEG, ligandlar, proteinler veya antikörler ile işlevselleştirilmesi lipozomları çeşitli biyomedikal uygulamalarda çok yönlü araçlar haline getirmektedir.

Lipozom nanoformülasyonları oluşturma yönteminin başlıca hedefleri, monodispers parçacıkların (dar boyut dağılımına sahip) ve istenen lamellarite derecesinin yanı sıra ürünlerin uzun süreli kolloidal stabilitesinin sağlanmasıdır. Geleneksel yöntemlerde, lipozomlar öncelikle volatiliteli bir organik çözücü içinde çözülür ve ardından sulu bir fazla karıştırılır. Organik bir çözücünün varlığı, entegre edilmiş aktif bileşenlerin kimyasal özelliklerini etkileyebilir veya üretilen nanoformülasyonun stabilitesini (veya toksisitesini) etkileyebilir. Lipozomların hazırlanmasında geleneksel yöntemler aşağıdaki ana aşamaları içerir:

- Lipidlerin organik bir çözücü içinde çözülmesi;
- Elde edilen lipid çözeltisinin organik çözücüyü buharlaştırarak kurutulması
- Lipidin sulu bir ortamla (karıştırma/çalkalama ile birlikte) nemlendirilmesi
- Boyut küçültme (veya lamellarite değişikliği)
- Oluşum sonrası işleme (saflaştırma, sterilizasyon)

Nanolipozom üretiminde kullanılacak yöntem, seçilen biyomoleküllerin özelliklerine, hedeflenen üretim miktarına ve uygulama alanına bağlı olarak belirlenir. Mekanik yöntemler, homojen yapılar elde etmek ve büyük ölçekli üretim gerçekleştirmek açısından avantaj sağlarken; mekanik olmayan yöntemler, daha hassas veya yapısal olarak bozulmaya yatkın moleküller için daha güvenli bir üretim ortamı sunar. Bu iki yaklaşım, kullanım amacına göre birleştirilerek optimize edilebilir. Çizelge 2.1’de lipozomların farklı oluşum yöntemleri kullanılarak elde edilen özelliklerin özeti verilmiştir ve bu, yöntemlerin karşılaştırmalı değerlendirmesini sunarak doğru teknik seçimine katkı sağlar [26].

Çizelge 2.1 Lipozomların farklı oluşum yöntemleri kullanılarak elde edilen özellikleri.

Metod	Avantajlar	Dezavantajlar	Lipozom tipi
İnce film Hidratasyonu (Bangham Yöntemi)	Basit prosedür, küçük ve büyük moleküller için iyi kapsülleme verimi (EE)	Organik çözücü kullanımı fazladır (uzaklaştırılması zordur), suda çözünen ilaçlar için düşük EE, küçük ölçekli üretim, partikül boyutu kontrolü yok, zaman alıcı, sterilizasyon gerekir.	Polidisperse MLV’ler
Deterjan Uzaklaştırma Yöntemi	Basit prosedür, küçük ve büyük moleküller için iyi kapsülleme verimi (EE)	Fazla miktarda organik (ve kalıntı) çözücü ihtiyacı, lipofilik ilaçlar için düşük EE, düşük son lipozom konsantrasyonu (düşük verim), zaman alıcı, sterilizasyon sorunu	MLV’ler, LUV’ler
Çözücü (Etanol/Eter) Enjeksiyonu	Basit, hızlı, tekrarlanabilir. Eter enjeksiyonu daha yüksek EE sağlar	Etanolün uzaklaştırılması zordur (su ile azeotrop oluşturur), biyolojik olarak aktif makromoleküllerin etanolle çalışılması zordur, meme tıkanması olabilir (eter sistemi), sterilizasyon sorunu	SUV’ler
Ters Faz Buharlaştırma	Basit yöntem, uygun EE	Fazla miktarda organik çözücü kullanımı, hassas (biyolojik) ilaçlar için uygun değil, zaman alıcı, sterilizasyon sorunu	MLV’ler, LUV’ler

2.3.5. Boyut Küçültme ve Sonraki İşlem Basamakları

Partikül boyutunun ve polidispersite indeksinin (PDI), lamellar yapının ve homojenliğin hassas şekilde kontrolü, üretim sürecinin kritik bir adımı ve ürün özelliklerinin belirlenmesinde temel bir parametredir. Bu nedenle, üretimin sonunda elde edilen büyük çok katmanlı veziküllerin (MLV'lerin) küçültülmesi amacıyla bir son işlem gereklidir.

Lipozomların küçültülmesinde en yaygın kullanılan üç temel yöntem şunlardır:

- Sonikasyon
- Ekstrüzyon
- Yüksek hızlı homojenizasyon

2.3.5.1. Sonikasyon

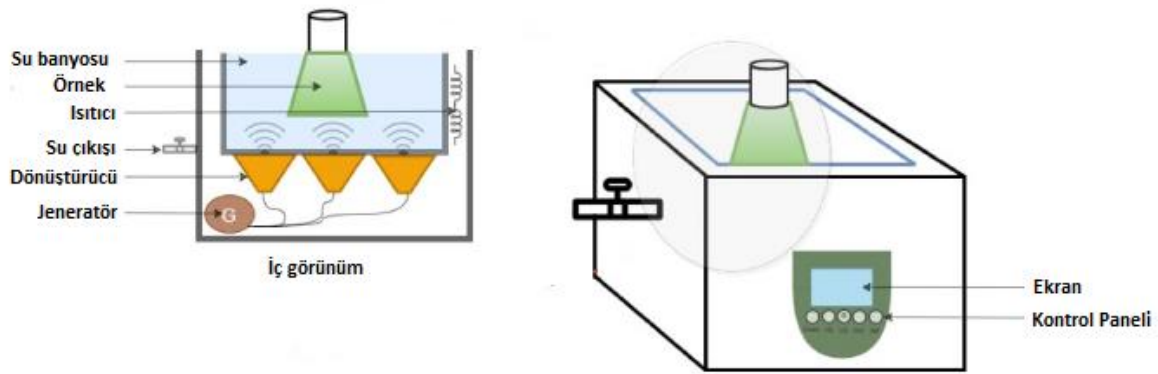
Sonikasyon, ultrasonik dalgaların sıvı bir ortamda uygulanmasıyla fosfolipitlerin nano boyutlu çift katmanlı yapılara organize edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, büyük lipozomların daha küçük ve homojen nanolipozomlara dönüştürülmesinde etkili bir araçtır. Ultrasonik dalgalar, çözeltide mikro kabarcıkların oluşmasına ve bu kabarcıkların hızla çökmesine neden olur. Bu çökme (kavitasyon) süreci, fosfolipitlerin mekanik olarak parçalanmasını sağlayarak nano ölçekli yapıların oluşumunu destekler.

Sonikasyon işlemi sırasında fosfolipit çözeltisi, ultrasonik bir prob veya banyoya maruz bırakılır. Prob tipi sonikatörler yüksek enerji yoğunluğu sağlarken, ultrasonik banyolar daha büyük hacimler için düşük enerji yoğunluğunda çalışır. İşlem süresi, dalga yoğunluğu ve frekans gibi parametreler, elde edilen nanolipozomların boyutunu ve homojenliğini doğrudan etkiler.

Nanoteknolojide sonikasyon, ilaç taşıma, biyobelirteç algılama ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda kullanılan nanolipozomların üretiminde kritik bir rol oynar. Örneğin, kemoterapötik ilaçlar veya mRNA bazlı aşılarda terapötik ajanların nanolipozomlarla enkapsüle edilmesi, etkinliğin artırılması ve yan etkilerin azaltılması amacıyla yaygın olarak tercih edilir.

Bu yöntem, düşük maliyetli, hızlı ve uygulanabilir bir teknik olmasının yanı sıra homojen ürün elde edilmesini sağlar. Ancak, işlem sırasında üretilen ısıнын fosfolipitlerin ve taşıyıcı moleküllerin zarar görmesine neden olabileceği unutulmamalıdır. Bu sorunu önlemek için sonikasyon işlemi sırasında sıvının soğutulması gereklidir.

Sonikasyon yöntemiyle üretilen nanolipozomlar, biyomedikal uygulamalarda yüksek etkinlik ve hassasiyet sağlayarak terapötik ve teşhis amaçlı süreçlerde geniş bir kullanım alanı sunmaktadır [27]. Şekil 2.8’de ultrasonik sonikatör tekniği şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8 Ultrasonik sonikatör sisteminin şematik diyagramı (su banyosu tipi) [28].

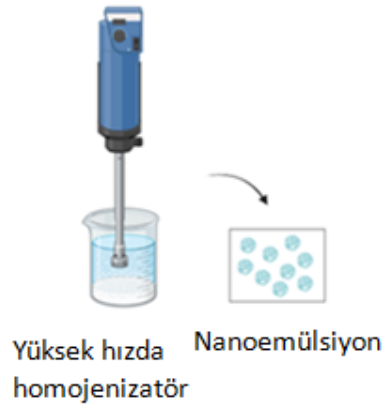
2.3.5.2. Homojenizasyon

Homojenizatör kullanılarak nanolipozom üretimi, yüksek basınç ve mekanik kesme kuvvetlerinin etkisiyle fosfolipitlerin nano boyutlarda çift katmanlı yapılar oluşturmasını sağlayan etkili bir yöntemdir. Bu teknik, büyük boyutlu lipozomların daha küçük ve homojen nanolipozomlara dönüştürülmesini mümkün kılar. Yöntem, ilaç taşıma, biyosensör geliştirme ve aşı üretimi gibi birçok biyomedikal uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu yöntem, fosfolipit çözeltisinin homojenizatör cihazında yüksek basınç altında dar alanlardan geçirilmesiyle çalışır. Bu işlem sırasında oluşan türbülans, çarpışmalar ve kesme kuvvetleri fosfolipitlerin boyutlarını nano ölçeğe indirir. Homojenizatörle üretilen nanolipozomlar, yüksek homojenlik, düşük boyut dağılımı ve kolay ölçeklenebilirlik gibi avantajlar sunar. Ayrıca, işlem süresince sıcaklığın kontrol altında tutulması, fosfolipitlerin yapısal bütünlüğünün korunması açısından büyük önem taşır.

Homojenizasyon işlemi üç aşamadan oluşur: başlangıç çözeltisinin hazırlanması, homojenizasyondan geçirilmesi ve elde edilen nanolipozomların boyut ve stabilite açısından optimize edilmesi. Başlangıç çözeltisi genellikle fosfolipitlerin organik bir çözücünde çözülmesiyle hazırlanır, ardından çözücü buharlaştırılarak bir fosfolipit filmi oluşturulur. Bu film, sulu bir fazda yeniden süspansiyon edilerek lipozomların oluşumu sağlanır. Homojenizasyon işlemi sırasında fosfolipitler nano boyutlara indirgenir ve elde edilen nanolipozomlar yüzey kaplamaları ile stabilize edilir.

Homojenizatörle nanolipozom üretimi, geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. İlaç taşıma sistemlerinde, kemoterapötik ilaçların hedefe yönelik olarak taşınması ve kontrollü salınımı sağlanabilir. Aşı geliştirme sürecinde ise nanolipozomlar, mRNA ve protein bazlı bileşiklerin stabilize edilmesi ve immünojenik etkinin artırılmasında kritik bir rol oynar. Ayrıca, biyosensör teknolojilerinde biyotanıma ajanlarının stabilizasyonu ve algılama hassasiyetinin artırılması amacıyla kullanılabilir [27]. Şekil 2.9'da yüksek hızda homojenizasyon tekniği şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.9 Yüksek hızda homojenizasyon tekniği

2.3.5.3. Ekstrüzyon

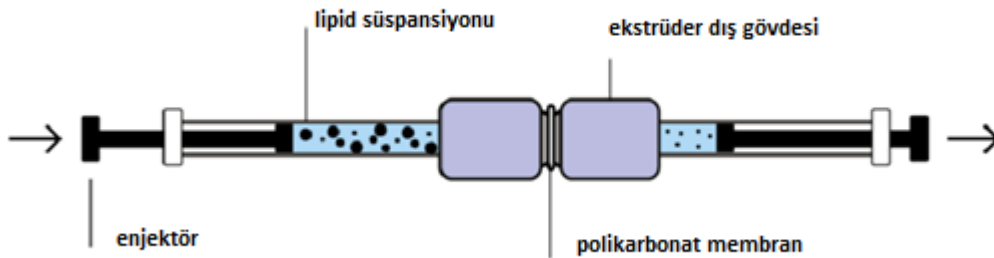
Ekstrüzyon, nanolipozom üretiminde kullanılan mekanik bir yöntem olup, fosfolipit çözeltisinin gözenek boyutu belirli bir membran filtreden geçirilmesiyle küçük ve homojen boyutlu nanolipozomların elde edilmesini sağlar. Bu yöntem, lipozom boyutunu dar bir aralıkta tutarak homojen bir ürün üretmek için tercih edilir. Ekstrüzyon işlemi sırasında, fosfolipitlerin hidrofobik ve hidrofilik özelliklerinden yararlanılarak çift katmanlı zar yapıları stabilize edilir.

Bu yöntemde, fosfolipit çözeltisi öncelikle sulu bir fazda süspanse edilir. Daha sonra, bu süspanسیون, yüksek basınç altında belirli gözenek boyutlarına sahip polikarbonat membranlardan defalarca geçirilir. Membranın gözenek boyutu (genellikle 100 nm veya daha küçük) lipozomların boyutunu belirler. Tekrarlanan ekstrüzyon işlemi, büyük boyutlu lipozomları parçalayarak daha küçük ve homojen boyutlu nanolipozomlara dönüştürür.

Ekstrüzyon yöntemi, homojen boyutlu nanolipozomlar üretmek için güçlü bir araçtır. Bu homojenlik, nanolipozomların biyomedikal uygulamalarda, özellikle ilaç taşıma sistemlerinde etkinliğini artırır. İlaçların taşınmasında boyut homojenliği, dolaşım sürelerini ve hedefleme etkinliğini doğrudan etkiler. Bu nedenle, ekstrüzyonla elde edilen nanolipozomlar, farmasötik endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ekstrüzyon işlemi sırasında, kullanılan membranın malzemesi ve gözenek boyutu kritik bir rol oynar. Polikarbonat membranlar, mekanik dayanıklılıkları ve biyouyumlulukları nedeniyle yaygın olarak tercih edilir. Ayrıca, ekstrüzyon işleminin hızı, uygulanan basınç ve çözeltinin viskozitesi de nanolipozomların boyut ve kararlılığını etkileyen önemli faktörlerdir.

Bu yöntemin en büyük avantajı, homojen ve küçük boyutlu nanolipozomlar üretme kapasitesidir. Ancak, ekstrüzyon işlemi sırasında kullanılan yüksek basınç nedeniyle fosfolipitlerin zarar görebileceği veya termal olarak bozulabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, ekstrüzyon işlemi sırasında sıcaklık kontrolü sağlanması önemlidir [24]. Şekil 2.10'da ekstrüzyon tekniğini şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.10 Ekstrüzyon tekniğinin şematik gösterimi.

2.4. COVID-19

COVID-19, şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) etkenli, atipik pnömoni ve solunum sistemi belirtileriyle seyreden, yeni ortaya çıkmış bulaşıcı bir koronavirüs hastalığıdır. İlk olarak 2019 yılı sonlarında Çin'in Hubei eyaletine bağlı Wuhan kentinde, nedeni bilinmeyen üst solunum yolu enfeksiyonu vakaları bildirilmiş ve kısa sürede küresel bir salgına dönüşmüştür. Hastalık hızla tüm şehre ve sonunda tüm ülkeye yayılmıştır. Ocak 2020'nin başlarında, bu enfeksiyonlara yeni bir koronavirüs SARS-CoV-2'nin (şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2) neden olduğu ve hastalığa COVID-19 (koronavirüs hastalığı 2019) adı verildiği belirtilmiş ve Mart 2020'de de Dünya Sağlık Örgütü tarafından küresel salgın ilan edilmiştir [30].

Koronavirüsler, soğuk algınlığından Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu'na (MERS) kadar değişen çeşitli solunum yolu hastalıklarına neden olabilen geniş kapsamlı bir virüs ailesidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 11 Mart 2020'de COVID-19'u küresel bir pandemi olarak ilan etmiştir. Son derece bulaşıcı olan SARS-CoV-2 virüsü, kısa sürede dünya çapında bir pandemiye yol açmış ve çoklu organ yetmezliği, akut solunum yolu sıkıntısı sendromu gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olmuştur. Özellikle yaşlılarda, bu enfeksiyon önemli sayıda ölüme yol açmıştır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun klinik semptomları hafiften şiddetliye kadar değişebilir ve hızla ilerleyerek ani ve ciddi hastalıklara yol açabilir. Yaygın belirtiler arasında ateş, öksürük, yorgunluk, boğaz ağrısı, kas ağrısı, baş ağrısı, nefes almada zorluk ve konjonktivit bulunabilir.

Yarasa kaynaklı SARS-CoV-2, bir RNA virüsüdür ve enfekte bir kişinin öksürmesi veya hapşırmasıyla yayılan aerosol damlacıkları yoluyla bulaşır. Vücuda girdikten sonra, özellikle anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörlerini ifade eden alveolar epitel hücrelerine saldırır [31].

2.4.1. Korona Virüslerin Genel Özellikleri, Sınıflandırılması ve Yapısal Özellikleri

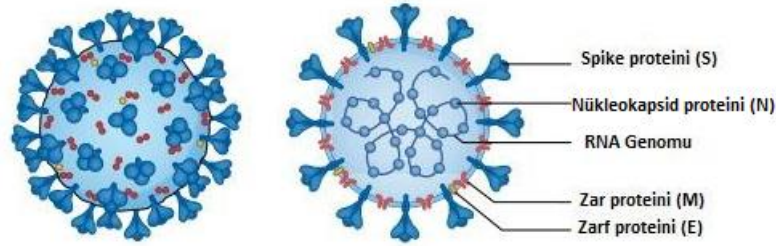
İnfluenza, çiçek hastalığı ve çocuk felci gibi hastalıkların etkenleri olan virüslerin aksine, koronavirüslerin insan popülasyonunu enfekte ettiği ancak son zamanlarda keşfedilmiştir. 1960'larda ilk keşfedildiklerinde, bu virüsler hakkında neredeyse hiçbir epidemiyolojik,

genomik veya patojenik bilgi bulunmamakta, yalnızca sivri uçlu proteinlerden oluşan bir zarla çevrili RNA içeriklerinin bulunduğu bilinmekteydi. Virüsün yüzeyinde bulunan sivri uçlu proteinlerin taç benzeri görünüşleri, bu virüs ailesinin Latince 'de taç anlamına gelen “korona” virüsler olarak isimlendirilmelerini sağlamıştır. Bu özel şekil ve yapıya sahip virüsler, filogenilerine göre dörde ayrılan Coronaviridae ailesine aittir: alfa-CoV, beta-CoV, gama-CoV ve delta-CoV. Alfa ve Beta cinsleri içerisinde insan patojeni olarak tanımlanmış yedi köken bulunur. Bunlar sıklıkla mevsimsel soğuk algınlığından sorumludurlar. Seyrek de olsa, Ağır Akut Solunum Sendromu virüsü (SARS-CoV), Orta Doğu Solunum Sendromu virüsü (MERS-CoV) ve Ağır Akut Solunum Sendromu virüsü 2 (SARS-CoV-2), pnömoni ve şiddetli solunum yetmezliğiyle ilişkili salgınlara neden olan etkenler arasında yer almıştır. Koronavirüs virion partikülü tipik olarak yuvarlak veya çok şekillidir. Çapı 120-160 nm'dir [32].

Koronavirüsler zarflı, tek zincirli, segmentsiz, pozitif polariteli, zoonotik RNA virüsleridir. RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi içermeyen koronavirüsler bu enzimi genomlarında kodlarlar. Bu virüs ailesinin 26-32 kilobaz (kB) uzunluğunda genomu bulunur. Genomu virüsün beş yapısal proteinini kodlar. Bunlar dikensi çıkıntılar (spike; S), membran (M), zarf (envelope; E), Hemagglutinin esteraz (HE) ve nükleokapsid (N) dir.

E glikoproteinleri ve N proteini tüm virionlarda bulunurken HE proteinleri yalnızca betakoronavirüslerde bulunmaktadır. N proteini virüsün nükleokapsidini oluşturur ve diğer koronavirüs ailesi üyelerinde de benzer yapıdadır. Bu protein, viral RNA replikasyonunda RNA genomuna bağlanarak replikasyon ve transkripsiyon için gerekli virion çekirdeğini oluşturur, viral RNA sentezinde ve enfekte olan konağın hücresel immün yanıtında rol alır. S glikoproteinler virüsün dışında bulunmakta ve virüse tipik şeklini vermektedir. S proteini virüsün reseptör tanıma ve hücre zarının füzyonu sırasında önemli rol oynamaktadır. İki alt birimden oluşan S proteinin S1 alt birimi, konak hücre reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE 2) ile afinitesi olan reseptör bağlanma alanı (RBD) içerir. S2 alt birimi ise, virüs ile konak hücre zarı arasında füzyonun gerçekleşmesini sağlayarak viral girişin kritik bir basamağını oluşturur. S proteini, SARS-CoV-2 ile enfeksiyon sırasında konak immün sistemi tarafından oluşturulan nötralize edici antikor ve T-hücre yanıtlarının indüklenmesinde de önemli bir mekanizmaya sahiptir. M proteinleri virüsün antijenik determinantlarından biri olup golgi aygıtında glikolizlenir. Virion yüzeyinde en çok bulunan yapısal protein olan M proteini virionların yenilenmesinde, hücre zarlarında virüs partiküllerinin meydana gelmesinde ve konakta immün yanıt oluşmasında görev alır.

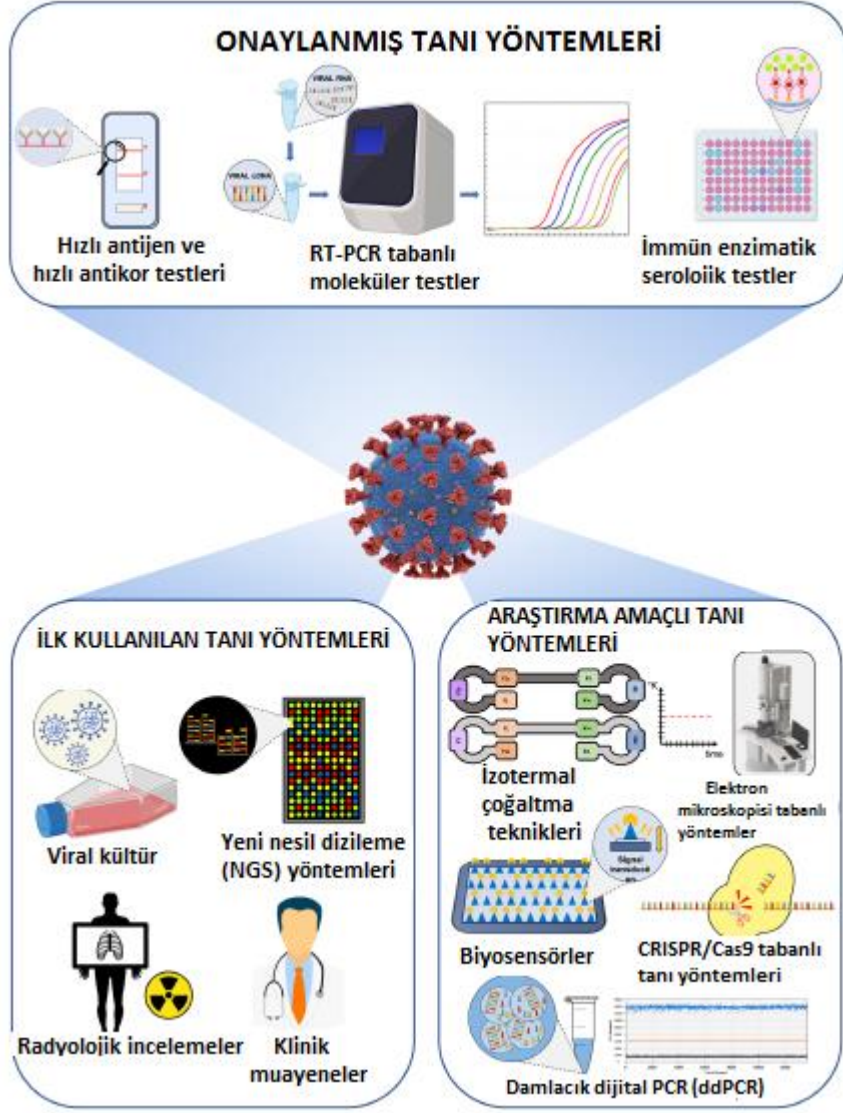
Virüsün zarf yapısının ana bileşeni hidrofobik yapıdaki E proteinidir. Virionun oluşumunda, tomurcuklanmasında, morfogenezinde ve hücrel fonksiyonlarının düzenlenmesinde temel yapı taşıdır. İyon kanalı aktivitesi ile konakta enflamasyonun tetiklenmesinden sorumludur.[30][32] Şekil 2.11’de SARS-CoV-2 nin yapısı gösterilmiştir [16].



Şekil 2.11 SARS-CoV-2 virüsü ve yapısal proteinleri [33].

2.4.2. Tanı Yöntemleri

COVID-19 pandemisi, tüm dünyada sağlık sistemlerini derinden etkileyerek, bulaşıcı hastalıklarla mücadelede tanı yöntemlerinin ne denli kritik olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. Enfeksiyonun erken evrede tespit edilmesi, hastalığın yayılımının önlenmesi, uygun tedavi süreçlerinin başlatılması ve izolasyon önlemlerinin zamanında alınabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte, bilimsel ve teknolojik gelişmelere paralel olarak çok çeşitli tanı yaklaşımları geliştirilmiş; laboratuvar ortamlarında uygulanan moleküler testlerden, bağışıklık sisteminin tepkilerini ölçen yöntemlere, taşınabilir ve hızlı çözümler sunan sistemlerden görüntüleme tekniklerine kadar farklı düzeylerde tanı uygulamaları yaygınlık kazanmıştır. Her bir tanı yöntemi, kendine özgü avantajlar ve sınırlılıklarla birlikte farklı klinik ihtiyaçlara yanıt vermektedir. Şekil 2.12’de COVID-19 enfeksiyonunun etkili tanısı için mevcut klinik, tanı ve araştırma stratejilerine genel bakış verilmiştir [34].



Şekil 2.12 COVID-19 enfeksiyonunun etkili tanısı için mevcut klinik, tanı ve araştırma stratejilerine genel bakış [34].

2.4.2.1. Nükleik Asit Tabanlı Tanı Yöntemleri

COVID-19 pandemisinin kontrol altına alınmasında erken ve doğru teşhis büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, nükleik asit tabanlı tanı yöntemleri, SARS-CoV-2 virüsünün genetik materyalini doğrudan hedef alarak yüksek duyarlılık ve özgüllük sunan tanı araçları olarak ön plana çıkmıştır. Viral RNA'nın tespitine dayanan bu yöntemler, özellikle enfeksiyonun erken dönemlerinde etkili sonuçlar vermekte ve yayılımın önlenmesinde kritik rol oynamaktadır. SARS-CoV-2'nin tespitine yönelik kullanılan başlıca nükleik asit temelli tanı yaklaşımlarının temel prensipleri ve uygulama alanları özetlenecektir.

2.4.2.2. Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR)

Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanısında dünya genelinde en yaygın kullanılan ve hâlen "altın standart" kabul edilen moleküler bir test yöntemidir. Bu teknik, virüsün genetik materyali olan RNA'nın önce DNA'ya çevrilmesini ve ardından belirli genetik bölgelerin çoğaltılarak saptanmasını sağlar. RT-PCR, özellikle özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek olması nedeniyle hem bireysel tanıda hem de geniş ölçekli taramalarda tercih edilir.

RT-PCR testlerinin temel prensibi, örnekten alınan RNA'nın önce ters transkripsiyon ile DNA'ya (cDNA) çevrilmesi, ardından bu DNA'nın polimeraz enzimi yardımıyla çoğaltılmasıdır. Amplifikasyon sırasında kullanılan floresan etiketli probalar, hedef dizilerle bağlanıp enzimatik olarak kesildiğinde floresan sinyali yayar. Bu sinyal, PCR cihazı tarafından gerçek zamanlı olarak izlenir ve elde edilen sinyalin gücü, virüsün miktarı ile doğru orantılıdır. Bu sayede virüsün varlığı hızlı ve özgün şekilde saptanabilir.

RT-PCR yaygın olarak kullanılan etkili bir yöntem olmakla birlikte, uygulamada çeşitli kısıtlılıklarla karşılaşılabilir. Öncelikle, örnek toplama ve saklama süreçlerinde yaşanan hatalar testi doğrudan etkiler. Özellikle asemptomatik veya düşük viral yüke sahip bireylerden alınan örneklerde yanlış negatiflik oranı yüksektir.

Tespit edilebilecek en düşük virüs miktarı anlamına gelen "Limit of Detection" (LoD) değeri, kullanılan kite bağlı olarak 0.3 kopya/ μ L ile 100 kopya/ μ L arasında değişmektedir. Ancak bu değerler teoriktir. Gerçek uygulamalarda örnek kaynaklı kirleticiler, inhibitörler ya da operatör hataları nedeniyle bu eşik değer genellikle 10 kat daha yüksek olabilir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), test güvenilirliğini artırmak için RT-PCR'ın en az iki farklı örnek üzerinde uygulanmasını, farklı genetik hedeflerin (örneğin iki viral gen + bir insan iç kontrol geni) aynı anda analiz edilmesini ve negatif/pozitif kontrollerin kullanılmasını önermektedir.

Sonuç olarak RT-PCR, yüksek özgüllüğü, göreceli olarak erişilebilirliği, teknolojik altyapısı ve iyi standartlaşmış protokolleriyle COVID-19'un güvenilir şekilde tanımlanmasında temel bir rol oynamıştır. Gelişen kitler sayesinde hem analiz süresi kısaltılmış hem de yanlış negatiflik

oranı azaltılmıştır. Her ne kadar alternatif hızlı test yöntemleri gelişmiş olsa da, RT-PCR hâlâ COVID-19 teşhisinde en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir [34].

2.4.2.3. İzotermal Amplifikasyon Teknikleri (RT-LAMP, TMA, RCA)

İzotermal nükleik asit amplifikasyonu, PCR yönteminde olduğu gibi döngüsel sıcaklık değişimlerine ihtiyaç duymadan, sabit sıcaklıkta genetik materyalin çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu özellik sayesinde daha basit ekipmanlarla çalışılabilir ve süreç önemli ölçüde hızlanır. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 tespiti için bu yönteme dayalı çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunlar arasında en çok kullanılanlar RT-LAMP (Ters Transkripsiyon- Döngüye Bağlı İzotermal Amplifikasyon), TMA (Transkripsiyon-Mediyeli Amplifikasyon) ve RCA (Rolling Circle Amplification) yöntemleridir.

RT-LAMP, SARS-CoV-2 tespiti için 63°C sabit sıcaklıkta yaklaşık 30 dakika içerisinde sonuç verebilen, renk değişimine ya da optik yoğunluk ölçümüne dayalı görsel tespit sağlayan hızlı bir yöntemdir. Bu teknikte birden fazla primer kullanılarak, hedef genin sekiz farklı bölgesinden özgül çoğaltım gerçekleştirilir. Renk değişimi (örneğin turuncudan yeşile ya da pembeden sarıya) veya floresan sinyaller, çoğaltımın başarıyla gerçekleştiğini gösterir. ORF1ab, E ve N gen bölgeleri aynı anda tespit edilebilmektedir. Düşük miktardaki genetik materyalden bile sonuç alınabilirken, bu yöntem RT-PCR ile benzer düzeyde özgüllük ve duyarlılık sunar. Ayrıca örnek saflaştırılmadan doğrudan kullanılabilirdiği için laboratuvar süreçlerini kısaltır [35].

Ancak, birçok RT-LAMP tabanlı moleküler teknik geliştirilmiş olsa da, çapraz reaktivite ve testlerin duyarlılık eksikliği nedeniyle çok azı ticarileştirilebilmiştir [36].

TMA yöntemi, retroviral ters transkriptaz ve T7 RNA polimeraz enzimlerini kullanarak RNA hedeflerini çoğaltan başka bir izotermal tekniktir. Yüksek örneklem kapasitesine sahip olması nedeniyle çok sayıda örneği aynı anda ve farklı patojenlerle birlikte analiz edebilir. Bu yöntemle yapılan testlerde, RT-PCR'a kıyasla daha yüksek duyarlılık elde edilmiş, düşük viral yük taşıyan örneklerde dahi güvenilir sonuçlar alınmıştır. Tanı süresinin kısalığı ve sistemin otomasyona uygunluğu nedeniyle yaygın taramalarda önemli bir avantaj sunar.

RCA ise dairesel DNA yapılarını çoğaltmaya dayalı, oldukça hassas bir tekniktir. Özellikle kısa sürede milyarlarca kopya üretebilme kapasitesiyle dikkat çeker. SARS-CoV tespitinde geçmişte başarıyla kullanılmış ve SARS-CoV-2 için de adaptasyon çalışmaları yapılmıştır. Circle-to-circle amplification adlı versiyonu, SARS-CoV-2'nin RdRP genine özgü bölgelere odaklanmış ve çok düşük konsantrasyonlarda bile güvenilir tespit yapılmasını sağlamıştır. 90 dakikada tamamlanan bu yöntem, yüksek özgüllük, geniş dinamik aralık ve SARS-CoV ile SARS-CoV-2 ayrımı gibi avantajlar sunmuştur.

Genel olarak izotermal teknikler, RT-PCR'a alternatif olarak daha hızlı, daha taşınabilir ve pratik çözümler sunar. Düşük maliyetli olmaları, özel ekipman gerektirmemeleri ve saha koşullarında bile uygulanabilir olmaları nedeniyle pandemi sürecinde hızlı tarama ve yaygın test ihtiyacına önemli katkı sağlamışlardır [35].

2.4.2.4. CRISPR Tabanlı Tanı Yöntemleri

CRISPR, gen düzenleme teknolojisi olarak bilinen ve moleküler biyolojide devrim yaratan bir tekniktir. Bu sistem, bakterilerin dış genetik materyallere karşı geliştirdiği doğal bir savunma mekanizmasıdır ve Cas proteinleri ile çalışarak hedeflenen DNA veya RNA dizilerini kesebilir. SARS-CoV-2'nin tespitinde de bu sistem başarıyla uygulanmış ve çok sayıda araştırma ekibi tarafından etkili tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

Zhang ve ekibi, CRISPR tabanlı SHERLOCK adlı bir tanı protokolü geliştirerek, SARS-CoV-2 genomunda yer alan S geni ve ORF1ab genlerini hedef almıştır. Bu yöntemde, viral RNA önce izotermal olarak çoğaltılmakta, ardından Cas13 enzimi ve kılavuz RNA ile birlikte karıştırılarak hedef RNA tanımlanmakta ve kesilmektedir. Kesilen reporter RNA, kağıt test çubuğuyla çıplak gözle görülebilecek bir sinyal üretmektedir. Bu protokol sentetik RNA parçalarıyla test edilmiştir ve 10–100 kopya/μL arasında tespit sınırı göstermiştir. qPCR gibi karmaşık ekipmanlara gerek duymadan, hızlı ve taşınabilir biçimde çalışabilen bu sistem, sonuçları bir saatten kısa sürede verebilmektedir [37].

CRISPR/Cas sistemleri, özellikle SHERLOCK ve DETECTR gibi yöntemlerle hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir tanı çözümleri sunarken, Cas13d gibi sistemler gelecekte COVID-19 ve diğer RNA virüslerine karşı tedavi seçenekleri arasında yer alma potansiyeline sahiptir. Bu

teknolojiler, sadece laboratuvar ortamlarında değil, sahada da uygulanabilecek şekilde geliştirildiği için pandemi gibi acil sağlık krizlerinde büyük önem taşımaktadır [38].

2.4.2.5. İmmünolojik Testler

İmmünolojik testler, antijen/antikor etkileşimini tespit etmeye veya miktarını belirlemeye dayalı yöntemlerdir. Bu testler, virüs enfeksiyonlarının seyri ve önceki maruziyetler hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Antikorlar, viral RNA'ya göre daha dayanıklıdır ve taşıma, depolama ve örnek alma işlemlerinden daha az etkilenir.

Antikorlar ya da immünoglobulinler, vücuda giren bakteri veya virüs gibi yabancı etkenlere karşı bağışıklık sistemi tarafından üretilir. İmmünolojik testlerde en sık kullanılan antikor türü IgG'dir. Enfeksiyon sırasında ilk olarak IgM antikorları üretilir ve kısa süreli bağışıklık sağlar; ardından IgG oluşur ve uzun süreli bağışıklık ile hafızayı sağlar. SARS enfeksiyonu sırasında, IgM 3–6 gün, IgG ise 8. günden itibaren kanda tespit edilebilmiştir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda da, IgM ve IgG'nin hastalık başlamadan 3–4 gün önce tespit edilebildiği belirtilmektedir. Ancak bazı çalışmalarda semptom başlangıcından sonra IgG pozitiflik oranı, IgM'ye göre daha yüksektir. Üç farklı serokonversiyon şekli tanımlanmıştır: her iki antikorun eşzamanlı ortaya çıkması, IgM'nin önce veya sonra gelişmesi.

COVID-19 tespitine yönelik çeşitli immünolojik testler geliştirilmiştir. Peptid bazlı lüminesans immünoassay yöntemiyle SARS-CoV-2'ye karşı IgG ve IgM antikorları saptanmıştır. ORF1ab, spike (S) ve nükleokapsid (N) proteinlerine ait yirmi sentetik peptid, streptavidin kaplı manyetik boncuklara bağlanmış, serum örnekleri ile reaksiyona sokulmuş ve lüminesans okuyucu ile ölçüm yapılmıştır. En iyi sonuç S proteininden elde edilmiştir. Sağlıklı bireylerden ve solunum yolu enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan serumlarla yapılan testte IgG ve IgM pozitiflik oranları sırasıyla %71,4 ve %57,2; her ikisinin birlikte pozitifliği %81,5 bulunmuştur.

Otomatik kemilüminesans immünoassay yöntemi ile IgM ve IgG antikorları, enfeksiyonun başlangıcından 7–12 gün sonra tespit edilmiştir. Hafif semptom gösteren bir hastada 7. günde antikorlar tespit edilmiş; ağır belirtiler gösteren hastalarda ise 12. günde ortaya çıkmıştır. Tüm kontrol örnekleri negatif sonuç vermiştir.

ELISA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Assay), COVID-19 tespitinde yaygın kullanılan başka bir yöntemdir. Yüksek hassasiyete sahip bu yöntem, doğrudan veya dolaylı formatlarda antijen ya da antikoru tespit edebilir. Doğrudan ELISA’da, örnekteki antijen, enzimle işaretli antikor aracılığıyla doğrudan tespit edilirken; dolaylı ELISA’da, antijen mikropılaka üzerine kaplanır, primer antikor bağlanır ve ardından sekonder enzimli antikorla ölçüm yapılır.

İmmünokromatografik test (ICA), lateral flow testleri olarak da bilinir ve çıplak gözle sonuç verilebilen kalitatif testlerdir. Basit bir okuyucu ile yarı nicel veri de sağlayabilir. Jie Xiang ve ekibi, ELISA ve kolloidal altın ICA kitlerini kullanarak IgM ve IgG’yi tespit etmiştir. ELISA’da IgM, doğrudan yöntemle, IgG ise rekombinant antijen ve HRP-konjuge monoklonal antikorla dolaylı yolla tespit edilmiştir. ICA testinde pozitiflik, her iki çizginin kırmızıya dönmesiyle belirlenmiştir. ELISA’nın duyarlılığı %87,3, ICA’nın ise %82,4 olarak bulunmuştur. RT-PCR ile karşılaştırıldığında bu oran %51,9 idi [39].

SARS-CoV-2’nin rekombinant nükleokapsid proteini kullanılarak geliştirilen başka bir sandviç ELISA yöntemi, 85 doğrulanmış COVID-19 vakasına ait 216 örnekte IgM ve IgG antikorlarını tespit etmek amacıyla uygulandı. Her iki antikor da hastalık belirtilerinden önceki dördüncü günden itibaren tespit edilebildi ve hastalık sürecinde 30 günden uzun süre seropozitif kaldı. Kontrol grubundaki üç vakada IgG pozitifliği görülürken, tüm örneklerde IgM negatif olarak bulundu. Her iki antikoru da SARS-CoV-2’nin serolojik tanısında başarılı sonuçlar verdiği bildirildi [40].

ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin birlikte kullanılarak hem antikoru hem de viral RNA’nın tespit edilmesi, enfeksiyon başlangıcından sonraki ilk hafta içinde bile %99,4 gibi yüksek bir duyarlılık oranına ulaşılmasını sağlamıştır. Buna karşılık, yalnızca RT-PCR ile yapılan testlerde bu oran %67,1’de kalmıştır [41].

Sonuç olarak, immünolojik testlerin duyarlılık ve özgüllük değerleri, pratik uygulamalarda oldukça önemlidir. Bu testlerde genellikle S, N ve reseptör bağlanma bölgesi (RBD) proteinleri hedef alınır. S proteinini, virüsün hücreye tutunmasında; RBD ise ACE2 reseptörüyle etkileşimde önemli rol oynar. S1 alt birimi sadece SARS-CoV ile çapraz reaksiyon göstermiştir. S2 alt birimi daha korunaklıdır. RBD, SARS-CoV ve SARS-CoV-2 arasında çapraz reaksiyon göstermektedir. N proteinine dayalı ELISA testleri iyi özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. RBD

ve N proteinine dayalı yöntemler, S1 proteinine göre daha duyarlıdır. Ayrıca IgA tabanlı ELISA testi, IgM'ye göre daha duyarlı; IgM ise daha özgül bulunmuştur [35].

2.4.2.6. Biyosensör Tabanlı Tanı Yöntemleri

COVID-19 pandemisiyle birlikte, hızlı, duyarlı ve taşınabilir tanı sistemlerine olan ihtiyaç hiç olmadığı kadar artmıştır. Bu doğrultuda, biyosensör tabanlı tanı yöntemleri; düşük maliyetli, kısa sürede sonuç veren ve laboratuvar dışı ortamlarda da kullanılabilen yapılarıyla ön plana çıkmıştır. SARS-CoV-2'nin tespitinde özellikle elektrokimyasal sensörler, alan etkili transistör (FET) tabanlı sistemler ve plazmonik-optik sensörler gibi yeni nesil teknolojiler dikkat çekmektedir. Bu sensör sistemleri, biyomoleküllerle özgül etkileşimlere dayanarak viral parçacıkların ya da konak yanıtlarının yüksek hassasiyetle saptanmasını mümkün kılar. Gelişmiş malzeme bilimi ve mikro-nano teknolojiyle desteklenen bu platformlar hem klinik kullanıma hem de Point-of-Care (POC) sistemlerine entegrasyon açısından güçlü bir potansiyele sahiptir. Bu bölümde, SARS-CoV-2 tanısında kullanılan biyosensör tabanlı yaklaşımlar kapsamlı bir şekilde ele alınarak, teknik ilkeleri, uygulama alanları ve tanı süreçlerine katkıları değerlendirilecektir [42].

Elektrokimyasal SARS-CoV biyosensörlerinin ilki Ishikawa ve ark. (2009) tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışma, antijen-antikor bağlanmasının kanal üzerindeki iletkenliği değiştirerek ölçülebildiği FET tabanlı bir immünosensör tasarımını içermektedir. SARS-CoV'un nükleokapsid N proteinini antijen olarak kullanılmış ve geleneksel antikorlar yerine antikor benzeri proteinler (AMPs) tercih edilmiştir. Bu AMP'ler, In₂O₃ nanotel kaplı Si/SiO₂ yüzeye immobilize edilerek sinyalin daha etkin çevrimi sağlanmıştır [9].

MERS-CoV'un tespiti için geliştirilen ilk amperometrik immünosensör Layqah ve Eissa (2019) tarafından rapor edilmiştir. Bu sensör, örnek içindeki serbest virüs ile elektrota immobilize edilmiş rekombinant spike proteininin, sabit antikor konsantrasyonu için rekabetine dayanmakta, farklı koronavirüs türlerinin eşzamanlı tanısını sağlayacak şekilde düzenlenmiştir. Altın nanoparçacıklarla modifiye edilmiş karbon elektrotlar, elektrokimyasal performansın artmasını sağlarken, non-spesifik bağlanma BSA çözeltisiyle azaltılmıştır. Sensör, MERS-CoV için 0.4 pg/mL, HCoV için 1.0 pg/mL saptama sınırı ile çalışmış ve ELISA'ya kıyasla çok daha hassas bulunmuştur [10].

Optik biyosensörlerde ise en yaygın kullanılan teknikler floresan ve yüzey plazmon rezonansıdır (SPR). SPR tabanlı biyosensörler, özellikle etiket gerektirmeyen, gerçek zamanlı biyomolekül tespiti sunması ile dikkat çeker, SARS-CoV'a özgü membran zarf proteini için genetik olarak modifiye edilmiş bir altın bağlayan polipeptidi SPR çip yüzeyine kendiliğinden monte ederek, anti-SCVme antikorlarının tespiti için spesifik bir sensör tasarlamıştır. Bu sistem, 200 ng/mL saptama sınırı ve 10 dakikada tespit süresi ile önemli avantajlar sunmuştur [43].

Piezoelektrik biyosensörler ise, antijen-antikor etkileşiminden kaynaklı kütle değişimlerini kuvars kristalin frekansındaki değişimle algılar. Zuo ve ark. tarafından geliştirilen ilk piezoelektrik SARS-CoV sensörü, at polisera antikorlarının kuvars yüzeye immobilizasyonu ile, aerosol ortamdaki antijenleri algılamış ve 0.6–4 µg/mL aralığında çalışmıştır [44].

Tüm bu biyosensör türleri, COVID-19 ve diğer zoonotik viral enfeksiyonların erken ve hassas tanısı için umut verici yaklaşımlar sunmakta olup, gelecekte tanı teknolojilerinde çok daha yaygın bir kullanıma sahip olması beklenmektedir.

2.4.2.7. Görüntüleme ve Destekleyici Tanı Yöntemleri

Her ne kadar viral nükleik asitlerin nicel ve nitel analizine dayalı RT–PCR testleri, SARS-CoV-2 tespitinde birincil yöntem olarak kabul edilse de, bu testlerin hassasiyeti orofaringeal sürüntülerde %32, nazal sürüntülerde %63 düzeyindedir. Ayrıca, test malzemelerinin yetersizliği veya teknik yeterlilik eksikliği nedeniyle sonuçlar bir haftayı aşkın sürede elde edilebilmektedir. Bu nedenle, RT–PCR sonucu olsun ya da olmasın, şüpheli vakalarda ek doğrulama yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Tanıyı netleştirmek için radyografik, moleküler ve antijen temelli testlerin tek başına ya da birlikte kullanımı tercih edilmektedir.

Solunum semptomlarının görülmesinin ardından yapılan ilk değerlendirmeler arasında genellikle görüntüleme yöntemleri yer alır. Bunlar; akciğer röntgeni (CXR), bilgisayarlı tomografi (BT/CT) ve akciğer ultrasonu (LUS) olabilir. Bu yöntemler, enfeksiyonun evrenmesinde de kullanılabilir. Genellikle basit bir CXR yeterli olur; fakat negatif bir röntgen, akciğer tutulumunun olmadığını kesin olarak gösteremez.

Her ne kadar RT–PCR virolojik tanıda altın standart olarak kabul edilse de CXR'nin duyarlılığı %69 olarak rapor edilmiştir. Ancak CXR görüntüleri genellikle özgül değildir.

Görülen belirtiler genellikle akciğerin üst sol lobu ve alt köşelerinde yoğun opak alanlar şeklindedir. Hastalık ilerledikçe daha belirgin radyografik bulgular ortaya çıkar. Ancak CXR, akciğer hastalığını doğrulamada faydalı olsa da; pnömotoraks, pulmoner ödem, plevral efüzyon, kitle ya da atelektazi gibi diğer olası hastalık durumlarını her zaman ayırt edemez.

Birçok çalışmada, özellikle yoğun bakım hastalarında seri röntgen görüntülemelerinin semptom süresini kısalttığı ve ek hastalıkları azalttığı belirtilmiştir [48].

Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

COVID-19 tanısında tamamlayıcı görüntüleme yöntemleri, enfeksiyonun doğrulanması ve izlenmesi için kullanılır. CXR'nin başlangıçtaki duyarlılığı yaklaşık %60'tır. BT taramalarında ise ters halo görünümü ve septal kalınlaşma bulguları dikkat çeker. Tipik BT bulguları; bilateral parankimal ground-glass opasiteleri, yoğun konsolidasyon alanları, yuvarlak morfolojiler ve periferik dağılımlar şeklindedir.

SARS-CoV ve MERS-CoV hastalarında da periferik tutulum gözlenmiştir. Ancak bu bulgular SARS-CoV-2 enfeksiyonuna özgü kabul edilmektedir. RT–PCR sonucu negatif çıkan ancak BT'de anormal bulgulara sahip hastalar daha sonra COVID-19 olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle, yüksek klinik şüphe durumunda, göğüs BT taraması RT–PCR'a ek olarak kullanılabilir. Yüksek çözünürlüklü BT, hem kesin tanı hem de hastalığın ciddiyetinin değerlendirilmesi için kritiktir.

MRG ise yumuşak doku detaylarını BT'den daha iyi gösterse de, temizlik sürecinin zorluğu, hava filtreleme sistemlerinin MRG ile uyumsuzluğu ve bulaş riski nedeniyle, Amerikan Radyoloji Koleji (ACR) COVID-19 hastalarında MRG kullanılmasını önermemektedir [48].

Akciğer Ultrasonu (LUS)

COVID-19 hastalarında akciğer ultrasonu (LUS) da kullanılmaktadır. Her ne kadar LUS, COVID-19 pnömonisini doğrudan tanımlamada spesifik olmasa da, enfekte alanların lokalizasyonunu saptamak için önerilir. LUS, düşük maliyetli bir yöntemdir ve pozitif ekspiryum sonu basınca (PEEP) iyi yanıt verdiği için CXR'den daha duyarlıdır.

LUS görüntüleri, şiddetli lokal enfeksiyonda akciğer konsolidasyonlarını, posterior alt akciğer bölgelerinde daha belirgin patolojik bulguları gösterir. Enfeksiyon genellikle akciğerlerin çevresinden merkezine doğru yayılır. Yoğun bakım hastalarında ise LUS, pulmoner ödem bulguları doğrultusunda hastaların pozisyonlanmasında tedaviye yön verir [48].

2.4.2.8.Point-of-Care (POC) ve Entegre Sistemler

COVID-19 pandemisiyle birlikte hızlı, güvenilir ve yerinde teşhis sistemlerine duyulan ihtiyaç önemli ölçüde artmıştır. Bu bağlamda Point-of-Care (POC) test sistemleri, laboratuvar altyapısına gerek duymadan, klinik veya saha ortamında tanı koyabilme kabiliyetleri sayesinde büyük avantaj sağlamıştır. POC testler, özellikle hasta başı teşhisinde zamanı kısaltarak enfeksiyon zincirinin kırılmasında etkili olmuştur.

POC sistemlerde sıklıkla lateral akış immünoassay (LFIA) ve izotermal amplifikasyon gibi yöntemler kullanılmakta olup, bunlar kısa sürede sonuç verme potansiyeline sahiptir. Ancak bu sistemlerin duyarlılık ve özgüllük açısından bazı sınırlılıkları bulunmakta ve bu durum özellikle asemptomatik vakaların atlanmasına neden olabilmektedir.

Bu nedenle, entegre mikroakışkan tabanlı sistemler ve lab-on-a-chip teknolojileri, POC sistemlerin doğruluğunu artırmak amacıyla geliştirilen yenilikçi yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Bu tür entegre sistemler, numune hazırlama, hedef amplifikasyonu ve sinyal tespiti gibi süreçleri tek bir platformda birleştirerek, tam otomatik ve kullanıcı dostu çözümler sunar. Özellikle elektro-kimyasal ve optik sensörlerin entegre edildiği bu sistemler, COVID-19 RNA'sını hızlıca tespit edebilmekte ve yüksek doğruluk oranlarına ulaşmaktadır. Gelecekteki pandemilere karşı hazırlıklı olmak adına, entegre POC sistemlerin düşük maliyetli, taşınabilir ve geniş ölçekte uygulanabilir biçimde yaygınlaştırılması hedeflenmektedir [45].

2.4.2.9. Lab-on-a-Chip (LoC) Sistemleri

LoC sistemleri, mikroakışkan kanallar ve entegre biyosensörler aracılığıyla, bir laboratuvarın işlevlerini tek bir çip üzerinde gerçekleştiren platformlardır. SARS-CoV-2 teşhisi için geliştirilen LoC sistemlerinde sıklıkla izotermal amplifikasyon teknikleri (RT-LAMP, NASBA) kullanılmaktadır. Bu teknikler, ısı döngüleyici gerektirmediğinden taşınabilir LoC sistemlerine entegrasyonu kolaydı [47]. Ayrıca, LoC platformlarında elektro-kimyasal, optik ya da plazmonik tabanlı transdüksiyon sistemleri yer alabilir ve bu sayede sinyalin hassas şekilde okunması sağlanır.

Birçok LoC sistemi, 15–30 dakika gibi kısa sürede sonuç verebilmekte ve klinik doğruluğu yüksek düzeyde sağlamaktadır. Ayrıca, düşük örnek hacmi ile çalışması, maliyet etkinliği ve tek kullanımlık tasarımları sayesinde kitlesel taramalarda kullanım için uygundur [49].

2.4.2.10. Kartuş Tabanlı Sistemler: CBNAAT ve TrueNAT

Cartridge Based Nucleic Acid Amplification Test (CBNAAT) ve TrueNAT, otomatik çalışan, entegre ve kullanımı kolay sistemlerdir. Bu sistemlerde, hasta örneği doğrudan kartuşa yüklenir ve örnek ekstraksiyonu, RNA amplifikasyonu ve sonuç okuma tek bir kapalı sistem içinde gerçekleşir. CBNAAT platformlarının en bilinen örneği GeneXpertsistemidir.

CBNAAT, SARS-CoV-2 RNA'sını RT-PCR temelli olarak yaklaşık 45 dakikada saptayabilir ve bulaşıcı hastalıklar için altın standart kabul edilen nükleik asit temelli tanı gücünü sahada taşınabilir hale getirir.

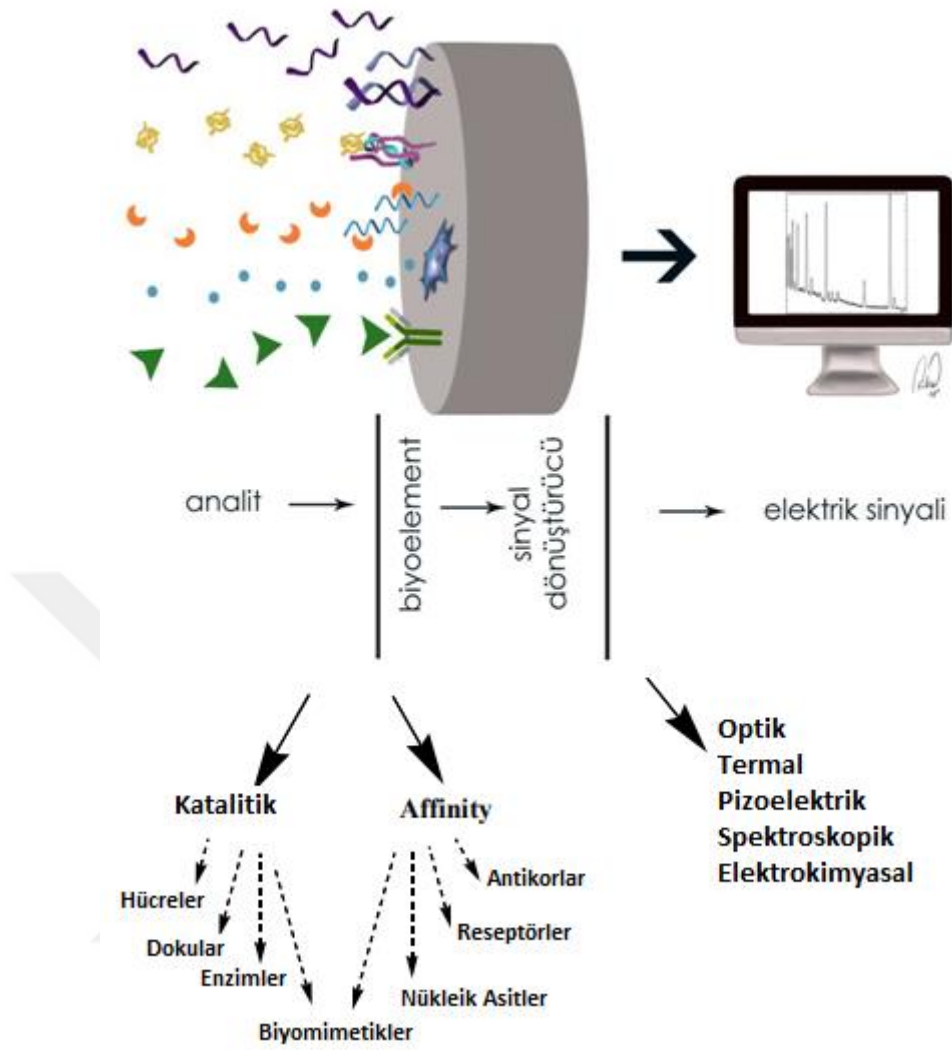
TrueNAT ise özellikle düşük kaynaklı bölgeler için geliştirilen, batarya ile çalışabilen ve taşınabilir bir moleküler tanı sistemidir. SARS-CoV-2 için geliştirilen TrueNAT kartuşları, önce E geni sonra pozitif çıkan örneklerde RdRp geni için ayrı kartuşla test sağlar. Bu sistemde sonuç süresi yaklaşık 1 saattir ve %90 üzeri duyarlılığa sahiptir.[50] Bu kartuş tabanlı sistemler, laboratuvar altyapısı olmayan yerlerde dahi güvenilir moleküler tanı sağlamakta ve sahada hızlı karar verilmesini kolaylaştırmaktadır.

2.5. BİYOSENSÖR

Biyosensör teknolojisi, biyomoleküller ile analitler arasındaki etkileşimleri ölçmek amacıyla biyolojik bileşenleri dönüştürücü sistemlerle bir araya getirerek elektronik sinyaller üreten cihazların geliştirilmesini konu alan bir alandır. Bu teknolojinin temelleri, Leland C. Clark'ın 1962 yılında enzim elektrodunu icat etmesiyle atılmıştır. Söz konusu elektrot, biyolojik materyalin bir dönüştürücüyle etkileşerek elektriksel sinyal üretmesini sağlayan bir prensibe dayanır. “Biyosensör” terimi ise ilk kez 1977 yılında kullanılmaya başlanmıştır.

Biyosensör ifadesi, iki ana bileşenden oluşan bir yapıyı tanımlar: bir biyoelement ve bir sensör elemanı. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tanımına göre biyosensör, biyomolekül ile dönüştürücüyü birleştirerek biyolojik tepkimeler sonucu elektriksel sinyaller üretebilen, kendi başına çalışabilen bir cihazdır. Bu tür sensörlerde enzimler, DNA, proteinler, hücreler ya da antikorlar gibi biyolojik moleküller görev alabilir. Analit ile biyomolekül arasında gerçekleşen reaksiyonlar, sensör platformunda ya da dönüştürücünün yüzeyinde meydana gelir. Dönüştürücü, kimyasal enerjiyi elektriksel sinyale çevirerek bu veriyi algılayıcı sistemlere aktarır ve ardından elektronik devreler aracılığıyla sinyal işlenerek analiz edilebilir hale getirilir.

Bir biyosensörün çalışma prensipleri temel olarak şu şekilde özetlenebilir: Örneğin bir enzim gibi belirli bir biyoelement, yalnızca hedef analiti tanır ve bu tanıma sonucunda oluşan biyolojik değişim, sensör elemanı tarafından elektrik sinyaline dönüştürülür. Biyoelement yalnızca ilgili analite karşı duyarlıdır; farklı analitlerle etkileşime girmez. Dönüştürücünün yapısına bağlı olarak biyosensörler; rezonans temelli, optik algılamalı, termal algılamalı, iyon duyarlı alan etkili transistör (ISFET) temelli ya da elektrokimyasal sistemler şeklinde çeşitlenebilir. Ölçülen parametreye göre sınıflandırıldığında ise elektrokimyasal biyosensörler iletkenlik, amperometrik ya da potansiyometrik türlerde olabilir. Bu sensörlerin temel ilkeleri ve sınıflandırılması Şekil 2.13’de şematik olarak sunulmuştur [51].



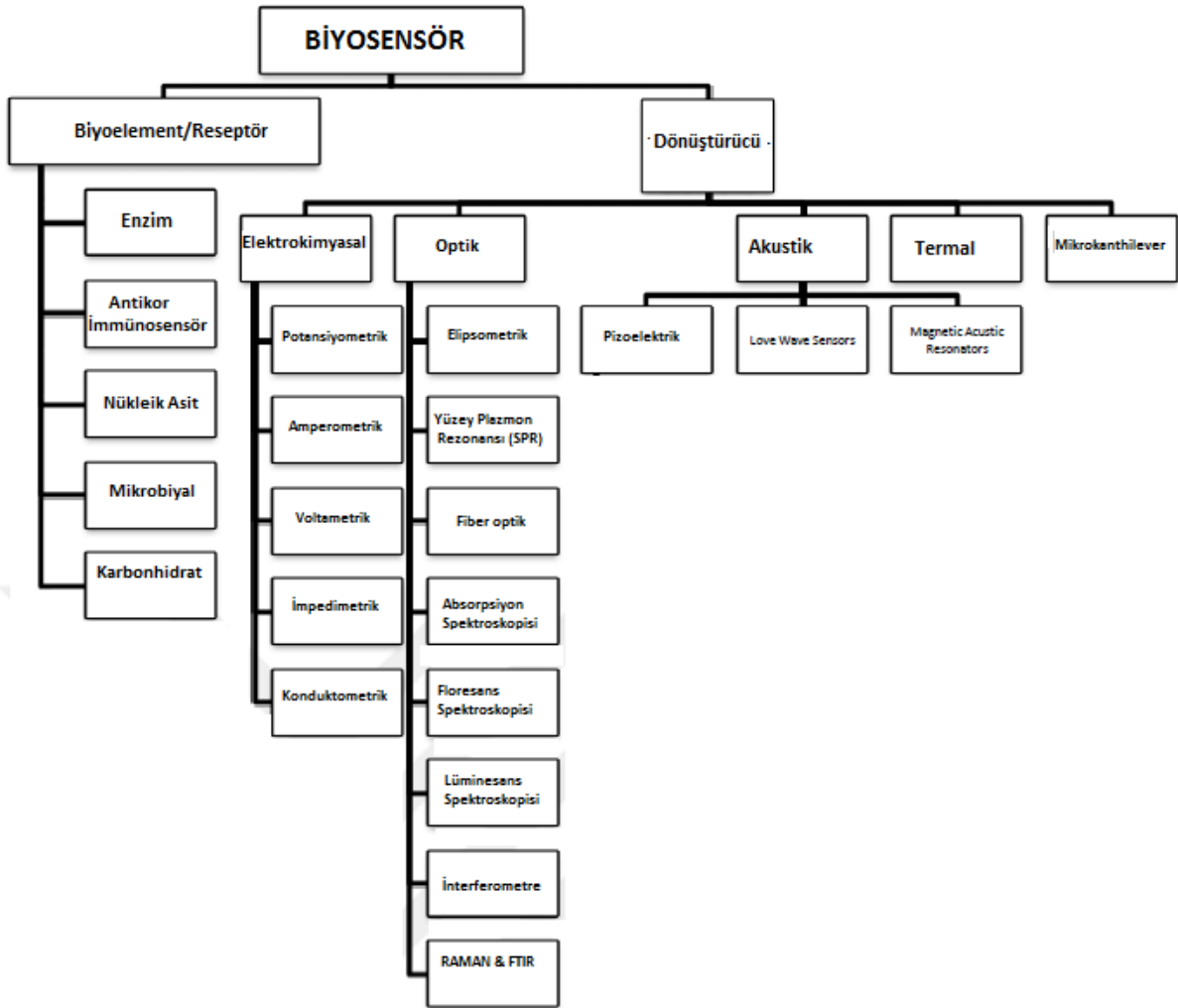
Şekil 2.13 Biyosensörün temel kavramları ve sınıflandırılmasının şematik gösterimi [52].

Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör tipine bağlı olarak iki ana gruba ayrılmaktadır: biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı biyosensörler. Biyokatalitik esaslı biyosensörler, sensör ortamında bulunan biyokatalizör makromoleküllerin gerçekleştirdiği katalitik reaksiyonlar üzerine kuruludur. Bu tür biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyolojik bileşenler; enzimler, hücreler ve doku kesitleridir.

Buna karşılık, biyoafinite esaslı biyosensörler, biyosensörün biyolojik bileşeninde yer alan makromoleküller ile analit arasındaki spesifik etkileşimlere dayanır. Bu sensörlerde biyoreseptör olarak sıklıkla antijen/antikor çiftleri ya da reseptör hücreler tercih edilmektedir. Eğer biyoreseptör olarak antijen–antikor etkileşimi esas alınıyorsa, bu tip biyosensörler “immunosensör” olarak adlandırılır. Immunosensörler, biyolojik tanıma elemanı olarak

immünoaktif bileşenlerin kullanıldığı özel bir biyosensör türüdür ve temel prensipleri, özgün antijen–antikor etkileşimi sonucu oluşan komplekslerin algılanmasına dayanır. Bu sistemlerde, antijen ya da antikorlar sensör yüzeyine immobilize edilerek kullanılır ve sensörler genellikle ölçüm yöntemlerine göre sınıflandırılır.

İmmünosensörlerde sensör platformu olarak çeşitli duyar elemanlar kullanılabilmektedir. Bunlar arasında elektrokimyasal yöntemler (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik sistemler, piezoelektrik elemanlar ve termometrik sensörler yer almaktadır [53]. Şekil 2.14’de biyosensör sınıflandırılmasının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.14 Biyosensör sınıflandırılmasının şematik gösterimi [54].

2.5.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler; temel bilimler, tıp ve mühendislik gibi pek çok alanda geniş uygulama imkânı sunan önemli araçlardır. Literatürde birçok araştırmacı, farklı elektrokimyasal sensör türlerinin geliştirilebileceğini ortaya koymuştur. Klinik perspektiften bakıldığında ise, bu sensörlerin geliştirilmesi hem çeşitli hastalıkların erken tanısında hem de bulaşıcı hastalıkların yayılmasını önlemede önemli katkılar sağlayabilir.

Genel anlamda sensörler, bir matriks içindeki analitin fiziksel miktarını ölçebilen küçük analitik cihazlardır. Elektrokimyasal sensörler ise temelde iki ana bileşenden oluşur: reseptör ve dönüştürücü. Reseptör, hedeflenen analitle özgül etkileşime giren bileşendir. Dönüştürücü ise bu etkileşimi ölçülebilir bir elektriksel sinyale çeviren kısımdır. Bu sensörler, elektrot ile çözelti arasındaki ara yüzeyde gerçekleşen elektrokimyasal özelliklerin ve elektrot reaksiyonlarının kontrol edilmesi temeline dayanır.

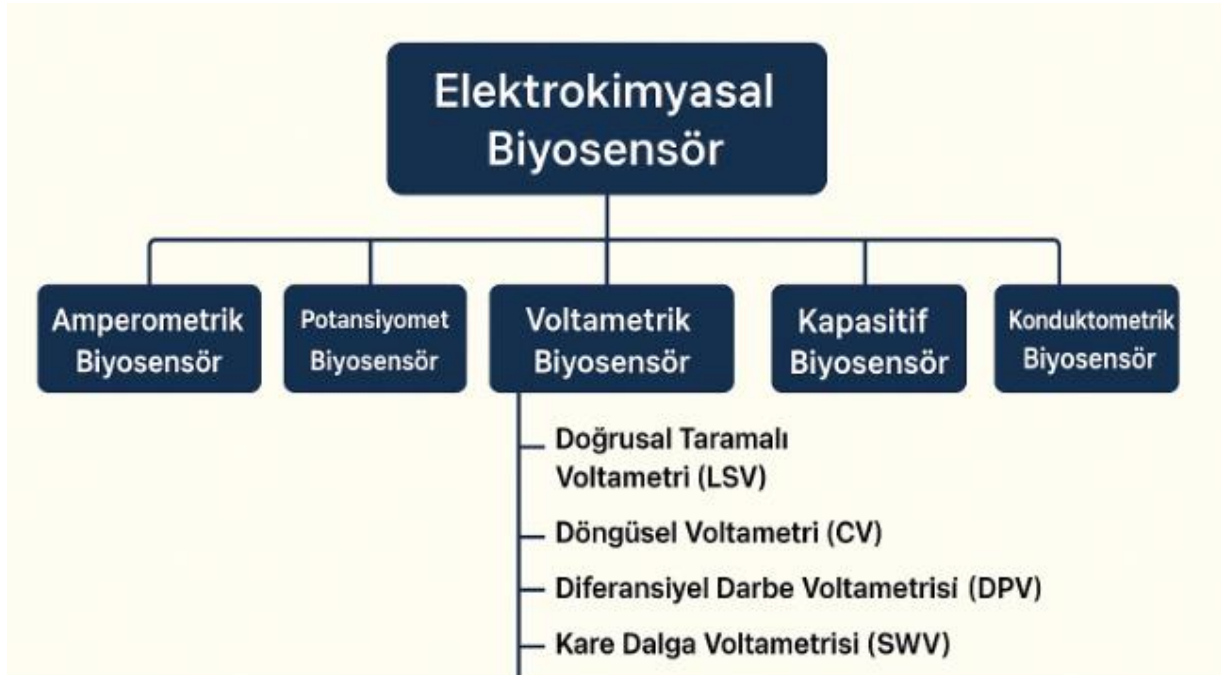
Elektrokimyasal sensörlerin tepkileri genellikle sürekli ve tersinir yapıdadır. Bu sensörlerin birçok avantajı bulunmaktadır: uzun süreli güvenilir performans, düşük gözlenebilme sınırı (LOD) ve düşük tayin limiti (LOQ) sağlama kapasitesi, yüksek hassasiyet, hızlı yanıt verme özelliği, kullanım kolaylığı, yüksek seçicilik ve düşük maliyetli olmaları bu avantajlardan sadece birkaçıdır [55].

Elektrokimyasal biyosensörler, basit yapıları, taşınabilir olmaları, hızlı tepki süreleri, yüksek hassasiyetleri, düşük maliyetleri, spesifik ve seçici olmaları gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca, diğer sensör türlerine göre daha az numune gereksinimi vardır.

Bir biyosensör, biyomolekül ve analit arasındaki etkileşim sonucu bir kimyasal değişim yarattığında ve bu değişim belirli bir analitin konsantrasyonuna göre bir elektrik sinyaline dönüştüğünde “elektrokimyasal” olarak adlandırılır. Bu tür biyosensörlerin algılama platformu veya dönüştürücü, genellikle altın, gümüş, karbon, platin gibi malzemelerden yapılan elektrotlardan oluşur.

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının algıladığı olayları elektriksel sinyallere dönüştürme mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Şekil 2.15’de elektrokimyasal

biyosensörlerinin sınıflandırılma şekli verilmiştir Bu sınıflandırma, sensörün ölçtüğü spesifik elektriksel parametreye ve çalışma prensibine dayanır.



Şekil 2.15 Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılması.

2.5.2. Amperometrik Sensörler

Amperometrik biyosensörler, elektrokimyasal biyosensörler arasında, elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonlarından kaynaklanan elektrik akımını ölçerek analit konsantrasyonu hakkında bilgi sağlayan cihazlardır. Bu biyosensörler, sabit bir potansiyel altında çalışır ve biyolojik tanıma elemanının (örneğin enzim, antikor veya DNA) hedef molekülle etkileşimi sonucunda oluşan elektroaktif ürünlerin yükseltgenmesi veya indirgenmesiyle ortaya çıkan akımı ölçer. Akımın büyüklüğü, analitin konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir ve bu, amperometrik biyosensörlerin hızlı ve hassas analiz yapmasını sağlar.

Bu sensörlerin temel prensibi, biyolojik tanıma elemanları ile analit arasında gerçekleşen reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan elektron transferine dayanır. Elektron transferi genellikle bir mediyatör aracılığıyla hızlandırılır ve bu süreçte mediyatör, elektronları biyolojik tanıma elemanından elektrota taşıyarak sinyal yoğunluğunu artırır. Bu özellik, sensörlerin düşük algılama sınırına sahip olmasını sağlar. Elektrot yüzeyi ise genellikle karbon nanotüpler, grafen

veya altın nanopartiküller gibi nanomalzemelerle modifiye edilerek sensör performansı iyileştirilir.

Amperometrik biyosensörler, glikoz, laktat, kolesterol ve DNA gibi biyobelirteçlerin tespitinde yaygın olarak kullanılır. Özellikle glikoz sensörleri, diyabet yönetiminde en yaygın kullanılan ticari uygulamalardan biridir. Bu sensörler, hızlı yanıt süreleri, geniş dinamik aralıkları ve yüksek hassasiyetleri sayesinde gıda güvenliği, çevre izleme ve farmasötik analiz gibi diğer alanlarda da önemli bir rol oynar. Ancak, çözeltideki parazit türlerin sinyali bozabilmesi ve elektrot yüzeyinde birikme nedeniyle performans düşüşü gibi sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sorunlar, elektrot yüzey modifikasyonları ve yenilikçi tasarımlarla büyük ölçüde çözülebilmektedir.

Gelecekte, nanoteknolojinin sunduğu yeniliklerle, amperometrik biyosensörlerin taşınabilir, düşük maliyetli ve çoklu analit algılama yeteneklerine sahip versiyonlarının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu sensörlerin performans iyileştirmeleri, hem tıbbi teşhis hem de çevresel analizlerde daha geniş uygulama alanlarına olanak tanıyacaktır [56].

2.5.3. Potansiyometrik Sensörler

Potansiyel ölçümüne dayanan analiz teknikleri, elektrokimyasal yöntemler arasında potansiyometrik analizler başlığı altında değerlendirilmektedir. Bu yöntem, genellikle biri referans diğeri gösterge (çalışma) elektrotu olmak üzere iki elektrottan oluşan ve akım geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu bir sistemde, potansiyelin zamana bağlı olarak ölçülmesi esasına dayanır. Özellikle iyon seçici elektrotların kullanıldığı sistemlerde, çözeltideki hedef iyonların derişimine bağlı olarak oluşan potansiyel değışimleri ölçmek için yaygın biçimde tercih edilmektedir. Bu sayede, analiz edilen iyonun konsantrasyonu yüksek doğrulukla belirlenebilir.

Tipik bir potansiyometrik sistem; sabit bir referans elektrot, analite duyarlı bir gösterge elektrot ve ölçüm yapılacak çözeltiden oluşur. Sistemin temel çalışma prensibi, bilinen bir referans potansiyelin, bilinmeyen potansiyelle karşılaştırılması esasına dayanır. Bu karşılaştırma ayarlanabilir bir direnç yardımıyla gerçekleştirilir ve iki potansiyel eşitlendiğinde sistemde akım geçişi olmaz; böylece potansiyel değeri doğrudan ölçülmüş olur.

İyon seçici membranlar ise iç standart çözelti ile test çözeltisini ayırarak yalnızca belirli iyonların geçişine izin verir. Yük ve derişime bağı olarak bu iyonlar membran boyunca hareket eder ve oluşan elektrostatik potansiyel farkı, referans ve gösterge elektrotlarının bir araya gelmesiyle ölçülebilir hale gelir.

Potansiyometrik sensörler, ilk olarak 1906 yılında Cremer tarafından tanımlanmış ve geçen zaman içinde önemli teknolojik gelişmelerle birlikte birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde bu yöntem; çevresel izleme, tıbbi tanı, gıda güvenliği ve tarımsal analiz gibi çeşitli uygulamalarda tercih edilmektedir. Düşük maliyetli oluşu, hızlı tepki süresi, düşük enerji ihtiyacı, yüksek seçicilik ve geniş çalışma aralığı gibi avantajları sayesinde potansiyometrik sistemler, rutin analizler için güvenilir bir seçenek haline gelmiştir [57].

2.5.4. İmpedimetrik Sensörler

İmpedimetrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oluşan elektriksel empedans değişikliklerini (direnc ve kapasitans) ölçer. Bu sensörler, biyolojik olayların elektrot yüzeyindeki etkilerini analiz ederek çalışır. Temel avantajları etiket gerektirmemeleri, biyolojik olayları doğrudan ölçebilmeleri ve yüksek özgüllük sunmalarıdır. Protein-protein etkileşimleri veya DNA hibritizasyonu gibi yüzeydeki etkileşimlerin izlenmesinde etkilidir. Ancak, çevresel değişiklikler sensör performansını etkileyebilir.

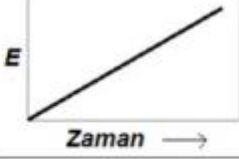
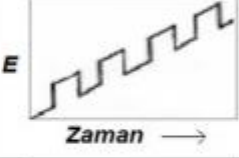
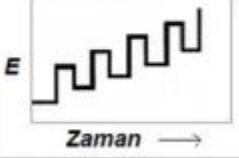
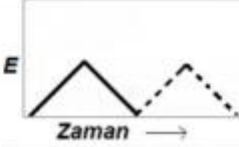
İmpedimetrik sensörler, tıbbi teşhislerden çevresel izlemeye kadar geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılır. Hücre metabolizmasını izleme ve toksik maddeleri algılama gibi görevlerde de faydalıdır. Elektrot yüzeyinin tasarımı, sensörün hassasiyetini artırmak için kritik bir faktördür ve karbon nanotüpler, grafen gibi nanomalzemelerle modifiye edilir.

Bu sensörlerin avantajları arasında etiket gerektirmemeleri, geniş algılama aralıkları ve hızlı analiz imkanı sunmaları bulunur. Ancak, biyolojik tanıma elemanlarının stabilitesi ve çözeltideki iyonlar algılama doğruluğunu etkileyebilir. Bu sınırlamalar, yüzey modifikasyonları ve çözümleme algoritmalarıyla aşılabılır.

İmpedimetrik sensörler, kanser biyobelirteçleri, ağır metaller, pestisitler ve toksinler gibi birçok alanda kullanılır. Nanoteknoloji ve yüzey kimyasındaki ilerlemeler, bu sensörlerin hassasiyetini ve algılama sınırlarını geliştirmiştir ve gelecekte daha geniş bir uygulama alanı beklenmektedir.

2.5.5. Voltametrik Biyosensör Teknikleri: LSV, CV, DPV ve SWV

Voltametrik biyosensörler, elektrokimyasal analizlerde elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonlarını ölçerek analitlerin tespit edilmesini sağlayan sensörlerdir. Bu sensörler, belirli bir potansiyel uygulandığında oluşan akım değişikliklerini ölçerek hedef moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirler. Voltametri tekniklerinde, çalışma elektroduna uygulanan ileri geri potansiyel süreci sonucunda elde edilen akım-potansiyel grafiği voltamogram olarak adlandırılır. Voltamogramların şekli, kullanılan voltametri türüne bağlı olarak farklılık gösterir. Yaygın olarak tercih edilen uyarma sinyalleri arasında üçgen dalga, kare dalga, diferansiyel puls ve doğrusal tarama yer almakta olup, bu sinyaller şekil üzerinde görsel olarak sunulmuştur. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal dönüşümler, uygulanan voltajın değiştirilmesiyle farklı yöntemler kullanılarak incelenebilir. Voltametrik biyosensörlerin dört temel çalışma yöntemi vardır: Doğrusal Taramalı Voltametri (LSV), Döngüsel Voltametri (CV), Diferansiyel Darbe Voltametrisi (DPV) ve Kare Dalga Voltametrisi (SWV). Her yöntem, biyosensörlerin hassasiyeti, doğruluğu ve uygulama alanları açısından farklı avantajlar sunar [58]. Şekil 2.16’da voltametrde yaygın olarak kullanılan uyarma sinyalleri gösterilmiştir.

İsim	Dalga Şekli	Voltametrinin Tipi
Doğrusal taramalı		Polarografi Hidrokinamik voltametri
Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil 2.16 Voltametrizde yaygın olarak kullanılan uyarma sinyalleri [59].

Doğrusal Taramalı Voltametri LSV

Doğrusal Taramalı Voltametri, elektrot yüzeyine uygulanan potansiyelin doğrusal olarak tarandığı ve buna karşılık gelen akımın ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu teknik, elektrokimyasal reaksiyonların termodinamik özelliklerini ve analitlerin redoks davranışlarını incelemek için kullanılır. Potansiyel, belirli bir hızla (mV/s cinsinden) artırılarak veya azaltılarak taranır ve bu sırada ölçülen akım değişimi kaydedilir. LSV, özellikle elektrot yüzeyinde gerçekleşen oksidasyon veya indirgenme reaksiyonlarını analiz etmek için yaygın olarak kullanılır.

Bu yöntemin temel prensibi, elektrokimyasal hücrede gerçekleşen redoks reaksiyonlarının kinetik parametrelerini ve elektrot yüzeyiyle etkileşimi değerlendirmektir. Elektrot yüzeyi, genellikle karbon nanotüpler, altın nanopartiküller veya grafen gibi nanomalzemelerle modifiye edilerek elektrokatalitik aktivite artırılır ve ölçüm hassasiyeti yükseltilir. LSV, biyobelirteçlerin tespit edilmesi, biyomoleküllerin elektrokimyasal davranışlarının anlaşılması ve farmasötik bileşiklerin analiz edilmesi gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptir [60].

Döngüsel Voltametri CV

Döngüsel Voltametri, elektrot yüzeyinde uygulanan potansiyelin ileri ve geri tarandığı ve akım-potansiyel eğrisinin kaydedildiği bir voltametrik tekniktir. CV, elektrokimyasal sistemlerin tersinirlik ve kinetik özelliklerini incelemek için en yaygın kullanılan analiz yöntemlerinden biridir. Potansiyel, belirli bir tarama hızıyla artırılarak hedeflenen maksimum değere ulaştığında yön değiştirilir ve ters tarama başlatılır. Bu işlem çoğunlukla birden fazla döngü halinde tekrarlanır; elde edilen voltamogramlar ise sistemde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonların kinetiği ve tersinirliği hakkında bilgi edinmek amacıyla analiz edilir.

CV, elektrot yüzeyinde gerçekleşen yüzey reaksiyonlarını analiz etmek, biyomoleküllerin oksidasyon veya indirgenme mekanizmalarını anlamak ve biyosensörlerin elektrokimyasal performansını değerlendirmek için ideal bir tekniktir. Elektrot yüzeyine immobilize edilen enzimler veya biyomoleküller ile modifiye edilmiş biyosensörlerde, CV kullanılarak enzimatik reaksiyonların kinetik analizi yapılabilir. Ayrıca, elektrot yüzeyinde meydana gelen adsorpsiyon ve desorpsiyon süreçleri hakkında detaylı bilgi sağlanır [60].

Diferansiyel Darbe Voltametrisi DPV

Diferansiyel Darbe Voltametrisi, yüksek çözünürlük ve hassasiyet gerektiren analizler için kullanılan gelişmiş bir voltametrik tekniktir. DPV’de, her potansiyel adımında kısa süreli bir darbe uygulanarak akım ölçülür ve bu işlem, analit konsantrasyonu ile orantılı olarak değişen bir sinyal oluşturur. DPV, düşük algılama sınırına sahip olması nedeniyle biyobelirteçlerin ve toksik maddelerin tespiti için oldukça etkili bir tekniktir.

Bu yöntemin temel avantajlarından biri, sinyal/gürültü oranını artırarak ölçüm hassasiyetini yükseltmesidir. DPV, biyosensörlerde DNA, proteinler, enzimler ve ilaç bileşiklerinin tespiti için yaygın olarak kullanılır. Çevresel analizlerde ağır metal iyonlarının belirlenmesi, farmasötik analizlerde ilaç moleküllerinin değerlendirilmesi ve biyomedikal uygulamalarda kanser biyobelirteçlerinin tespit edilmesi gibi alanlarda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir [60].

Kare Dalga Voltametrisi SWV

Kare Dalga Voltametrisi, potansiyelin belirli aralıklarla kare dalga şeklinde uygulanarak ölçüm yapıldığı bir voltametrik tekniktir. Kare dalga voltametrisi (SWV), elektrokimyasal sistemlerde gerçekleşen redoks reaksiyonlarını hızlı ve yüksek hassasiyetle analiz etme olanağı sunar. Uygulanan her kare dalga sonunda ölçülen akım farkları, analit konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılır.

SWV, biyosensör uygulamalarında enzimatik reaksiyonların incelenmesi, biyomoleküllerin elektroanalitik analizleri ve toksik maddelerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılır. Bu teknik, diferansiyel darbe voltametrisinden daha hızlı bir analiz süresi sunar ve çoklu analit tespiti için uygundur. Elektrokimyasal sensörlerde, elektrot yüzeyine immobilize edilmiş biyotanıma elemanları ile birlikte kullanıldığında, biyobelirteçlerin ve patojenlerin algılanmasında yüksek doğruluk sağlar [61].

2.5.6. Kapasitif Biyosensörler

Kapasitif biyosensörler, elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyomoleküler etkileşimleri kapasitans değişimleri aracılığıyla ölçen elektrokimyasal sensörlerdir. Biyotanıma elemanlarının hedef moleküllerle etkileşimi sonucu yük dağılımı değişir ve bu değişiklik kapasitans ölçümleriyle belirlenir.

Bu sensörler, elektrot-elektrolit arayüzünde kapasitans değişimlerini izleyerek yüzeye bağlanan biyomolekülleri tespit eder. Etiketleme gerektirmemesi, yüksek hassasiyet sunması ve hızlı yanıt vermesi nedeniyle biyomedikal teşhis, çevresel izleme, gıda güvenliği ve farmasötik analiz gibi birçok alanda kullanılır.

Biyomedikal teşhislerde, kapasitif biyosensörler antijen-antikor etkileşimleri, DNA hibridizasyonu ve kanser biyobelirteçlerinin tespiti için kullanılır. Enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde de güvenilir sonuçlar sunar. Çevresel izleme alanında, ağır metaller, pestisitler ve kirleticilerin belirlenmesinde etkilidir. Gıda güvenliğinde, patojen mikroorganizmaların ve toksinlerin tespit edilmesinde kullanılır. Farmasötik analizlerde ise ilaç-biyomolekül etkileşimlerini analiz ederek ilaç geliştirme süreçlerine katkı sağlar [62].

2.5.7. Konduktometrik Biyosensörler

Konduktometrik biyosensörler, biyotanıma elemanı ile hedef analit arasındaki etkileşim sonucu çözelti içerisindeki iyonik iletkenlik değişimlerini ölçerek çalışan elektrokimyasal sensörlerdir. Bu sensörler, iyon hareketlerini algılayarak analitin varlığını ve konsantrasyonunu belirler. Ölçüm, iki veya dört elektrotlu sistemler kullanılarak gerçekleştirilir ve iyon yoğunluğundaki değişim, elektriksel iletkenlik farkı olarak kaydedilir.

Bu biyosensörler, biyomedikal teşhislerde glikoz, üre ve laktat gibi biyobelirteçlerin tespitinde kullanılır. Çevresel izleme alanında ağır metaller ve pestisitlerin belirlenmesi için etkili bir yöntemdir. Gıda güvenliğinde, bakterilerin metabolik aktiviteleri sonucu oluşan iyon değişimlerini algılayarak gıda kaynaklı patojenleri tespit eder. Farmasötik analizler, ilaç ve biyomoleküller arasındaki etkileşimleri değerlendirerek yeni ilaç geliştirme süreçlerinde kritik bir rol üstlenmektedir. Konduktometrik biyosensörlerin performansı, elektrot yüzeyine uygulanan nanomalzemelerle artırılabilir. Altın nanopartiküller, karbon nanotüpler ve grafen gibi iletken malzemeler, hassasiyeti artırarak düşük konsantrasyonlu analitleri tespit etmeyi mümkün kılar. Mikroakışkan sistemlerle entegre edilmesi, taşınabilir ve hızlı analiz yapmaya olanak tanır. İlerleyen dönemlerde bu sensörlerin hem biyomedikal teşhis hem de çevresel analiz alanlarında kullanım alanlarının genişlemesi beklenmektedir [63].

2.6. BİYOSENSÖRLERE BİYOMOLEKÜLLERİN İMMOBİLİZASYONU

Biyosensörlerin temel bileşenlerinden biri, biyomoleküllerin dönüştürücü yüzeye yapışmasıdır. Bu işlem "immobilizasyon" olarak adlandırılır ve biyosensör inşasında en kritik ilk adımı oluşturur. Biyomolekül immobilizasyonu için dört ana teknik bulunmaktadır: adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve kapsülleme. Bu tekniklerden adsorpsiyon ve kapsülleme fiziksel yöntemlerdir, çapraz bağlama ve kovalent bağlama ise kimyasal yöntemlerdir.

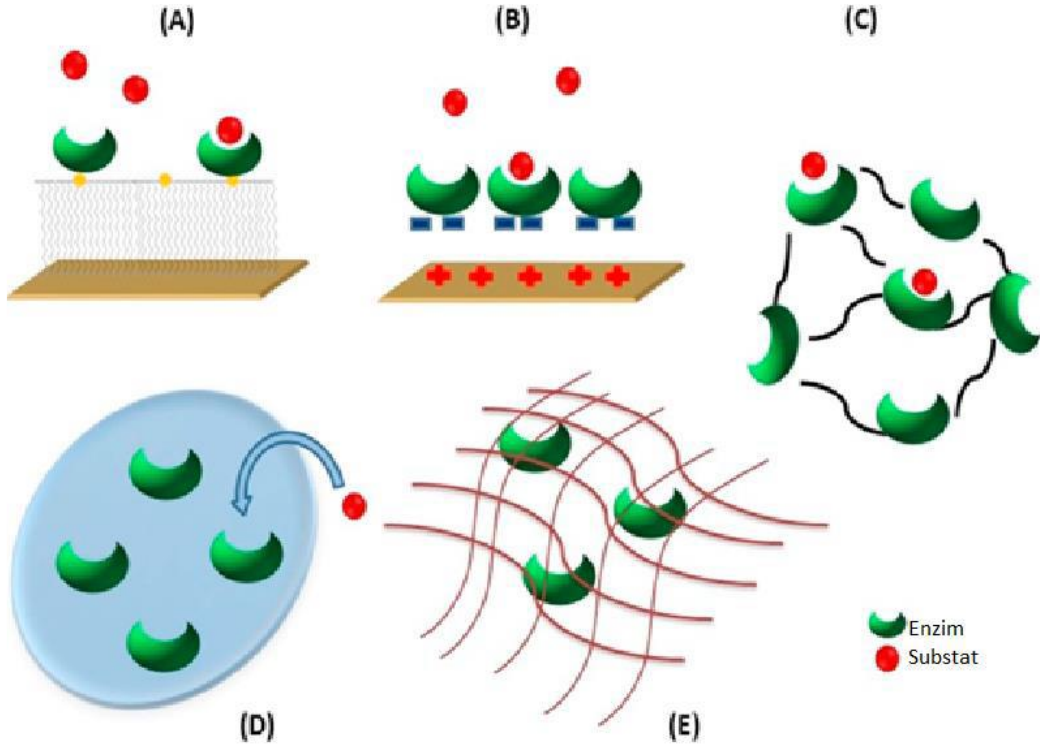
Biyosensör yapımındaki en önemli faktör, biyomoleküllerin immobilize edilmesi ve yüzeylere tutturulması için immobilizasyon teknolojilerinin geliştirilmesidir. Elektrokimyasal tabanlı biyo-algılama sistemlerinin geliştirilmesinde en kritik aşamalardan biri, biyomoleküler bir film tabakasının metal veya yarı iletken bir yüzey üzerine uygun şekilde immobilize edilmesidir. Bir biyosensörün yüksek performans gösterebilmesi için, tanıma molekülünün transdüser yüzeye

geri döndürülemez biçimde bağlanması büyük önem taşır. Bu bağlamda, yüzey kimyasının ve kapsama oranının hassas şekilde kontrol edilmesi; biyomoleküllerin doğru yönelimde, kararlı ve erişilebilir biçimde yerleştirilmesini sağlarken, aynı zamanda spesifik olmayan adsorpsiyonları da en aza indirir. Bu immobilizasyon süreci, biyosensörün genel doğruluk, hassasiyet ve seçiciliği üzerinde doğrudan belirleyici etkiye sahiptir.

Biyomateryallerin immobilizasyonu için kullanılacak tekniğinin karşılaması gereken bir takım gereklilikler vardır: (i) biyolojik bileşen, sensör yüzeyine bağlandığında biyolojik etkinliğini önemli ölçüde muhafaza etmelidir; (ii) biyolojik film yapısını ve işlevini muhafaza ederken sensör yüzeyine sıkıca bağlı kalmalıdır; (iii) immobilize edilmiş biyolojik filmin uzun vadeli kararlılığının ve dayanıklılığının olması gerekir; ve (iv) biyolojik materyalin, belirli bir biyolojik bileşene yüksek bir spesifikliği olmalıdır. Etkili bir biyosensör için bu koşullar yerine getirilmelidir [51]. Şekil 2.17’de temel immobilizasyon yöntemleri şematik olarak gösterilmiştir.

Temel immobilizasyon yöntemleri şunlardır:

1. Bir yüzeye kovalent bağlama
2. Katı bir yüzeyde fiziksel veya kimyasal adsorpsiyon
3. Moleküller arası çapraz bağlama
4. Enkapsülasyon
5. Bir membran, sürfaktan matrisi, polimer veya mikrokapsül içerisine tutuklama [64]



Şekil 2.17 Biyosensörlerde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri. (A) kovalent bağlama; (B) adsorpsiyon; (C) çapraz bağlama; (D) enkapsülasyon; (E) tutuklama.

Kullanılan immobilizasyon yöntemi bir takım faktörlere bağlıdır; ancak genel olarak yöntem immobilize edilecek biyomoleküle, immobilizasyonun yapılacağı sensör yüzeyine veya matrisine ve nihai olarak sensörün son kullanımı ile uyumlu olmalıdır. Tüm bu hususlar, biyolojik unsurun maksimum etkinlik sergilemesine ve cihazın stabilitesine ve tekrar kullanılabilirliğine yardımcı olmasına izin verecektir. Başarılı bir biyosensör immobilizasyon tekniğinin bazı temel özellikleri sağlaması gerekir: biyomoleküllerin düzgün ve hızlı bir şekilde immobilize edilmesi, sızıntı olmaması, uzun ömürlülük, biyomoleküllerin kimliklerini koruması ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi. Ancak, bu tüm özelliklerin tek bir teknikle sağlanması mümkün değildir [65].

Biyosensörlerde kullanılan biyomolekül immobilizasyon tekniklerinden bazıları, biyosensörlerin dayanıklılığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Adsorpsiyon yönteminde, biyosensörlerin zamanla biyomolekül kaybına uğrayarak çözündüğü ve bu nedenle kısa ömürlü oldukları gözlemlenmiştir. Buna karşılık, kovalent bağlama ve çapraz bağlama teknikleri, biyomolekül ve dönüştürücü arasında güçlü kimyasal bağların oluşmasını sağlar. Bu kimyasal bağlar, biyosensörlerin uzun ömürlü olmasını destekler; ancak, kimyasal yapıların

incelenmesini gerektirdiğinden karmaşık ve zaman alıcıdır. Ayrıca, biyomolekölün kimliğini değiştirebilecek tehlikeli kimyasallar içerir.

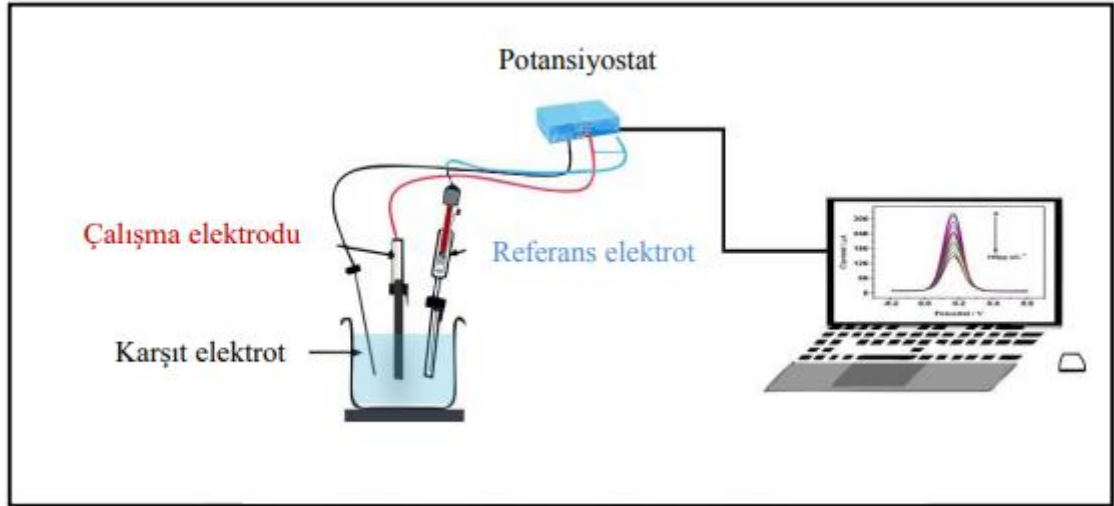
Kapsülleme yöntemi ise kimyasal ve adsorpsiyon yöntemlerinin avantajlarını birleştirirken, dezavantajlarını büyük ölçüde ortadan kaldırır. Bu yöntemde, biyomolekül, dönüştürücü yüzeyindeki gözenekli bir polimer matris içerisine hapsedilir. Polimer matrisin önemli bir özelliği, kolayca ayarlanabilen bir yapıya sahip olmasıdır. Bu teknik, kimyasal bağlanma ve çapraz bağlamadaki gibi karmaşık kimyasal incelemeleri gerektirmez. Dahası, kapsülleme tekniği biyomolekölün matris içinde kalmasını sağladığından, biyomolekül sızıntısı nadiren meydana gelir. Bu yöntem, biyomolekölün bütünlüğünü koruyarak onun doğal yapısına zarar vermeden işlem yapmayı mümkün kılar.

Biyosensörlerin verimli çalışması için doğru immobilizasyon ve uygun dönüştürücü seçimi önemlidir. Dönüştürücüler, kimyasal, optik, kütle veya sıcaklık değişimlerini elektrik sinyaline çevirir. Buna göre biyosensörler; elektrokimyasal, optik, termal ve piezoelektrik olarak sınıflandırılır. Elektrokimyasal biyosensörlerde, analitin biyomolekülle reaksiyonu elektrik sinyali oluşturur. Optik biyosensörlerde, analit ile biyomolekül arasındaki ışık etkileşimlerinden yararlanılır. Termal biyosensörler sıcaklık değişimlerini algılayarak, piezoelektrik biyosensörler kütle değişimlerini ölçer [65].

2.7. BİYOSENSÖRLERİN TEMEL BİLEŞENLERİ VE ÇALIŞMA PRENSİBİ

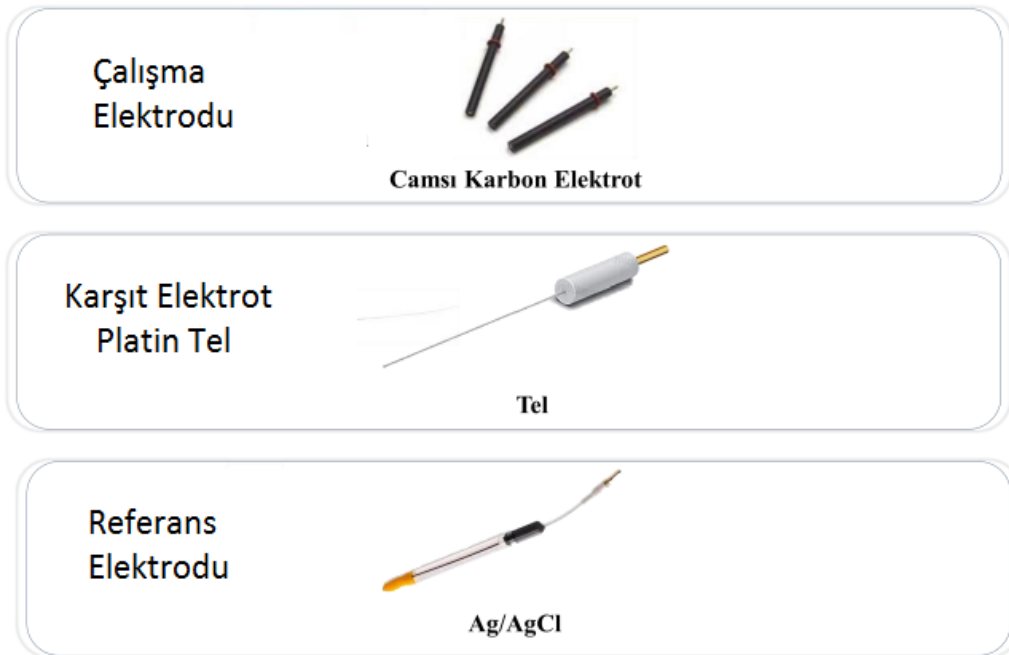
Bir biyosensör ölçüm sisteminde referans, çalışma ve karşı elektrot olmak üzere üç farklı elektrot kullanılır. Bu elektrotlar, özel kablolar aracılığıyla potansiyostata bağlanır. Ölçümler, elektrokimyasal bir hücre içerisinde gerçekleştirilir. Şekil 2.18’de, bu elektrokimyasal hücre ile üç elektrotlu sistemin şematik yapısı gösterilmektedir.

Biyosensörlerin çalışma prensibi, analitin biyoreseptör tarafından tanınması ve bu tanıma olayı sonucunda oluşan biyokimyasal sinyalin ölçülebilir bir çıktıya dönüştürülmesine dayanır. Bu süreçte, hedef analit ile biyoreseptör arasında özgül bir reaksiyon meydana gelir. Reaksiyon sonucunda oluşan değişimler, dönüştürücü tarafından çoğunlukla elektriksel sinyallere çevrilir. Elde edilen bu elektriksel sinyal, hedef analitin miktarına bağlı olarak değişir ve böylece analitin konsantrasyonu hakkında bilgi edinilmiş olur. Elektrokimyasal hücre ve üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi şekilde sunulmuştur [66].



Şekil 2.18 Elektrokimyasal hücre ve üçlü elektrot sisteminin şematik gösterimi [66].

Biyomoleküler etkileşimlerin ölçülebilir elektriksel sinyallere dönüştürülmesinde görev alan elektrotlar, elektrokimyasal biyosensörlerin temel işleyişini oluşturan kritik bileşenlerdendir. Bu sensörlerde, biyolojik tanıma sürecinin ardından oluşan elektriksel değişimlerin güvenilir bir şekilde algılanması ve değerlendirilmesi, doğrudan elektrot sistemi aracılığıyla gerçekleşir. Bu noktada, sistemin bileşenleri olan çalışma (referans) elektrodu, karşıt elektrot ve bazı durumlarda kullanılan yardımcı elektrot, ölçümün doğruluğu ve sinyalin istikrarı açısından belirleyici rol oynamaktadır. Şekil 2.19’da elektrokimyasal biyosensörde kullanılan elektrotlar verilmiştir [67].



Şekil 2.19 Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan elektrotlar [67].

Çalışma elektrodu, kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği ve bu süreçte elektronların serbest bırakıldığı elektrot türüdür. Elektroaktif türlerin çalışma elektrodu üzerindeki indirgenmesiyle meydana gelen akım katodik akım (I_k) olarak adlandırılırken, yükseltgenmeleri sonucu oluşan akım anodik akım (I_a) olarak bilinir. Voltametri de çalışma elektroduna uygulanan potansiyel negatif yönde arttırıldığında elektrot katot olarak işlev görür ve indirgenme reaksiyonları gerçekleşir. Potansiyel pozitif yönde arttırıldığında ise elektrot anot olarak işlev görür ve anodik akımlar oluşur. Bir elektrokimyasal sensör tasarımında, öncelikle çalışma elektrodunun katot ve anaot olarak hareket edeceği potansiyeller belirlenir. Bu işlemler elektroaktif maddenin, çevrenin ve elektrodun türüne bağlı olarak gerçekleştirilir. elektrokimyasal sensörlerde, çalışma elektrodu olarak Altın (Au), platin (Pt) ve camı karbon elektrot (GCE) türleri en yaygın olarak kullanılır.

Karşıt elektrot, bir elektrokimyasal sensör tasarımında elektronların elektrik sinyalinin kaynağından alarak, çalışma elektroduna iletilmesini sağlar. Bu tür elektrot olarak genellikle tel yada spiral levha olarak platin (Pt) elektrot kullanılır.

Referans elektrot, elektron sayısını başlangıçta ve reaksiyon esnasında karşılaştırarak çalışma prensibi üzerine kuruludur. Deney süresince potansiyelini değiştirmeyen ve polarizasyona direnç gösteren bir elektrottur. İdeal bir referans elektrot, minimal akımlarda bile potansiyelini sabit tutabilen ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmeyen özelliklere sahiptir. Standart hidrojen elektrotu (SHE), doymuş kalomel (DKE) ve Ag/AgCl gibi elektrotlar sulu ortamlarda, Ag/AgNO₃ gibi elektrotlar ise susuz ortamlarda referans elektrot olarak kullanılabilir [67].

2.8 BİYOSENSÖRLERİN ÖNÜNDEKİ BÜYÜK ZORLUK VE GELECEK BEKLENTİLERİ

Biyosensörler birçok farklı alanda geniş uygulama potansiyeline sahip olsa da, bu alandaki en büyük zorluklardan biri, geliştirilen yüzlerce biyosensörden yalnızca çok azının ticarileştirilebilmesidir. Bu sorunu aşmak ve biyosensörlerin yaygın olarak kullanılabilir hale gelmesini sağlamak için araştırmacılar, özellikle düşük maliyetli immobilizasyon tekniklerine odaklanmaktadır. Bu doğrultuda, laboratuvar ortamlarında her gün farklı immobilizasyon malzemeleri test edilmekte ve en verimli sonuçları sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yürütülmektedir.

Ticarileştirme sürecinde karşılaşılan bir diğer önemli zorluk ise biyosensörlerin minyatürleştirilmesi ve algılama hassasiyetinin artırılmasıdır. Bu hedeflere ulaşmak amacıyla, elektrokimyasal biyosensörlerde nanoteller, nanoçubuklar ve nanotüpler gibi nanoyapılar kullanılmakta ve bu sayede sensörlerin performansları önemli ölçüde iyileştirilmektedir. Nanoyapıların yüksek özgüllük ve hassasiyet sunmaları nedeniyle, günümüzde hidrojen peroksit, glikoz, kolesterol, DNA, bakteri ve kanser gibi birçok farklı analitin tespitinde yaygın olarak tercih edilmektedirler. Özellikle minyatür biyosensör geliştirme çalışmalarında, grafen ön plana çıkmaktadır. Geniş yüzey alanı ve yüksek elektrik iletkenliği gibi avantajları sayesinde, grafen tabanlı elektrokimyasal biyosensörler çevredeki ağır metal iyonlarının tespiti gibi çevresel uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, grafen temelli DNA biyosensörleri genetik bozuklukların teşhisinde ve adli analizlerde suçlu tespitinde de kullanılmaktadır. Günümüzde araştırmacılar yalnızca biyosensörlerin ticarileştirilmesi üzerine değil, aynı zamanda çoklu analitleri aynı anda tespit edebilen entegre biyosensör sistemlerinin geliştirilmesine de odaklanmaktadır. Ek olarak, doğrudan vücuda yerleştirilebilecek, tıbbi uygulamalara uygun biyosensörler üzerine yürütülen araştırmalar da hızla devam etmektedir.

Biyosensör teknolojisinde yaşanan bu hızlı gelişmeler, gelecekte biyosensörlerin yaşamın hemen her alanında yaygın olarak kullanılacağını göstermektedir. Önümüzdeki yıllarda bireyler, idrar, kan ya da tükürük gibi biyolojik örnekleri kendi kendilerine analiz edebilecek; biyosensörlerin herhangi bir anormallik tespit etmesi durumunda doktora başvurarak erken müdahale şansı elde edebilecektir. Bu sayede, kalp krizi gibi acil durumların riski önceden belirlenebilecek ve kanser gibi ciddi hastalıkların erken teşhisi mümkün hale gelecektir.

Biyosensörlerin yalnızca sağlık alanında değil, toplumun diğer kesimlerinde de önemli bir rol üstleneceği öngörülmektedir. Örneğin, trafik denetimlerinde görevli polisler, sürücülerin alkol alıp almadığını anlamak için tek kullanımlık alkol biyosensörlerinden faydalanabilecektir. Tarım sektöründe ise çiftçiler, ürünlerdeki pestisit düzeyini biyosensörler aracılığıyla hızlıca analiz ederek insan sağlığını tehdit etmeyecek sınırlar içinde kalmasını sağlayabilecektir.

Gıda ve ilaç sanayisinde biyosensörler, analiz süreçlerini hem hızlandıracak hem de kolaylaştıracaktır. Bunun yanında, organik ve inorganik gıdalar arasındaki farkın tespiti gibi daha özgül görevlerde de kullanılması mümkün olacaktır. Örneğin, çay ya da kahve gibi içeceklerin bileşenlerinin konsantrasyonunu anında ölçebilen biyosensörlerin geliştirilmesi, yakın gelecekte ulaşılabilir bir hedef olarak değerlendirilmektedir.

Sonuç olarak, biyosensörler; daha hijyenik bir yaşam, hastalıkların erken teşhisi ve önlenmesi, daha az eforla daha bilinçli sağlık takibi gibi avantajlarla yaşam kalitesini önemli ölçüde artırma potansiyeline sahiptir [68].

2.9. SARS-CoV-2 TESPİTİNE İLİŞKİN BİYOSENSÖR ÇALIŞMALARI

Torres ve arkadaşları, SARS-CoV-2 virüsünün hızlı, düşük maliyetli ve sahada uygulanabilir bir şekilde teşhis edilmesine yönelik bir biyosensör geliştirilmesi üzerine araştırma yapmıştır. Çalışmada, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) kullanılarak virüsün spike proteini ile insan ACE2 reseptörü arasındaki biyomoleküler bağlanma olayını elektrik sinyallerine dönüştüren bir sistem tasarlanmıştır. Bu doğrultuda, cihazın ana bileşeni olan elektrot yüzeyi, glutaraldehit ile işlenmiş, ACE2 enzimi bu yüzeye sabitlenmiş ve yüzeyin biyolojik örneklerdeki istenmeyen etkilerden korunması için bovin serum albümini (BSA) ile stabilize edilerek Nafion membranı ile kaplanmıştır.

Araştırmada, cihazın hem tükürük hem de burun/boğaz sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 tespitindeki duyarlılığı, özgüllüğü ve doğruluğu değerlendirilmiştir. Test sonuçları, cihazın yalnızca 4 dakikada kesin sonuç verebildiğini ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha düşük maliyetli ve hızlı bir çözüm sunduğunu ortaya koymuştur. Araştırmada ayrıca cihazın yüksek ölçeklenebilirliği ve geniş üretim kapasitesi vurgulanmıştır. Bu özellikler, cihazın toplu teşhis ihtiyaçlarını karşılamada etkili bir araç olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada geliştirilen RAPID 1.0 biyosensörünün, COVID-19'un erken teşhisinde ve pandeminin yönetiminde önemli bir yenilik sunduğu belirlenmiştir [69].

Raziq ve arkadaşları SARS-CoV-2 antijeninin hızlı, hassas ve taşınabilir bir cihazla tespiti için moleküler baskılanmış polimer (MIP) tabanlı elektrokimyasal bir sensör geliştirmiştir. Sensör, SARS-CoV-2'nin nükleokapsid proteini (ncovNP) ile spesifik etkileşime giren bir tanıma elemanına sahiptir. Bu amaçla, ncovNP-MIP, altın tabanlı ince film elektrot (Au-TFE) üzerinde sentezlenmiş ve taşınabilir bir potansiyostat ile birleştirilmiştir. Sensör, ncovNP varlığında, kırmızıoksit probu aracılığıyla elektrot yüzeyinde yük transferini etkin bir şekilde azaltarak sinyal oluşturmıştır.

Sonuçlar, sensörün hem sentetik hem de klinik örneklerde SARS-CoV-2 antijenini seçici bir şekilde tespit edebildiğini göstermiştir. ncovNP'nin lysis tamponunda lineer olarak algılanabilirliği 2.22-111 fM aralığında saptanmış ve tespit sınırı (LOD) 15 fM, miktar tayin sınırı (LOQ) ise 50 fM olarak belirlenmiştir. Klinik örneklerde, sensör SARS-CoV-2'nin diğer proteinleriyle karışık ortamda dahi yüksek seçicilik göstermiş ve RT-PCR doğrulamalı COVID-19 pozitif örneklerde başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Araştırma, taşınabilir ve uygun maliyetli bu yeni sensörün, SARS-CoV-2 teşhisinde hızlı tarama için alternatif bir platform sunduğunu ve gelecekteki pandemilere karşı etkili bir araç olabileceğini göstermektedir [70].

Curti ve arkadaşları, SARS-CoV-2 spike proteininin hızlı ve tek adımlı tespiti için bir katlanmaya dayalı elektrokimyasal aptasensör geliştirmiştir. Bu sensör, SARS-CoV-2'nin S1 alt birimindeki reseptör bağlanma bölgesine (RBD) spesifik olarak bağlanan bir DNA aptameri kullanmaktadır. Aptamerin hedef proteine bağlanması, aptamer yapısında konsantrasyona bağlı bir katlanma meydana getirerek, redoks etiketi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transfer verimliliğini azaltmaktadır. Bu süreç, amperometrik sinyalde bir azalmaya neden olmaktadır.

Sonuçlar, sensörün SARS-CoV-2 S1 proteinini hem tampon çözeltilerde hem de nazofarengeal sürüntüler için kullanılan yapay viral taşıma ortamında yüksek özgüllükle tespit edebildiğini göstermiştir. Sensörün dissosiyasyon sabiti (KD) 43 ± 4 nM olarak belirlenmiş ve 7 nM'lik bir tespit sınırına ulaşılmıştır. Ayrıca, sensörün farklı viral proteinlerle (örneğin, MERS-CoV S1 ve H1N1 proteinleri) çapraz reaksiyon göstermediği ve hedef S1 proteinine karşı yüksek özgüllük sergilediği saptanmıştır.

Bu çalışma, düşük maliyetli ve taşınabilir bu aptasensörün, SARS-CoV-2'nin hızlı teşhisinde etkili bir araç olarak kullanılabileceğini ve aynı platformun diğer biyomoleküllerin tespiti için uyarlanabileceğini ortaya koymaktadır [71].

Vadlamani ve arkadaşları, SARS-CoV-2'nin hızlı ve hassas bir şekilde tespiti için kobalt fonksiyonlu TiO₂ nanotüp tabanlı elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmiştir. Sensör, virüsün yüzeyindeki spike glikoproteininin reseptör bağlanma alanını (S-RBD) hedef alarak çalışmaktadır. TiO₂ nanotüpler, elektrokimyasal anodizasyon yöntemi ile üretilmiş ve daha

sonra kobalt ile fonksiyonel hale getirilmiştir. S-RBD proteinini tespit etmek için amperometri tekniği kullanılmış, sensörün yaklaşık 30 saniyede sonuç verebildiği gösterilmiştir.

Araştırmanın sonuçları, geliştirilen sensörün S-RBD proteininin 14 ile 1400 nM konsantrasyon aralığında tespit edebildiğini ve tespit sınırının 0.7 nM olduğunu ortaya koymuştur. Sensör, viral proteine karşı yüksek seçicilik göstermiş ve lineer bir yanıt profili sunmuştur. Bu özellikler, sensörün nazal, nazofaringeal sürüntüler ve tükürük gibi klinik örneklerde hızlı tanı için uygulanabilir bir araç olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu biyosensör, basit, düşük maliyetli ve hızlı bir tanı platformu sunarak SARS-CoV-2 gibi diğer solunum yolu viral hastalıklarının teşhisinde de kullanılabilir. Geliştirilen yaklaşım, nanotüplerin uygun metallerle fonksiyonelleştirilmesi yoluyla diğer patojenlerin tespitine de uyarlanabilir [72].

Tabrizi ve arkadaşları, SARS-CoV-2'nin reseptör bağlanma bölgesinin (RBD) tespiti için foto-elektrokimyasal bir aptasensör geliştirmiştir. Bu amaçla, grafit karbon nitrür (gC₃N₄) ve kadmiyum sülfür (CdS) kuantum noktaları fotoaktif nanomalzeme olarak sentezlenip birleşik bir nanokompozit oluşturulmuştur. Bu nanokompozit, kitosan ile birlikte bir ITO elektrot yüzeyine sabitlenmiş ve amin-terminal aptamer probu kullanılarak işlevsel hale getirilmiştir. Elektrot yüzeyi, SARS-CoV-2 RBD ile spesifik etkileşim sağlayan aptamerlerle modifiye edilmiştir.

Sonuçlar, geliştirilen sensörün 0.5 ile 32.0 nM arasında dinamik bir aralıkta SARS-CoV-2 RBD'yi tespit edebildiğini ve 0.12 nM'lik bir tespit sınırına sahip olduğunu göstermiştir. Aptasensör, insan tükürük örneklerinde yüksek hassasiyet ve seçicilik sergilemiş, insan immünoglobulinleri (IgG, IgA, IgM) ve serum albümini gibi biyomalzemelerden etkilenmediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, sensörün 3 haftalık bir süre boyunca stabil kaldığı ve tekrarlanan ölçümlerde tutarlılık gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışma, düşük maliyetli, taşınabilir ve yüksek hassasiyetli bu aptasensörün, SARS-CoV-2'nin teşhisinde ve diğer biyobelirteçlerin tespitinde potansiyel bir araç olduğunu ortaya koymaktadır [73].

Amouzadeh ve arkadaşları, SARS-CoV-2'nin reseptör bağlanma bölgesini (RBD) tespit etmek için karbon nanofiber (CNF) ve altın nanoparçacık (AuNP) ile modifiye edilmiş bir ekran baskılı elektrot (CSPE) kullanılarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tabanlı bir aptasensör geliştirmiştir. CNF ve AuNP kombinasyonu, yüksek iletkenlik, geniş yüzey alanı ve biyouyumluluk özellikleri sunarak sensör performansını artırmıştır. Elektrot yüzeyine tiol-terminal aptamerler kovalent bağlarla bağlanarak SARS-CoV-2 RBD'ye yüksek spesifiklik sağlanmıştır.

Sonuçlar, sensörün SARS-CoV-2 RBD'yi 0.01–64 nM konsantrasyon aralığında tespit edebildiğini ve 7 pM'lik bir algılama sınırına ulaştığını göstermiştir. Ayrıca, insan serum albümini ve immünoglobulinler gibi biyomalzemelerle çapraz reaksiyon göstermediği, bu nedenle yüksek seçicilik ve hassasiyet sergilediği belirlenmiştir. Sensör, insan tükürük örneklerinde başarılı bir şekilde test edilmiş ve biyobelirteçlerin varlığından etkilenmeden doğrulukla ölçüm yapabildiği gösterilmiştir. Cihazın tekrarlanabilirlik oranı %3.6 olarak bulunmuş ve uzun süreli stabilite göstermiştir.

Bu aptasensör, düşük maliyeti ve kolay uygulanabilirliği ile SARS-CoV-2 tespiti için etkili bir platform olarak öne çıkarken, farklı biyomoleküllerin tespiti için de uyarlanabilir bir teknoloji sunmaktadır [74].

Liustrovaite ve arkadaşları, SARS-CoV-2'ye özgü spike proteinine (SCoV2-rS) karşı gelişen antikorların elektrokimyasal yöntemlerle tespiti için bir immünosensör geliştirmiştir. Altın elektrot yüzeyi, 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA) ve 6-merkapt-1-heksanol (6-MCOH) karışımı bir self-assembled monolayer (SAMmix) ile modifiye edilmiş ve ardından spike proteini bu yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. Sensör, SCoV2-rS proteini ile spesifik antikorlar (anti-rS) arasındaki etkileşim sonucunda oluşan immün kompleksin elektrokimyasal yöntemlerle tespitine dayanmaktadır. Sensör performansı hem döngüsel voltametri (CV) hem de elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemleriyle değerlendirilmiştir. CV ve EIS ölçümleri, sensörün anti-rS antikorlarını sırasıyla 2.53 nM ve 1.99 nM algılama sınırlarında tespit edebildiğini göstermiştir.

Sonuçlar, geliştirilen immünosensörün SARS-CoV-2'ye karşı oluşan antikorların hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesine olanak sağladığını ve bu yöntemin hem COVID-19 teşhisi hem de aşı etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılabilir olduğunu ortaya koymaktadır. Sensör, düşük maliyetli, taşınabilir ve yüksek doğruluk oranıyla klinik uygulamalar için umut vaat eden bir araçtır [75].



BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. UYGULANAN DENEYSEL ADIMLARA GENEL BAKIŞ

Bu çalışmada, SARS-CoV-2'yi yapısal ve fonksiyonel olarak taklit eden bir nanolipozomal sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda yürütülen deneysel çalışmalar; lipozomların hazırlanması, RNA'nın bu yapılar içerisine kapsüllenmesi, Spike-S1 proteininin immobilizasyonu ve biyosensör uygulamaları olmak üzere dört temel aşamada planlanmıştır.

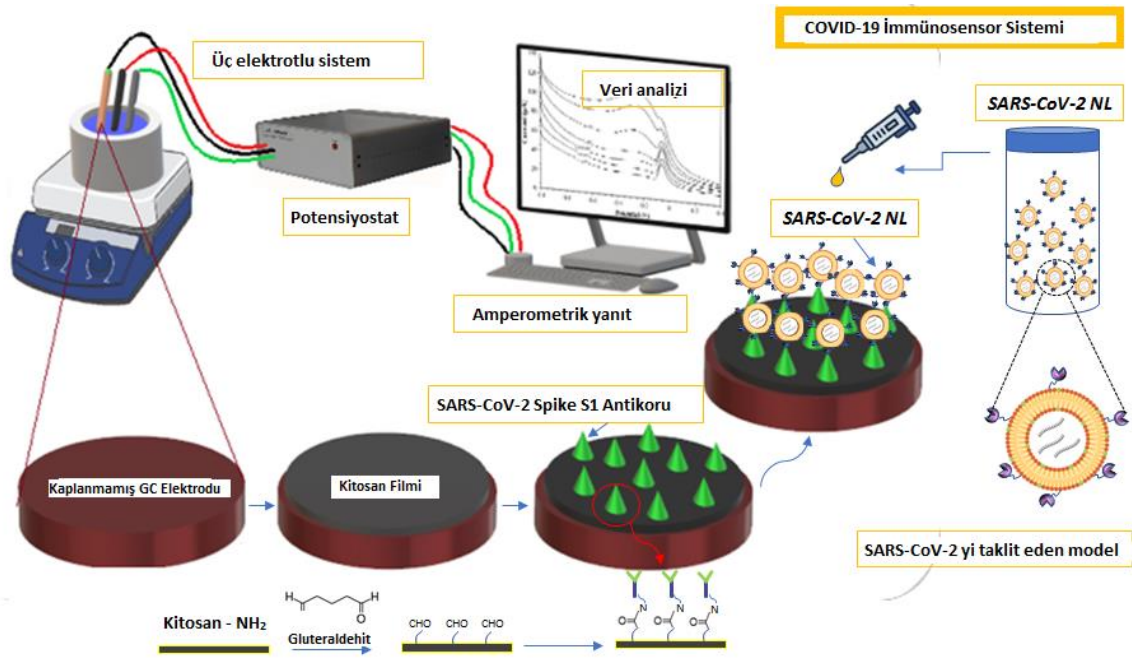
Nanolipozom Hazırlanması: Çalışmanın ilk aşamasında, biyouyumlu lipid bileşenlerinden oluşturulan nanolipozomal yapılar hazırlanmıştır. İnce film hidratasyonu temelinde uygulanan bu yöntem ile elde edilen yapılar, sonikasyon ve ekstrüzyon işlemleriyle belirli boyut aralıklarına indirgenmiş ve elde edilen nanolipozomal sistemler SARS-CoV-2 benzeri model sistem oluşturmak amacıyla karakterize edilmiştir.

RNA Yüklü Nanolipozomların Geliştirilmesi: Çalışmanın ikinci aşamasında, RNA'nın nanolipozomal yapılara kapsüllenmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk yöntemde, RNA çözeltisi lipidlerin organik çözücü içindeki karışımına eklenmiş ve çözücünün buharlaştırılmasıyla birlikte RNA'nın film oluşumu sırasında lipidlerle birlikte kapsüllenmesi sağlanmıştır. İkinci yöntemde ise, önceden hazırlanmış kuru lipid filmi, RNA içeren çözelti ile rehidrate edilerek RNA'nın lipid ortamla etkileşime geçmesi ve kapsüllenmesi hedeflenmiştir. Her iki yöntemin ardından, hazırlanan RNA yüklü nanolipozom süspansiyonları sırasıyla ekstrüder cihazından geçirilerek boyutsal homojenlik sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen yapılar, Float-A-Lyzer membran sistemleri kullanılarak serbest halde kalan RNA'dan arındırılmıştır. Bu saflaştırma adımı, yalnızca lipozom içerisine kapsüllenmiş RNA'nın sistemde kalmasını sağlayarak, elde edilen yapıların saflık düzeyini artırmış ve fiziksel stabilitelerini desteklemiştir. En son bu nanolipozomal yapılar detaylı olarak karakterize edilmiştir.

SARS-CoV-2 Spike-S1 Proteini Immobilizasyonu: Üçüncü aşamada, SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini RNA kapsüllenmiş nanolipozom yüzeyine kimyasal bağlanma yoluyla immobilize edilmiştir. Bu işlem için, antijenler EDC/sulfo-NHS yöntemi ile aktive edilmiş, ardından lipozom yüzeyindeki amin gruplarıyla tepkimeye sokularak kovalent bağlanma sağlanmıştır. Konjugasyon oranları literatürden alınan moleküler oranlar doğrultusunda belirlenmiş ve proteinlerin biyolojik aktivitesi korunarak SARS-CoV-2'yi taklit eden nanoyapılar (SARS-CoV-2 NL) oluşturulmuştur.

Biyosensör Çalışmaları: Son aşamada, geliştirilen SARS-CoV-2 NL yapıları elektrokimyasal biyosensör testlerinde kullanılmıştır. Biyosensör sistemi, camı karbon elektrot üzerine kitosan ve glutaraldehit ile oluşturulan film aracılığıyla antikor immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Bu sensör, Spike-S1 antijenleri ile antikorların özgül etkileşimine dayanarak kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemiyle test edilmiştir. Elde edilen elektrokimyasal sinyaller, SARS-CoV-2 NL konsantrasyonuna duyarlı ve tekrarlanabilir yanıtlar sunarak geliştirilen platformun biyosensör olarak güvenilirliğini ortaya koymuştur.

Şekil 3.1'de, SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini immobilize edilmiş RNA kapsüllü nanolipozomların, antikorla modifiye edilmiş elektrot yüzeyiyle gerçekleştirdiği özgül etkileşim sonucunda oluşan bağlanmanın; kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemiyle elektrokimyasal olarak tespit edilme süreci şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Geliştirilen biyosensör platformunun genel çalışma prensibini özetleyen şematik gösterimi.

3.2. LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI

Bu bölümde nanolipozom üretiminde kullanılan farklı tekniklerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Üretim sürecinde kullanılan yöntemler, lipozomların boyutu, lamel sayısı, homojenliği ve stabilitesi üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Bu bağlamda, çalışmada yer verilen yöntemler; sonikasyon, ince film hidrasyonu ile birlikte sonikasyon, ince film hidrasyonu ve homojenizasyonun birlikte kullanımı ile ekstrüzyon yöntemidir. Her bir yöntem, kullanılan ekipman, işlem koşulları ve elde edilen ürün özellikleri bakımından farklılık göstermekte olup, uygulama alanlarına göre avantaj ve sınırlılıklar sunmaktadır. Aşağıda bu yöntemler ayrı alt başlıklar halinde detaylı olarak açıklanmıştır. Lipozomlar (L1–L5) nano/mikrolipozom olarak formüle edilmiş ve aşağıda açıklanan yöntemlere göre hazırlanmıştır.

3.2.1. Sonikasyon Metodu

Sunulan tezde, SARS-CoV-2 virüsünü taklit edebilecek yapıda, RNA taşıyabilen ve yüzeyinde Spike (S) proteinlerine benzer proteinlerin yerleştirilebileceği nanolipozomların hazırlanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, zar yapısını oluşturan lipid karışımı olarak biyolojik uyumluluğu ve zar stabilitesini artırıcı etkileriyle literatürde sıkça kullanılan kolesterol, L- α -fosfatidilkolin

(PC) ve stearilamin lipid karışımı tercih edilmiştir. Söz konusu lipidler, liyofilize(dondurularak kurutulmuş) toz formunda ve 63:18:9 oranlarındadır (Sigma-Aldrich, Almanya).Lipid karışımı, doğrudan kloroform/etanol (2:1, v/v) karışımı içerisinde çözündürülmüştür. Bu çözücü sistemi hem tüm lipid bileşenlerinin etkili bir şekilde çözünmesini sağlamış ve tamamen homojen bir çözelti elde edilmiştir. Homojen çözelti, lipozom oluşumunun ilk adımı olan sonikasyon işlemine alınmıştır. İşlem, kapsamlı ve kontrollü boyut küçültme sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için küvet tipi ultrasoniksonikatör cihazı (Kudos, Çin) kullanılmıştır. Cihazın çalışma frekansı 53 kHz olarak ayarlanmış ve işlem süresince sıcaklık sabit 20 °C olarak tutulmuştur. Sıcaklık kontrolü, özellikle lipit bileşenlerin yapısal bütünlüğünün korunması açısından kritik öneme sahiptir. Lipid çözeltisi, cihazın ultrasonik banyosuna yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. İşlem sırasında çözelti ara ara hafifçe çalkalanarak, lokal ısınmaların önüne geçilmiştir. Bu aşamada sonikasyon enerjisi, çözeltideki lipid moleküllerinin kendiliğinden organize olarak nanoboyutta çiftkatmanlı veziküller (lipozomlar) oluşturmaya olanak tanımıştır. Bu yöntemle elde edilen lipozomal yapılar, çalışma kapsamında L1 koduyla tanımlanmış ve daha sonra gerçekleştirilecek karakterizasyon ve uygulama analizleri için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Şekil 3.2’de tez çalışmasında kullanılan küvet tipi sonikatör cihazı gösterilmektedir.



Şekil 3.2 Küvet tipi sonikatör.

3.2.2. İnce Film Hidrasyonu ve Sonikasyon Metodu

Nanolipozom üretiminde, literatürde yaygın olarak kullanılan ve güvenilirliği birçok çalışmayla ortaya konmuş olan ince film hidrasyonu yöntemine dayalı sonikasyon tekniğinden

yararlanılmıştır. Bu kombinasyon yöntemi, hem kontrollü bir lipozom oluşumu sağlaması hem de boyut küçültme açısından etkili sonuçlar vermesi nedeniyle tercih edilmiştir. Sürecin sonunda, dağılımı dar, boyutsal olarak daha küçük, yapısal olarak ise stabil nanolipozomlar elde edilmesi hedeflenmiştir. Hazırlık sürecinin ilk aşamasında, %63 kolesterol, %18 L- α -fosfatidilkolin ve %9 stearilamin içeren lipid karışımı, çözücü olarak kullanılan kloroform ve etanolün 2:1 (v/v) oranındaki karışımı içerisinde tamamen çözündürülmüştür. Bu çözücü sistemi, lipidlerin homojen bir şekilde çözünmesini sağlayarak sonraki film oluşturma aşaması için uygun bir başlangıç çözeltisi sunmuştur. Elde edilen 1,5 mL'lik homojen çözeltiden 0,75 mL'lik bir kısım, cam yüzeyi geniş ve buharlaşma için uygun olan 100 mL hacmindeki yuvarlak tabanlı balon jojeye dikkatlice aktarılmıştır. Bu aşamada çözücülerin tamamen buharlaştırılması amacıyla balon, karıştırma hızı 30 rpm olarak ayarlanan manyetik karıştırıcı üzerine yan yatırılarak yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında bir gün süreyle bekletilmiştir.

Bu işlem sonucunda, cam yüzey boyunca eşit şekilde yayılan, kuru, opak ve düzgün yapıda bir lipid filmi elde edilmiştir. Film oluşumu pasif buharlaşma yöntemiyle gerçekleştirilmiş olup, işlem tamamlandığında çözeltide artık çözücü kalmadığından emin olunmuştur.

Lipid filmi elde edildikten sonra, hidrasyon aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada, önceden yan yatırılarak lipid filminin cam yüzey boyunca yayılması sağlanmış olan balon joje içerisine, 10 mL hacmindeki steril fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi (pH: 7.40) dikkatlice eklenmiş ve böylece çözelti ile lipid film arasında doğrudan temas sağlanmıştır. PBS ilavesinin ardından karışım, oda sıcaklığında bir saat süreyle bekletilmiş ve bu süre zarfında lipidlerin suyla etkileşerek kendiliğinden lipozom yapıları oluşturması sağlanmıştır. Hidrasyonun tamamlanmasının ardından, yapıların stabilizasyonunu desteklemek amacıyla süspansiyon 4 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte, görünümdeki opaklaşma ve viskozite artışı, hidrasyonun başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Oluşan süspansiyon, yapısal stabilitenin artırılması amacıyla 4 °C'de bir gece boyunca (yaklaşık 12–16 saat) inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından, lipozomların boyutsal olarak küçültülmesi ve daha düzenli morfolojiler kazanması amacıyla sonikasyon aşamasına geçilmiştir. Elde edilen süspansiyon, frekansı sabit 53 kHz olan küvet tipi ultrasoniksonikatör (Kudos, Çin) cihazında, 20 °C sabit sıcaklıkta 30 dakika boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyon sırasında oluşan

mekanik dalgalar, çok katmanlı veziküllerin parçalanmasını ve daha küçük, daha kompakt lipozomlara dönüşmesini sağlamıştır.

Bu işlemin ardından elde edilen yapılar, fiziksel boyut ve yapı düzenliliği açısından optimize edilmiş, SARS-CoV-2 virüsünü taklit etmeye uygun, çift katmanlı nanolipozomlardır. Üretilen bu formülasyon, çalışmada L2 koduyla tanımlanmış ve karakterizasyon aşamalarına geçilmiştir.

3.2.3. İnce Film Oluşumu ve Homojenizasyon Metodu

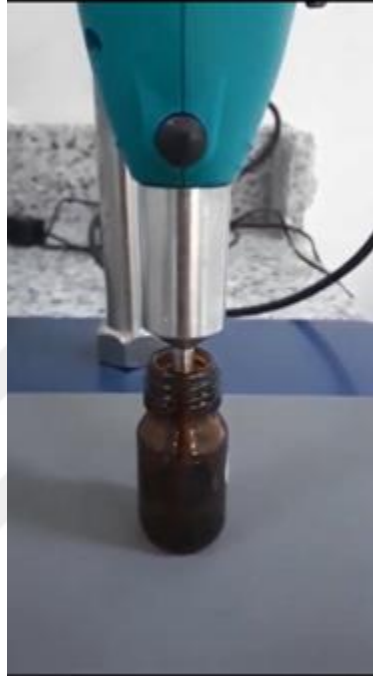
İnce film oluşturma sürecinin tamamlanmasının ardından, cam şişenin iç yüzeyine homojen şekilde yayılmış ve tamamen kurumuş halde bulunan lipid tabakası, yeniden hidrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemde, önceden steril koşullarda hazırlanmış ve pH değeri 7.40 olarak ayarlanmış Fosfat Tamponlu Salin (PBS) çözeltisi kullanılmıştır.

Hidrasyon işlemi sırasında, 10 mL PBS çözeltisi, önceden yan konumda tutulmuş cam şişe içerisine dikkatlice eklenmiş ve çözelti ile lipid filmin doğrudan temas etmesi sağlanmıştır. Bu temas sayesinde, lipidlerin kontrollü bir şekilde suyu emmesi ve kendiliğinden organize olarak veziküler yapılar oluşturmaları mümkün olmuştur. Karışım, bu amaçla oda sıcaklığında bir saat boyunca bekletilmiş, bu süre zarfında çok katmanlı veziküllerin (multilamellar vesicles, MLV) oluşumu desteklenmiştir. Hidrasyonun ilerlemesiyle birlikte süspansiyonun opaklaştığı ve viskozitesinin arttığı gözlenmiştir; bu durum, su alımının etkin bir şekilde gerçekleştiğini ve çift katmanlı yapıların oluşmaya başladığını göstermektedir.

Hidrasyon tamamlandıktan sonra, elde edilen lipozomal süspansiyonun fiziksel olarak daha stabil bir forma kavuşması amacıyla, 4 °C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Soğuk inkübasyon süreci, lipid çift katmanlarının yeniden düzenlenmesine olanak sağlayarak yapıların daha dayanıklı ve uzun vadeli stabiliteye sahip hale gelmesine katkıda bulunmuştur. Ayrıca, bu adım boyutsal homojenliğin sağlanmasına da destek olmuştur.

İnkübasyonun ardından, ön oluşumu tamamlanmış lipozomal süspansiyon, boyut küçültme ve parçacık dağılımını daraltma amacıyla homojenizasyon işlemine alınmıştır. Bu aşamada, numune oda sıcaklığında çalışan ve 2000 rpm hıza ayarlanmış bir homojenizatör (Isolab,

Almanya) kullanılarak, toplam 4 dakika boyunca işleme tabi tutulmuştur. Uygulanan mekanik kesme kuvvetleri, lipozom zarlarının fiziksel olarak parçalanmasına ve daha küçük çaplı partiküller elde edilmesine olanak sağlamıştır. Bu işlem sonucunda, büyük ve çok katmanlı yapıların parçalanarak daha homojen ve tekdüze boyut dağılımına sahip lipozomlar oluşturulması hedeflenmiştir. Homojenizasyon aşamasının uygulama sürecine ait görsel, şekil 3.3’de sunulmuştur.



Şekil 3.3 Homojenizasyon işlemi esnasındaki genel görünüm.

Tüm bu aşamaların ardından hazırlanan ve yapısal bütünlüğü optimize edilmiş olan lipozomalformülasyon, bu çalışma kapsamında L3 koduyla tanımlanmış ve sonraki deneysel analizlerde kullanılmak üzere uygun saklama koşullarında korunmuştur.

3.2.4. Ekstrüzyon Metodu

Yukarıda ayrıntılı biçimde açıklanan ince film hidrasyonu işlemi sonucunda elde edilen ham lipozomal süspansiyon, parçacık boyutlarının daha tutarlı aralıkta olması ve dağılımın daha dengeli hale getirilmesi amacıyla ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşama, lipozomların yalnızca daha küçük boyutlara indirgenmesini değil, aynı zamanda benzer boyutta parçacıklardan oluşan daha düzenli bir yapı kazanmalarını da sağlamıştır. Ekstrüzyon işlemi,

bu çalışma kapsamında manuel ekstrüder cihazı (Avanti Polar Lipids Inc., ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında, hazırlanan lipozomal süspansiyon 0,2 mikrometre (μm)por çapına sahip polikarbonatmembran filtrelerden geçirilmiştir. Bu aşamada, süspansiyon ile membran yüzeyi arasında kontrollü bir basınç uygulanarak fiziksel filtrasyon sağlanmış ve böylece parçacıkların belirli bir boyut aralığında şekillenmesi hedeflenmiştir. Ekstrüzyon işlemi, yalnızca parçacık boyutlarını belirli sınırlar içinde tutmakla kalmamış, aynı zamanda elde edilen lipozomların genel stabilitesini artıran bir etki de sağlamıştır.

Bu doğrultuda, lipozomal süspansiyon farklı sayılarda ekstrüzyon döngüsüne tabi tutularak yapısal özelliklerinin iyileştirilmesi hedeflenmiştir. Süspansiyonun 11 kez ekstrüzyon işleminden geçirilmesiyle elde edilen formülasyon çalışmada L4, 21 kez ekstrüzyona tabi tutulan örnek ise L5 koduyla tanımlanmıştır. Bu çoklu ekstrüzyon işlemleri, elde edilen lipozomların boyutsal olarak daha tutarlı, tek tip yapıya yakın ve morfolojik açıdan daha düzgün bir form kazanmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca işlem sonrasında gözlemlenen fiziksel stabilite artışı, bu lipozomal yapıların biyolojik uygulamalara yönelik potansiyelini önemli ölçüde güçlendirmiştir. Tez çalışmasında kullanılan ekstruder cihazı Şekil 3.4’de gösterilmiştir.



Şekil 3.4 Ekstrüzyon işleminde kullanılan ekstruder cihazının görünümü.

3.3. RNA KAPSÜLLÜ LİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI

RNA ile kapsüllenen lipozomlar (RL1–RL4), bu çalışmada ekstrüzyon temelli bir yöntemle hazırlanmıştır. Hazırlık süreci, klasik ince film hidrasyon yöntemine dayanmaktadır. İlk aşamada, kolesterol, L- α -fosfatidilkolin ve stearilamin içeren lipid karışımı, 2:1 oranında hazırlanmış kloroform/etanol çözücüsü içinde çözülmüş ve bu çözelti, geniş yüzey alanına sahip yuvarlak tabanlı cam balon jojeye aktarılmıştır. Çözücüler, oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcı üzerinde 30 rpm hızla döndürülerek, yaklaşık 24 saatlik pasif buharlaşma süreci sonunda tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda, cam yüzey boyunca homojen olarak yayılan kuru, ince bir lipid filmi elde edilmiştir. Film oluşumu süresince çözücü kalıntısı kalmamasına dikkat edilmiş ve işlemin sonunda cam yüzey opak bir görünüm almıştır.

Lipid filmi oluşturan cam şişe, RNA kapsülleme süreci için RNA içeren çözelti ile rehidrate edilmiştir. RNA, toz formda temin edilmiş olup (torula mayasından elde edilen Tip IX ribonükleik asit; ribonükleik asit dietilaminoetanol tuzu, katalog no: R3629, Sigma-Aldrich), PBS içinde çözündürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan RNA çözeltisinin konsantrasyonu %10 (v/v) olacak şekilde ayarlanmış ve lipid filmi üzerine dikkatli bir şekilde eklenerek, oda sıcaklığında 1 saat boyunca hidrasyon işlemi uygulanmıştır. Kullanılan RNA çözeltisi, lipid karışımıyla 1:10 oranında karıştırılmıştır. Hidrasyonun ardından elde edilen süspansiyonlar, boyutlarının küçültülmesi ve yapısal homojenliğin artırılması amacıyla 0.2 μ m por çapına sahip polikarbonatmembranlardan geçirilmiştir. Süspansiyonlardan biri 11 kez, diğeri ise 21 kez ekstrüzyona tabi tutularak sırasıyla RL1 ve RL2 kodlarıyla tanımlanmıştır.

RL3 koduyla tanımlanan lipozomalformülasyon ise benzer bir hazırlama protokolü izlenerek oluşturulmuştur. Ancak bu grupta, RNA çözeltisi lipid karışımıyla 1:20 oranında karıştırılmış ve elde edilen süspansiyon 0.2 μ m por çapına sahip polikarbonatmembranlardan 21 kez geçirilerek ekstrüde edilmiştir. 1:20 oranındaki RNA/lipid karışımı, yüksek yüklenme basıncından kaçınılarak, partiküllerin daha küçük boyutlarda şekillenmesini amaçlamıştır. Hazırlanan RL1, RL2 ve RL3 formülasyonlarında, lipozomlarakapsüllenmemiş RNA'nın ortamdan uzaklaştırılması amacıyla 4 °C'de, 8 saat boyunca diyaliz işlemi uygulanmıştır. Bu adımda kullanılan Float-A-Lyzer® G2 diyaliz ünitesi (MWCO: 100 kDa, Spectra-Por®, Sigma, Almanya), lipozom dışındaki serbest RNA moleküllerinin yarı geçirgen yapı üzerinden dış ortama geçişine olanak tanıyarak süspansiyonun saflaştırılmasına katkı sağlamıştır. Şekil 3.5'de tez çalışmasında kullanılan Float-A-Lyzer® G2 membran sistemi gösterilmektedir.



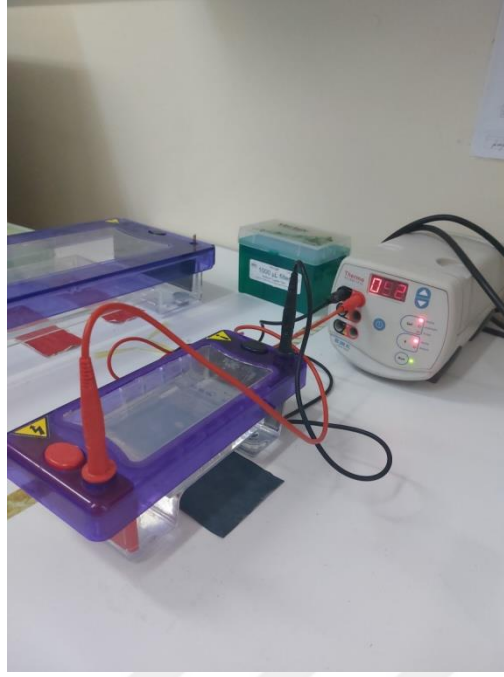
Şekil 3.5 Float-A-Lyzer® G2 diyaliz ünitesi

RL4 formülasyonu, diğer gruplardan farklı olarak RNA çözeltisinin doğrudan lipidlerle karıştırılmasının ardından birlikte ince film hidrasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yaklaşımda, %10 (v/v) konsantrasyonundaki RNA çözeltisi, önceden hazırlanmış lipid karışımı ile 1:20 oranında karıştırılmıştır. Elde edilen homojen karışım, yuvarlak tabanlı cam balon jojeye aktarılmış ve çözücüsünün uzaklaştırılması amacıyla oda sıcaklığında, 30 rpm’de dönen manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda, cam yüzeyde RNA içeren kuru ve opak görümlü bir lipid filmi elde edilmiştir. İnce film oluşturma işleminin ardından, elde edilen film rehidrate edilmiştir. Rehidratlama süreci boyunca, lipidlerin tam çözünmesini ve düzgün süspansiyon oluşumunu desteklemek amacıyla karışım, manyetik karıştırıcıda 10 dakika süreyle karıştırılmış sonrasında oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletilerek lipozomal yapıların oluşması sağlanmıştır. Hidrasyonun tamamlanmasının ardından, diğer örneklerde olduğu gibi, süspansiyon 4 °C’de 8 saat boyunca diyalize alınarak ortamda kalan serbest RNA uzaklaştırılmıştır. Bu saflaştırma işlemi Float-A-Lyzer® G2 membran sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak, süspansiyon 0.2 µm por çapına sahip polikarbonat membranlardan 21 kez geçirilmiş ve ekstrüzyon işlemi tamamlanarak RL4 formülasyonu elde edilmiştir.

RL2 ve RL4 lipozomal formülasyonlarına ait kapsülleme verimliliği (Encapsulation Efficiency, EE), diyaliz işlemi sonrasında süspansiyon dışında kalan serbest RNA miktarına göre değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Float-A-Lyzer® G2 diyaliz cihazı kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma işleminin ardından, membran dış ortamında biriken çözelti kısmından örnekler alınmış ve bu örneklerdeki RNA varlığı kapsüllenmemiş serbest RNA olarak kabul edilmiştir. RNA'nın 260 nm dalga boyunda karakteristik absorbans göstermesi esasına dayanan ölçümler, Shimadzu UV-1800 model spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesinde cihazın kalibrasyonu yapılmış, böylece güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, çözelti içerisindeki RNA konsantrasyonu hesaplanmış; bu veriler doğrultusunda, başlangıçta kullanılan toplam RNA miktarından serbest kalan RNA çıkarılarak lipozomlara kapsüllenen miktar dolaylı olarak belirlenmiştir. Her bir örnek için hesaplanan bu değer, kapsülleme verimliliği olarak yüzde cinsinden ifade edilmiştir. Bu hesaplamalar RL2 ve RL4 lipozom grupları için ayrı ayrı yapılmış ve sonuçların doğruluğunu artırmak amacıyla deneyler üç kez tekrarlanmıştır. Kapsülleme verimliliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$KapsüllemeVerimliliği(EE) = \left(\frac{KapsüllenenRNAMiktarı}{BaşlangıçtakiTolamRNAMiktarı} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

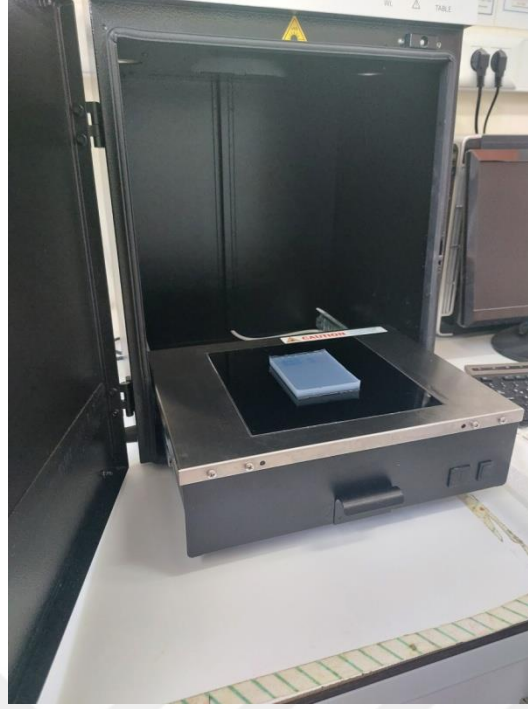
Kapsülleme işleminin etkinliğini değerlendirmek amacıyla, agaroz jel elektroforezi yöntemi uygulanmıştır. Bu analiz, RNA'nın lipozom yapıları içerisinde kapsüllenip kapsüllenmediğini görsel olarak değerlendirmeye olanak sağlamaktadır. Bu amaçla %1 (w/v) oranında agaroz jel (Biomax, Prona Agarose) hazırlanmış ve elektroforez, Tris-asetik asit-EDTA (TAE) tampon sistemi içerisinde, 100 volt gerilim altında yaklaşık 35 dakika süresince yürütülmüştür. Şekil 3.6'da işleme ait görsel sunulmuştur.



Şekil 3.6 %1 (w/v) agaroz jel üzerinde, elektroforez işleminin yürütülmesi esnasında çekilen görsel.

Elektroforez analizinde kullanılan örnekler, Float-A-Lyzer® G2 diyaliz membran sisteminin dış kısmından alınmıştır. Bu faz, lipozomlarakapsüllenmemiş serbest RNA moleküllerini içermektedir. Bu nedenle, jel üzerinde gözlemlenen bantlar, lipozom yapıları dışında kalan RNA miktarının doğrudan göstergesi niteliğindedir. Böylece, diyaliz sürecinde zar dışına çıkan RNA'nın varlığı ve miktarı, kapsülleme verimliliğinin nitel olarak değerlendirilmesini mümkün kılmıştır. Sonuç olarak bantların varlığı ya da yokluğu, kapsülleme sürecinin etkinliğine dair doğrudan bir görsel kanıt sunmuş ve yöntem, çalışmada nitel doğrulama aracı olarak kullanılmıştır.

Elektroforez işleminden önce, analiz edilecek örnekler ticari olarak temin edilen yükleme boyası (DNA Gel Loading Dye; katalog no: R0611, ThermoFisherScientificInc.) eklenmiştir. Yükleme boyası içindeki izleme boya (tracking dyes) RNA'nın jel içerisindeki hareketinin takibini kolaylaştırmıştır. Agaroz jele eklenmiş olan EtBr solüsyonu (katalog no: 1778, ThermoFisherScientificInc), RNA bantlarının UV ışığı altında görüntülenebilmesini sağlamıştır. Elektroforez sonrasında elde edilen jel görüntüleri, Bio-Print ST4 jel dokümantasyon sistemi (VilberLourmat, Cedex, Fransa) kullanılarak yüksek çözünürlükte kaydedilmiştir. Şekil 3.7'de tezde kullanılan elektroforez cihazı gösterilmektedir.



Şekil 3.7 Jel görüntüleme cihazı.

3.4. LİPOZOMLARIN VE RNA YÜKLÜ LİPOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU

Lipozomlara ait partikül boyutu dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri, dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu ölçümler sırasında Malvern (İngiltere) üretimi ZetasizerNano-S cihazından yararlanılmıştır. DLS, partiküllerin sıvı ortamdaki Brown hareketlerini analiz ederek hem ortalama boyutlarını hem de bu boyutların sistem içindeki dağılımını değerlendirmeye olanak tanıyan yaygın bir yöntemdir. Analiz öncesinde, numuneler %1'lik bir oranla (1:100, v/v) distile su ile seyreltilmiş ve tek kullanımlık polistiren hücrelere aktarılmıştır. Polidispersite indeksi (PDI), sistemdeki partiküllerin boyutsal çeşitliliğini yansıtan bir parametredir. 0 ile 1 arasında değişen bu değer, sistemin homojenliğine dair fikir verir; değer 0'a yakın olması, parçacıkların boyut açısından birbirine daha yakın olduğunu, yani dağılımın daha düzenli olduğunu gösterir. Her numune için ölçümler, oda sıcaklığında üç kez tekrar edilmiş ve sonuçlar ortalama değer ile birlikte standart hata şeklinde raporlanmıştır.

Ayrıca, lipozomların yüzey yüklerini belirlemek amacıyla lazer dopplerelektroforez (LDE) yöntemi kullanılmış ve bu analizler de ZetasizerNano-S cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyeli olarak adlandırılan bu parametre, parçacıkların yüzeyindeki elektriksel yük miktarını gösterir ve sistemin kolloidal kararlılığı açısından belirleyici bir faktördür. Yüksek zeta potansiyeli, partiküller arası itici kuvvetlerin fazla olduğunu, dolayısıyla çökme ya da

kümelenme eğiliminin düşük olduğunu gösterir. Ölçümler, tek kullanımlık kapiler hücrelerde gerçekleştirilmiş ve her bir numune üç kez ölçülerek ortalama değer elde edilmiştir.

Lipozomların yapısal görünümü ise optik mikroskop ve elektron mikroskobu yardımıyla incelenmiştir. İlk olarak, L1 numaralı lipozom grubunun morfolojik yapısı, Nikon (Japonya) üretimi bir optik mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Bu ön gözlem, lipozomların genel yapısı, yaklaşık boyutları ve bütünlüğü hakkında hızlı ve görsel bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlamıştır.

L1, L2 ve L3 numaralı lipozom örneklerinin yüzey morfolojileri, daha ayrıntılı bir yapısal analiz için taramalı elektron mikroskobu (SEM, FEG450, FEI Quanta, Hollanda) kullanılarak incelenmiştir. SEM yöntemi, özellikle yüzey ayrıntılarını yüksek çözünürlükte gösterebilme özelliği sayesinde tercih edilmiştir. İncelemeler, 15–25 kV aralığında bir hızlandırıcı voltaj altında gerçekleştirilmiş ve her bir örnek için yüzey düzgünlüğü, bütünlük ve detay seviyesi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Hazırlık aşamasında, seyreltik lipozom çözeltilerinden alınan küçük hacimli örnekler karbon film kaplı yüzeylere damlatılmış ve oda koşullarında kurutulmuştur. Görüntüleme kalitesini artırmak amacıyla, örneklerin yüzeyine ince bir altın kaplama yapılmıştır. Bu kaplama işlemi, argon gazı ortamında gerçekleştirilmiş ve elektron sinyallerinin daha net toplanmasına katkı sağlamıştır. Bu işlem, yüzeyden yansıyan elektronların mikroskop tarafından daha verimli toplanmasını sağlamıştır.

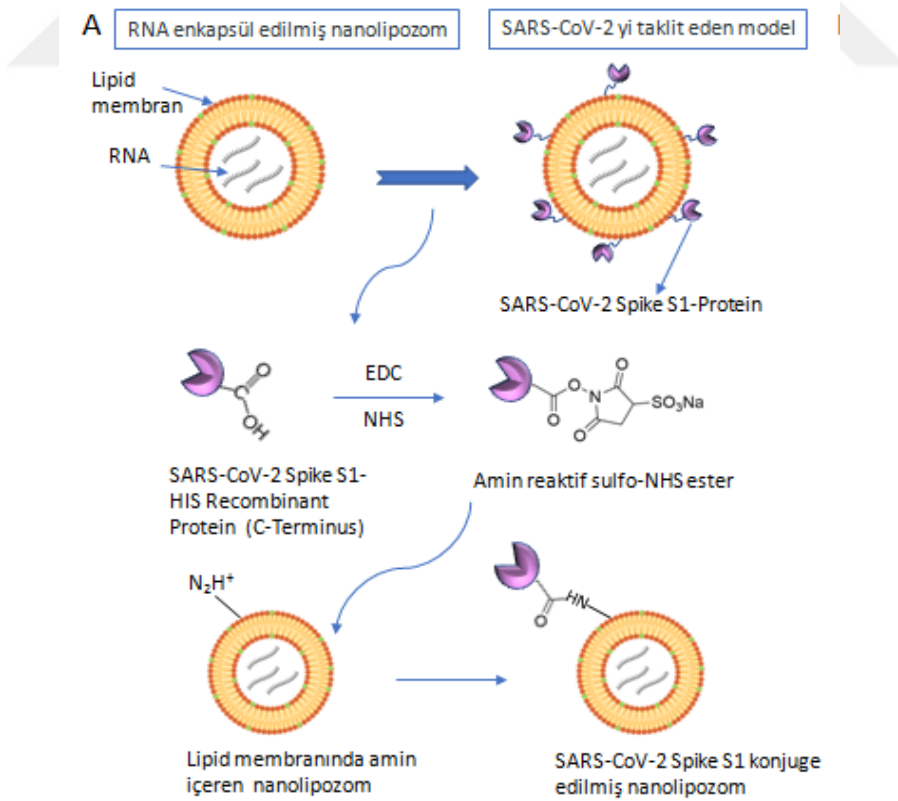
Buna ek olarak, L4, L5 ve RNA taşıyan lipozom örnekleri (RL1–RL4), iç yapılarının daha net bir biçimde değerlendirilebilmesi amacıyla transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülenmiştir. Bu analizlerde, FEI marka 120 kV CTEM cihazı (ABD) kullanılmıştır. TEM yöntemi, özellikle nanometrik ölçekteki yapıları detaylı şekilde inceleme olanağı sunması nedeniyle, bu tür yapısal analizlerde yaygın olarak tercih edilmektedir. Numuneler, 1:10 oranında seyreltildikten sonra, TEM bakır ızgarasına (300 tel bakır) transfer edilmiştir. Daha net ve kontrastlı görüntüler elde edebilmek amacıyla negatif boyama tekniği uygulanmıştır. Bu işlemde, lipozomlar %1 fosfotungstik asit (PTA) çözeltisi ile boyanmış ve bu sayede lipid zarları dışındaki bölgeler elektron yoğunluğu kazandırılarak görsel ayırım kolaylaştırılmıştır.

Uygulanan her iki görüntüleme yöntemi, lipozomların boyutsal özelliklerinden yüzey morfolojilerine kadar pek çok yapısal detaya dair bilgi sağlamıştır. Buna ek olarak, RNA'nın kasüllenme özellikleri de görüntüleme yoluyla açık biçimde ortaya konmuştur. Elde edilen

gözlemler yalnızca yapısal bütünlüğü değerlendirmekle kalmamış; aynı zamanda bu taşıyıcı sistemlerin biyomedikal alandaki potansiyel uygulamalarına dair fikir edinilmesine de katkı sağlamıştır.

3.5. SARS-CoV-2 SPIKE-S1 PROTEİNİ IMMOBİLİZE EDİLMİŞ NANOLİPOZOMLARIN HAZIRLANMASI

SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini (SARS-CoV-2 Spike S1-His Rekombinant Proteini), RL4 kodlu nanolipozomların yüzeyine sabitlenmesi amacıyla iki basamaklı bir eşleştirme (konjugasyon) sürecine tabi tutulmuştur. Bu süreçte proteini reaksiyona uygun hâle getirmek için iki farklı ajan kullanılmıştır: EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidehidroklorür) ve sulfo-NHS (N-hidroksisülfosüksinimid). Uygulamanın sonunda, proteinin yapısındaki karboksil gruplarının lipozomyüzeyindeki amin grupları ile etkileşime girmesi sağlanmıştır [76]. Şekil 3.8’de SARS-CoV-2’yi taklit eden nanolipozomların üretim sürecine ait deneysel aşamaların şematik olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 3.8 SARS-CoV-2'yi taklit eden nanolipozomların üretim sürecine ait deneysel aşamaların şematik olarak gösterimi.

Sonuç olarak, immünoliposomlar iki aşamalı bir bağlama prosedürü ile hazırlanmıştır. İlk aşamada, antijen, peptit veya protein üzerindeki serbest karboksil grupları, EDC ve sulfo-NHS ile aktive edilmiştir. Ardından, bu aktif yapılar, lipozomların yüzeyindeki amin gruplarıyla reaksiyona sokularak antijenin lipid yapıya kovalent olarak konjuge edilmesi sağlanmıştır. Bu aşamada, amin içeren lipozomların aktive edilmiş ligandla etkileşimine geçmeden önce, reaksiyon ortamındaki fazla EDC ve sulfo-NHS'in uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan araştırma sonucu literatürden alınan bilgiler doğrultusunda, antijenin karboksil gruplarını EDC/NHS ile aktive etmek amacıyla, protein miktarına karşılık 10 kat molar fazlası EDC ve 25 kat molar fazlası sulfo-NHS kullanıldığı bildirilmiştir. Bu bilgi temel alınarak, çalışmada 0.4 μ M derişiminde hazırlanan SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini için 4 μ M EDC ve 10 μ M sulfo-NHS içeren bir çözelti hazırlanmış ve karıştırılmıştır [76]. Karışım, oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletilerek, reaksiyonun gerçekleşmesi için uygun koşullar oluşturulmuştur. Bu süreçte EDC, proteinin karboksil gruplarını aktive ederken; sulfo-NHS, bu ara yapının daha stabil ve suda çözünür bir forma geçmesine katkı sağlamıştır.

EDC ve sulfo NHS ile konjugasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra elde edilen aktif SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini, reaksiyon ortamında oluşan yan ürünler ve fazla reaktiflerden arındırılmak üzere saflaştırılmıştır. Bu amaçla, jel filtrasyon temelli Zeba™ Spin Desalting Columns (ThermoScientific) tercih edilmiştir. Bu sistem, proteinlerin düşük moleköl ağırlıklı bileşenlerden ayrılmasını sağlayarak, biyomoleküllerin yapısal bütünlüğü korunarak saflaştırılmasına imkân tanır. Zeba™ Spin Desalting Columns, protein çözeltilerini düşük moleköl ağırlıklı bileşenler, tuzlar ve reaksiyon artıkları gibi istenmeyen maddelerden ayırmak amacıyla kullanılan etkili bir jel filtrasyon sistemidir. Kolonun içerisinde yer alan özel tasarlanmış polimerik jel matrisi, molekülleri boyutlarına göre ayırarak proteinlerin, daha küçük yapılarla etkileşmeden saf halde elde edilmesini sağlar. Bu yapı sayesinde, yüksek moleköl ağırlıklı proteinler geçerken, küçük moleküller jelde tutulur; böylece istenilen biyomoleküllerin etkin şekilde izole edilmesi mümkün olur. Hazırlanan çözelti, Zeba™ Spin DesaltingColumn sistemine yerleştirilmiş bir Eppendorf tüpüne dikkatlice aktarılmış ve santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada kullanılan Zeba™ Spin DesaltingColumns, sadece fazla reaktifleri ve küçük moleküllü yan ürünleri uzaklaştırmakla kalmamış, aynı zamanda proteinin biyolojik aktivitesini kaybetmeden sonraki uygulamalarda kullanılmasına imkân tanımıştır. Böylece, elde edilen ürün biyosensör gibi hedef uygulamalarda daha kararlı ve işlevsel bir formda değerlendirilmiştir [77].

Bu konjugasyon işlemi sırasında, antijenin lipozomal yüzeye etkin şekilde bağlanabilmesi için hem lipid bileşiminin hem de kullanılan antijen miktarının doğru oranlarda belirlenmesi önem arz etmektedir. Literatürde yer alan bir çalışmada, antijenin toplam lipid miktarına oranla yaklaşık 1:1000 molar oranda kullanılması gerektiği ifade edilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda, Spike-S1 proteini ile RL4 lipozomları arasındaki tepkime oranı dikkatle planlanmıştır.

Protokolün ikinci aşamasında, daha önce saflaştırılmış ve kimyasal olarak aktive edilmiş SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini, amin grupları taşıyan RL4 nanolipozomlarıyla birleştirilmiştir. Bu konjugasyon işlemi sırasında, lipid karışımında yer alan sterilamin miktarı, formülasyondakimolar oranlar dikkate alınarak hesaplanmıştır (18 µmol/vial). Hesaplamalarda, sterilamin bileşeninin tamamının lipozomların dış yüzeyine maruz olduğu varsayılmış ve bu doğrultuda 1 mL lipozom süspansiyonu yaklaşık olarak 0.4 mMsterilamine karşılık gelmektedir.

SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini ile nanolipozomlar arasındaki konjugasyon için yaklaşık 1000:1 oranında bir molar oran tercih edilmiştir. Bu oran, 0.4 mM konsantrasyonundaki sterilamin içeriğinin, 0.4 µM düzeyinde hazırlanan Spike-S1 proteini ile etkili bir şekilde bağ kurmasını destekleyecek şekilde belirlenmiştir. Belirlenen bu oranlama, lipozom yüzeyindeki amin gruplarının proteine maksimum düzeyde tutunabilmesini sağlamak amacıyla optimize edilmiştir. Konjugasyon süreci, oda sıcaklığında en az iki saat boyunca sürdürülmüş ve bu süre zarfında Spike-S1 proteini, lipozomların dış yüzeyinde yer alan amin gruplarına bağlanarak kararlı bir yapı kazanmıştır.

Son aşamada, konjugasyona girmemiş serbest haldeki SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini, Float-A-Lyzer® G2 diyaliz ünitesi (MWCO: 100 kDa, Spectra-Por®, Sigma, Almanya) kullanılarak sistemden uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, 4 °C'de yaklaşık 8 saat süreyle gerçekleştirilmiş ve serbest proteinlerin yanı sıra reaksiyon sonucunda oluşan küçük moleküllü yan ürünlerin de çözeltiden ayrılmasını sağlamıştır. Böylece, yalnızca Spike-S1 proteini ile yüzeyleri modifiye edilmiş nanolipozomlar elde edilmiştir. Diyaliz işlemi aynı zamanda çözeltideki fazla iyonların giderilmesine katkı sağlamış ve bu sayede lipozomlarınbiyosensör uygulamalarındaki stabilitesi artırılmıştır.

Elde edilen Spike-S1 immobilizenanolipozomlar (SARS-CoV-2 NL), biyosensör sistemlerinde kullanılmak üzere son formuna getirilmiştir. Bu yapılar, özellikle SARS-CoV-2 antijenlerinin tespiti ve takibine yönelik biyomedikal uygulamalarda değerlendirilebilecek potansiyele sahiptir.

3.6. SARS-CoV-2 SPIKE-S1 PROTEİNİ IMMOBİLİZE EDİLMİŞ NANOLİPOZOMLARIN KARAKTERİZASYONU

SARS-CoV-2 nanolipozomlarının (SARS-CoV-2 NL) boyutlarına ve yüzey yüklerine ilişkin karakterizasyon çalışmaları için, literatürde sıklıkla tercih edilen dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan ölçümler, Malvern markasına ait ZetasizerNano-S cihazı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. DLS tekniği, partiküllerin sıvı ortamda sergilediği Brown hareketlerinden yararlanarak; ortalama partikül çapı, dağılım profili ve zeta potansiyeli gibi temel parametrelerin belirlenmesine olanak sağlar. Nanometrik ölçekteki sistemlerin fizikokimyasal özelliklerini değerlendirmede yüksek güvenilirlik sunması nedeniyle, bu yöntem çalışma kapsamında tercih edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, nanolipozomlara ait büyüklük ve dağılım değerleri hızlı, doğru ve tekrarlanabilir biçimde elde edilmiştir.

Ayrıca, yapılan zeta potansiyeli ölçümleriyle partiküllerin yüzey yükleri belirlenmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda sistemin kolloidalstabilitesi değerlendirilmiştir. Zeta potansiyelinin yüksek olması, partiküller arasındaki elektrostatik itici kuvvetlerin artmasına neden olarak agregasyon eğiliminin azalmasına yardımcı olur ve bu durum süspansiyonun kararlılığını artırır.

SARS-CoV-2 NL yapılarına ilişkin morfolojik değerlendirmeler, daha önce literatürde tanımlanmış görüntüleme protokollerine göre transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde, 120 kV hızlandırıcı voltajla çalışan FEI marka bir TEM cihazı (CTEM, ABD) kullanılmıştır. TEM cihazıyla, nano ölçekteki partiküllerin iç yapısını yüksek çözünürlükle incelenebildiğinden hem lipozomal yapıların bütünlüğü hem de Spike-S1 proteininin yüzeye etkin biçimde immobilize edilip edilmediği konusunda detaylı bilgi edinilmesini sağlamıştır. Elde edilen TEM görüntülerine göre partiküllerin morfolojik bütünlüğü, boyut dağılımları ve yüzey düzenlilikleri üzerine değerlendirmeler yapılmış böylece konjugasyon sürecinin başarısı hakkında önemli veriler elde edilmiştir.

Ayrıca, RNA, lipozomlar, SARS-CoV-2 NL yapıları ve Spike-S1 proteinine ait özgün fonksiyonel grupların tespiti amacıyla ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared) spektroskopisi yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, moleküllerin kimyasal yapılarına özgü karakteristik titreşim bantlarını analiz ederek, fonksiyonel grupların varlığını belirlemede kullanılan bir tekniktir. Ölçümler, örnek yüzeyine gönderilen ışığın moleküler bağlarla etkileşime girerek oluşturduğu yansımanın, dalga boyuna bağlı olarak gösterdiği değişimleri temel alır. Özellikle biyolojik sistemlerin incelenmesinde yaygın olarak kullanılan ATR-FTIR, RNA ve protein gibi biyomoleküllerde yer alan amin, karbonil, fosfat ve alkil gruplarının belirlenmesinde yüksek düzeyde hassasiyet sağlamaktadır.

Söz konusu analizler, Bruker Vertex V70 model FTIR spektrometresi (The Woodlands, TX, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ölçümler $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında alınmıştır. Bu spektral aralık, organik bileşiklerde yaygın olarak bulunan fonksiyonel grupların karakteristik titreşim frekanslarını kapsadığı için tercih edilmiştir. Elde edilen ölçüm sonuçları, RNA molekülünde yer alan fosfat grupları, lipozomların fosfolipit yapıları ve Spike-S1 proteininin amino asit yan zincirlerine ait özgün kimyasal sinyallerin tanımlanmasını mümkün kılmıştır. Böylece, sistemdeki yapıların immobilizasyonunun başarıyla gerçekleşip gerçekleşmediği ve konjugasyon işlemlerinin doğruluğu değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, boyut analizleri, yüzey yükü ölçümleri, mikroskopik incelemeler ve ATR-FTIR spektroskopisi verileri birlikte değerlendirilerek, SARS-CoV-2 NL yapılarının fizikokimyasal özellikleri kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bu çok yönlü analiz yaklaşımı, geliştirilen sensör platformunun biyomedikal uygulamalardaki potansiyel uygunluğunu değerlendirmek açısından önemli veriler sağlamıştır.

Gerçekleştirilen ölçümler, SARS-CoV-2 nanolipozomlarının kare dalga voltametrisi (SWV) tekniğiyle tespit edilebilecek karakteristik elektriksel yanıtlar ürettiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sinyal profilleri, sensör platformunun hedef antijenlere karşı hem seçicilik hem de duyarlılık açısından etkin bir performans sergilediğini göstermiş; böylece bu yöntemin SARS-CoV-2 antijenlerinin tanımlanmasında uygulanabilirliğini güçlü biçimde desteklemiştir.

Gerçekleştirilen ölçümler, SARS-CoV-2 nanolipozomlarının kare dalga voltametrisi (SWV) tekniğiyle tespit edilebilecek karakteristik elektriksel yanıtlar ürettiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sinyal profilleri, sensör platformunun hedef antijenlere karşı hem seçicilik hem de

duyarlılık açısından etkin bir performans sergilediğini göstermiş; böylece bu yöntemin SARS-CoV-2 antijenlerinin tanımlanmasında uygulanabilirliğini güçlü biçimde desteklemiştir.

3.7. BİYOSENSÖR

SARS-CoV-2 nanolipozomlarının elektrokimyasal olarak tespit edilmesine yönelik immünosensör uygulamaları, potansiyostat tabanlı bir sistem (Model 1040B, CH Instruments, ABD) kullanılarak yürütülmüştür. Ölçümler sırasında klasik üç elektrotlu yapı tercih edilmiştir. Bu sistem; çapı 3 mm olan cam karbon (GC) elektrotu çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl (3 M NaCl) elektrodu referans olarak ve bir platin tel elektrotu karşı elektrot olarak içermektedir. Belirtilen tüm elektrot bileşenleri, CH Instruments'a ait bir elektrokimyasal hücre sistemi içinde yapılandırılmıştır. Bu kurulum, ölçüm sırasında güvenilir veri elde edilmesini sağlayacak biçimde optimize edilmiştir. Elektrotlar arası uygun konumlandırma ve sistemin bütünsel hassasiyeti sayesinde, immünosensörün performansı doğru ve tutarlı bir şekilde analiz edilebilmiştir. Sunulan tez çalışmasında kullanılan üç elektrotlu yapı şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9 Tez çalışmasında kullanılan üçlü elektrot sistemi.

SARS-CoV-2 nanolipozomlarının elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesinde kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, biyomoleküler yapıların saptanmasında sağladığı hassas ölçüm kapasitesi sayesinde, elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilen güçlü bir teknik olarak değerlendirilmektedir. Uygulama sırasında deneysel ayarlar özenle yapılandırılmış; genlik değeri 0.1 V, frekans 20 Hz, voltaj artış oranı 0.004 V ve tarama aralığı -1.0 V ile +1.0 V arasında tutulmuştur. Bu ölçüm koşulları, test edilen nanolipozomal sistemin elektrokimyasal tepkilerini en uygun biçimde gözlemleyebilmek adına optimize edilmiştir. Böylece hem sinyal kalitesi hem de ölçüm tekrar edilebilirliği güvence altına alınmıştır.

Elektrokimyasal analizler, tüm elektrotların nötr pH'a sahip fosfat tamponlu çözeltide (10 mM, pH 7.40) yerleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu ortam, biyolojik örneklerin yapısını korurken, nanolipozomlarla gerçekleşen elektrokimyasal etkileşimlerin doğru ve güvenilir şekilde izlenmesini sağlamıştır.

Gerçekleştirilen ölçümler, SARS-CoV-2 nanolipozomlarının kare dalga voltametrisi (SWV) tekniğiyle tespit edilebilecek karakteristik elektriksel yanıtlar ürettiğini ortaya koymuştur. Elde edilen sinyal profilleri, sensör platformunun hedef antijenlere karşı hem seçicilik hem de duyarlılık açısından etkin bir performans sergilediğini göstermiş; böylece bu yöntemin SARS-CoV-2 antijenlerinin tanımlanmasında uygulanabilirliğini güçlü biçimde desteklemiştir.

3.7.1. Biyosensör Elektrodunun Hazırlanması

Cam karbon (GC) elektrodun yüzey kalitesini iyileştirmek ve mikroskobik düzeydeki düzensizlikleri gidermek amacıyla, sırasıyla 1 µm, 0.3 µm ve 0.05 µm boyutundaki gama alümina tozları kullanılarak parlatma işlemi uygulanmıştır. Bu işlem, mikroped zımpara yardımıyla gerçekleştirilmiş ve sonrasında elektrot yüzeyi ultra saf su ile dikkatlice durulanarak, yüzeyde kalabilecek partikül ve kalıntıların giderilmesi sağlanmıştır. Görsel olarak fark edilemeyen kirleticilerin de yüzeyden tamamen uzaklaştırılması amacıyla, elektrot beş dakika süreyle ultra saf su içinde ultrasonik banyoya alınmış ve ardından yeniden durulanmıştır. Bu temizleme protokolü, elektrot yüzeyinin hem fiziksel hem de kimyasal olarak ölçüme uygun hale gelmesi açısından kritik bir hazırlık adımını oluşturmuştur.

Elektrot yüzeyine SARS-CoV-2 Spike S1 antikorunun immobilizasyonu işlemi, elektrot yüzeyinde önceden kaplanmış polimer tabakasındaki fonksiyonel gruplar esas alınarak

gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, elektrot yüzeyi kitosan ve glutaraldehit (GA) gibi bağlayıcı ajanlarla kimyasal olarak aktifleştirilmiş ve antikorun kovalent bağ yoluyla yüzeye sabitlenmesi sağlanmıştır. İlk olarak, 0.2 M asetik asit içerisinde 5 mg/mL derişimde çözündürülmüş ve %5 (w/v) oranında hazırlanmış kitosan çözeltisi ile %2.5 (v/v) oranında hazırlanmış glutaraldehit çözeltisi, 1:1 (v/v) oranında 15 dakika boyunca karıştırılarak homojen bir bağlayıcı karışım elde edilmiştir. Bu karışımdan, toplamda 5 µL olacak şekilde, camı karbon elektrot yüzeyine ardışık biçimde 1 µL damlatılmış ve her bir uygulamadan sonra yüzeyde polimer film oluşumunu sağlamak amacıyla kısa süreli bekleme yapılmıştır. Yüzeyde istenilen film tabakası oluşturulduktan sonra, elektrot yaklaşık 30 dakika boyunca %2.5'lik GA çözeltisi içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerinde 100 rpm de sabit sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Bu süreç, kitosan filmi üzerinde fonksiyonel çapraz bağların oluşumunu destekleyerek yüzeydeki polimer yapının daha dayanıklı ve stabil hale gelmesini sağlamıştır. Şekil 3.10'da manyetik karıştırıcı üzerinde film kaplı elektrodun inkübe edilme aşaması gösterilmektedir.



Şekil 3.10 Film kaplı elektrodun inkübe edilme aşaması.

Fonksiyonel grupların aktivasyonu tamamlandıktan sonra, elektrot saf distile su ile nazikçe yıkanarak yüzeydeki reaktif kalıntılardan arındırılmıştır. Temizlenen elektrot, fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) içerisinde hazırlanmış SARS-CoV-2 Spike S1 antikorı içeren çözeltiye daldırılmış ve 4 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre zarfında antikorların elektrot yüzeyine kovalent bağlarla tutunması sağlanmış ve böylece immobilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Antikor immobilizasyonu aşamasında, önceden kimyasal olarak aktive edilmiş elektrot, SARS-CoV-2 Spike-S1 antikor (tavşandan elde edilmiş monoklonal antikor, 100 µg/mL) içeren çözeltiye yerleştirilmiştir. 10 µL antikor çözeltisi, 1 mL fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) içerisinde seyreltilerek immobilizasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Elektrot, bu çözeltinin içerisine daldırılmış ve antikorların yüzeydeki aktif gruplarla etkileşime geçerek bağlanabilmeleri amacıyla 4 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, elektrot sistemden çıkarılmış ve yüzeyde bağlanmamış ya da zayıf şekilde tutunmuş antikorların uzaklaştırılması için PBS ile dikkatlice yıkanmıştır. Bu yıkama adımı, sadece sağlam şekilde bağlanmış antikorların yüzeyde kalmasını sağlamış ve böylece sensörün hedef molekülleri tanıma yeteneğini artırmıştır.

Antikorla kaplanmış elektrot, farklı derişimlerde hazırlanmış (0.053nM, 0.53nM, 1.013nM, 2nM, 4nM, 6nM, 8nM) SARS-CoV-2 nanolipozom (SARS-CoV-2 NL) çözeltilerine daldırılarak, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşama, yüzeyde immobilize edilmiş antikorların nanolipozomlarla spesifik olarak etkileşime girmesini ve antijen-antikor bağlarının oluşmasını amaçlamaktadır. Elektrot yüzeyinde antikor-antijen bağlanması gerçekleştiğinde, elektrot yüzeyindeki elektriksel özelliklerde ölçülebilir bir değişim ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklik, kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemiyle analiz edilmiştir. SWV, belirli bir potansiyel aralığında oluşan akım sinyallerini takip ederek, bağlanma olayının elektrokimyasal etkilerini ortaya koyar. Kaydedilen akım değişimi, yüzeye tutunan SARS-CoV-2 nanolipozomlarının miktarı ile doğrudan ilişkili olup, sistemin analitik yanıtını oluşturmaktadır. Şekil 3.11'de tez çalışmasında kullanılan SWV yöntem düzeneği gösterilmiştir.



Şekil 3.11 SWV düzeneği.

Tespit yöntemi, antikor ile antijen arasında gerçekleşen bağlanma sırasında oluşan elektrokimyasal akım değişimlerinin hassas biçimde ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem sayesinde, çözeltide bulunan SARS-CoV-2 nanolipozomlarının miktarı arttıkça, elektrot yüzeyinde kaydedilen akım değerlerinde de artış gözlemlenmiştir. Elde edilen akım tepkilerinin SARS-CoV-2 NL konsantrasyonu ile uyumlu şekilde artması, sensör sisteminin hem hassas hem de güvenilir olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma kapsamında uygulanan yöntem, düşük düzeydeki antijen varlığını bile başarıyla tespit edebilen gelişmiş bir immünosensör yapısının oluşturulmasını sağlamıştır. Elektrot yüzeyinin hazırlanmasından antikorların sabitlenmesine kadar tüm adımlar, sensörün doğruluğunu ve etkinliğini artırmak amacıyla dikkatle optimize edilmiştir.



BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. FARKLI LİPOZOM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ

4.1.1. Ön Boyutlandırma Yöntemleriyle Hazırlanan Lipozomlar (L1, L2, L3)

Bu bölümde, farklı hazırlama yöntemleri ile elde edilen nanolipozomların fiziksel özellikleri değerlendirilmiştir. Uygulanan her üretim yöntemi sonucunda oluşan partiküller; ortalama çap, boyut dağılımı polidispersite indeksi ve morfolojik yapıları açısından incelenmiş; elde edilen veriler aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir. İlgili her formülasyon, kendi başlığı altında detaylı şekilde tartışılmış ve elde edilen veriler, nicel ölçümler ve görsel doğrulamalarla desteklenmiştir.

Çizelge 4.1 Çeşitli üretim yöntemleri altında kapsülleme verimliliğine sahip nanolipozomların ve RNA kapsüllü nanolipozomların DLS sonuçları.

Nanolipozom Üretim Yöntemleri					
	Sonikasyon (L1)	İnce film ve sonikasyon (L2)	İnce film ve homojenizasyon (L3)	İnce film ve ekstrüzyon 11 döngü (L4)	İnce film ve ekstrüzyon 21 döngü (L5)
Z-average(d.nm)	3116 ± 25	745.9 ± 19	1055 ± 45	144 ± 11	130.1 ± 08
PDI	0.232	0.223	0.634	0.126	0.163
RNA Enkapsüle Edilmiş Nanolipozom Üretim Yöntemleri					
	İnce film ve ekstrüzyon 11 döngü ^a (RL1)	İnce film ve ekstrüzyon 21 döngü ^{a,*} (RL2)	İnce film ve ekstrüzyon 21 döngü ^b (RL3)	İnce film ekstrüzyon 21 döngü ^{b,c,**} (RL4)	
Z-average(d.nm)	1632 ± 60	649.4 ± 125	673.9 ± 47	128.2 ± 05	
PDI	1.000	0.613	0.831	0.058	

^a RNA çözeltisinin lipid karışımına 1:10 hacimsel oranı

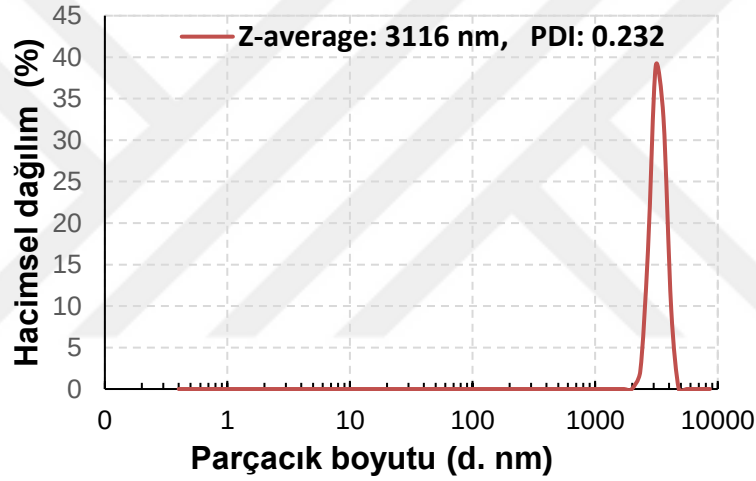
^b RNA çözeltisinin lipid karışımına 1:20 hacimsel oranı

^c İnce film oluşumundan önce RNA eklenmesi

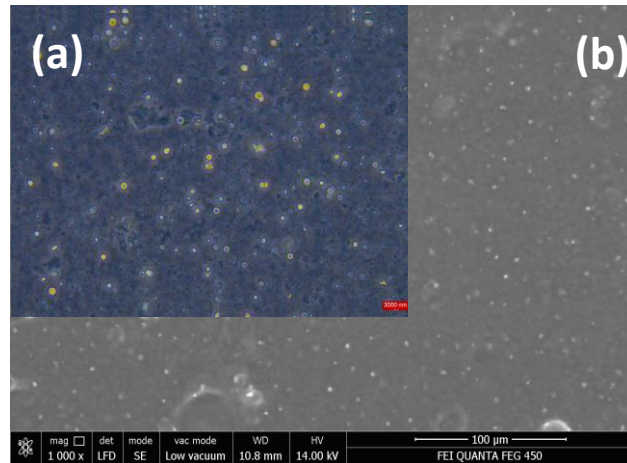
* RNA Enkapsülasyon Verimliliği= 94.75 ± 0.5

** RNA Enkapsülasyon Verimliliği= 98.60 ± 0.7

Yalnızca sonikasyon yöntemiyle hazırlanan L1 grubunda, dinamik ışık saçılımı (DLS) analizleri sonucunda ortalama partikül çapı 3116 ± 25 nm olarak ölçülmüş, polidispersite indeksi (PDI) ise 0.232 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.1). Bu değer, sistemdeki partiküllerin boyutsal dağılım açısından oldukça homojen bir yapı sergilediğini göstermektedir. Şekil 4.1’de sunulan partikül boyutu dağılım grafiği incelendiğinde, dağılım eğrisinin dar yapıda olduğu ve büyük partiküllere rağmen ölçümlerin tutarlı gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Mikroskobik analizlerde (optik mikroskop ve SEM), partiküllerin genellikle küresel morfolojide olduğu ve belirgin bir agregasyon eğilimi göstermediği görülmüştür. (Şekil 4.2) Büyük çaplı yapılara rağmen sistemin homojenliğini koruması, bu yöntemin özellikle yapısal tutarlılık açısından olumlu sonuçlar verdiğine işaret etmektedir.

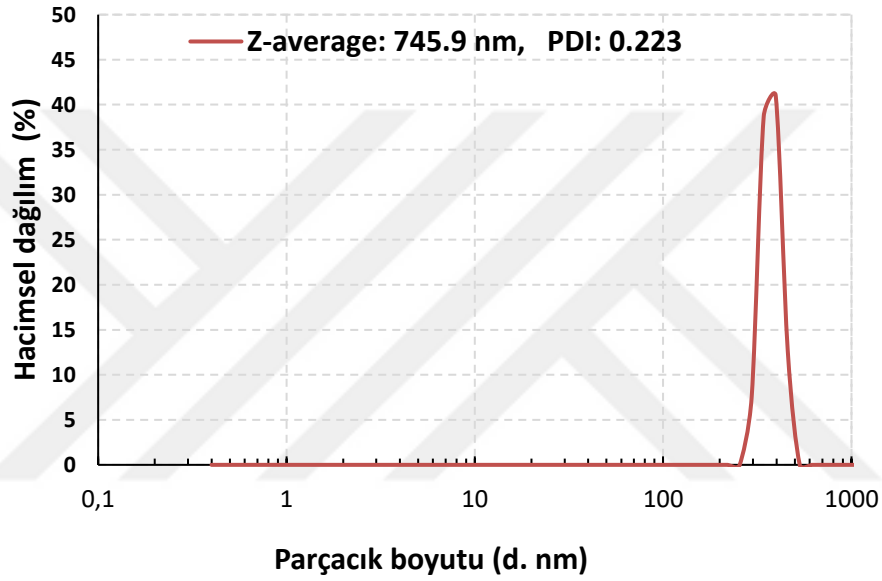


Şekil 4.1 Sonikasyon, yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) (n = 3). (L1).

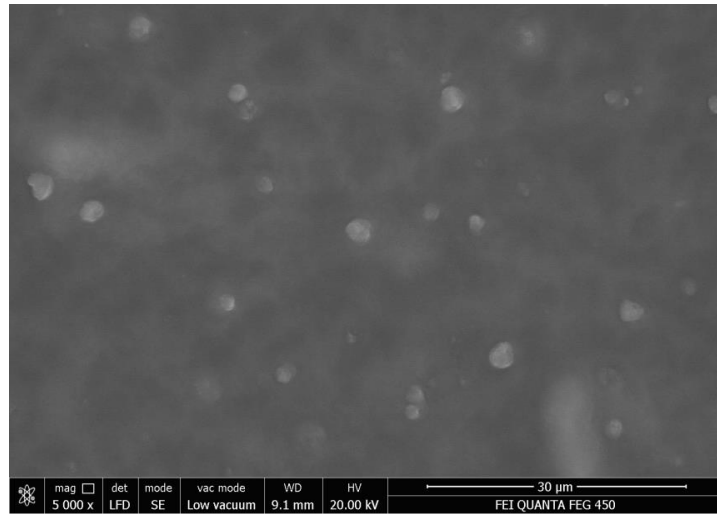


Şekil 4.2 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren optik mikroskop (a) ve SEM (b) görüntüleri (L1).

İnce film hidrasyonu sonrası sonikasyon uygulanarak elde edilen L2 grubunda, DLS analizleri partikül çapını 745.9 ± 19 nm olarak ortaya koyarken, PDI değeri 0.223 ile homojenliğin yüksek olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.3). Şekil 4.2’de sunulan partikül dağılım profili, bu verileri destekleyici niteliktedir; dağılım eğrisi oldukça dar ve simetrik bir yapı sergilemektedir. Mikroskopik incelemelerde de bu gruba ait lipozomların küresel formda, düzgün dağılmış ve kümelenmeden uzak yapılar oluşturduğu gözlemlenmiştir. (Şekil 4.4) Bu yapıların yüzey düzenliliği ve düşük PDI değeri, sistemin biyolojik ortamlarla etkileşimi açısından önemli bir avantaj sağlayabileceğini göstermektedir.

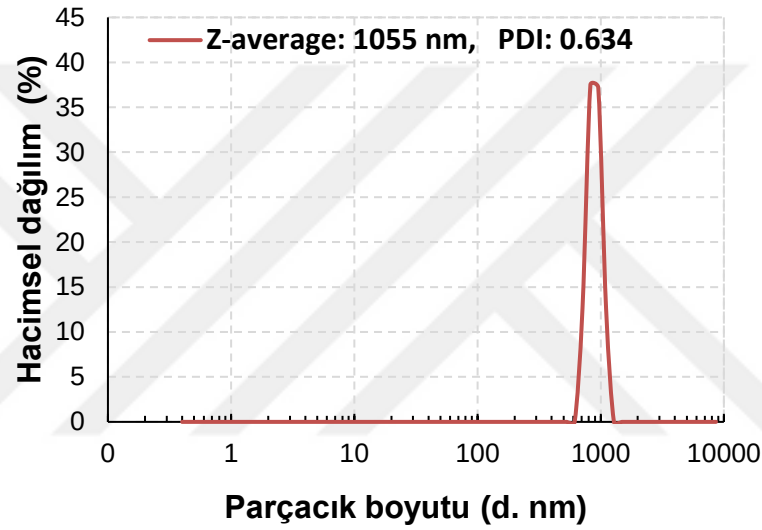


Şekil 4.3 İnce film oluşumu ve sonikasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) ($n = 3$). (L2).

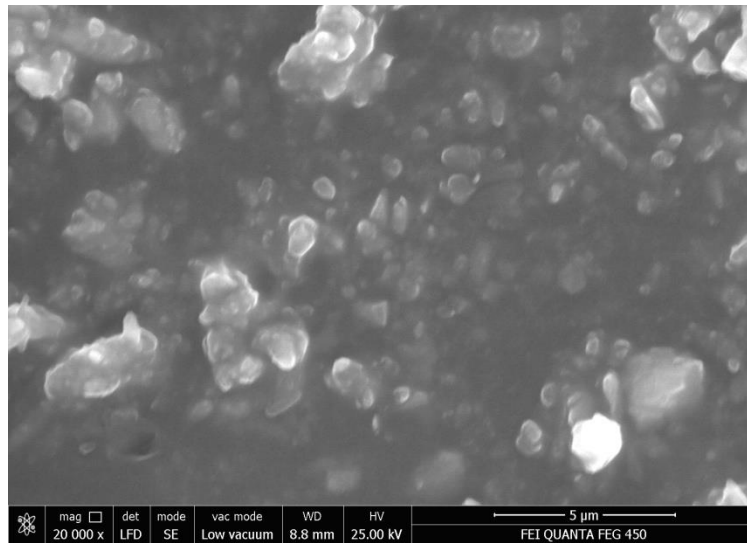


Şekil 4.4 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren SEM görüntüleri. (L2).

İnce film hidrasyonu ve homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan L3 grubunda ise, DLS analizlerine göre ortalama partikül çapı 1055 ± 45 nm olarak ölçülmüş ve PDI değeri 0.634'e kadar yükselmiştir (Çizelge 4.1). Bu PDI değeri, sistemin oldukça heterojen bir dağılıma sahip olduğunu ve parçacıkların boyutsal olarak düzensiz olduğunu göstermektedir. Şekil 4.5'de yer alan dağılım grafiğinde de bu durum açıkça görülmekte; dağılım eğrisi daha yaygın ve çok merkezli bir yapı sergilemektedir. Mikroskopik analizlerde partiküllerin morfolojisinin düzensiz olduğu, bazı bölgelerde ise agregasyon eğilimlerinin başladığı gözlemlenmiştir. (Şekil 4.6) Bu yapısal dağınıklık, üretim yöntemi sonrası oluşan fiziksel etkilerin partikül stabilitesi üzerinde sınırlayıcı olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 4.5 İnce film olumu ve homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların partikül boyut dağılım profilleri (PDI: polidispersite indeksi) ($n = 3$) (L3).

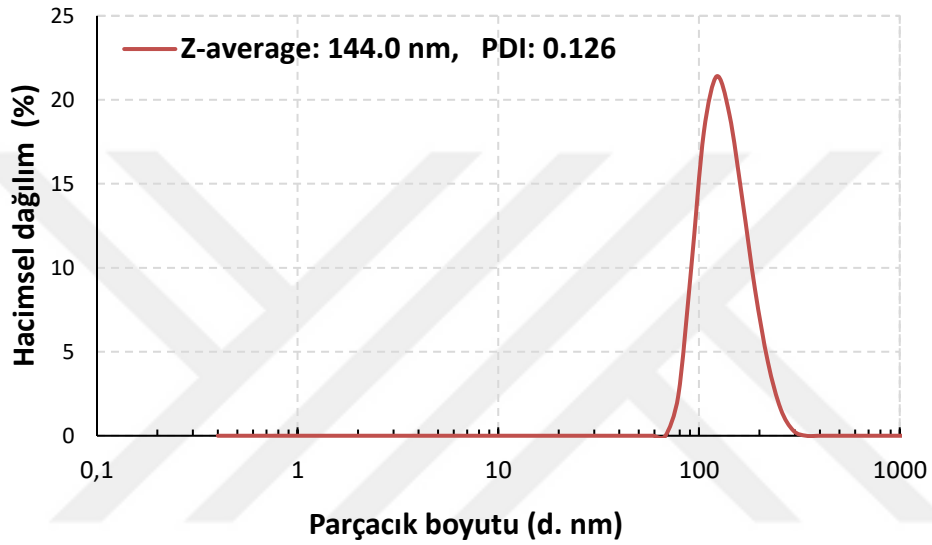
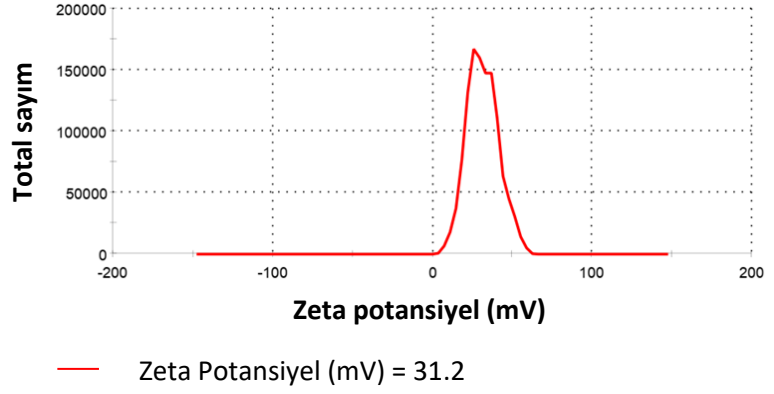
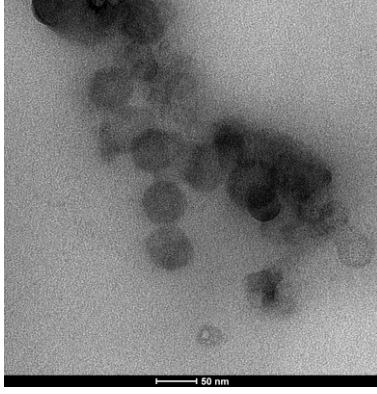


Şekil 4.6 Oluşan lipozomların morfolojisini gösteren SEM görüntüleri (L3).

4.1.2. İnce Film Hidrasyonu Sonrası Ekstrüzyon Uygulanan Formülasyonlar (L4 ve L5)

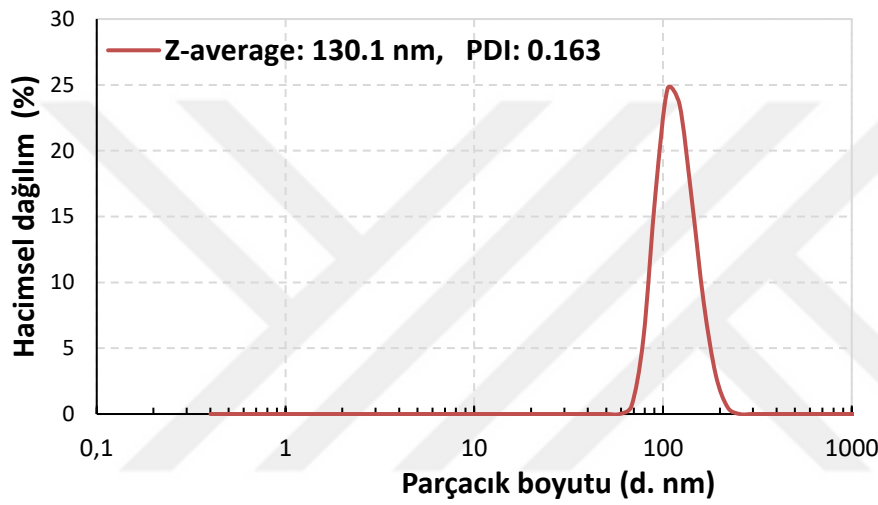
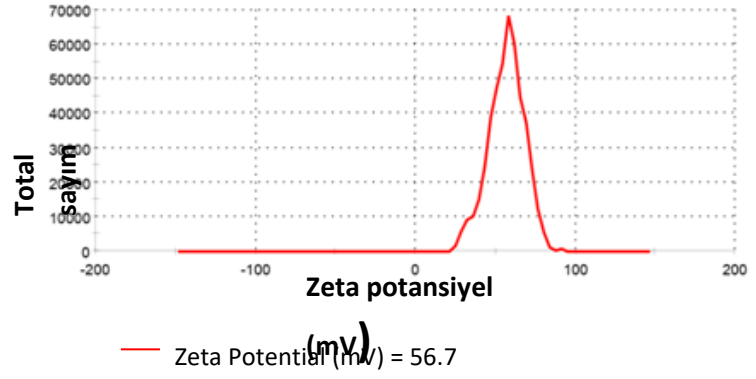
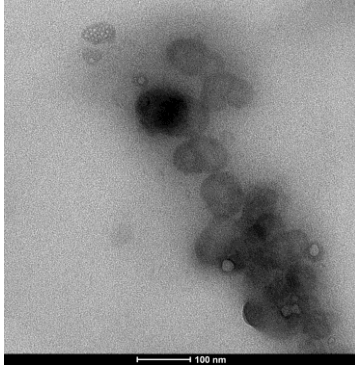
Bu çalışmada, partikül boyutunun küçültülmesi ve dağılım homojenliğinin artırılması amacıyla, ince film hidrasyonu işleminden sonra ekstrüzyon tekniği uygulanmıştır. Bu kapsamda, aynı lipid karışımıyla hazırlanan lipozom süspansiyonlarına ekstrüzyon işlemi uygulanmış ve farklı döngü sayılarının boyut üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen iki yeni formülasyon, 11 döngü ekstrüzyona tabi tutulan L4 ve 21 döngü uygulanan L5 olarak adlandırılmıştır.

L4 grubunda, DLS analizleri sonucunda ortalama partikül çapı 144.0 ± 11 nm, PDI değeri ise 0.126 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7, Çizelge 4.1). Bu değerler, ekstrüzyon işleminin partikül boyutunu dar bir dağılım aralığına çekerek homojenliği artırdığını göstermektedir. Aynı örneğe ait zeta potansiyeli ölçümü ise 31.2 mV olarak kaydedilmiş olup, bu değer sistemin yüzey yükü açısından stabil olduğunu ortaya koymaktadır. TEM görüntüleri (Şekil 4.7) lipozomların küresel morfolojide ve sistem içerisinde düzgün şekilde dağılmış olduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 4.7 11 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (PDI: poli dispersiyon indeksi) ($n = 3$). (L4)

L5 grubunda, ekstrüzyon döngü sayısının artırılmasıyla birlikte daha da küçük partiküller elde edilmiştir. DLS analizlerine göre ortalama boyut 130.1 ± 8 nm'ye düşerken, PDI değeri 0.163 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8, Çizelge 4.1). Bu değer, sistemin homojenliğini koruduğunu ve daha da iyileştirdiğini göstermektedir. Zeta potansiyeli 56.7 ile oldukça yüksek bir yüke ulaşmış ve bu da parçacıkların koloidal stabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. TEM görüntülerinde (Şekil 4.8) partiküllerin morfolojisi net şekilde belirginleşmiş, küresel yapılar sistematik olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 21 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan lipozomların parçacık boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (PDI: polidispersite indeksi) ($n = 3$). (L5)

Elde edilen bu sonuçlar, ekstrüzyon yönteminin yalnızca boyutsal küçültme sağlamakla kalmadığını, aynı zamanda dağılım homojenliği ve yüzey yükü kontrolü açısından da etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, literatürde ekstrüzyonun üretim sonrası boyut düzenleme ve tekrarlanabilirlik açısından yaygın bir strateji olarak önerildiğini desteklemektedir [28, 29]. Özellikle belirli bir boyut aralığında tutarlı yapılar gerektiren biyomedikal sistemlerde, bu yöntemin tercih edilmesinin taşıyıcı sistemin başarısında kritik rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bu bağlamda, ekstrüzyon işlemi sadece mekanik bir küçültme tekniği değil, aynı zamanda lipozomların hedef uygulamalara uygun hale getirilmesinde önemli bir süreç olarak değerlendirilmelidir.

Gerçekleştirilen farklı formülasyonlar karşılaştırıldığında, yalnızca sonikasyon yöntemiyle hazırlanan yapılar (L1), homojen bir dağılım gösterse de partikül boyutları mikron düzeyinde

kalmış, bu nedenle istenilen nanometrik boyutlara ulaşamamıştır. İnce film ve sonikasyon yönteminin birlikte uygulandığı grupta (L2), yaklaşık 745 nm ortalama çapta, daha küçük ve boyutsal olarak homojen yapılar elde edilmiştir. Bu kombinasyon, hem boyut kontrolü hem de dağılım düzenliliği açısından başarılı bir sonuç vermiştir. İnce film ve homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan grupta (L3) ise, parçacıklar hem daha büyük (~1055 nm) hem de daha düzensiz bir yapı sergilemiştir; yüksek PDI değeri bu durumu desteklemiştir.

Ekstrüzyon işleminin eklendiği formülasyonlarda, partikül boyutlarında belirgin bir azalma sağlanmış ve homojenlik artmıştır. Özellikle 11 ve 21 kez ekstrüzyona tabi tutulan örneklerde (L4 ve L5), partikül çapı nanoskalaya indirgenmiş; L5 grubunda 130.1 ± 0.8 nm gibi oldukça küçük ve düzenli yapılar elde edilmiştir. Aynı zamanda düşük PDI (0.163) ve yüksek zeta potansiyeli (56.7 mV) değerleri, bu formülasyonun fiziksel stabilite ve yüzey özellikleri açısından en başarılı yapı olduğunu ortaya koymuştur.

Aşağıda L1 ila L5 formülasyonları, üretim metodolojilerine bağlı olarak şekillenmiş ve temel karakterizasyon parametreleri açısından karşılaştırılmış ve her bir formülasyonun genel yapısal ve fonksiyonel durumu özetlenmiştir.

L1: Homojen ama çok büyük partiküller (mikron düzeyinde).

L2: Küçük ve homojen yapılar, en dengeli formülasyonlardan biri.

L3: Büyük ve düzensiz partiküller, düşük homojenlik.

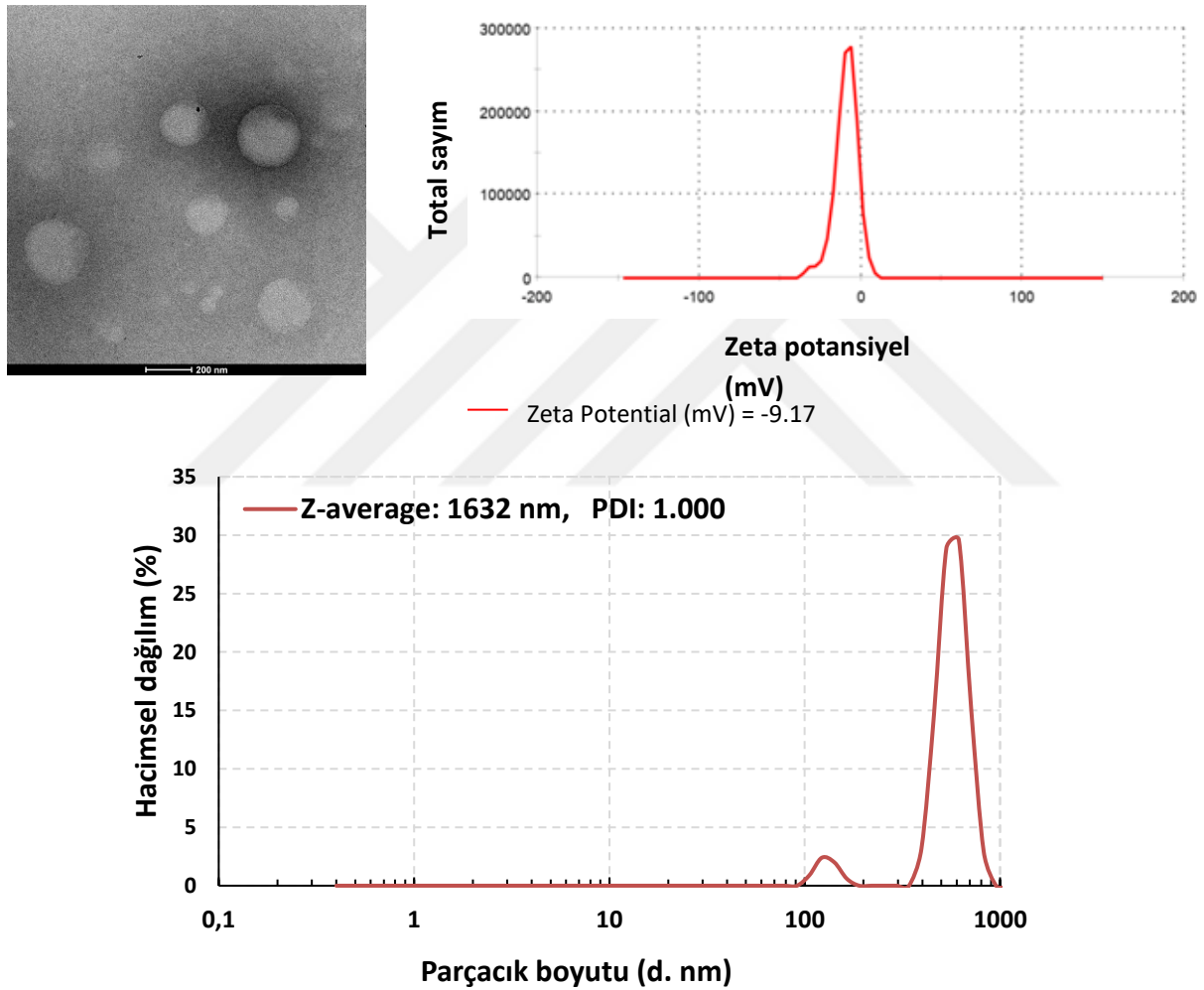
L4: Ekstrüzyonla boyut küçülmüş, homojenlik artmış.

L5: En küçük ve en kararlı yapı; yüksek homojenlik ve ideal zeta potansiyeli.

4.1.3. RNA Kapsülleneli Lipozomların Hazırlanması (RL1, RL2, RL3, RL4)

Tez kapsamında yürütülen bu aşamada, SARS-CoV-2'yi taklit edebilecek yapılar oluşturmak amacıyla RNA kapsüllenmiş lipozomal sistemler hazırlanmıştır. Model RNA olarak Torula maya kökenli ribonükleik asit kullanılmış, bu RNA lipidlerle birleştirilerek lipozomlar kapsüllenmiştir. Hazırlanan sistemlerde, RNA'nın lipozom yapısına ne zaman ve hangi oranda eklendiğinin, parçacık boyutu, dağılım homojenliği ve kapsülleme verimliliği üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

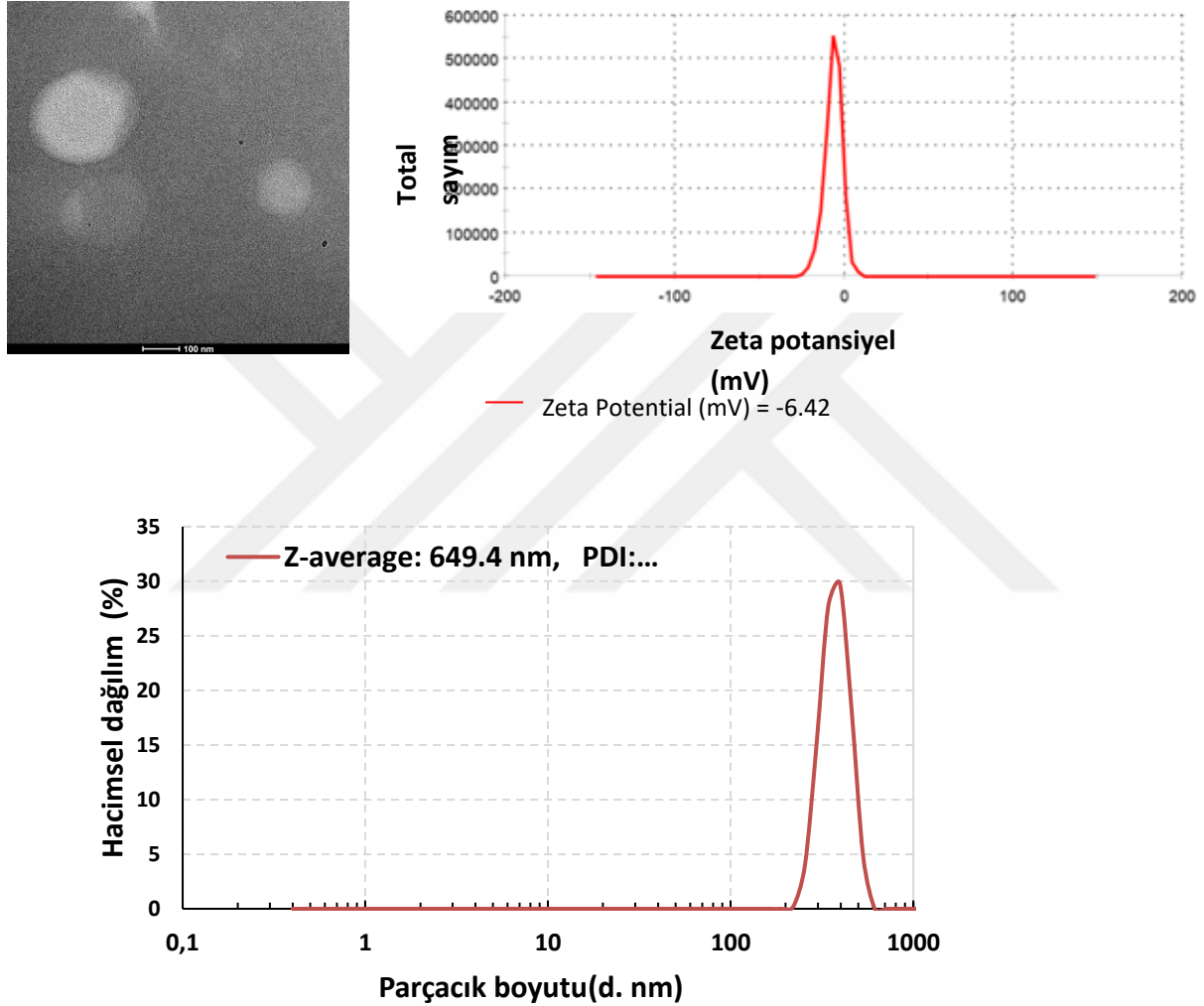
RNA:lipid oranı 1:10 olarak belirlenen RL1 grubunda ve lipozomlar 11 döngü ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu grupta ölçülen ortalama partikül boyutu 1632 ± 60 nm gibi oldukça yüksek bir değerde bulunmuş; bu durum, partiküllerin mikron boyutunda kaldığını göstermektedir. Polidispersite indeksi (PDI) 1.000 olarak ölçülmüş ve bu değer, sistemdeki partiküllerin çok geniş bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan ölçüm sonucunda zeta potansiyeli -9.17 mV olarak ölçülmüştür. Şekil 4.9 ve Çizelge 4.1’de sunulan bu veriler, ekstrüzyon sayısının yetersiz kalması durumunda lipozomal yapının boyut ve homojenlik açısından uygunluk göstermediğini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 4.9 11 döngü ve altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllenmiş lipozomların parçacık boyutu dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (1:10 (v/v) RNA: lipid) (PDI: poli dispersiyon indeksi) (n = 3).(RL1)

RNA: lipid oranı korunarak ekstrüzyon döngü sayısı 21 olan RL2 grubunda, partikül boyutunun belirgin şekilde küçüldüğü ve daha homojen bir dağılım elde edildiği görülmüştür. Bu grupta ortalama partikül boyutu 649.4 ± 25 nm’ye kadar düşmüş; PDI değeri ise 0.613 olarak

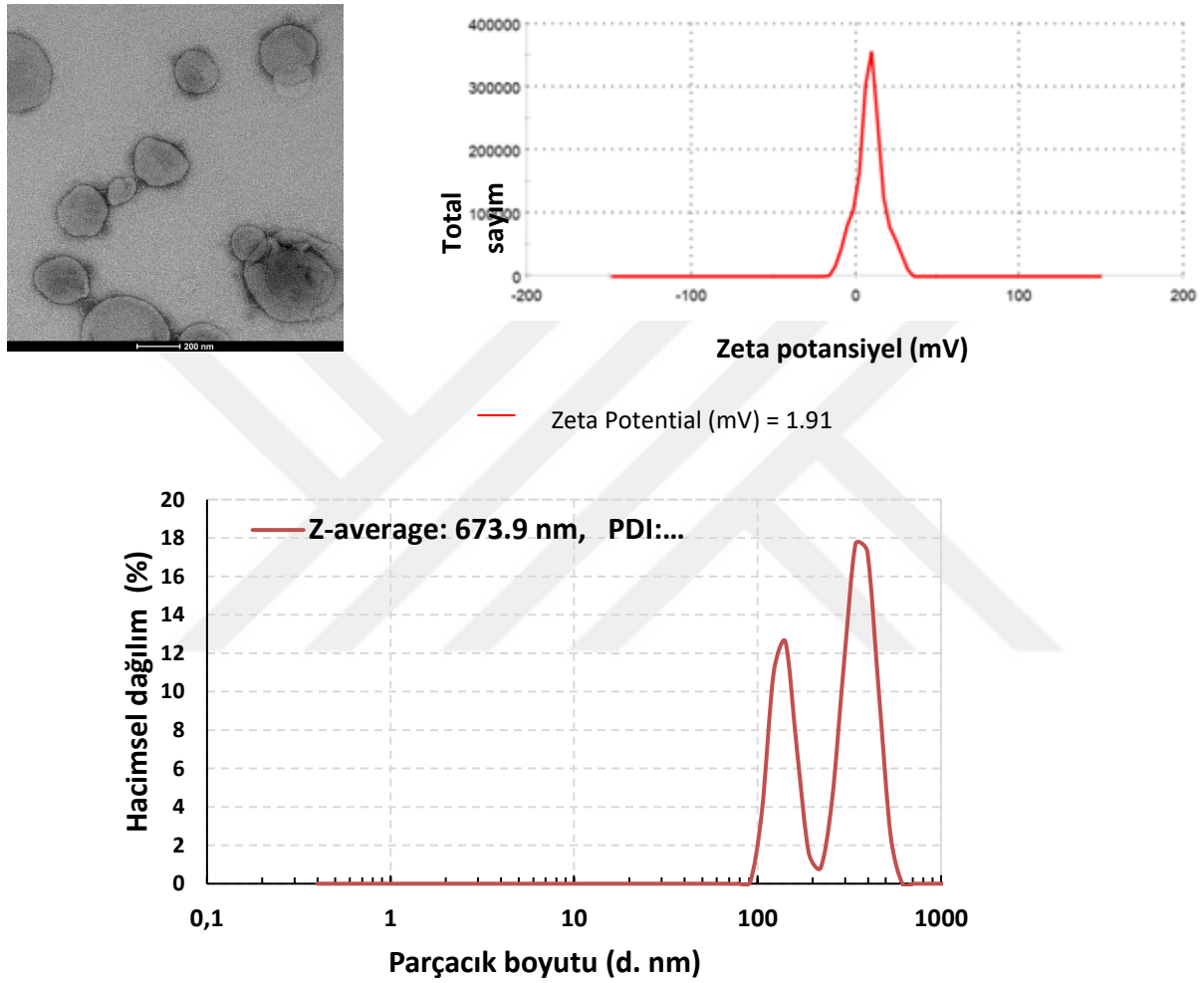
ölçülmüştür. Bu değer, boyut dağılımının RL1 grubuna göre daha dengeli olduğunu, ancak yine de ideal homojenlikten uzak olduğunu göstermektedir. Ölçülen zeta potansiyeli -6.42 mV olup, bu değer partiküllerin yüzeyinde belirli bir elektrostatik yükün bulunduğunu ve sistemin kolloidal stabilite açısından uygun özellikler gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Şekil 4.10 ve Çizelge 4.1’de yer alan bu veriler, ekstrüzyon sayısının artırılmasının hem boyutsal küçülme hem de yüzeysel özelliklerde iyileşme sağladığını ortaya koymuştur.



Şekil 4.10 21 döngü altında ince film hidrasyonu ve ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllenmiş lipozomların parçacık boyutu dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri, (1:10 (v/v) RNA: lipid) (PDI: poli dispersiyon indeksi) (n = 3). (RL2)

RNA: lipid oranı 1:20 olarak belirlenmiş ve RNA’nın ince film hazırlığı sonrasında eklendiği RL3 grubunda, ortalama partikül boyutu 673.9 ± 47 nm olarak ölçülmüştür. Bu değer, RL2 grubuna benzer bir boyutsal küçülme göstermesine rağmen; PDI değeri 0.831 gibi oldukça yüksek bir değerde kaydedilmiştir. Bu durum, sistemdeki parçacıkların farklı boyutlarda

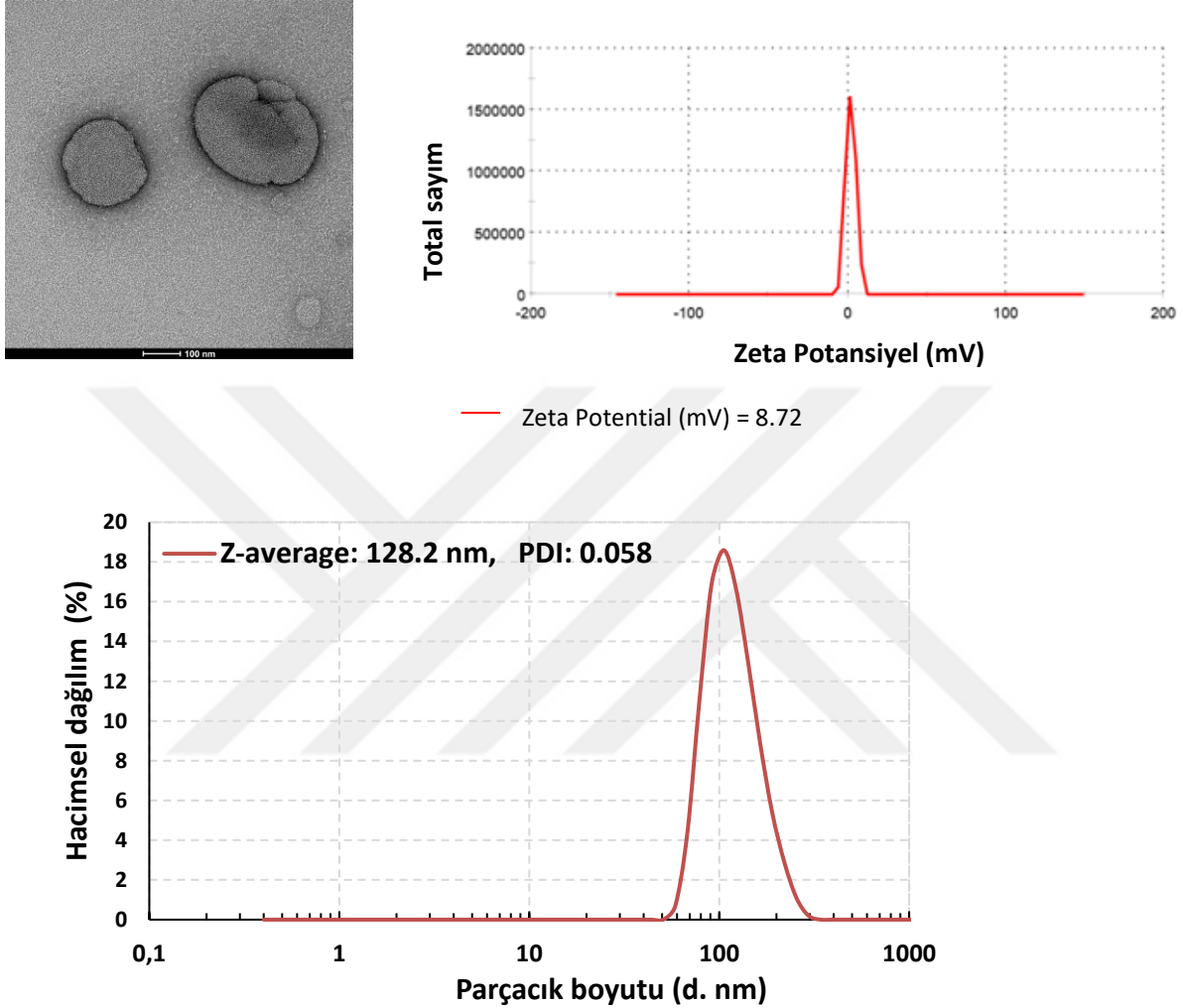
oluşturduğunu ve homojenlikten uzak bir yapı sergilediğini göstermektedir. Zeta potansiyeli 1.91 mV olarak ölçülmüş olup, bu durum sistemin kolloidal stabilite açısından kararsız bir yapıda olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, Şekil 4.11’de sunulan Z-ortalama analizinde iki farklı pik gözlenmiş, bu da heterojen partikül yapısının varlığını desteklemiştir. TEM görüntülerinde ise partikül agregasyonu ve boyutsal çeşitlilik net bir şekilde gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.11 İnce film oluşturma ve 21 döngüde ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllü lipozomların ince film hidrasyonundan sonra RNA muamelesi ile elde edilen (1:20 (v/v) RNA: lipid) partikül boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri (PDI: polidispersif indeks) (n = 3). (RL3)

RNA: lipid oranı 1: 20 olarak belirlenmiş ve RNA'nın ince film hazırlığı öncesinde eklendiği RL4 grubunda, en düşük partikül boyutu olan 128.2 ± 0.5 nm elde edilmiştir. Bu boyutsal küçüklüğe ek olarak, PDI değeri 0.058 gibi oldukça düşük bir seviyede kaydedilmiş ve bu durum sistemde yüksek düzeyde homojen partiküller bulunduğunu göstermiştir. Zeta potansiyeli ise 8.72 olarak ölçülmüş, bu da yüzey kararlılığının yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 4.12 ve Çizelge 4.1’de sunulan verilerle desteklenen bu bulgular, RL4

grubunun hem fiziksel yapı hem de stabilite açısından en başarılı formülasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca TEM görüntüleri de partiküllerin küresel morfolojisini ve homojen dağılımını doğrulamıştır.



Şekil 4.12 İnce film oluşturma ve 21 döngüde ekstrüzyon yöntemi ile hazırlanan RNA kapsüllü lipozomların ince film hidrasyonundan önce RNA muamelesi ile elde edilen (1:20 (v/v) RNA: lipid) partikül boyut dağılım profilleri, zeta potansiyeli ve TEM görüntüleri (PDI: polidispersif indeks) (n = 3). (RL4)

RL1, RL2, RL3 ve RL4 grupları karşılaştırıldığında; RNA: lipid oranı 1:10 olup 11 döngü ekstrüzyon uygulanan RL1 grubunda partikül boyutu oldukça büyük (1632 ± 60 nm) ve dağılım homojenliği düşüktür (PDI: 1.000). Ekstrüzyon döngü sayısının 21'e çıkarıldığı RL2 grubunda, partikül boyutu 649.4 ± 25 nm'ye düşmüş, PDI 0.613 seviyesine inmiş bu da boyutsal kontrol ve yüzey kararlılığında gelişme sağlandığını göstermektedir. RNA'nın film sonrasında eklendiği RL3 grubunda, partikül boyutu 673.9 ± 47 nm, PDI 0.831 ve zeta potansiyeli 1.91 mV olarak kaydedilmiş, dağılımın oldukça heterojen olduğu ve yüzey kararlılığının zayıf

kaldığı anlaşılmıştır. Buna karşılık, RNA'nın film öncesinde eklendiği ve RNA: lipid oranı 1:20 olan RL4 grubunda, partikül boyutu 128.2 ± 0.5 nm'ye kadar küçülmüş, PDI 0.058 gibi çok düşük bir değere ulaşmış ve zeta potansiyeli 8.72 olarak ölçülmüştür. Ayrıca, kapsülleme verimliliği RL2 grubunda $\%94.75 \pm 0.5$ iken, RL4 grubunda bu oran $\%98.60 \pm 0.7$ 'ye yükselmiştir. Tüm bu bulgular, boyutsal küçüklük, homojenlik, yüzey kararlılığı ve yüksek kapsülleme verimliliği açısından RL4 grubunun en başarılı formülasyon olduğunu ortaya koymuştur.

Aşağıda RL1 ile RL4 formülasyonları, üretim metodolojilerine bağlı olarak şekillenmiş ve temel karakterizasyon parametreleri açısından karşılaştırılmış ve her bir formülasyonun genel yapısal ve fonksiyonel durumu özetlenmiştir.

RL1: 11 döngü ekstrüzyon uygulanmış, büyük ve homojen olmayan partiküller elde edilmiştir.

RL2: Ekstrüzyon döngü sayısı 21'e çıkarılmış, boyut küçülmüş ve homojenlik artmıştır.

RL3: RNA ince filminden sonra eklenmiştir; partiküller heterojen ve kararsız yapıdadır.

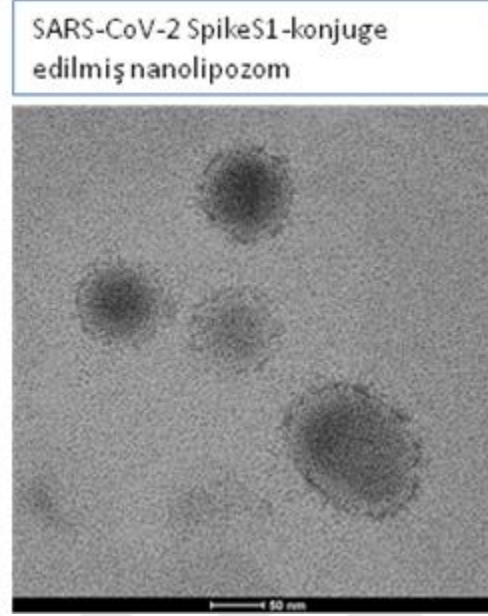
RL4: RNA ince film öncesi eklenmiştir; küçük, homojen ve kararlı yapılar elde edilmiştir.

4.1.4. SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini immobilize edilmiş nanolipozomlar (SARS-CoV-2NL)

SARS-CoV-2 Spike-S1 proteininin nanolipozom yüzeyine başarıyla immobilize edilmesiyle, RL4 formülasyonuna dayalı işlevsel bir immünoliposomal sistem geliştirilmiştir. Bu amaçla uygulanan biyokonjugasyon işlemi, Spike-S1 proteinindeki karboksil gruplarının EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimidehidroklorür) ve sulfo-NHS (N-hidroksisülfosüksinimid) ile aktivasyonu sonrasında, stearylamin içeren nanolipozomların yüzeyindeki amin grupları ile kovalent bağ oluşturmaya dayanmıştır. Bu sayede SARS-CoV-2'yi taklit etme potansiyeline sahip, antijen taşıyan, RNA kapsüllü ve yüzeyi fonksiyonel proteinle işlenmiş immünolipozomal yapılar (SARS-CoV-2 NL) elde edilmiştir.

Elde edilen bu sistemin morfolojik özellikleri, Şekil 4.13'te sunulan TEM görüntüsüyle değerlendirilmiştir. Görsel analizler sonucunda, nanolipozomların küresel morfolojisini koruduğu, RL4 grubuyla benzer boyutsal aralıkta yapıların oluştuğu ve konjugasyon işleminin lipozomal bütünlüğü bozmadığı belirlenmiştir. Ayrıca zeta potansiyeli ölçümü, bu yapılar için 8.72 mV olarak kaydedilmiş olup, partiküllerin elektrostatik olarak birbirinden uzak durma

eğiliminin yüksek olduğunu ve koloidal stabilitenin başarılı şekilde sağlandığını göstermektedir. Elektriksel iletkenlik ölçümü ise 15.1 mS/cm değerinde bulunmuş ve bu durum, yüzey yük dengesinin sistem içinde iyi korunduğuna işaret etmiştir.



Şekil 4.13 SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozomun morfolojisini gösteren TEM görüntüsü.

Aşağıda yer alan agaroz jel elektroforez görüntüsü, RNA'nın nanolipozomal sistem içerisinde başarıyla kapsüllenip kapsüllenmediğini değerlendirmek amacıyla yürütülen analizlere dayanmaktadır. Şekil 4.14 de yer alan her bir bant, sistemin bileşenlerine ilişkin önemli veriler sunmakta ve kapsülleme başarısını hem görsel temelli hem de karşılaştırmalı biçimde ortaya koymaktadır.

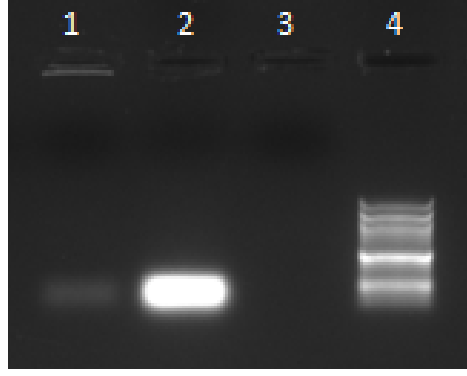
Elektroforez çıktısında sol tarafta yer alan ve görece daha silik bir görünüm sergileyen 1. bant, RNA kapsüllü nanolipozomları temsil etmektedir. Bu bandın düşük yoğunlukta ve net sınırlardan yoksun bir yapıda gözlemlenmesi, RNA'nın büyük oranda nanolipozomal yapılar içerisinde tutulduğunu ve elektroforez sürecinde ortam dışına serbestçe geçemediğini göstermektedir. Jel içerisindeki sınırlı yoğunluk dağılımı, RNA'nın nanolipozomlar tarafından etkin şekilde sarıldığını ve bu yapı sayesinde jel ortamında serbest hareketinin belirgin ölçüde kısıtlandığını ortaya koymaktadır. Böylece, elektroforez süresince RNA'nın hareket kabiliyeti engellenmiş ve jel boyunca ilerlemesi kayda değer şekilde sınırlandırılmıştır.

Görselde ikinci sırada yer alan ve belirgin şekilde yoğunluk sergileyen 2.bant, saf RNA örneğini temsil etmektedir. Bu bant, RNA'nın kapsüllenmeden serbest halde bulunduğu koşullarda elektroforez ortamında nasıl bir hareketlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yüksek yoğunluğu ve net sınırlarıyla dikkat çeken bu bant, RNA'nın jel matrisi içerisinde yapısal bir sınırlamaya uğramaksızın serbestçe hareket edebildiğini ve RNA'nın ortam içerisinde herhangi bir fiziksel engelle karşılaşmadan yayılım gösterebildiğini bununla birlikte güçlü bir sinyal verdiğini kanıtlamaktadır. Serbest RNA'ya ait bu belirgin bant, kapsülleme yapılmamış moleküllerin sistemde nasıl davrandığını göstermesi açısından karşılaştırmalı analizler için anlamlı bir örnek sunmaktadır.

3.bant, kontrol grubu olarak hazırlanan, RNA içermeyen boş nanolipozomal yapıya aittir. Bu bantta herhangi bir anlamlı sinyalin bulunmaması, nanolipozomal yapıların elektroforez koşullarında RNA benzeri bir floresan veya boyanabilir molekül taşımadığını doğrulamaktadır. Bu kontrol, deneyde gözlemlenen sinyalin RNA'ya ait olduğunu ve liposomal yapıların tek başına jel içinde herhangi bir görünür bant oluşturmadığını kanıtlamaktadır. Bu bulgu, analiz sisteminin spesifikliğini desteklemektedir.

En sağdaki 4.bant grubu ise marker (DNA merdiveni) (katalog no: 15628019, Thermo Fisher ScientificInc) olup, elektroforez boyunca oluşan bantların boyutlarına göre konumlandırılmasına olanak sağlamaktadır. Bu bantlar, sistemde gözlemlenen RNA örneklerinin yaklaşık moleküler boylarını karşılaştırmak için referans olarak kullanılmıştır.

Elektroforez sonuçları doğrultusunda, jel ortamında serbest haldeki RNA'ya kıyasla jel boyunca yayılımı belirgin şekilde sınırlandığı ve RNA'nın nanolipozomal yapılar içerisinde etkin biçimde kapsüllendiği ortaya konmuştur. Bu bulgular, geliştirilen sistemin kapsülleme kapasitesini görsel olarak desteklemekte ve yapının yapısal bütünlüğünü başarıyla koruduğunu göstermektedir. Elde edilen bu görsel bulgular, UV spektroskopik analizlerle hesaplanan yüksek kapsülleme verimlilikleriyle de uyumlu olup, geliştirilen sistemin başarılı bir RNA kapsülleme performansı sergilediğini açıkça doğrulamaktadır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.14 SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozomda RNA'nın varlığını ve başarılı RNA kapsüllenmesini gösteren agaroz jel elektroforezi (1: RNA kapsüllenmiş lipozom, 2: RNA 3: Kontrol (nanolipozom) 4: Marker (DNA merdiveni))

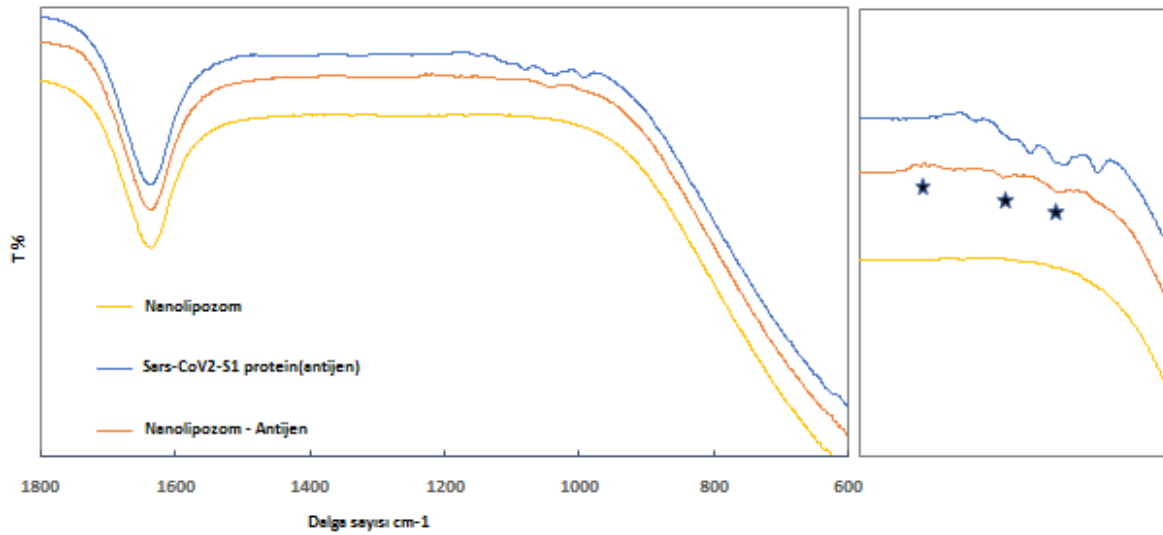
Nanolipozomal sistemin hem SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini hem de RNA içerip içermediğinin kimyasal olarak doğrulanması amacıyla ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared) spektroskopisi uygulanmıştır. Şekil 4.15'te sunulan spektral analiz, farklı örnek gruplarına (yalnızca nanolipozom, yalnızca Spike-S1 proteini ve nanolipozom-protein konjugatı) ait karakteristik titreşim bantlarını ayrıntılı biçimde göstermektedir.

Elde edilen spektrumlarda, özellikle 1100 cm^{-1} civarında gözlemlenen belirgin bant, Spike-S1 proteininin yapısında bulunan $\nu(\text{C-N})$ ve $\delta(\text{C-H})$ titreşim modlarına karşılık gelmektedir. Bu sinyaller, proteine özgü kimyasal yapıların varlığını göstermekte olup, yalnızca nanolipozom-antijen grubunda görülmesi, proteinin lipozom yüzeyine özgün ve başarılı bir şekilde kovalent olarak bağlandığını göstermektedir. Söz konusu sinyallerin, saf nanolipozom ve saf Spike-S1 protein spektrumlarından farklı olarak sadece konjuge yapıda yer alması, biyokonjugasyon işleminin gerçekleştiğine dair güçlü bir kanıt sunmaktadır.

Ayrıca, spektrumun 1200 cm^{-1} civarındaki bölgesinde düşük şiddetli bir bant daha gözlemlenmiştir. Bu bölge, fosfat grubu içeren bileşiklerin özellikle nükleik asitlerin ve fosfolipitlerin karakteristik titreşimlerine karşılık gelmektedir. Nanolipozom-antijen örneğinde ortaya çıkan bu bant, RNA'nın lipozomal sistem içerisinde var olduğunu gösteren spektral bir belirti niteliğindedir. Aynı zamanda, bu sinyalin yalnızca nanolipozom-protein-RNA kombinasyonunda ortaya çıkması, RNA'nın sistem içerisinde stabil biçimde tutulduğunu ve fiziksel bütünlüğünü koruduğunu düşündürmektedir. Bu titreşim bölgesi, fosfolipit çift katman

yapısı ile birlikte RNA'nın fosfat omurgasından kaynaklı titreşimleri de içerebileceğinden, sistemin bütünsel yapısal bileşimini doğrulayan bir spektral iz olarak değerlendirilmektedir.

Spektrumun tamamında yer alan bu karakteristik bantlar, geliştirilen nanolipozomal sistemin hem antijen (Spike-S1) hem de nükleik asit (RNA) bileşenlerini başarıyla içerebildiğini göstermekte; aynı zamanda yüzey konjugasyonunun ve içerik kapsülleme işleminin etkinliğini kimyasal düzeyde teyit etmektedir. Elde edilen FTIR verileri, daha önce UV spektroskopisi ve agaroz jel elektroforezi ile elde edilen bulgularla tutarlılık göstermekte ve sistemin fonksiyonel bütünlüğünü çok yönlü olarak desteklemektedir.



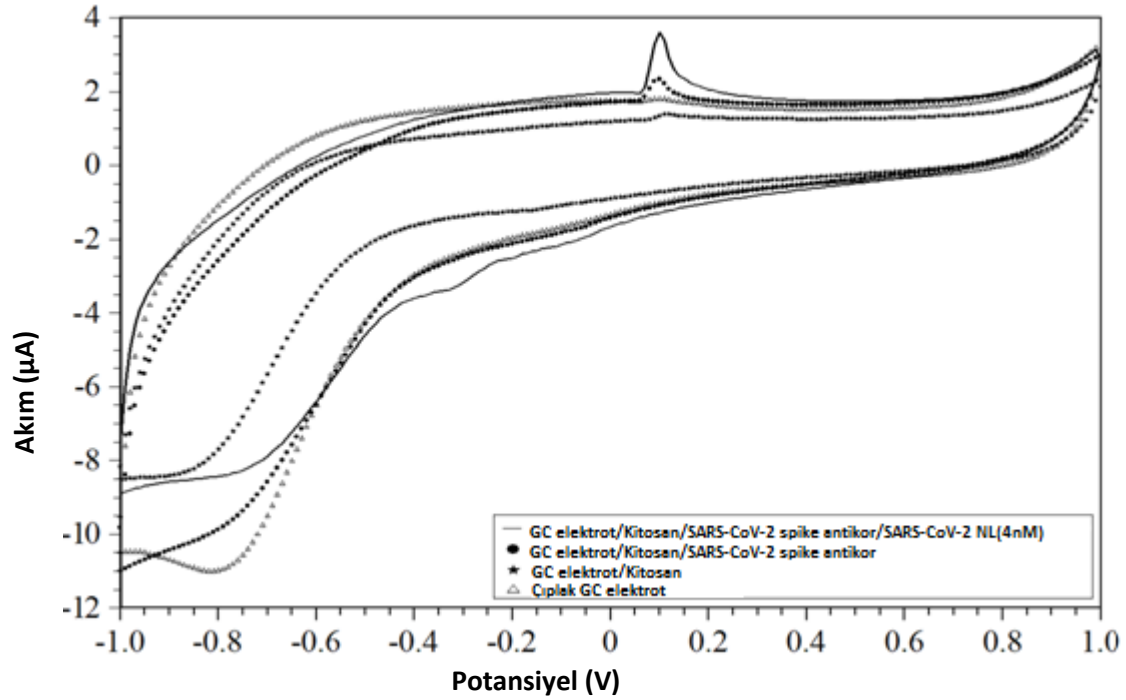
Şekil 4.15 Nanolipozom, RNA, SARS-CoV-2 Spike S1 ile konjuge edilmiş RNA kapsüllü nanolipozom (nanolipozom-antijen) ve SARS-CoV-2 Spike S1 proteini (antijen) için ATR-FTIR spektrumları.

4.2. BİYOSENSÖR ELEKTRODUNUN ELEKTROKİMYASAL YÜZEY KARAKTERİZASYONU

Geliştirilen biyosensör platformunun yüzey modifikasyon basamaklarını değerlendirmek ve üretim süreci boyunca gerçekleştirilen kimyasal immobilizasyonların etkinliğini doğrulamak amacıyla, elektrokimyasal karakterizasyon yöntemleri olarak döngüsel voltametri (CV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) analizleri uygulanmıştır. Bu analizler, modifikasyon işlemlerinin elektrot yüzeyinde meydana getirdiği değişimleri izlemek ve biyosensörün işlevsel performansını belirlemek açısından kritik öneme sahiptir. CV ve SWV ölçümleri sayesinde, elektrota uygulanan her modifikasyonun sistem üzerindeki etkileri hem görünür hem de

ölçülebilir şekilde değerlendirilmiştir. Buna göre, modifiye edilmemiş çıplak GC elektrot, GC/kitosan, GC/kitosan/SARS-CoV-2 Spike antikoru ve GC/kitosan/SARS-CoV-2 Spike antikoru/SARS-CoV-2 NL (4 nM) yapılandırmalarına ait elde edilen veriler Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de sunulmaktadır.

4.2.1. CV Analiziyle Biyosensör Yüzeyinin Karakterizasyonu



Şekil 4.16 Üretim sürecinde GC elektrot yüzeyinin 10 mMpH 7.40 PBS içinde adım adım CV karakterizasyonu.

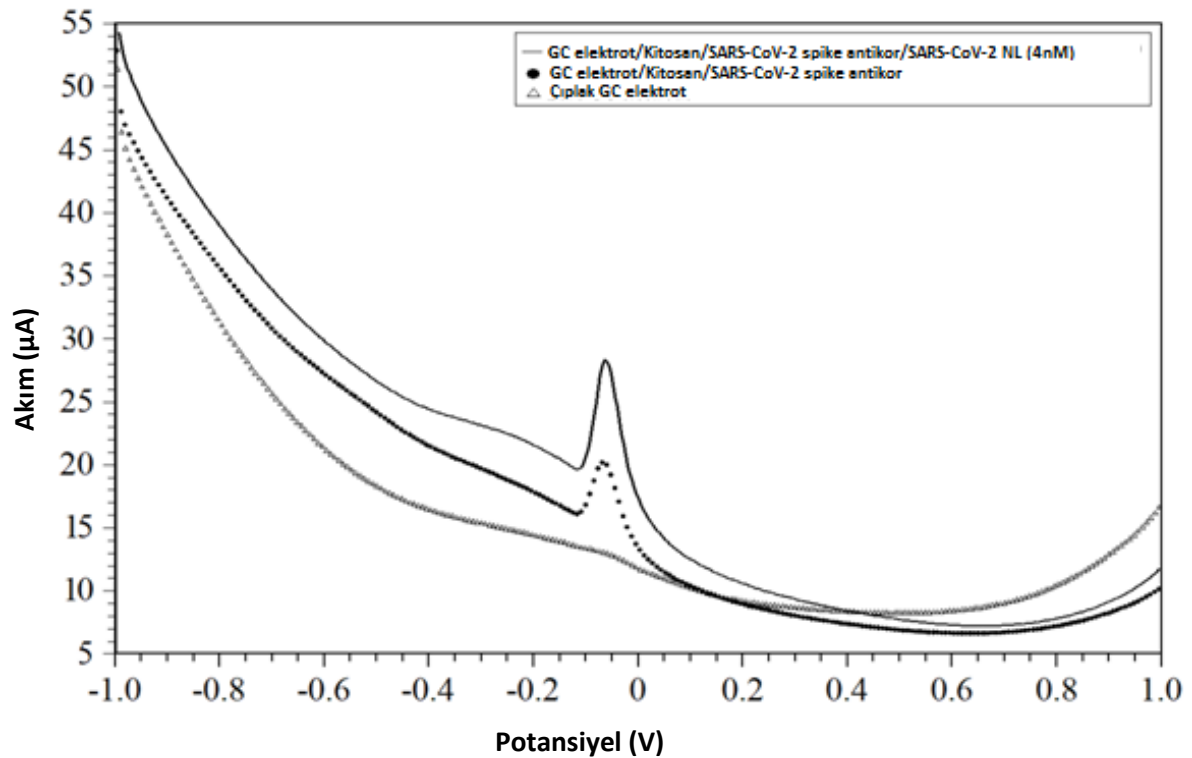
CV analizinde, elektrot yüzeyinde meydana gelen modifikasyonlara bağlı olarak akım-potansiyel eğrilerinde belirgin yapısal değişiklikler gözlemlenmiştir. Çıplak GC elektrot, yüzeyde herhangi bir biyomolekül bulunmadığı için oldukça düşük akım yanıtı üretmiştir. Bu durum, elektrot yüzeyinin henüz fonksiyonel tanıma molekülleriyle kaplanmadığını ve yüzeyin elektrokimyasal olarak pasif bir karakterde olduğunu göstermektedir.

GC/kitosan modifikasyonu sonrasında gözlenen akım artışı, kitosanın yüzeyde film tabakası oluşturarak elektron transferini kolaylaştırdığını ve yüzey ile çözelti arasında daha verimli bir etkileşim sağladığını göstermektedir.

SARS-CoV-2 Spike antikoru immobilize edildikten sonra grafikte belirgin bir anodik tepe oluşmuştur. Bu sinyal, antikorun elektrot yüzeyine etkili şekilde bağlandığını ve bu biyomolekülün elektron transfer süreçlerini değiştirdiğini göstermektedir. Ayrıca görülen bu artış, antikorların elektrot yüzeyine sağlam şekilde bağlandığını ve sistemin biyolojik olarak aktif hâle geldiğini göstermektedir.

Son modifikasyon aşamasında, 4 nM konsantrasyonunda SARS-CoV-2 NL antijeninin immobilize edilmesiyle birlikte, voltametrik profilin belirgin biçimde değiştiği ve gözlenen akımın anlamlı düzeyde arttığı dikkat çekmektedir. Bu artış, antijen- antikor etkileşiminin yüzeyde başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve bu etkileşimin elektrot yüzeyinde redoks aktivitesini kuvvetlendirdiğini göstermektedir. Ayrıca, voltamogramın genel eğrisinde gözlenen simetri ve tepe genişliği, elektrot yüzeyinde oluşan yapının düzenli ve işlevsel bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir.

4.2.2. SWV Analiziyle Biyosensör Yüzeyinin Karakterizasyonu



Şekil 4.17 Üretim sürecinde GC elektrot yüzeyinin 10 mMpH 7.40 PBS içinde adım adım SWV karakterizasyonu.

SWV analizi, CV'ye kıyasla daha hassas akım ölçümleri sunarak, elektrot yüzeyindeki küçük değişimlerin bile tespit edilmesini mümkün kılmaktadır. Şekil 4.17'de görüldüğü üzere, çıplak GC elektrot için gözlemlenen akım yanıtı son derece düşüktür ve belirgin bir tepelenme gözlenmemektedir. Bu sonuç, yüzeyde biyomoleküler bir tanıma elemanı bulunmadığını ve elektrotun pasif halde olduğunu göstermektedir.

GC/kitosan/SARS-CoV-2 Spike antikoru yapısına ait SWV grafiğinde -0.05 V civarında düşük şiddetli bir tepe gözlemlenmiştir. Bu tepelenme, antikorun elektrot yüzeyine immobilize edildiğini ve bu molekülün çözeltideki hedef antijen ile etkileşim kurmaya hazır hale geldiğini göstermektedir.

Bu yapıya 4 nM SARS-CoV-2 NL antijeni eklendiğinde ise, aynı potansiyel bölgesinde gözlemlenen tepe akımın şiddetinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu artış, antijen-antikor bağlanmasının spesifik ve etkin bir şekilde gerçekleştiğini ve bu etkileşimin yüzeydeki elektron transferini kuvvetlendirdiğini göstermektedir. Ayrıca, sinyal şiddetinde gözlenen bu anlamlı artış, sistemin biyolojik olarak tanıyıcı özelliğe sahip olduğunu ve SARS-CoV-2 NL varlığında yüksek duyarlılıkla yanıt verebildiğini doğrulamaktadır.

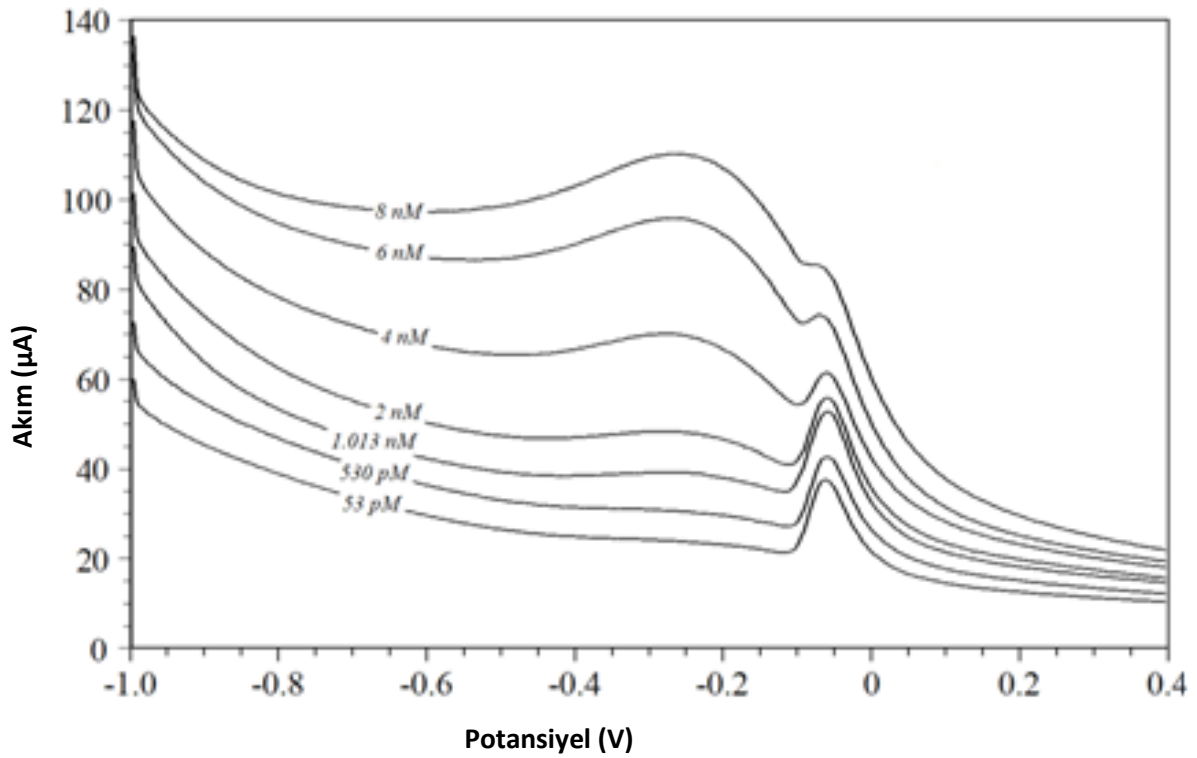
4.3. İMMÜNOSENSÖRÜN ANALİTİK PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Geliştirilen biyosensör sisteminin analitik performansını değerlendirmek amacıyla, SARS-CoV-2 NL antijenine karşı 53 pM ile 8 nM aralığında hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler ile kapsamlı bir voltametrik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizde, her bir antijen konsantrasyonu için modifiye GC/kitosan/SARS-CoV-2 Spike antikor yapısına sahip elektrotlar kullanılmıştır. Elektrotlar, hedef molekül ile oda sıcaklığında 30 dakika boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Bu süre boyunca antijenin elektrot yüzeyine sabitlenmiş antikorlarla etkileşime girerek bağlanması beklenmiş; böylece biyotanıma olayının optimum koşullarda gerçekleşmesi sağlanmıştır.

İnkübasyon süreci sonunda gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümler, kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemiyle, -1.0 V ile +1.0 V potansiyel aralığında kaydedilmiştir. Elde edilen SWV eğrileri Şekil 4.18'de sunulmakta olup, her bir antijen konsantrasyonuna karşılık gelen akım yanıtları detaylı olarak analiz edilmiştir. Grafik incelendiğinde, SARS-CoV-2 NL

konsantrasyonu arttıkça, sistemden elde edilen pik akım değerlerinin düzenli ve belirgin şekilde yükseldiği açıkça görülmektedir. Bu artış, biyosensörün hedef antijene karşı duyarlılığını ve sinyal yanıtındaki tutarlılığı doğrulayan önemli bir bulgudur.

Antikor-antijen bağlanması -0.05 V'de gözlemlenmiş olsa da (Şekil 4.17), antijen konsantrasyonunun artması potansiyel değerinde negatif bir kaymaya neden olmuştur. Sinyalin -0.3 V seviyesinde belirginleşmesi, biyosensör sisteminin özgül antijen-antikor etkileşimini doğru şekilde algılayarak, bu etkileşimi elektrokimyasal bir tepkiye dönüştürebildiğini ve böylece işlevsel tanı potansiyelini başarıyla yansıttığını göstermektedir. Söz konusu tepe akımı, hedef antijenin elektrot yüzeyinde tanınması ve bağlanmasının doğrudan bir sonucu olarak ortaya çıkmış; bu da sistemin seçicilik, duyarlılık ve ölçüm güvenilirliği açısından güçlü bir platform olduğunu ortaya koymuştur.



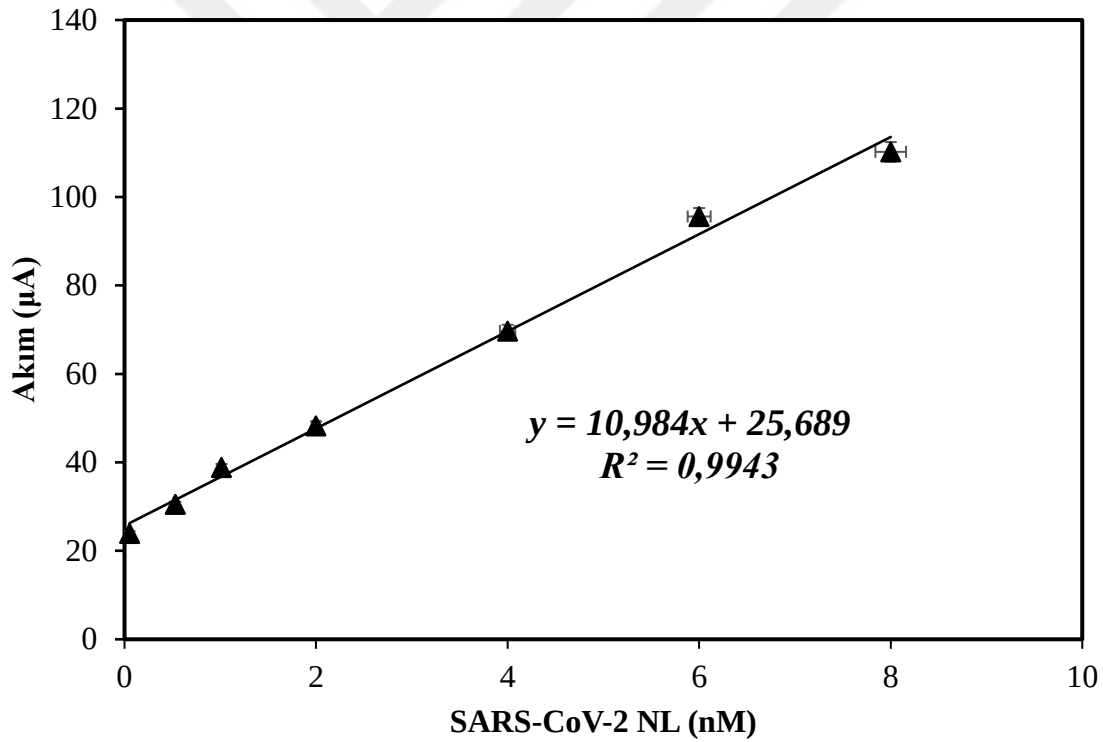
Şekil 4.18 SARS-CoV-2 NL konsantrasyonunun artırılmasıyla elde edilen immüno-sensör tepkimesi.

SWV analizlerinden elde edilen akım değerleri doğrultusunda oluşturulan kalibrasyon eğrisi, Şekil 4.19'da grafiksel olarak sunulmuştur. Antijen konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı şekilde yükselen tepe akımları, sistemin analitik tepkisinin lineer bir seyir izlediğini ortaya koymuştur. Bu doğrusal ilişki, $y = 10.984x + 25.689$ şeklindeki regresyon denklemiyle

tanımlanmış ve elde edilen korelasyon katsayısı ($R^2 = 0.9943$), biyosensörün oldukça yüksek bir ölçüm doğruluğuna ve tutarlılığına sahip olduğunu istatistiksel olarak doğrulamıştır.

Bu denli yüksek bir korelasyon değeri, ölçümlerin tekrarlanabilirliğini ve sistemin hassasiyet düzeyini destekler nitelikte olup, biyosensör platformunun güvenilirliği açısından önemli bir göstergedir. Ayrıca, doğrusal bölgedeki geniş konsantrasyon aralığı (53 pM – 8 nM), geliştirilen sistemin hem düşük hem de orta düzey antijen varlıklarını başarıyla algılayabildiğini ortaya koymaktadır.

Buna göre, Şekil 4.19’da sunulan kalibrasyon eğrisi yalnızca ölçümsel verilerin grafiksel temsili olmanın ötesinde, sistemin analitik performans karakteristiğini sayısal ve görsel düzeyde destekleyen önemli bir doğrulama aracı işlevi görmektedir.



Şekil 4.19 SARS-CoV-2 NL konsantrasyonunun artırılmasıyla elde edilen immünosensörün kalibrasyon eğrisi.

Sistemin algılama sınırı (LOD) sinyal/gürültü oranı esas alınarak $3 \times S_b/m$ formülüyle hesaplanmış ve 3.79 pM olarak belirlenmiştir. Bu değer, sistemin ultra düşük konsantrasyon düzeylerinde dahi tutarlı yanıt verebildiğini ve erken dönem enfeksiyon belirteçlerinin tespitinde kullanılabilecek düzeyde duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır. Hesaplanan

duyarlılık (slope) değeri olan $155.47 \mu\text{A nM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, sensörün düşük derişimlerdeki artışlara bile elektrokimyasal açıdan anlamlı yanıt üretebildiğini göstermektedir. Aynı şekilde, $[(\text{ölçülen konsantrasyon/gerçek konsantrasyon}) \times 100]$ formülüyle belirlenen %100.95'lik doğruluk oranı, ölçümlerin klinik standartlara yakın değerlerde gerçekleştirilebildiğini teyit etmektedir [78,79].

Sensörün operasyonel kararlılığı ise ardışık ölçümler ve çoklu elektrotlarla yürütölen deneylerle analiz edilmiştir. Sekiz ardışık ölçümle belirlenen (RSD) değeri (standart sapma / ortalama akım) $\times 100$ formülüyle hesaplanmış ve %0.33 gibi oldukça düşük bir değer elde edilmiştir. %0.33'lük görelil standart sapma, sistemin yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik sergilediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, dört ayrı modifiye elektrotla yürütölen yeniden üretilebilirlik testlerinde %99 düzeyinde tutarlılık elde edilmiştir. Bu da sistemin üretim süreçlerinde standardizasyon sağlanabileceğini ve prototip geliştirme için uygun altyapıya sahip olduğunu göstermektedir [80].

İmmünosensörün uzun dönem kararlılığı ise Z-puanı değerlendirmesi ile incelenmiş ve elde edilen en düşük değer -0.9 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuç, sistemin zamanla ölçüm performansında anlamlı bir düşüş yaşamadığını ve uzun süreli uygulamalarda da etkinliğini koruyabileceğini göstermektedir. Tüm bu bulgular, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da sunulan elektrokimyasal verilerle doğrudan örtüşmekte; geliştirilen biyosensörün yalnızca yüksek duyarlılık değil, aynı zamanda istikrarlı ve güvenilir ölçüm kapasitesiyle de öne çıktığını ortaya koymaktadır.

4.4. LİTERATÜRDE RAPORLANAN SARS-CoV-2 TESPİTİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ İLE KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRME

COVID-19 pandemisinin ardından, SARS-CoV-2 virüsünün hızlı, hassas ve özgöl bir şekilde tespitine yönelik çok sayıda elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiş; bu alanda yapılan çalışmalar, hem duyarlılığı artırmak hem de tanısal doğruluğu iyileştirmek üzere çeşitli nanomalzeme ve biyotanıma elemanlarını içeren yenilikçi platformlar ortaya koymuştur. Bu bağlamda, mevcut çalışmada geliştirilen sistemin performans özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla, literatürde yer alan bazı seçilmiş çalışmalara ve analitik parametrelerine Çizelge 4.2'de yer verilmiştir.

Çizelge 4.2 SARS-CoV-2 virüsünün elektrokimyasal tespiti için analitik parametrelerin özeti.

Algılama Probu	Örnek	Lineer Aralık	LOD	Ref.
Grafen mürekkepleri ve aerosol jet baskı elektrodu	Tükürükte RBDaSpike'ı	1-1000 ng ml ⁻¹	22.91 pgmL ⁻¹	[81]
Karbon nanofiber/Nprotein serigrafi baskılı elektrot	N-protein	1-1000 ng ml ⁻¹	0.8 pgmL ⁻¹	[82]
Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2/ glutaraldehit /serigrafi baskılı elektrot	S-protein	10 fg mL ⁻¹ -100 ng mL ⁻¹	2.18 fg mL ⁻¹	[83]
Mikroakışkan kağıt bazlı/ZnOnanotelleri/ kağıt elektrot	IgG	10-1000 ng mL ⁻¹	0.4 pgmL ⁻¹	[84]
Nükleoprotein moleküler baskılı polimer/altın bazlı ince film elektrot	Nükleoprotein	2.12-111 fM	15 fM	[85]
Büyük gözenekli altın serigrafi baskılı elektrot	SARS-CoV-2 RBD	2-40 pg mL ⁻¹	0.7 pgmL ⁻¹	[86]
Pirol/grafen oksit camı karbon elektrot	SARS-CoV-2	0.74-9.03 fg mL ⁻¹	0.326 fg mL ⁻¹	[87]
Grafen oksit entegre Ag serigrafi baskılı elektrot	SARS-CoV-2	0.01-100 fM	0.1fM	[88]
Co-TiO ₂ nanotüpleri	SARS-CoV-2 RBD	14-1400 nM	0.7 nM	[89]
AuNPs/rGO	S1 protein RBD antibody	- -	2.8 fM 16.9 fM	[90]
Kendi kendine birleşen tek tabaka (11-merkaptodekanoik asit ve 6 merkaptto-1-heksanol)-modifiye altın elektrot	Anti-rS protein	30-150 nM	2.53 nM (with CV) 1.99 nM (with EIS)	[91]
Altın nanopartiküllerimodifiye edilmiş karbon nanofiberleri	RBD	0.01-64 nM	7 pM	[92]
Grafit karbon nitrür kadmiyum sülfür kuantum noktaları nanokompozit	RBD	0.5-32 nM	0.12 nM	[93]
Redoks etiketli bir DNA aptameri hareketsizleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüp	SARS-CoV-2 spike protein S1	20-100 nM	7 nM	[94]
GC/kitosan/SARS CoV-2 spike antikoru	SARS-CoV-2 NL	53 pM- 8nM	3.79 pM	Bu çalışma

Örneğin, bir çalışmada rekombinantSpike (SCoV2-rS) proteini, 11-merkaptoundekanoik asit ve 6-merkaptto-1-heksanol içeren kendiliğinden düzenlenen bir monolayer ile modifiye edilmiş altın elektrot üzerine immobilize edilmiştir [75]. Bu yapı, anti-rS antikoru ile etkileşim temelinde çalıştırılmış ve döngüsel voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans

spektroskopisi (EIS) ile test edilmiştir. Elde edilen tespit sınırları sırasıyla 2.53 nM (CV) ve 1.99 nM (EIS) olarak rapor edilmiştir.

Benzer şekilde, karbon nanoyünlerinin altın nanopartiküllerle modifiye edilerek serigrafi baskılı karbon elektrotlara uygulanmasıyla oluşturulan bir sensör platformu, SARS-CoV-2 reseptör bağlanma bölgesini tanımaya yönelik olarak geliştirilmiş ve 0.01–64 nM aralığında logaritmik doğrusal bir tepki vermiştir. Bu çalışmada 7.0 pM gibi son derece düşük bir LOD değeri elde edilmiştir [74].

Foto-elektrokimyasal temelli bir diğer çalışmada, Tabrizi ve arkadaşları iletken cam yüzeyine grafitik karbon nitrit ve CdS kuantum noktaları entegre ederek, RBD (reseptör bağlanma domaini) tanıyıcı bir aptasensör geliştirmiştir [73]. Bu sensör, 0.5–32.0 nM aralığında ölçüm yapabilmiş ve 0.12 nM LOD ile oldukça yüksek bir hassasiyet sergilemiştir. Ayrıca, sistemin geçerliliği insan tükürüğü örneklerinde de başarıyla doğrulanmıştır.

Vadlamani ve ekibi tarafından geliştirilen Co-TiO₂ nanotüp tabanlı sensör ise, 14–1400 nM doğrusal aralıkta çalışmış ve 0.7 nM LOD değeriyle SARS-CoV-2 antijeninin tespitinde güçlü bir alternatif olarak öne çıkmıştır [72].

Başka bir yaklaşımla, redoks işaretli DNA aptamerlerinin sabitlendiği tek duvarlı karbon nanotüp bazlı elektrot kullanılarak, SARS-CoV-2 Spike proteininin S1 alt birimi hedef alınmıştır. Bu sensörde 20–100 nM doğrusal aralıkta ölçüm yapılmış, 7.0 nM LOD elde edilmiştir [71].

Tüm bu literatür verileri Çizelge 4.2'de özetlenmiş olup, çeşitli elektrot modifikasyonları ve tanıma elemanlarının sistem performansına olan etkileri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Bu kapsamda değerlendirildiğinde, farklı çalışmalarda altın, kobalt gibi metal nanoparçacıklar, grafen oksit, karbon nanotüpler, titanyum dioksit nanotüpleri ve DNA aptamerleri gibi yüksek iletkenlik ve özgül tanıma kapasitesi sağlayan yapıların elektrot yüzeyinde tercih edildiği görülmektedir. Bu yapıların temel amacı, elektrokimyasal sinyali hem güçlendirmek hem de daha kararlı bir analiz yüzeyi oluşturmaktır. Ancak birçok çalışmada bu sistemler oldukça karmaşık modifikasyon adımları, yüksek maliyetli malzemeler ve özel reaktifler gerektirmektedir.

Buna karşılık, mevcut çalışmada geliştirilen biyosensör sistemi, yalnızca GC/kitosan tabanlı elektrot ve SARS-CoV-2 Spike antikoru ile basit ancak etkili bir yapı sunmaktadır. Sistemde herhangi bir metal nanoparçacık, kuantum nokta ya da grafen türevi malzeme kullanılmadan, sade üretim yöntemiyle 3.79 pM LOD, %100.95 doğruluk, %0.33RSD gibi son derece güçlü analitik parametreler elde edilmiştir. Bu sonuçlar, hem sistemin yüksek hassasiyet gösterdiğini hem de ölçüm tekrarlanabilirliği açısından güvenilir bir yapı sunduğunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca, literatürdeki diğer çalışmalarda genellikle nM seviyelerinde LOD değerleri elde edilirken, bu çalışmada pM düzeyinde duyarlılığa ulaşılmış olması, sistemin tanı hassasiyeti açısından önemli bir gelişme sunduğunu göstermektedir. Ölçüm değerleri arasındaki düşük varyasyon oranı ve sensör yüzeyinde antijen-antikor etkileşiminin spesifikliğini gösteren voltametrik eğriler, sistemin biyomedikal tanı alanında klinik uygulamalara uygun bir altyapıya sahip olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen biyosensör, gerek üretim kolaylığı, gerekse üstün analitik performans kriterleri ile SARS-CoV-2 tespiti için güçlü, tekrarlanabilir, düşük maliyetli ve pratik bir çözüm olarak değerlendirilmekte; ayrıca literatürde raporlanmış ileri sistemlerle rekabet edebilecek nitelikte bir platform sunduğu açıkça görülmektedir.

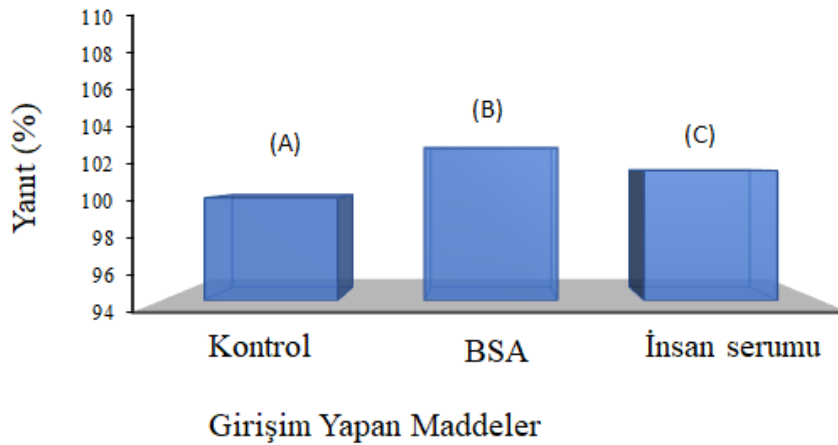
4.5. KONTROL DENEYLERİ VE ETKİLEŞİM ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada geliştirilen biyosensör sisteminin yalnızca hedef analite (SARS-CoV-2 NL) karşı spesifik yanıt verip vermediğini değerlendirmek amacıyla, sistematik kontrol deneyleri gerçekleştirilmiştir. Biyosensör sistemlerinin klinik tanıda güvenle kullanılabilmesi için, yalnızca hedef moleküle karşı sinyal üretmesi, yani yüksek seçiciliğe sahip olması gereklidir. Bu doğrultuda yapılan deneylerde, elektrot yüzeyine immobilize edilen SARS-CoV-2 Spike S1 antikorlarının, antijen içermeyen nanolipozomlarla (RNA içeren ve içermeyen formlar) etkileşimi araştırılmıştır.

İlk kontrol grubunda, hem RNA hem de antijen içermeyen nanolipozom çözeltisi (4 nM) hazırlanmış ve modifiye elektrot bu çözeltiye daldırılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürecin sonunda elektrot PBS tamponu içerisinde döngüsel voltametri (CV) analizine tabi tutulmuştur. Benzer şekilde, ikinci bir kontrol grubunda yalnızca RNA içeren, ancak antijen içermeyen nanolipozomlarla aynı işlem tekrarlanmıştır. Her iki durumda da, elektrotların -0.05

V civarında sınırlı düzeyde akım artışı gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, RNA'nın ya da lipozomal yapının elektrot yüzeyindeki antikorlarla zayıf fiziksel etkileşim kurabildiğini düşündürmektedir. Ancak bu etkileşim, sensörün analitik yanıt üretim potansiyeli olan -0.3 V civarında anlamlı bir sinyale dönüşmemiştir. Bu bulgu, sistemin yalnızca SARS-CoV-2 antijenine karşı özgül sinyal ürettiğini ve yanlış pozitif sonuçlardan büyük ölçüde arındırılmış olduğunu göstermektedir.

Sistemin biyolojik örneklerdeki seçiciliğini değerlendirmek üzere girişim testleri de gerçekleştirilmiştir. Bu testlerde, hedef dışı moleküllerle karşılaşıldığında sensörün spesifik yanıt üretme kapasitesi incelenmiştir. Girişim analizi iki farklı çözelti kullanılarak yapılmıştır: (i) 10 μ M sığır serum albümini (BSA) içeren PBS çözeltisi ve (ii) %1 oranında seyreltilmiş insan serumu içeren PBS çözeltisi. Her iki durumda da sensör, referans olarak yalnızca PBS içeren sistemle karşılaştırılmıştır. Ölçümler sonucunda, BSA içeren çözelti %2.95 oranında, insan serumu içeren çözelti ise %1.60 oranında pozitif girişim göstermiştir. Bu düşük sapma oranları, sensörün kompleks biyolojik matrislerde bile özgün yanıt verebildiğini ve hedef dışı moleküllerden kaynaklanan etkilenimlerin ölçüm doğruluğunu anlamlı şekilde bozmadığını ortaya koymuştur. Şekil 4.20'de, kontrol grubuna kıyasla BSA ve insan serumu içeren çözeltilerin sensör yanıtı üzerindeki etkisi karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.20 10 μ M BSA çözeltisi (B) ve 100 kat seyreltilmiş insan serumunun (C), GC/kitosan/SARS-CoV-2 spike antikoru/SARS-CoV-2 NL elektrodu üzerindeki girişim etkisi

Literatürde yer alan benzer çalışmalarda, kontrol analizlerinin sensör doğruluğunu belirlemedeki önemi sıkça vurgulanmaktadır. Örneğin, aerosol jet baskılı elektrot ile geliştirilen grafen bazlı bir immünosensörde, H1N1 hemaglutinin proteini yaklaşık %15 düzeyinde sinyal sapmasına neden olmuş ve bu durum sensörün sınırlı seçiciliğini ortaya koymuştur [95]. Yine, DNA aptamerleriyle fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp tabanlı bir sistemde, VTM ortamında yapılan testlerde %36'ya varan sinyal baskılanması gözlemlenmiştir [71].

Buna karşılık, mevcut çalışmada geliştirilen GC/kitosan/SARS-CoV-2 Spike antikor/SARS-CoV-2 NL tabanlı sistem, insan serumu gibi yüksek kompleksiteye sahip ortamlarda dahi özgün ve güvenilir yanıtlar verebilmiş, girişim etkilerine karşı büyük ölçüde direnç göstermiştir. Bu durum, sensör sisteminin hem özgüllük hem de biyouyumluluk açısından klinik örneklerle çalışmaya uygun yapıda olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen biyosensörün seçicilik ve girişim toleransı yüksek düzeyde olduğu, sistemin yalnızca hedef antijen olan SARS-CoV-2 NL'ye karşı anlamlı sinyal ürettiği ve diğer biyomoleküllerle olan zayıf etkileşimlerin ölçüm sonuçlarına anlamlı sapma yaratmadığı belirlenmiştir. Bu bulgular, sensörün tanı amaçlı uygulamalarda güvenilir bir tespit aracı olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ayrıca, sistemin kompleks biyolojik örneklerde de başarıyla çalışabilmesi, klinik doğrulama testleri için ileri aşamada yapılacak deneylere güçlü bir temel teşkil etmektedir.

BÖLÜM 5

TEMEL DEĞERLENDİRMELER

Aşağıda, yürütülen tez çalışması kapsamında elde edilen temel bulgular ve bunların bilimsel değerlendirmeleri sunulmaktadır.

- Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, SARS-CoV-2 Spike-S1 proteini ile konjuge edilmiş ve RNA kapsüllü olarak tasarlanan nanolipozomal sistemin, virüs benzeri bir nano-platform oluşturma hedefine başarılı bir şekilde ulaştığı anlaşılmaktadır. Bu yapı, taşıdığı RNA sayesinde virüsün genetik yapısını taklit ederken, yüzeyine bağlanan Spike-S1 proteini ile virüse özgü antijenik özellikleri de göstermektedir. Bu yapıda hem RNA hem de Spike-S1 proteininin bir arada bulunması, sistemin hem sağlam hem de biyolojik olarak aktif olmasını sağlamaktadır.
- Morfolojik analizler, özellikle TEM görüntüleri aracılığıyla, lipozomal yapıların küresel formunu koruduğunu ve konjugasyon sonrasında yapısal deformasyona uğramadığını göstermiştir. Bu durum, hem mekanik stabilitenin hem de üretim sonrası bütünlüğün sürdürülebilirliğini teyit etmektedir. Ayrıca, DLS ölçümleriyle belirlenen partikül boyutu ve düşük PDI değerleri, elde edilen sistemin homojen dağılım gösterdiğini, yüzey yükü analizleri ise zeta potansiyel değerlerinin, elektrostatik stabilite açısından sınırlar içinde olduğunu göstermiş; bu da kolloidal çökme eğiliminin düşük olduğunu ve uzun süreli kararlılık sağlanabileceğini işaret etmiştir.
- Kimyasal karakterizasyon açısından değerlendirildiğinde, FTIR analizleriyle elde edilen özgün spektral sinyaller, hem Spike-S1 proteininin lipozom yüzeyine bağlandığını hem de RNA'nın lipozom içerisine kasıllendiğini doğrudan göstermiştir. Bu bulgular, sadece fiziksel değil, kimyasal düzeyde de sistemin başarılı bir şekilde yapılandırıldığını ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra, elektroforez ve UV spektrofotometrisi ile belirlenen yüksek kapsülleme verimliliği, RNA'nın sistemde etkin bir biçimde tutulduğunu ve işlevsel yük taşıyıcılığı kapasitesinin yüksek olduğunu desteklemektedir.

- Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen nanolipozomal sistemin SARS-CoV-2 virüsünü yapısal olarak taklit edebilen, kontrollü bileşen içeriğine sahip, yüksek düzeyde kararlı ve fonksiyonel bir biyomimetik model sunduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu yapı, özellikle tanı amaçlı biyosensörlerde kullanılmak üzere güçlü bir adaydır. Hedefe özgü antijen tanıma yeteneği sayesinde, sadece tanı değil; aynı zamanda bağışıklık tepkisi oluşturma, biyobelirteç saptama ve aşı taşıyıcılığı gibi ileri biyomedikal uygulamalarda da kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu yönüyle sistem, hem temel araştırmalarda virüs taklit platformu olarak hem de uygulamalı tanı sistemlerinde güvenilir bir nanoteknolojik araç olarak değerlendirilebilir niteliktedir.
- Gerçekleştirilen elektrokimyasal analizler neticesinde, biyosensör platformunun işlevselliğine ve özgüllüğüne dair önemli veriler elde edilmiştir. Her iki voltametrik analiz sonucunda elde edilen bulgular, 4 nM düzeyindeki SARS-CoV-2 NL varlığında elektrokimyasal sinyalin anlamlı düzeyde arttığını, yani biyosensör sisteminin spesifik tanıma özelliğini yüksek başarıyla sergilediğini ortaya koymuştur. Antijen-antikor etkileşimi, yalnızca fiziksel bağlanmayı değil, aynı zamanda fonksiyonel bir elektrokimyasal yanıt oluşturma potansiyelini de beraberinde getirmiştir. CV ve SWV sonuçlarının birbirini doğrulayan yapıda olması, elektrot modifikasyonlarının güvenilir ve tutarlı bir şekilde gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır. Bu bağlamda, geliştirilen elektrot sisteminin, SARS-CoV-2 Spike proteininin hassas tespiti için umut vaat eden, özgün ve yüksek performanslı bir biyosensör platformu olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur.
- Gerçekleştirilen kalibrasyon çalışması sonucunda elde edilen veriler, geliştirilen biyosensörün SARS-CoV-2 NL antijenine karşı yüksek duyarlılıkla ve doğrusal bir yanıt aralığı içerisinde çalıştığını göstermiştir. 53 pM ile 8 nM arasında elde edilen doğrusal ilişki ($R^2 = 0.9943$), sistemin ölçüm güvenilirliğini ve analitik kararlılığını açıkça ortaya koymuştur. Bu sonuç, elektrokimyasal ölçümlerin hem tekrarlanabilir hem de tutarlı biçimde gerçekleştirilebildiğini ve biyosensörün hedef antijene karşı yüksek özgüllükle çalıştığını teyit etmektedir. Böylece, sunulan platformun, SARS-CoV-2 benzeri viral yapılar için erken tanıya yönelik hızlı, güvenilir ve hassas tespit sistemleri arasında güçlü bir aday olduğu sonucuna ulaşılmıştır.
- Yapılan analitik değerlendirmeler sonucunda, geliştirilen biyosensörün yalnızca duyarlılık açısından değil, aynı zamanda tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik ve doğruluk bakımından da yüksek performans sergilediği ortaya konmuştur. 3.79 pM

seviyesinde belirlenen algılama sınırı, sistemin ultra düşük konsantrasyonlardaki SARS-CoV-2 NL varlığını güvenle tespit edebildiğini gösterirken, %100.95 oranındaki ölçüm doğruluğu ve %0.33'lük RSD değeri, sensörün istikrarlı ve güvenilir çalıştığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, farklı elektrotlarla yapılan testlerde %99 düzeyinde tutarlılık sağlanmış olması, sistemin üretime ve saha uygulamalarına uygunluğunu da desteklemektedir. Tüm bu sonuçlar, geliştirilen biyosensörün sadece laboratuvar düzeyinde değil, aynı zamanda klinik ve pratik uygulamalarda da güçlü bir tanı aracı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

- Literatürde yer alan birçok biyosensör sistemi karmaşık modifikasyonlar ve yüksek maliyetli nanomalzemeler gerektirirken, bu çalışmada geliştirilen platform yalın yapısıyla dikkat çekmektedir. Üretim sürecindeki sadelik, sistemin hem uygulanabilirliğini hem de sürdürülebilirliğini artırmıştır. Ayrıca, antijen-antikor etkileşimine dayalı güvenilir sinyal üretimi sayesinde yüksek özgüllük ve tutarlılık sunmuş; literatürdeki gelişmiş sistemlerle karşılaştırıldığında sade ama etkili bir alternatif olarak öne çıkmıştır.
- Gerçekleştirilen kontrol ve girişim analizleri, geliştirilen biyosensör sisteminin yüksek seçicilik ve özgüllüğe sahip olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Hem antijen içermeyen yapılarla hem de kompleks biyolojik matrislerle yapılan testlerde düşük sapma oranları elde edilmiş; sistem yalnızca hedef antijen olan SARS-CoV-2 NL'ye karşı anlamlı elektrokimyasal yanıt üretmiştir. Bu sonuçlar, sensörün yanlış pozitif riski taşımadan çalışabildiğini ve klinik örneklerde uygulanabilirliğe sahip, güvenilir bir tanı platformu sunduğunu göstermektedir.



KAYNAKLAR

- [1] **Seo G, Lee G, Kim MJ, Baek SH, Choi M, Ku KB, Lee CS, Jun S, Park D, Kim HG** (2020) Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. *ACS Nano*.14(4):5135–5142.
- [2] **Andrianova MS, Panova OS, Titov AA, Komarova NV, Kuznetsov A** (2023) Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection. *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2023;78:231–254.
- [3] **Orooji Y, Sohrabi H, Hemmat N, Barati A, Kazemnejad N, Babaei M, Shariati S, Dabbagh A, Bagheri A, Mokhtarzadeh A, Mohaghegh M, Maleki A** (2021) An overview on SARS CoV 2 (COVID 19) and other human coronaviruses and their detection capability via amplification assay, chemical sensing, biosensing, immunosensing, and clinical assays. *Nano Micro Lett.* 13(1):1–30.
- [4] **Zhao Z, Cui H, Song W, Ru X, Zhou W, Yu X** (2020) A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2. *bioRxiv*.
- [5] **Koczula KM, Gallotta A.** (2016) Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 60:111–120.
- [6] **David A, Scott L, Jugwanth S, Gihwala D, Singh B, Baillie V, Khoosal M, Hsiao M, Mayne E, Garrett N, Samsunder N, Strydom A, Madurai S, Doolabh D, Naicker D, Ntombela N, Maharaj A, Ramphal U, Bhorat QE, Wadee S, Yende-Zuma N, Van Zyl G, Esterhuizen TM, Shenje J, Mlisana K, Bekker LG, Gray G, Williamson C, Moore PL, Morris L** (2021) Operational characteristics of 30 lateral flow immunoassays used to identify COVID 19 immune response. *J Immunol Methods.* 496:113096.
- [7] **Pang J, Wang MX, Ang IYH, Tan SHX, Lewis RF, Chen JI, Gutierrez RA, Gwee SXW, Chua PEY, Yang Q, Ng XY, Yap RK, Tan HY, Teo YY, Tan CC, Cook AR, Yap JC, Hsu LY** (2020) Potential rapid diagnostics, vaccine and therapeutics for 2019 novel coronavirus (2019 nCoV): A systematic review. *J Clin Med.* 9(3):623.
- [8] **Antiochia R** (2021) Developments in biosensors for CoV detection and future trends. *Biosens Bioelectron.* 173:112777.
- [9] **Ishikawa FN, Chang HK, Curreli M, Liao HI, Lee K, Cote RJ, Thompson ME, Zhou C** (2009) Label-free, electrical detection of the SARS virus N protein with nanowire biosensors utilizing antibody mimics as capture probes. *ACS Nano.* 3(4):1219–1224.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [10] **Layqah LA, Eissa S** (2019) An electrochemical immunosensor for the corona virus associated with the Middle East respiratory syndrome using an array of gold nanoparticle modified carbon electrodes. *Microchim Acta*. 186(4):224.
- [11] **Qiu G, Gai Z, Tao Y, Schmitt J, Kullak-Ublick GA, Wang J** (2020) Dual functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection. *ACS Nano*. 14(5):5268–5277.
- [12] **Zamzami MA, Rabbani G, Ahmad A, Basalah A, Alsaieedi A, Al-Qahtani M, Pakistani M, Choudhry H** (2022) Carbon nanotube field-effect transistor (CNT FET)-based biosensor for rapid detection of SARS-CoV 2 (COVID 19) surface spike protein S1. *Bioelectrochemistry*. 143:107982.
- [13] **Kim J, Jeong S, Sarawut S, Chang Y, Kim S, Choi J, Park TJ** (2022) Functional Nanomaterials Enhancing Electrochemical Biosensors as Smart Tools for Detecting Infectious Viral Diseases. *Lab Chip*. 22(5):899–907.
- [14] **Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Yang L, Zhou P** (2023) Nanotechnology-assisted biosensors for the detection of viral nucleic acids. *Biosensors*. 13(2):168.
- [15] **Curulli A** (2023) Functional Nanomaterials Enhancing Electrochemical Biosensors as Smart Tools for Detecting Infectious Viral Diseases. *Molecules*. 28(14):3777.
- [16] **Pan M, Lednický JA, Wu CY** (2019) Collection, particle sizing and detection of airborne viruses. *J Appl Microbiol*. 127(6):1596–1611.
- [17] **Rabbani G, Khan ME, Khan AU, Syed M, Zamzami MA, Ahmad A, Bashiri AH, Zakri W** (2024) Label-free and ultrasensitive electrochemical transferrin detection biosensor based on a glassy carbon electrode and gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 256(Part 1):128312.
- [18] **Dinçyürek Ekici D** (2018) Meme kanseri tedavisi için nanolipozomal antikanser ilaç sistemleri ve tasarımı. *Doktora Tezi*, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- [19] **Morina D** (2019) pH duyarlı lipozom taşıyıcı sistemlere yüklenmiş hidrofilik ilaçların beyin travması üzerine etkisinin incelenmesi. *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- [20] **Nizam N** (2021) Melissa officinalis L. bitkisinin etanol ekstraktının nanolipozomal formülasyonunun antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- [21] **Kırtıl E, Öztop MH** (2014) Enkapsülasyon maddesi olarak lipozom ve gıdalarda kullanımı: Yapısı, karakterizasyonu, üretimi ve stabilitesi. *Akademik Gıda*. 12(4):41–57.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [22] **Jesorka A, Orwar O** (2008) Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*. 1:801–832.
- [23] **Tecimen S (2021)** Nanolipozomlar içinde enkapsüle edilen incir lateksi ve fisin enziminin HT 29 insan kolon kanser hücre hattında incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- [24] **Lombardo D, Kiselev MA** (2022) Methods of liposomes preparation: Formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics*. 14(3):543.
- [25] **Bük V** (2014) Aljinat CuO GOD temelli amperometrik glukoz biyosensörünün geliştirilmesi ve elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [26] **Lombardo D, Kiselev MA** (2022) Methods of liposomes preparation: Formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application. *Pharmaceutics*. 14(3):543.
- [27] **Pradhan B, Kumar N, Saha S, Roy A** (2015) Liposome: Method of preparation, advantages, evaluation and its application. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. 3(3):22–30.
- [28] **Kalsi BS, Singh S, Alam MS** (2022) Influence of ultrasound processing on the quality of guava juice. *Journal of Food Process Engineering*. 45(11):e14163.
- [29] **Li Y, Zhao X, Zu Y, Zhang Y** (2015) Preparation and characterization of paclitaxel nanosuspension using novel emulsification method by combining high speed homogenizer and high pressure homogenization. *International Journal of Pharmaceutics*. 490(1–2):324–333.
- [30] **Dürer RA** (2024) COVID-19’da aşı ve hastalık sonrası oluşan nötralizan hastalığın süresi ve şiddeti açısından prediktif değeri. *Doktora Tezi*, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- [31] **Akgül A** (2023) COVID-19 için etkili bir tedavi yöntemi olarak hedefe yönelik ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı.
- [32] **Shi Y, Wang G, Cai X, Deng J, Zheng L, Zhu H, Zheng M, Yang B, Chen Z** (2020) An overview of COVID-19. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 21(5):343–360.
- [33] **Maia R, Carvalho V, Faria B, Miranda I, Catarino S, Teixeira S, Lima R, Minas G, Ribeiro J** (2022) Diagnosis methods for COVID-19: A systematic review. *Micromachines*. 13(2):134.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [34] **Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A, Spandidos DA, Libra M** (2021) Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 47:100.
- [35] **Sheikhzadeh E, Eissa S, Ismail A, Zourob M** (2020) Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. *Talanta*. 220:121392.
- [36] **Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I** (2021) Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(2):441–455.
- [37] **Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS** (2020) A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics (v.20200321). *Broad Institute Protocol Document*.
- [38] **Jalandra R, Yadav AK, Verma D, Dalal N, Sharma M, Singh R, Kumar A, Solanki PR** (2020) Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 129:110446.
- [39] **Diao B, Wen K, Chen J, Liu Y, Yuan Z, Han C, Chen Y, Pan Y, Chen L, Dan Y, Wang J, Chen Y, Deng G, Zhou H, Wu Y** (2020) Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *Clinical Microbiology Journal (J Clin Microbiol)*. 58(8):e01932-20.
- [40] **Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, Zhou Q, Ye H, Li H, Xiao X, Gao P, Ma W** (2020) Antibody detection and dynamic characteristics in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 71(8):1930–1934.
- [41] **Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, Wang X, Yuan J, Li T, Li J, Qian S, Hong C, Wang F, Liu Y, Wang Z, He Q, Li Z, He B, Zhang T, Zhang Z** (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 71(16):2027–2034.
- [42] **Antiochia R** (2022) Electrochemical biosensors for SARS-CoV-2 detection: Voltametric or impedimetric transduction? *Bioelectrochemistry*. 147:108190.
- [43] **Park TJ, Hyun MS, Lee HJ, Lee SY, Ko S** (2009) A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Talanta*. 79(2):295–301.
- [44] **Zuo B, Li S, Guo Z, Zhang J, Chen C** (2004) Piezoelectric immunosensor for SARS-associated coronavirus in sputum. *Analytical Chemistry*. 76(13):3536–3540.
- [45] **Wan Y, Su Y, Zhu X, Liu G, Fan C** (2013) Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*. 47:1–11.
- [47] **Mu HY, Lu YL, Hsiao TH, Huang JH** (2020) Microfluidic-based approaches for COVID-19 diagnosis. *Biomicrofluidics*. 14(6):061504.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [48] Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, Soni D, Das S, Hasan M, Patel M, Senan AM, Gorantla S, McMillan J, Edagwa B, Eisenberg R, Gurumurthy CB, Reid SPM, Punyadeera C, Chang L, Gendelman HE (2021) Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature Materials*. 20(5):593–605.
- [49] Lee SG, Zarei M (2022) Chapter 16 – “Lab-on-a-phone” project: Micro- and nanotechnology-enabled applications for portable miniaturized analytical systems. In: Zarei M (ed.) *Micro- and Nanotechnology Enabled Applications for Portable Miniaturized Analytical Systems*. pp. 375–400.
- [50] Priyadarshi K, Nag VL, Kombade SP, Gadapalli RS, Misra S, Singh K (2020) Molecular diagnosis of COVID-19: An update and review. *Annals of the National Academy of Medical Sciences (India)*. 3(2):126–137.
- [51] Mengüllüoğlu U (2018) Ferritin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi esaslı immünosensör geliştirilmesi. *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 131 s.
- [52] Tanrıverdi S (2012) Spectrophotometric and amperometric biosensors based on conducting polymers of 1-benzyl-2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrole and (4,7-dithien-2-yl-2,1,3-benzothiadiazole). *Yüksek Lisans Tezi*, Middle East Technical University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara, 108 s.
- [53] Yazıcı B (2017) Klenbuterol tayini için altın nanopartikül katkılı potansiyometrik immünosensör geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 87 s.
- [54] Şahin S (2016) Monoklonal CEA antikoru immobilizasyonu ile carcinoembryogenic antigen (CEA) tespiti için altın nanoparçacıkla modifiye edilmiş baskılı altın elektrot tabanlı etiketsiz elektrokimyasal impedimetrik immünosensör geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [55] Uysal İ (2024) Nanomalzeme temelli elektrokimyasal sensör ve biyosensörlerin geliştirilmesi ve uygulamaları. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [56] Dzyadevych SV, Arkhipova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N (2008) Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*. 29(3):171–180.
- [57] Özbek O (2021) Valproat-seçici potansiyometrik biyosensör: Biyolojik ve farmasötik örneklerdeki uygulamaları. *Doktora Tezi*, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tokat.
- [58] Sharifi H (2023) 5-Metoksi-2-((4-(3-metil-3-fenil-siklobütil)-tiyazol-2-il)-hidrazon)-fenil-metil-fenol maddesinin sensör elektrot olarak kullanılmasının araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [59] **Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA** (1998) *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Orlando, FL: Harcourt Brace College Publishers.
- [60] **Gupta VK, Jain R, Radhapyari K, Jadon N, Agarwal S** (2011) Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. *Analytical Biochemistry*. 408(2):179–196.
- [61] **Mirceski V, Skrzypek S, Stojanov L** (2018) Square-wave voltammetry. *ChemTexts*. 4:17.
- [62] **Berggren C, Bjarnason B, Johansson G** (2000) Capacitive biosensors. *Electroanalysis*. 12(3):173–180.
- [63] **Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV** (2008) Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors*. 8(4):2569–2588.
- [64] **Al-Sadoon MTN** (2019) Characterization of HRP-based amperometric biosensor by using screen printed electrodes. *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes University, Graduate School of Science, Department of Biology, Kayseri.
- [65] **Rodríguez-Delgado MM, Alemán-Nava GS, Rodríguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martínez-Chapa SO, Barceló D, Parra R** (2015) Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*. 74:21–45.
- [66] **Kavacık M** (2022) İnsan serumundaki kolesterol seviyesinin yeni bir biyosensörle belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zonguldak.
- [67] **Kazıcı D** (2024) Antikor temelli voltametrik biyosensör ile anti-Müllerian hormon düzeyinin elektrokimyasal olarak belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- [68] **Bhardwaj T** (2015) Review on biosensor technologies. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET)*. 6(2):36–62.
- [69] **Torres MDT, de Araujo WR, de Lima LF, Ferreira AL, de la Fuente-Nunez C** (2021) Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. *Nature Communications*. 4(7):2403–2416.
- [70] **Raziq A, Kidakova A, Boroznjak R, Reut J, Öpik A, Syritski V** (2021) Development of a portable MIP-based electrochemical sensor for detection of SARS-CoV-2 antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. 178:113029.
- [71] **Curti F, Fortunati S, Knoll W, Giannetto M, Corradini R, Bertucci A, Careri M** (2022) A folding-based electrochemical aptasensor for the single-step detection of the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 14(15):17405–17413.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [72] **Vadlamani BS, Uppal T, Verma SC, Misra M** (2020) Functionalized TiO₂ nanotube-based electrochemical biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2. *Sensors*. 20(20):5871.
- [73] **Tabrizi MA, Nazari L, Acedo P** (2021) A photo-electrochemical aptasensor for the determination of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor-binding domain by using graphitic carbon nitride-cadmium sulfide quantum dots nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 343:130377.
- [74] **Tabrizi MA, Acedo P** (2022) An electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for the determination of SARS-CoV-2-RBD using a carbon nanofiber-gold nanocomposite modified screen-printed electrode. *Biosensors*. 12(3):142.
- [75] **Liustrovaite V, Drobysh M, Rucinskiene A, Baradoke A, Ramanaviciene A, Plikusiene I, Samukaite-Bubniene U, Viter R, Chen CF, Ramanavicius A** (2022) Towards an electrochemical immunosensor for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of The Electrochemical Society*. 169(3):037523.
- [76] **Hazra M, Singh SK, Ray S** (2011) Surface modification of liposomal vaccines by peptide conjugation. *Journal of PharmSciTech*. 1(1):41–47.
- [77] **Kuwajima K, Yagi-Utsumi M, Yanaka S, Chandak M** (2022) Use of spin desalting columns in dimethylsulfoxide-quenched H/D-exchange 2D NMR spectroscopy with fully unfolded proteins. *Molecules*. 27(23):8232.
- [78] **Khan R, Kaushik A, Solanki PR, Ansari AA, Pandey MK, Malhotra BD** (2008) Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 616(2):207–213.
- [79] **Eguilaz M, Villalonga R, Agui L, Yañez-Sedeño P, Pingarrón JM** (2011) Gold nanoparticles:poly(diallyldimethylammonium chloride)–carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: application to the determination of cholesterol. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 661(1):171–178.
- [80] **Saxena U, Chakraborty M, Goswami P** (2011) Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 26(6):3037–3043.
- [81] **Katsaras J, Raghunathan VA** (2000) Aligned lipid–water systems. In: Gutberlet T, Katsaras J (Eds.) *Lipid Bilayers: Structure and Interactions*. ss. 25–46. Springer.
- [82] **Akbarzadeh A, Rezaei Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati Koshki K** (2013) Liposome: Classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*. 8(1):102.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [83] Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR (2018) Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 10(2):57.
- [84] Ong SGM, Chitneni M, Lee KS, Ming LC, Yuen KH (2016) Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics*. 8(4):36.
- [85] Schneider T, Sachse A, Roessling G, Brandl M (1995) Generation of contrast carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. *International Journal of Pharmaceutics*. 117(1):1–12.
- [86] Morais Armas S, Medina Suárez S, Machín F (2023) Effect of carrier yeast RNAs in the detection of SARS-CoV-2 by RT-LAMP. *microPublication Biology*.
- [87] Sahaya Glingston R, Yadav J, Rajpoot J, Joshi N, Nagotu S (2021) Contribution of yeast models to virus research. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 105(12):4855–4878.
- [88] Hazra M, Singh SK, Ray S (2011) Surface modification of liposomal vaccines by peptide conjugation. *AAPS PharmSciTech*. 1(1):41–47.
- [89] Jarallah SJ, Aldossary AM, Tawfik EA, Altamimi RM, Alsharif WK, Alzahrani NM, Sobeai HMA, Qamar W, Alfahad AJ, Alshabibi MA (2023) GL67 lipid based liposomal formulation for efficient siRNA delivery into human lung cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 31(7):1139–1148.
- [90] Barth A (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*. 1767(9):1073–1101.
- [91] Zucchiatti P, Mitri E, Kenig SA, Billè F, Kourousias G, Bedolla DE, Vaccari L (2016) Contribution of ribonucleic acid (RNA) to the Fourier transform infrared (FTIR) spectrum of eukaryotic cells. *Analytical Chemistry*. 88(24):12090–12098.
- [92] Liustrovaite V, Drobysh M, Rucinskiene A, Baradoke A, Ramanaviciene A, Plikusiene I, Samukaite-Bubniene U, Viter R, Chen CF, Ramanavicius A (2022) Towards an electrochemical immunosensor for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of The Electrochemical Society*. 169(3):037523.
- [93] Amouzadeh Tabrizi M, Acedo P (2022) An electrochemical impedance spectroscopy based aptasensor for the determination of SARS-CoV-2 RBD using a carbon nanofiber–gold nanocomposite modified screen printed electrode. *Biosensors*. 12(3):142.
- [94] Tabrizi MA, Nazari L, Acedo P (2021) A photo-electrochemical aptasensor for the determination of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor-binding domain by using graphitic carbon nitride-cadmium sulfide quantum dots nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 343:130377.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- [95] **Pola CC, Rangnekar SV, Sheets R, Szydlowska BM, Downing JR, Parate KW, Wallace SG, Tsai D, Hersam MC, Gomes CL** (2022) Aerosol-jet-printed graphene electrochemical immunosensors for rapid and label-free detection of SARS-CoV-2 in saliva. *2D Materials*. 9(3):035016.





ÖZGEÇMİŞ

Fusun KAZANCI, ilkokul, ortaokul ve lise öğrenimini TED Zonguldak Kolejinde tamamladı. 2014 yılında Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. 2017 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Yüksek Lisans Programından mezun oldu. 2018 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır.