

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**VİRAL YAPILARIN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE
ELEKTROKİMYASAL TEMELLİ BİYOSENSÖR
PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

RÜMEYSA EKİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA - 2022

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**VİRAL YAPILARIN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE
ELEKTROKİMYASAL TEMELLİ BİYONSENSÖR
PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

HAZIRLAYAN

RÜMEYSA EKİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ

ANKARA - 2022

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Rûmeysa EKİCİ tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06 / 01 / 2022

Tez Adı: Viral Yapıların Tayininde Kullanılmak Üzere Elektrokimyasal Temelli Biyosensör Platformlarının Geliştirilmesi

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı - Soyadı, Kurumu)

İmza

Prof. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Ahmet Çabuk, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş, Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Ömer Faruk ELALDI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : ... / ... /

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 17/ 01/ 2022

Öğrencinin Adı, Soyadı: Rümeysa EKİCİ

Öğrencinin Numarası: 21910152

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Biyomedikal Mühendisliği

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Başlığı: Viral Yapıların Tayininde Kullanılmak üzere Elektrokimyasal Temelli
Biyosensör Platformlarının Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 17/ 01/ 2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

.../ 01/ 2022

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca tecrübesi ve bilgisiyle beni destekleyen, her zaman yanımda olan, her konuda anlayış gösteren, her konuda yardımcı olmaya çalışan ve olaylara daha anlamlı bakmamı sağlayan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a en içten teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarım da yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, akademik bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Betül BOZDOĞAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Orhan Erdem HABERAL'a ve Dr. Öğr. Üyesi Tansel UYAR'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

SEM görüntülerini çekmemizde bize zaman ayıran ve yardımcı olan saygıdeğer Erdem BARIŞ'a, deneysel çalışmalarımızda bize laboratuvarlarını açan Biyotek TEKMER Genel Müdürü Ali İhsan ÜNLÜ'ye, N proteinlerini temin etmemizi sağlayan Özgür NAMAL'a ve Dr. Öğr. Üyesi İbrahim SÖZDUTMAZ'a en içten teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde yaptığım tüm çalışmalarda beni motive eden, bana her zaman destek olmaya çalışan ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Betül ÇİMEN'e: Her zaman yanımda olmalarından mutluluk duyduğum, tez yazım sürecimde desteklerini ve motivasyonlarını esirgemeyen beni ayakta tutan arkadaşlarım Esra GÖKMEN'e ve Tuğba TAŞTEKİN'e, sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, beni karşılıksız sevgi, emek ve destekleri ile büyüten, üzüldüğümde üzülen sevindiğim benden daha fazla mutlu olan, kararlarıma her zaman saygı duyup sonsuz güvenen can ötelerim annem Şeyma EKİCİ'ye ve babam Hasan EKİCİ'ye; her zaman yanımda olan, beni güldüren, mutlu eden, motivasyonumun yükselmesini sağlayan, aramızda 10 yaş olmasına rağmen benden daha olgun davranan yakışıklı kardeşim Nevzat Efe EKİCİ'ye teşekkürü bir borç bilirim...

ÖZET

RÜMEYSA EKİCİ

VİRAL YAPILARIN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE

**ELEKTROKİMYASAL TEMELLİ BİYOSENSÖR PLATFORMLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2022

Virüslerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklar (influenza, Zika, insan immün yetmezliği, Ebola, dang, hepatit ve Covid-19 virüsü gibi) yüzyılın son çeyreği boyunca tüm dünyanın gündeminde olan ve insanların en önemli sorunlarından biri haline gelen hastalıklardır.

Hastalığa yakalanan kişilerin acil olarak tanımlanması, hastalığa yakalanan bu kişilerin etkili bir şekilde tedavi edilmesini sağlayacaktır. Bu bağlamda, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı yöntemler, hassasiyetle yanıt veren en genel ve yaygın olarak kullanılan yöntem olmuştur. Bununla birlikte, PCR uygulamalarında karşılaşılan bazı dezavantajlar nedeniyle (özellikle; test protokolündeki detaylar, zaman açısından uzun sürmesi, ekonomik olmaması, kullanıcının uzman olması gerekliliği, alanda/alan ölçümleri vb. için uygun olmaması vb), yeni nesil (bir başka deyimle hızlı sonuç verebilen, ekonomik, hassas, yerinde uygulama için uygun vb.) çözüm sağlayabilecek sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çok sayıda test tabanlı analiz yöntem ve tekniğinde kullanılan farklı test-teşhis uygulamaları konusunda elektroanalitik sistemlerin önemli avantajları vardır. Bu sunum kapsamında, elektrot yüzeylerinin uygun biyokimyasal ve viral yapılar kullanılarak yüzey baskılı elektrotlar için düşük maliyetli, minyatürleştirilmiş elektrokimyasal platformlar uygun ajanlarla dekore edilmiştir. Bu platformlar, viral patojenik hastalıkların tanımlanması için bazı özel viral proteinlerin belirlenmesi şeklinde kullanılabilir.

Bu çalışmada; bakır ile modifiye edilmiş olan grafit elektrotlar geliştirilmiş ve SEM ile karakterize edilmiştir. Geliştirilen elektrotlar değerlendirilen numunelerdeki protein miktarını ölçmek için Covid-19 N proteini antikoru ile donatılmıştır. Dönüşümlü voltametri (CV) sinyallerine bakıldığında N protein antikoru kaplanmış elektrodun 1.156 mA olduğu, N protein antijeni ile kaplanan elektrodun 0.712 mA olduğu saptanmıştır. N protein saptamasında modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan ölçümlerde önce bilinmeyen numuneler için bir

kalibrasyon eğrisi hazırlanmış ve daha sonra N protein miktarı virüs pozitif veya virüs negatif olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Elektrokimyasal biyosensör, viral patojen, elektrot modifikasyonu



ABSTRACT

Rümeysa EKİCİ

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL BASED BIOSENSOR PLATFORMS TO BE USED IN THE DETERMINATION OF VIRAL STRUCTURES

Baskent University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biomedical Engineering

2022

Infectious diseases caused by viruses (such as influenza, Zika, human immunodeficiency, Ebola, dengue, hepatitis and Covid-19 virus) are diseases that have been on the agenda of the whole world for the last quarter of the century and have become one of the most important problems of people.

Urgent identification of the people infected with the disease will allow these people who have contracted the disease to be treated effectively. In this context, the polymerase chain reaction (PCR) based methods have been the most common and widely used method that responds with sensitivity. However, due to some disadvantages encountered in PCR applications (in particular; the test protocol is comprehensive, not fast in terms of time, not economical, requires user expertise, is not suitable for field/on-site measurements, etc.), the new generation (which can give fast results, economical, sensitive, suitable for on-site application, etc.) systems that can provide solutions are needed. On the subject of different test-diagnostic applications used in a large number of test-based analysis methods and techniques, electroanalytical systems have some advantages. Within the scope of this presentation, a low-cost, miniaturized electrochemical platforms for surface-printed electrodes by using appropriate biochemical and viral structures of the electrode surfaces decorated with suitable agents. These platforms can be used as the determination of some particular viral proteins for the understanding of viral pathogenic diseases.

In this study; copper modified graphite electrode was developed and characterized with SEM. Afterwards an antibody of N protein of Covid-19 was decorated surrounding this electrode to measure the amount of that protein in the samples. When the Cyclic voltammetry (CV) signals were examined, it was determined that the electrode coated with N protein antibody was 1.156 mA, and the electrode coated with N protein antigen was 0.712 mA. It has been shown that there is an obvious effect on the electrochemical activity of modified electrodes in the detection of N protein. In these measurements first a calibration curve was

performed for the unknown samples then the amount of N protein was determined as virus positive or not.

Keywords: Electrochemical biosensor, viral pathogen, electrode modification



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Patojen Ne İfade Eder?	3
2.2. Patojenlerin Enfeksiyon Yetenekleri	3
2.3. Patojenlerin Konakçıyı Hasta Etmesi.....	3
2.3.1. Patojenlerin bulaşma yolları ve belirtileri	3
2.4. Patojen Tipleri	4
2.4.1. Bakteriler	5
2.4.2. Mantarlar	5
2.4.3. Parazitler	5
2.4.4. Virüsler	5
2.5. Solunum Virüsleri	7
2.6. Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2)	9
2.6.1. SARS-CoV-2 virionlarının protein yapısı	10
2.6.2. SARS-CoV-2 virüslerinin bulaşma yolları ve yayılması.....	12
2.6.3. SARS-CoV-2 virüsünde fiziksel mesafe	13
2.6.4. SARS-CoV-2 klinik belirtileri semptomları.....	13
2.6.5. Hücre bağlanması ve patogenezi.....	14
2.6.6. Reseptör bağlama alanı ve ACE-2 reseptörü.....	15

2.6.7. SARS-CoV-2 hayat döngüsü	16
2.6.8. Yüzeylerde virüs dayanıklılığı.....	17
2.6.9. Hastalardan numune alınması	18
2.6.10. SARS-CoV-2 için önleme taktikleri.....	19
2.7. SARS-CoV-2’de Nanoteknoloji.....	19
2.8. SARS-CoV-2’nin Teşhis Ve Tespit Yaklaşımları	21
2.8.1. Polimeraz zincir reaksiyonu ve nükleik asit amplifikasyon testleri	21
2.8.2. Bilgisayarlı tomografi.....	23
2.8.3. Bakım noktası teşhisi (POCT).....	24
2.8.4. Hızlı antijen testleri (RAT).....	25
2.8.5. SARS-CoV-2 için antikor testleri.....	25
2.8.6. Nanoteknoloji tabanlı sensörler	25
2.9. Biyobelirteçler	26
2.9.1. SARS-CoV-2 virüsünde nükleokapsid (n) spesifik antijen	26
2.10. Biyosensörler.....	27
2.10.1. Elektrokimyasal biyosensörler	29
2.10.2. Potansiyometrik elektrokimyasal sensörler	30
2.10.3. Voltametri	30
2.10.4. Döngüsel voltametri (CV) ve Kare dalga voltametrisi (SWV)	30
2.10.5. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS).....	31
3. MATERYAL METOD.....	32
3.1. Kullanılan Kimyasallar	32
3.1.1. Kalem grafit elektrotlarının (PGE) hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar	32
3.1.2. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 Nükleokapsid proteini antikoru ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar	32
3.2. Kullanılan Cihazlar	33

3.3. Elektrotların Modifikasyonu	33
3.3.1. Hidroksiapatit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi/kaplanması.....	33
3.3.2. Bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi	35
3.3.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi/kaplanması.....	38
3.3.4. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 nükleokapsid antikoru ile fonksiyonelleştirilmesi	40
3.3.5. COVID-19 nükleokapsid antikoru ile fonksiyonelleştirilmiş kalem grafit elektrotlar ile antijen tespiti	42
3.4. Hazırlanan Elektrotların Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları.....	43
3.4.1. Hazırlanan elektrotlarla elektrokimyasal çalışmalar ve analiz	43
3.4.2. Elektrokimyasal hücre	43
3.4.3. Çözeltilerin hazırlanması.....	44
3.4.4. Elektrotların davranışlarının incelenmesi	44
3.5. Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu	45
3.5.1. Hazırlanan elektrotların morfolojik karakterizasyonu	45
4. DENEYSEL BULGULAR.....	46
4.1. Hazırlanan Elektrotların Morfolojik Karakterizasyonu.....	46
4.1.1. Modifiye edilmemiş elektrotların karakterizasyonu.....	46
4.1.2. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların karakterizasyonu	48
4.1.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların karakterizasyonu.....	50
4.2. Elektrokimyasal Analiz Sonuçları	53
4.2.1. Dönüşümlü voltametre analiz sonuçları.....	53
4.2.2. Bakır oksit modifiye edilmiş elektrotların CV analiz sonuçları	53
4.2.2.1. Bakır oksit içerisindeki NaOH derişiminin elektrot cevabına etkisi ve analiz sonuçları	53

4.2.2.2. Bakır oksit içerisindeki NaOH çözeltisi oranlarının elektrot cevabına etkisi ve analiz sonuçları	54
4.2.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların CV analizi	56
4.2.3.1. Hidroksiapatit ve bakır oksit içerisindeki CuSO_4 ve NaOH derişiminin elektrot cevabına etkisi ve analiz sonuçları	56
4.2.4. Elektrokimyasal yöntem ile antijen tespiti.....	63
5. SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR.....	69



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Patojenlerin yaptığı bazı hastalıklar	7
Tablo 2.2. Solunum Yolu Virüsleri	8
Tablo 2.3. SARS-CoV-2 virüsünün gözenekli ve gözeneksiz yüzeylerdeki stabilitesi.....	17
Tablo 4.1. Literatürde daha önce geliştirilmiş elektrokimyasal SARS-CoV-2 sensörleriyle karşılaştırma	66



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Patojenlerin bulunduğu alanlar [16]	4
Şekil 2.2. Virüsün basit yaşamsal döngüsü [17].....	6
Şekil 2.3. Viral zarın tomurcuklanma ile alınması	7
Şekil 2.4. Koronavirüs enfeksiyonlarının geçmişi [28].....	8
Şekil 2.5. İnsan koronavirüslerine genel bakış [32]	9
Şekil 2.6. SARS-CoV-2'nin şematik görüntüsü [56].....	11
Şekil 2.7. SARS-CoV-2 virüsünün bulaşması [57] [59]	13
Şekil 2.8. SARS-CoV-2'nin hücreye bağlanması, viral girişi ve replikasyonu [80].....	15
Şekil 2.9. Nazofaringeal (NP) sürüntü numunesi alınması	19
Şekil 2.10. SARS-CoV-2 önleyici nanoteknoloji tabanlı stratejiler [98]	20
Şekil 2.11. PCR testinin akış şeması [110].....	22
Şekil 2.12. Biyomimetrik virüs hedefleme [114]	23
Şekil 2.13. Virüsün nanoparçacık tabanlı kolorimetrik tespiti [114]	24
Şekil 2.14. Biyosensör bileşenleri ve çalışma prensibi [138].....	28
Şekil 2.15. Virüs tespiti için elektrokimyasal biyosensörlerin prensibi [1]	29
Şekil 3.1. (A) Hidroksiapatit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi ve (B) kapalı sistemin gösterilmesi	35
Şekil 3.2. (A) Bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi, (B) kapalı sistemin gösterilmesi ve (C) elektrotların kurutulması	37
Şekil 3.3. CV ölçüm analizi deney düzeneği.....	37
Şekil 3.4. (A) HAP ve CuO modifiyeli kalem grafit elektrotların hazırlanması ve (B) HAP ve CuO modifiyeli kalem grafit elektrotların kapalı ortamda 24 saat bekletilmesi	40
Şekil 3.5. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 nükleokapsid antikoru ile fonksiyonelleştirilmesinin adımları.....	42
Şekil 3.6. Üçlü elektrot sistemi ve kabloların bağlanmasının gösterilmesi.....	44
Şekil 3.7. SEM-EDX cihazı.....	45
Şekil 4.1. Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun SEM görüntüleri (A) büyütme oranı 300 x, (B) büyütme oranı 80 000 x	47

Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun EDX görüntüsü silisyum elementinin varlığı, büyütme oranı 1 300 x	47
Şekil 4.3. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrodun SEM görüntüsü (A) büyütme oranı 300 x, (B) büyütme oranı 20 000 x	49
Şekil 4.4. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların EDX görüntüsü, büyütme oranı 12 000 x.....	49
Şekil 4.5. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrodun SEM görüntüleri, büyütme oranları (A) 300 x, (B) 1 300 x, (C) 40 000 x	51
Şekil 4.6. CaP tuzları ile bakır modifiye edilmiş elektrotların EDX görüntüleri, büyütme oranları (A) 3 000 x, (B) 6 000 x	52
Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M CuSO ₄ +0.1M NaOH 1:1, 0.5M CuSO ₄ +0.3M NaOH 1:1, 0.5M CuSO ₄ +0.5M NaOH 1:1 çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	54
Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M CuSO ₄ +0.5M NaOH 1:1, 0.5M CuSO ₄ +0.5M NaOH 1:3, 0.5M CuSO ₄ +0.5M NaOH 1:5 çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	55
Şekil 4.9. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.05M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	57
Şekil 4.10. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.1M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	58
Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.2M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	59
Şekil 4.12. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.3M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	60
Şekil 4.13. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	61
Şekil 4.14. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.7M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	62
Şekil 4.15. Modifiye edilmemiş elektrot, 1M CuSO ₄ *5H ₂ O çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri.....	63
Şekil 4.16. 6,4x10 ⁻¹⁴ ile 1x10 ⁻⁹ g/mL aralığında farklı NP derişimleri ve farklı sürelerde (1, 5 ve 10 dakika) inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} redoks probunda kaydedilmiş SWV akım baskılanmasının (ΔI) NP derişimlerinin logaritmik fonksiyonuna karşı grafiği.	64
Şekil 4.17. Farklı NP derişimlerinde 10 dakika inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} redoks probunda kaydedilmiş baseline düzeltilmiş kare dalga voltametrileri.....	65

Şekil 4.18. Kalibrasyon grafiği: farklı NP derişimlerinde 10 dakika inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunda kaydedilmiş akım sinyali baskılanmasının (ΔI) NP derişiminin logaritmik fonksiyonuna karşı çizilen analitik eğrinin doğrusal regresyonu. 66



SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE-2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Reseptörü
Ag/AgCl	Gümüş/Gmüş Klorür
AgNP	Gümüş Nanopartiküller
Al ⁺²	Alüminyum İyonu
AuNP	Altın Nanopartiküller
Au-S	Altın Sitrat Etkileşimi
BSA	Albumin
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
CaP	Kalsiyum Fosfat Bileşikleri
Cd ⁺²	Kadmiyum İyonu
cDNA	Tek Sarmallı Viral Deoksiribo Nükleik Asit
cm	Santimetre
COVID-19	Yeni Koronavirüs Hastalığı
Ct	Döngü Eşiği Değeri
Cu	Bakır
Cu ⁺²	Bakır İyonu
CuNP	Bakır Nanopartikül
CuO	Bakır Oksit
CuSO ₄ *5H ₂ O	Bakır(II) Sülfat Pentahidrat
CV	Döngüsel Voltametri
DC	Doğru Akım
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPV	Diferansiyal Puls Voltametri
E	Zarf Proteini
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride
EDX	Elektron Dağılım Spektroskopisi
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERGIC	Endoplazmik Retikulum - Golgi Ara Bölmesi
Fe(CN) ₆ ^{-3/-4}	Hekzasiyanoferrat
g/mL	Mililitre Başına Gram
HAP	Hidroksiapatit
HCF	Hekzasiyanoferrat
HCl	Hidroklorik Asit
H-CoV	İnsan Koronavirüsü
HE	Hemaglutinin – Esteraz Proteini
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
Hz	Frekans Birimi
IgG	İmmünglobulin G
IgM	İmmünglobulin M

KCl	Potasyum Klorür
(K ₃ Fe(CN ₆))	Potasyum Ferrisiyanür
(K ₄ Fe(CN ₆))	Potasyum Ferrosiyanür
KGE	Kalem Grafit Elektrot
KKD	Kişisel Koruyucu Donanım
LOD	Düşük Algılama Sınırı/ Tespit Sınırı
LOQ	Ölçüm Sınırı
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans
M	Molar
m	Metre
MP	Zar Proteini
mA	Miliamper
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
mg/mL	Mililitre Başına Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı Riboz Nükleik Asit
mV	Mili volt
N	Nükleokapsid Protein
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
(Na ₂ HPO ₄)	Sodyum Fosfat
(NaH ₂ PO ₄)	Monosodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NH ₃	Amonyak
NH ₄	Amonyum
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamonyum-Fosfat
(NH ₄ OH)	Amonyak
Ni ⁺²	Nikel İyonu
ng/mL	Mililitre Başına Nanogram
NHS	N- Hydroxysuccinimide
nm	Nanometre
NP	Nazofaringeal Sürüntüler
Nsps	Yapısal Olmayan Protein
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pg/mL	Mililitre Başına Pikogram
PGE	Kalem Grafit Elektrot
pH	Potansiyel Hidrojen
POCT	Bakım Noktası Teşhisi
pp1a	Viral Replikaz Poliproteinleri
pp1ab	Viral Replikaz Poliproteinleri
qRT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAT	Hızlı Antijen Testleri

RBD	Reseptör Bağlama Alanı
RNA	Riboz Nükleik Asit
RNP	Ribonükleoprotein
RSV	Solunum Sinsityal Virüsü
RTC	Replikaz-Transkriptaz Kompleksi
RT-PCR	Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	Başak Proteini
S1	Başak Protein Glikoproteinleri
S1-CTD	Başak Rekombinant Protein
S1-NTD	Başak Rekombinant Protein
S2	Başak Protein Glikoproteinleri
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPION	Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartiküller
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
TMPRSS-2	Transmembran Serin Proteaz-2
V	Volt
V/s	Volt/Saniye
w/v	Kütle/Hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Zn ⁺²	Çinko İyonu
α-	Alfa
β-	Beta
µm	Mikrometre
°C	Derece
µL	Mikrolitre
3D	Üç Boyutlu

1. GİRİŞ

Virüs kaynaklı enfeksiyon hastalıkları son çeyrek asırda tüm dünyanın gündemine oturan ve insanların en önemli problemlerinden biri haline gelen hastalıklardır. Konu ile ilgili olarak influenza, zika virüsü, HIV virüsü, ebola, hepatit ve SARS-CoV-2 virüsü bu tür hastalıkları oluşturan başlıca viral kaynaklardır. Söz konusu viral kaynakların belirtilen hastalıklara neden olmasını önleyebilmek amacıyla alınan en geçerli önlemlerden biri ilgili enfeksiyonel oluşumlara karşı aşı geliştirilmesi çalışmalarıdır. Ancak bu uygulamanın yanında belirtilen viral kaynakların bulaşıcı olmaları nedeniyle hastalığın bulaştığı kişilerin ivedilikle belirlenmesi hastalığa yakalanan bu kişilerin etkin bir şekilde tedavi edilebilmelerine olanak tanıyacaktır. Bu bağlamda yukarıda belirtilen viral rahatsızlıkların varlığını ortaya koymak üzere pek çok değişik teknik ve yöntem kullanılmakla beraber polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler moleküler boyutta ve hassasiyette yanıtlar verdiğinden en sık ve yaygın olarak kullanılan yöntemler olmuştur. Ancak PCR uygulamalarında karşılaşılan bazı olumsuzluklardan dolayı (özellikle test protokolünün kapsamlı olması, zaman yönünden hızlı olmaması, ekonomik olmaması, kullanıcı uzmanlığı gerektirmesi, alanda/yerinde ölçümlere uygun olmaması gibi) yeni nesil (hızlı sonuç verebilen, ekonomik, hassas, yerinde uygulamaya uygun vb.) çözümler sağlayabilen sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Konu ile ilgili olarak değişik test-tanı uygulamalarında kullanılan çok sayıda test-analiz yöntem ve tekniği bulunmakla beraber elektroanalitik temelli sistemler yukarıda belirtilen yeni nesil uygulamalara uygun birtakım üstünlükler sunmasından dolayı tüm dünyada üzerinde en yoğun çalışılan test-analiz teknik ve yöntemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır [1] [2] [3] [4].

Sunulan tez kapsamında düşük maliyetli, minyatürize edilmiş elektrokimyasal platformlar olan kalem grafit elektrotlar kullanılarak, bu elektrotların yüzeylerinin uygun biyokimyasal ajanlar ile dekore edilen ve viral yapıları (ya da bunların komponentlerini) tanıyan bu yapılar sayesinde hedeflenen viral yapıların tanımlanmasını sağlayacak ve yerinde ölçümlere olanak sağlayacak olan bir sistemin geliştirilmesi planlanmıştır.

Tezin temel amacı; değişik enfeksiyonel hastalıklara yol açan patojenik viral yapıların (Covid-19 gibi) teşhis edilebilmesi için düşük maliyetlerle üretilebilecek, yerinde ölçüme olanak tanıyabilecek, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar veren, uzman kullanıcı bilgi ve deneyimi gerektirmeyecek olan elektrokimyasal temelli test-tanı sisteminin geliştirilmesidir.

Tez kapsamında elektrokimyasal temelli test-tanı sisteminde yer alan elektrotlar tanıyıcı moleküllerin dekore edileceği yüzeyler olarak kullanılacaktır. Bu elektrotlardan

referans elektrodu, karşıt elektrot ve modifiye edilecek olan çalışma elektrodunu içeren l elektrot sistemi kullanılarak, ligand reseptör etkileşimi ile oluşabilen elektriksel değişimler (voltametrik, amperometrik veya konduktometrik) potansiyostat-galvanostat cihazı yardımıyla farklı metodlar (dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametrisi) ile ölçülecektir. Planlanan alışma kapsamında ilk olarak viral yapıların yüzey reseptörlerinin tanımlanması ve bu reseptörlere spesifik olarak bağlanan ligandlar/antikorlar belirlenecektir. Sonraki aşamada viral yapıların yüzeyindeki bu gruplara yüksek spesifikitede bağlanan ligandlar/antikorlar ile modifiye edilmiş elektrotlar gerekmektedir. Bu amaçla, belirlenen viral yapıların türüne özgü ligandlar antikorlar ile elektrotlar modifiye edilecektir. Bu modifikasyon işleminin gerçekleştirilmesi esnasında çeşitli malzemeler (iletken polimerler, nanopartiküller vb.) kullanılarak kompozit yapılar geliştirilecektir. Böylece yüzey alanı genişletilerek ligandlar/antikorlar ile modifiye edilmiş elektrotların daha fazla analit ile etkileşmesi sağlanacaktır. Modifikasyon sırasında kullanılan bu malzemeler ile elektron transferi de arttırılacak, böylece daha düşük derişimdeki reseptörler dahi saptanabilecektir. Bu da viral yapıların daha erken evrede teşhis edilebilmesi anlamına gelmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Patojen Ne İfade Eder?

Hastalığa neden olan organizmalara patojen denir. Patojen terimi; tek hücrelileri etkileyen mikroplar ve çok hücreli organizmaların işleyiş ve hücre bütünlüğünü bozan yapılar için kullanılmaktadır [5]. Patojenler vücuda girdiklerinde hastalığa neden olurlar. Hastalığa neden olan patojenler bağışıklık sistemini etkiler. Bu durum göz önüne alındığında konak hasarına neden olur. Hasara neden olan mikroplara patojen denir [6]. Konakçı, patojenin hayatta kalması ve yaşamına devam etmesi için ihtiyaç duyduğu bir şeydir. Konakçı olarak insan sıcak, nemli, patojenler için besin açısından zengin, stabil sıcaklıkta kalabilen ve sürekli kendini yenileyebilen bir ortamdır. Çoğu mikroorganizmanın böyle bir konakta hayatta kalması ve üreme yeteneğini geliştirmesi muhtemeldir [7].

2.2. Patojenlerin Enfeksiyon Yetenekleri

Virülans terimi hastalığa neden olma kabiliyetini ifade eder. Mikrobiyal bir niteliği açıklamak ve bir mikrobun hastalık yapma becerisini ayırt etmek için ifade edilmektedir [8]. Konakçı ve mikropların birbirlerini etkilemenin ve etkileşim oluşturmanın neticesi virülansdır. Virülans, patojenlerin veya patojen olmayanları ayrıştırılmasını virülans faktörleri ile ifade eder. Virülans faktörleri, hücre içi yaşamına devam etme yeteneği, istilayı kolaylaştırma, konakta bir mikrobun büyüyüp gelişmesi de dahil olmak üzere sayısız rolü vardır [9] [10]. Bağışıklık sisteminin bozukluğunda gerekli virülans faktörlerinden yoksun mikroplar, öldürücü olabilirler [11]. Virülans faktörleri bir konakçıda gelişmeye onay veren niteliklerin katılması, sayısız virüse yayılmasına izin verir. Çünkü konakçı hücrelerde replikasyon süreci patojenite ile ilişkilidir. Bazı mikroorganizmaların virülansı, konakçı dokulara hasar verme yeteneği ile ilgilidir [12] [13].

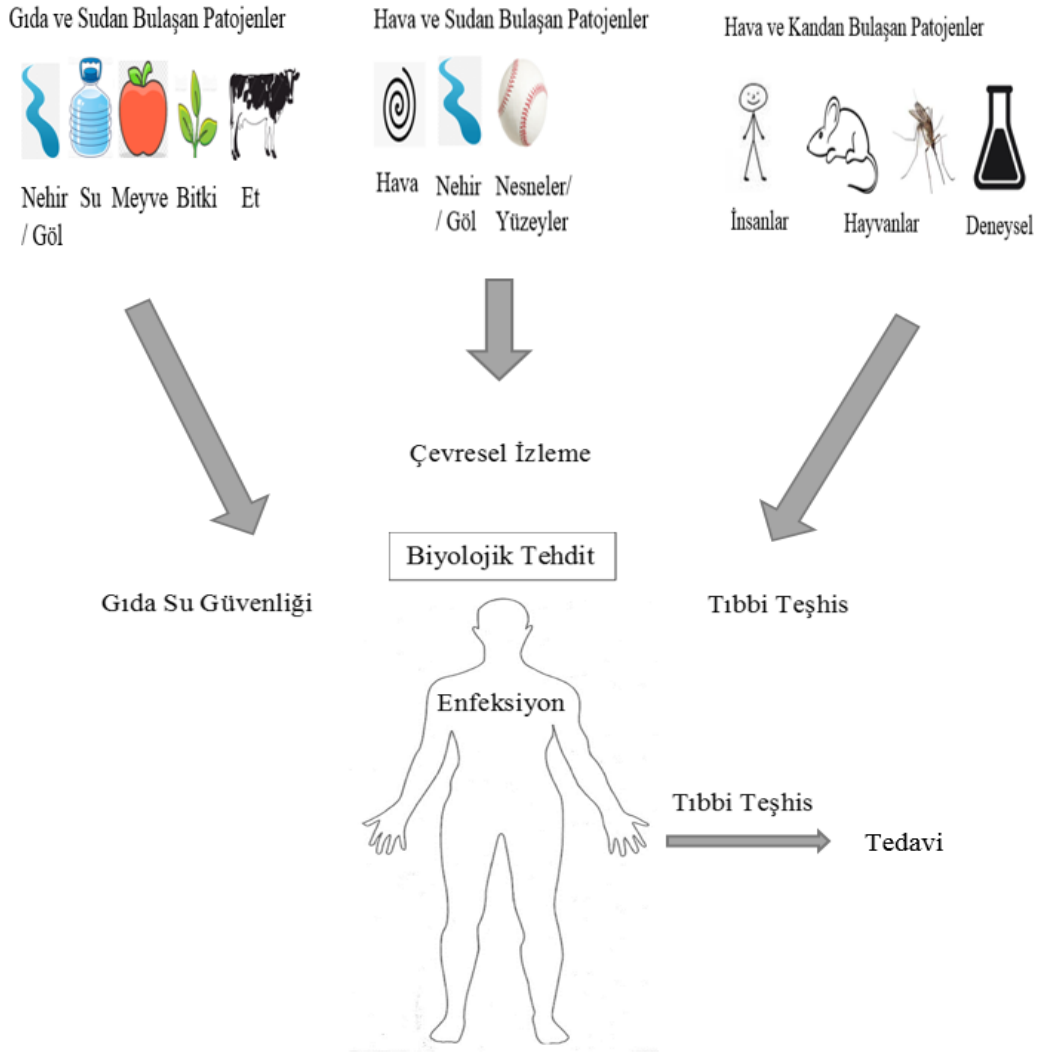
2.3. Patojenlerin Konakçıyı Hasta Etmesi

Patojenler konakçıları ürettiği toksinler ile hasta eder. Toksinlerin üretilmesi replikasyon sırasında doku veya hücrelerin zarar görmesine neden olur. Konakçıya verilen zarar, bütün hücreleri ayırım gözetmeden öldürür ve dokularda hasar bırakır. Patojenlerin çoğu, konakçının bağışıklık tepkisinden yararlanır [14].

2.3.1. Patojenlerin bulaşma yolları ve belirtileri

Patojenler doğrudan temas veya dolaylı temas yoluyla bulaşır. Doğrudan temas, kişiden kişiye cinsel yolla iletim ve damlacık yayılması yoluyla gerçekleşir. Dolaylı temas

ise havadaki partiküller, enfekte birinin dokunduğu yüzeye dokunma, kontamine olmuş yiyecek ve içecek tüketilmesi ve böcek ısırması ile yayılabilir. [15]



Şekil 2.1. Patojenlerin bulunduğu alanlar [16]

Patojenlerle ilişkilendirdiğimiz belirtilerin çoğu, konağın bağışıklık tepkilerinden kaynaklanmaktadır. Enfeksiyon bölgesinde şişme, kızarıklık ve iltihap üretimi dahil olmak üzere enfeksiyonun ayırt edici özellikleri, konaktaki patojenleri yok etmeye çalışan bağışıklık sistemi davranışlarının doğrudan sonucudur. Vücut sıcaklığındaki artış da bir savunma tepkisidir. Çünkü bazı organizmaların büyümesini ve yaşamına devam etmesini engelleyebilir. [17] [18]

2.4. Patojen Tipleri

Patojen tipleri bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüslerden oluşmaktadır. Bu patojenlerin çoğu insanlarda hastalığa neden olur.

2.4.1. Bakteriler

Bakteriler tek hücrelidir ve hızla ürerler. Virüslerden çok karmaşık, farklı ve daha büyüktürler. Organik bileşiklerini sentezleme işlevlerini kendileri yapar. Beslenme için konakçı üzerinde yaşayan hücrelerdir [17]. Bakterilerin boyutları 0,5-5,0 mikrometredir. Farklı şekillere göre sınıflandırılırlar. Yüzey uzantılarına sahiplerdir. Bu özellik farklı yüzeylere yapışma sağlar. Bakterilerin bazıları hastalık yapmaz. Sadece küçük bir kısmı hastalık yapar. Hastalık yapan bakterilere de patojenik bakteri denir. Hastalık yapan bakteri sadece insan vücudunda çoğalabilir. Hastalık yapan çoğu bakteri, toksinleri üretir. Toksinler hücrelere zarar verip hasta eden çok güçlü kimyasallardır. Bakterilerin sebep olduğu hastalıkları iyileştirmek için antibiyotikler kullanılır [19] [20].

2.4.2. Mantarlar

Mantarlar, insan derisi de içinde olmak üzere her alanda bulunabilir. Fazlaca üreyip büyüdüklerinde enfeksiyon oluştururlar [21]. Mantarlar, zardan ve kalın olan hücre duvarından oluşmaktadır. Yapıları gereği onları etkisiz hale getirmek oldukça güçtür [22]. Mantarlar bulaşıcıdır. Temas yoluyla yayılabilir [23].

2.4.3. Parazitler

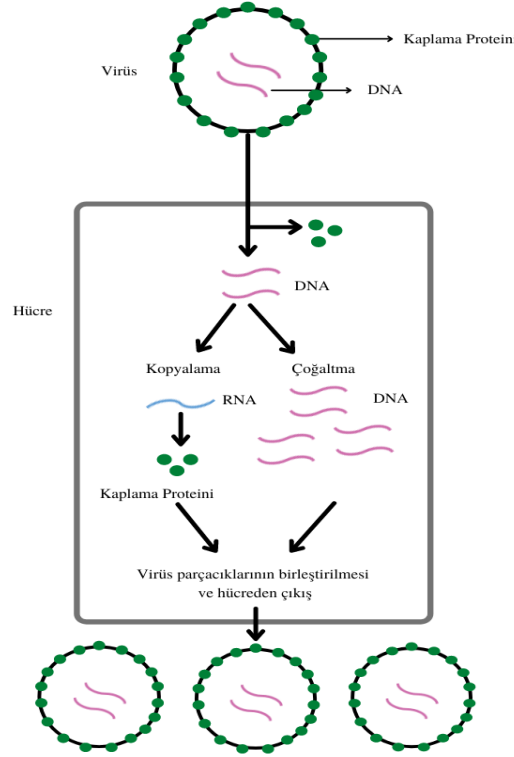
Parazitler, bir konakçının içerisinde veya üstünde yaşayan ve konakçının kaynaklarından yararlanan organizmalardır. Bazı parazit türleri insanları hasta edebilir. Protozoa tek hücreli organizmalardır. Yaşamlarına devam edebilmek ve çoğalabilmek için konakçıları hasara ve hastalığa neden olur. Dokulara hücum etmek ve üremek için gelişme göstermişlerdir.

Mantar ve protozoa ökaryot hücrelerdir. Konakçı ölmeden bu hücreleri yok edebilecek ilaçları bulmak fazlasıyla güçtür. Bulunan ilaçların etkileri antibiyotik etkilerinden daha azdır. Mantar ve parazit hastalıklarının tedavi edilememelerine neden olan bir problem ise, hastalık yapan bu hücrelerin hayatta oldukları süre içerisinde çok fazla ve farklı modeller arasında transfer yapma isteğinde olmasıdır. Herhangi bir modeli etkisiz hale getiren ilaç, diğer bir modeli etkisiz hale getiremeyebilir [17].

2.4.4. Virüsler

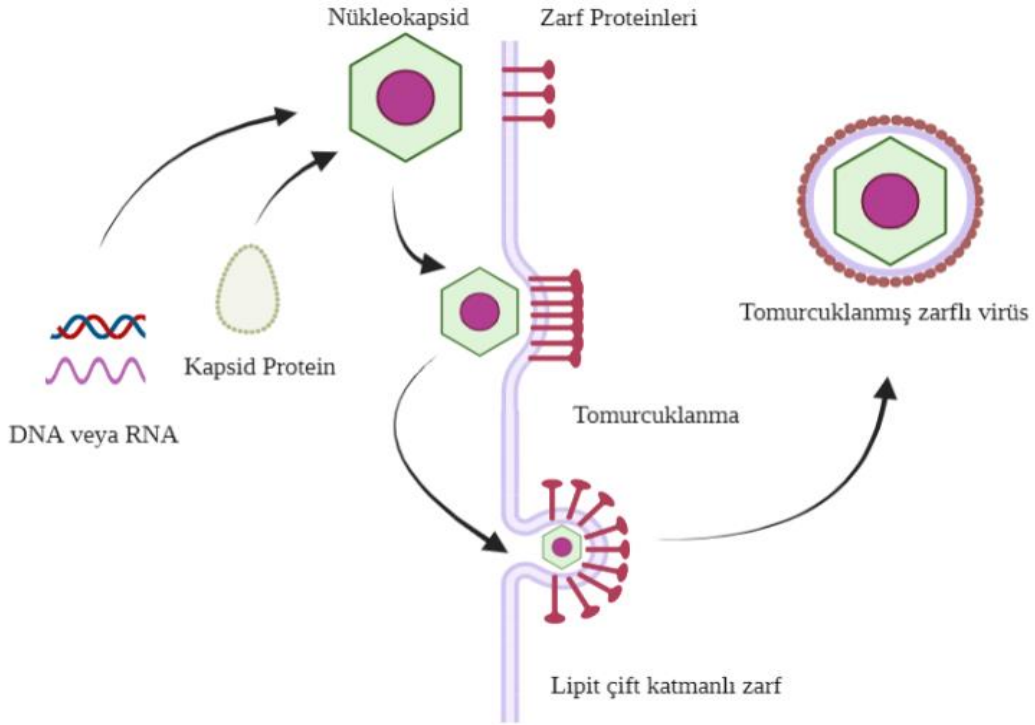
Virüsler patojen tiplerine kıyasla çok küçüktür. Araştırılan virüsler 10 ile 300 nm çapa sahiptirler. Kapsid proteinin bir parçasıdır ve dış koruyucu kaplaması içinde kullanılır. Virüslerde kapsid ile kaplanmış nükleik asitlerden oluşur. DNA ve RNA'dan genetik bilgi

taşıır. Nükleik asit biçimindeki bilgiyi taşıırlar. Konakçılar bilgiyi kopyalar ve korur. Virüsler de üremek için bu hücrelere hücum eder ve konak hücreler istila altında olur. Virüsler, soğuk algınlığından COVID-19 a kadar çeşitli hastalıklara neden olur. Virüsler kapsid ve zara sarılmış nükleik asit (DNA veya RNA) parçalarıdır. DNA veya RNA parçalarının ayrı olması durumunda tek veya çift zincirli olabilen sadece ya DNA ya da RNA'dan oluşan genom içerir. Bu genomlar kapsid içinde birikmiştir.[17]



Şekil 2.2. Virüsün basit yaşamsal döngüsü [17]

Virüsler genelde replikasyon ile çoğalırlar. Replikasyon virüs partiküllerinin saklanması, viral hücreye ait DNA RNA gibi genetik bilgilerin kopyalanmasını, virüs kaynaklı proteinlerin üretilmesini ve bu bilgilerin yeniden birleştirilip üretilmesini sağlar. Konak hücreyi hasta olmasına neden olan tek virion, hasta hücrede yüzlerce virüs oluşturur. Bu hızlı üreme konak hücreyi yok eder. Virüslerin çoğalma sırasında en önemli basamağı zarın oluşumudur. Virüs tomurcuklanma ile üreyip hücreyi parçalamadan dışarı çıkarsa hücre zarından zar ile ayrılmış olur. Bu tarz virüslere zarlı virüs denilmektedir. Fakat hücreleri patlatarak dışarı çıkıp üremeye çalışırsa zarı patlattığından dolayı zar alamaz. Bu sebeple bu tarz virüslere zarsız virüsler denilmiştir. Antijenik yapıların zarlı virüslerde fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda zarlı virüslerin hücrelere daha rahat girmesi ve hastalık oluşturabilmesi düşünülmektedir [17].



Şekil 2.3. Viral zarın tomurcuklanma ile alınması

Antibiyotikler virüslere etki etmez ve virüslerin oluşturacağı hastalıklar için bir tedavi şekli değildir. Viral hastalıkları stabil duruma getirmenin en iyi yöntemi, konakçılara aşı uygulamaktır [17]. Tablo 2.1. de patojen tiplerinin neden olduğu bazı hastalıklar belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Patojenlerin yaptığı bazı hastalıklar

Virüs	Bakteri	Mantar	Parazit/Protozoan
SARS-CoV	Tüberküloz	Pamukçuk	Sıtma
MERS-CoV	Boğaz Ağrısı	Saçkıran	Dizanteri
Ebola Virüsü	Bel Soğukluğu	Atlet Ayağı	Kasık Biti
İnfluenza	Bakteriyel Menenjit	Kasık Mantarı	Bağırsak Solucanları
Zika Virüsü	Tifo	Vajinal Mantar	Giardiasis
Herpes/Uçuk Virüsü	Lyme Hastalığı	Tırnak Mantarı	Trikomoniyaz

2.5. Solunum Virüsleri

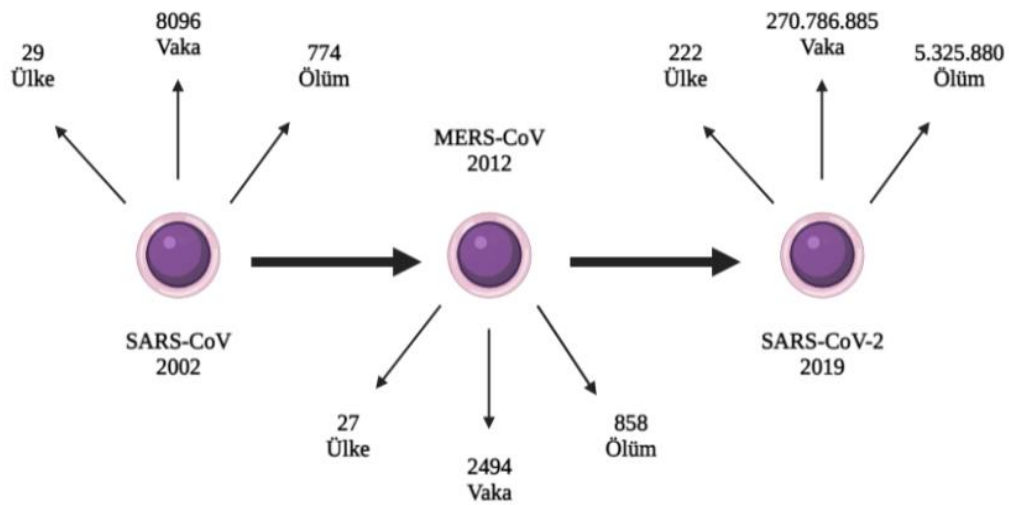
Solunum yolu virüsleri, yaşanan ortam ile etkileşim halindedir. Bağışıklık için önemli bir sorun oluşturur. Bağışıklık sistemi solunum yolu patojenlerini hemen tanır. Bağışıklık sisteminde zayıflık yoksa virüse karşılık verir ve kontrol altına almaya çalışır. Virüsler için solunum vücuda giriş yoludur. Akciğer ortamla doğrudan ve dolaylı etkileşim halindedir. Virüs akciğerde enfeksiyona neden olduğunda virüsü tanımak ve ikincil hasarı

önlemek için bağışıklık tepkilerinin üretilmesini sağlar. Solunum virüsleri insanda bölgesel ve hızlı çoğalan hastalıklar oluşturan virüslerdir. Çoğunlukla üst solunum yolunda görülürler. Başlıca üst solunum yolu virüsleri influenza, solunum sinsityal virüsü (RSV), parainfluenza şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2), orta doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV), rinovirüs, adenovirüs ve insan koronavirüsüdür (H-CoV). Bu insan virüslerinden en önemlisi ve gündemde olanı şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü-2 dir (SARS-CoV-2). Bu patojen türü, dünyada yüksek derecede görüldüğü için ortaya çıkmıştır [24].

Tablo 2.2. Solunum Yolu Virüsleri

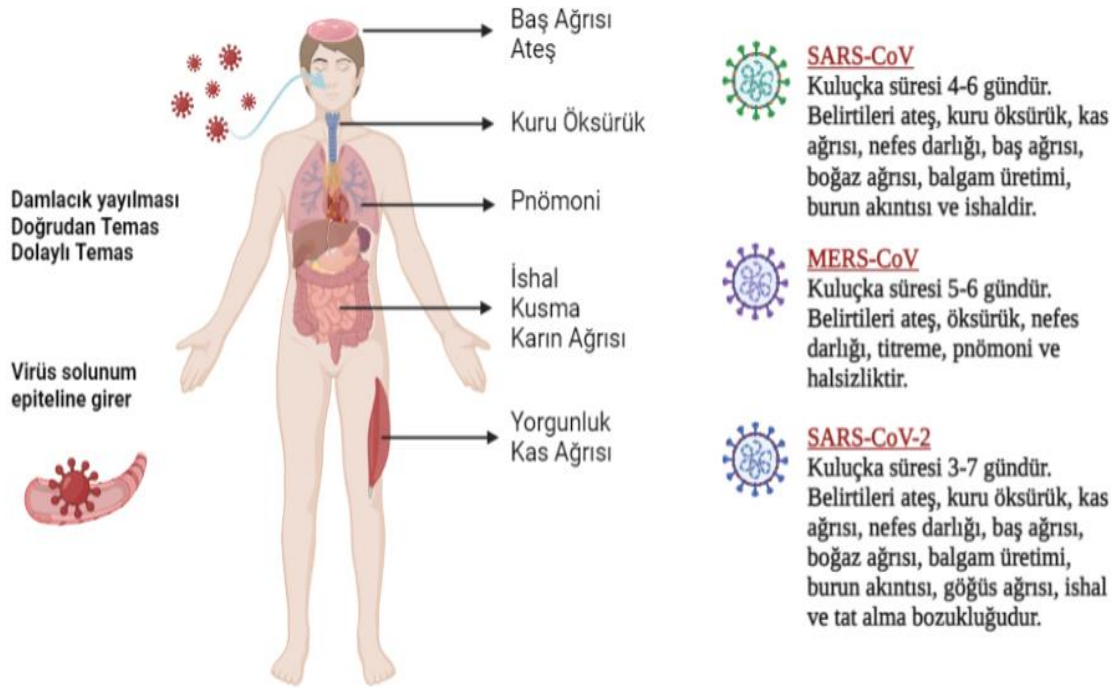
Virüs	Genetik Modeli	Bulaş Yolu	Kuluçka Süresi
İnfluenza	RNA	Damlacık yoluyla	2 gün
RSV	RNA	Damlacık yoluyla	2-8 gün
Koronavirüsler	RNA	Damlacık yoluyla	2-14 gün
Adenovirüs	DNA	Damlacık yoluyla	3-10 gün
Rinovirüs	RNA	Damlacık yoluyla	2-4 gün

Bu virüslerin aşırı hastalık yapma ve hızlı bir şekilde yayılma potansiyellerinden dolayı insanlar endişeye kapılmıştır [25]. Virüsleri etkisiz hale getirmek amacıyla etkili koruma sağlayan aşıları geliştirebilmek için çalışmalar halen devam etmektedir [24]. Tablo 2.2. 'de solunum yoluyla bulaşan virüslerinin genetik modelleri ve kuluçka süreleri özetlenmiştir. SARS-CoV-2 ve diğer solunum virüslerinin kış aylarında ortaya çıktığı fark edilmiştir. Sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler solunum yolu virüslerinin bulaşmasını etkiler [26] [27].



Şekil 2.4. Koronavirüs enfeksiyonlarının geçmişi [28]

Şiddetli akut solunum sendromu (SARS-CoV) 2002 yılında Hong Kong’da görüldü. Hava yolu ile bulaşması hızlanan salgın tüm dünyaya yayıldı. Virüse yakalanan bireylerde 4-6 günlük inkübasyon süresinden sonra başlangıçta ateş, halsizlik ve ishal gibi belirtiler görüldü. Sonrasında ölümcül bir alt solunum yolu hastalığı olan pnömoniye neden oldu. SARS-CoV salgınından 10 yıl sonra Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ortaya çıktı. MERS-CoV, öksürük ve yüksek ateş belirtileri ile alt solunum yolu hastalığına sebep oldu. Zoonotik virüs olan SARS-CoV ve MERS-CoV’ların içinde bulunduğu koronavirüs ailesi insan koronavirüsünü de (HCoV) içerisinde bulundurulur. HCoV’lar soğuk algınlığının bir numaralı nedenidir [29]. Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler sadece yarasalarda gözlemlendi. Bu nedenle, SARS-CoV ve MERS-CoV virüsleri gibi meydana gelen zoonotik HCoV’ler, yarasalarda ortaya çıkmış, konaklara bulaşma sırasında çok kez mutasyona uğramış ve insan konakları hasta etme kabiliyeti kazanmıştır [30]. COVID-19 koronavirüs hastalığının ölüm oranının diğer HCoV virüslerine göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir. COVID-19 salgını halen devam etmektedir [31].



Şekil 2.5. İnsan koronavirüslerine genel bakış [32]

2.6. Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2)

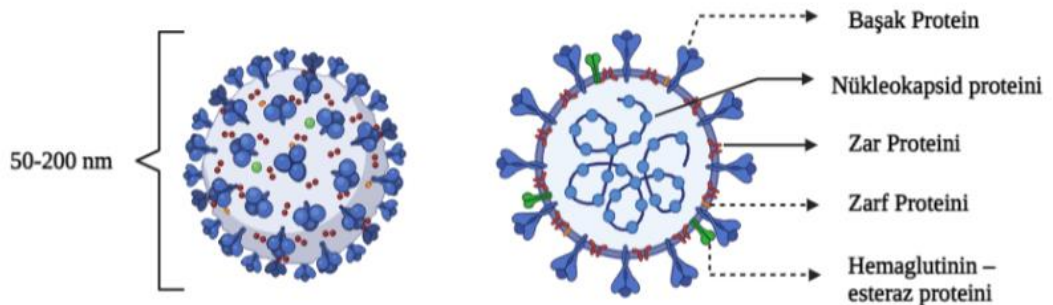
Solunum yolu virüslerinin en yenisi ve günümüzde en önemli yere sahip olan koronavirüs yani diğer adıyla COVID-19 şiddetli akut solunum sendromu alan SARS-CoV-2’ den meydana gelmektedir [33]. Bu virüs hızlıca yayılmaktadır. Bu yayılmanın en büyük

sebebi inkübasyon süresinin uzun olmasıdır. Covid-19 vakası ilk olarak aralık ayı 2019'da Hubei eyaletinin başkenti Wuhan'da olmak üzere Çin'de görülmüştür [34]. Virüs hızlı yayıldığı gibi ciddi hastalıklara ve ölümlere neden olmaktadır [35]. SARS-CoV-2 Riboviria ailesi, Nidovirales sınıfı, Coronaviridae familyası, Orthocoronavirinae alt familyasına aittir. Coronavirinae dört farklı alt tipe bölünmüştür. α - ve β - koronavirüs tipleri insanlarda gama- ve delta- olmak üzere 2 tipide hayvanlarda bulunur. İnsan koronavirüsü (HCoV) α - koronavirüs içerisinde, SARS-CoV SARS-CoV-2 ve MERS-CoV'da β - koronavirüs içerisinde bulunur [36] [28]. Koronavirüsler, büyük, tek sarmallı ve tek iplikli pozitif RNA'dan oluşan zarflı bir virüstür. CoV kaynaklı virüslerin insanları hasta ettiği ve solunum ile ilgili hastalıklara sebep olduğu anlaşılmaktadır. Bu virüsler dünyada küresel salgına sebep olan patojenik koronavirüslerdir [36]. Virüs hayvanlardan insanlara bulaşır. İnsanlarda damlacık ve aerosol yolu ile başka insanlara hastalığı enfekte edebilir [37].

2.6.1. SARS-CoV-2 virionlarının protein yapısı

SARS-CoV-2 virionları çapı 50-200 nm aralığında lipit yapıdan oluşan çift katlı parçacıklardır. Yüzeylerinde taç şeklinde görünüm sağlayan 20 nm uzunluğunda sivri uçlar bulunur. Virüs yüzeyinde 5 yapısal protein bulunur. Hücreye virüs girişini sağlayan başak proteini (S), viral RNA'yı koruyan ve tutan nükleokapsid proteini (N), virüslerin bir araya gelmesini sağlayan zar proteini (M), virüs bileşenine katılan zarf proteini (E) ve hemaglutinin – esteraz proteinini (HE) içermektedir [38]. Virüsün konakçı hücrelere bağlanmasını sağlayan protein başak glikoproteinidir [28]. Cazip bir antiviral hedef olan S protein, koronavirüslerin girişi için önemlidir [39]. Virüs yüzeyindeki başak glikoproteini, konak hücrenin reseptörlerinin bağlanabilmesi için önemlidir [29]. Başak protein, virüsün konakçı hücreye bağlanmasında, ACE-2 reseptörünün tanınmasında ve koronavirüs girişinde önemli bir rol oynar [40], [41]. Dışarıya doğru çıkıntı şeklinde meydana gelen S1 ve S2 lipidik zarf üzerinde başak glikoproteinlerini oluşturur [42] [43]. Anjiyotensin dönüştürücü enzim reseptörü (ACE-2) S1 biriminin, alt solunum hattında bulunur. Konakçı hücre reseptörünü tanıyan ve reseptörün bağlanmasını sağlayan bir reseptör bağlama alanını (RBD) kapsar [44]. S2 alt birimi, virüslerin ve konakçı hücrelerin zarlarını kaynaştırma (membran füzyonu) işlevi yapar [45]. S proteininde 13 mutasyon gözlemlenmiştir [39]. Konak tanıma ve istilasındaki görevi dikkate alındığında, S proteini, ilaç ve aşı tasarımı için önemli bir hedef haline geldi [46]. Başak protein, influenza, Ebola virüsü, zika virüsü ve HIV gibi virüslerin dahil olduğu birçok koronavirüs ailesi için ortaktır [47]. SARS-CoV-2 bünyesinde

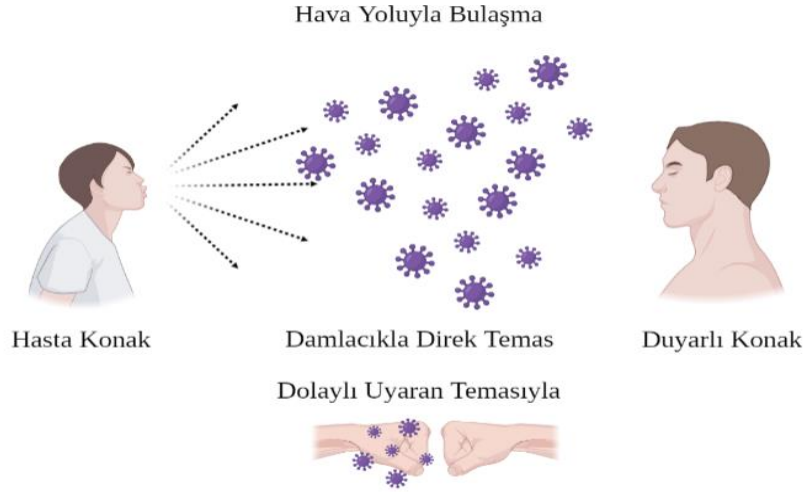
enfeksiyon sırasında bolca bulunan protein nükleokapsid fosfoproteinidir. N proteini, nükleokapsidi oluşturur. Virüsün RNA genomuna bağlanan tek proteindir. Viral RNA genomunu korumaktadır. Viral replikasyonda ve konağın enfeksiyona karşı gösterdiği hücresel tepkide rol oynar. Virüsün hücre ile birleşmesi ve tomurcuklanmasında N proteininin endoplazmik retikulum lokalizasyonu işlev taşır. N proteininin virüs parçacıkları oluşumunu büyük ölçüde arttırdığı gözlenmiştir [48]. N protein hastalığın ilk 15 gün içerisinde serum veya idrar numunelerinde görülür. Hasta olduktan sonra en yüksek yayılma on gün içerisinde gerçekleşir [35]. Virüs oluşumunda M proteini, birçok virüs parçacıkları oluşturmak için hücresel zarları birleştirerek merkezi bir rol oynar. M proteininin ana özelliği, virüsün tomurcuklanması için lazım olan yapısal proteinlerin (S, E ve N) bir araya getirilmesini sağlar. Membranın eğimli yapısını güçlendirir ve N proteinine bağlanır. Virüslerin bir araya gelmesi için gerekli olan protein-protein etkileşimlerinin çoğunu yönetir. M proteini kendi kendine bağlanma özelliği taşır [49]. Ayrıca virüs benzeri parçacıklar (VLP'ler) yalnızca M proteini, E proteini ile birlikte eksprese edildiğinde oluşturulabilir, bu da bu iki proteinin virüsün membran yapısını üretmesi gerektiğini düşündürmektedir [50]. Virüsün boyutu ve şekli, M proteinleri tarafından korunur [51]. Konakçı hücrelere virüs bağlanması anında ve virüsün hücreye giriş proseslerinin düzenlenmesinde gözlenmektedir [52]. E proteini, virüslerin patogeneğinde ve hücre içine salınmasında görev alan en küçük proteindir [38]. Replikasyon sırasında hasta hücre içinde bol miktarda bulunur. Ancak virüs zarfına minik bir kısmı katılır. Viral birleşmeye katılır. Virüslerin salınmasında görev alır [53] [54]. HE proteini giriş reseptörüne bağlandıktan sonra hücre içerisine girişi ve virüs yayılmasını kolaylaştırır. Ayrıca reseptörü yok etmeye çalışan enzim aktivitesinin bulunduğu hücrelere bağlanmayı engellediği düşünülmektedir [55].



Şekil 2.6. SARS-CoV-2'nin şematik görüntüsü [56]

2.6.2. SARS-CoV-2 virüslerinin bulaşma yolları ve yayılması

SARS-CoV-2 virüsü dört şekilde bulaşabilir. Doğrudan fiziksel temas yoluyla, yüzeylerle dolaylı temas yoluyla, damlacıklar yoluyla ve aerosoller ile bulaşabilir [57]. SARS-CoV-2, hasta olanlar ve hasta olmayanlar arasında korunmasız bir durumda yakın temas halinde kontamine olmuş yüzeyler (fomitler) ve damlacıklar ile bulaşır [58]. Enfekte kişiler sağlıklı insanları hasta edebilen canlı virüsler içeren solunum sıvısı damlacıkları yayar [59]. Hasta olan kişiler tarafından öksürme, hapsirme veya konuşma yoluyla üretilen havaya yayılan damlacıklar içerisinde bulunan virüs partiküllerini solumak enfekte olmayan insanlara SARS-CoV-2 bulaştırır [60]. Damlacıklar yüzeylere bulaşıcılık kazandırmak için çekirdek olarak yerleşebilirler [61]. Virüs dolaylı temas durumunda da yayılabilir. Virüslü damlacıklar ve kontamine yüzeyler eller ile temas halinde elleri kirletir, insanlar virüslü elleri ile ağız, burun ve gözlerin mukoza zarlarına temas da bulunarak hastalığa sebep olur [58]. COVID-19 yayılmasında en yaygın yol aerosoller nedeniyle hava yolu ile yayılmadır [39], [31], [62]. Havada bulunan aerosollerdeki SARS-CoV-2 3 saate kadar canlı kalabilir [37]. Enfekte hastalar tarafından havaya salınan virüs yüklü damlacıklar kapı kolları, lamba anahtarları, asansör düğmeleri üzerinde birikerek bulaşıcı fomitelere dönüştüğü gibi uzun süre havada kalabilirler [61]. Virüs içeren vücut salgıları ve dışkıları, damlacıklar şeklinde aerosol haline getirilebilir [63]. Aerosoller genellikle çok dağılan farklı boyutlara sahip damlacıklardır [62]. Enfekte konaktan çıkan aerodinamik çapı 5 µm'den küçük olan damlacıklar, sağlıklı bireylerin akciğerlerinin derinliklerine kolayca nüfuz edebilirler. Büyük damlacıkların ise hızlı bir şekilde üst solunum yoluna ulaştığı görülür. [64]. SARS-CoV-2 virüsleri boğazda, kanda ve dışkıda sıklıkla tespit edilmiştir [65]. Yapılan son çalışmalarda SARS-CoV-2 virüsünün bağırsak epitelinde çoğaldığını ve bağırsak yoluyla yayıldığını da göstermektedir. Ayrıca SARS-CoV-2 virüsüne yakalanan bireylerin idrarları da virüs içerir [66], [67]. COVID-19 pandemisi sırasında tuvaletler virüs bulaşması açısından çok tehlikelidir. [62]. Virüsler konak hücrelere ulaşmadan engellemek gerekir. Virüs damlacıklarının yayılmasını azaltmak, kontamine olmuş nesne ve yüzeyleri temizlemek, virüslü havayı filtrelemek, kişisel hijyene dikkat etmek ve maske gibi kişisel koruyucu donanımların giyilmesine özen göstermek virüslerin sağlıklı konaklara bulaşmasını engellemek için önemlidir [61]. Maske kullanılması, el temizliğine ve sosyal mesafeye dikkat edilmesi virüsten korunmaya yardımcı olacaktır.



Şekil 2.7. SARS-CoV-2 virüsünün bulaşması [57] [59]

Şekil 2.8 de SARS-CoV-2 enfeksiyonu, iki konak arasında kısa mesafede damlacık yolu ile hasta konakla temas yoluyla, hasta konağın dokunduğu, öksürdüğü, hapşırdığı yere dolaylı temas ile veya uzun mesafede alınan hava yoluyla bulaşır. Hava içerisinde hasta konağın 10 μm çapından büyük damlacıkları veya 5 μm çapından küçük damlacıkları bulunur. Bu damlacıklar hava akımı ile dağılır. Duyarlı konakçılar tarafından solunur [68].

2.6.3. SARS-CoV-2 virüsünde fiziksel mesafe

Fiziksel mesafe, SARS-CoV-2 virüsünü kontrol altına alma önlemlerinin bir parçasıdır. SARS-CoV-2'nin yayılmasını azaltmak için konaklar arasında fiziksel mesafenin 1 veya 2 metre olması damlacık boyutuna göre şekillenmiştir. Wells'in yaptığı araştırmalara göre, enfekte konaktan yayılan büyük damlacıklar, hızlı bir şekilde havaya düşer ve 1-2 m'lik mesafeye kadar iniş sergiler. Göz ile görülemeyen havadaki küçük damlacıklar hızlı bir şekilde buharlaşır. Hava akımıyla daha uzak mesafelere yayılabilirler. Hava akımı olmadan, boyutu büyük olan damlacıklar en uzağa (1-2 m) doğru hareket ederken, küçük olanlar kaynağa yakın olacaktırlar [69].

2.6.4. SARS-CoV-2 klinik belirtileri semptomları

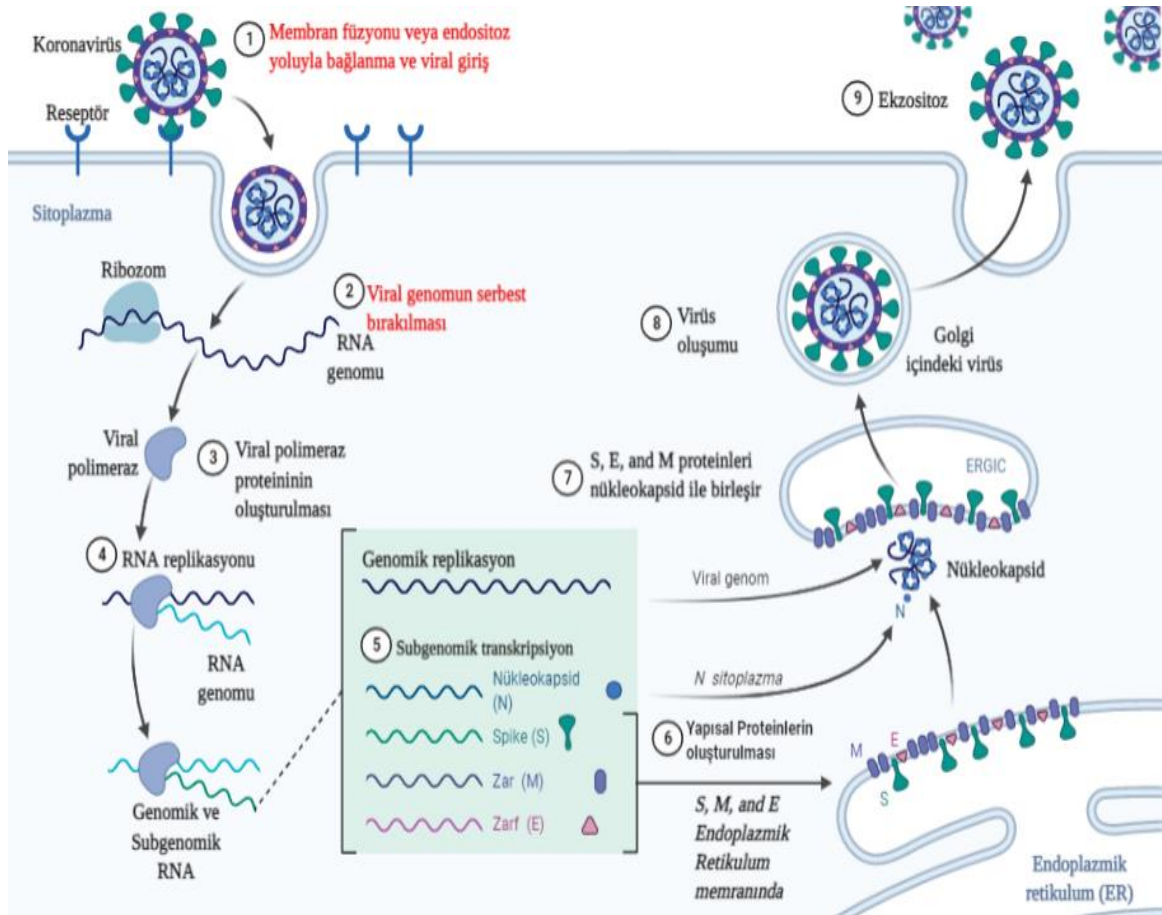
SARS-CoV-2 virüsünün yaklaşık inkübasyon süresi 3 ile 7 gün arasındadır. Maksimum inkübasyon süresi ise 14 gündür [70]. Ateş ve kuru öksürük gibi gribe benzer bulgular ana belirtilerdir [71]. En fazla görülen bulguları ateş, nefes darlığı, öksürük ve kas ağrısıdır. Orta sıklıkta baş, boğaz, göğüs ağrıları ve burun akıntısı görülmektedir. Daha az yaygın bulgular ise diyare, bulantı, kusma ve yaşlılarda zihin bulanıklığıdır. 60 yaş ve sonrası hastalarda solunum yetmezliği görülme oranı daha yüksektir. Hastalığı geçirme süre-

si de daha uzun olmaktadır. Yaşı küçük bireylerde hastalığın şiddeti daha azdır [72]. Virüsten en çok etkilenen organ akciğerdir ve bunun sonucunda akciğer sorunlarına ve akut böbrek sorunlarına yol açabilir. Akciğer sorunları da hastaların ventilatöre bağlanmasını gerektirir. Organ yetmezliği belirlenen ağır hastalarda ölüm meydana gelebilir [28]. Hastaların ölüm nedenlerinden bir diğeri de SARS-CoV-2 koronavirüsünün kardiyovasküler sisteme zarar vermesi nedeniyle oluşan miyokard hasarıdır [73].

2.6.5. Hücre bağlanması ve patogenezi

Virüsün konak hücreye girmesi viral enfeksiyonun, patogenezin ve replikasyon için önemlidir ve ilk adımını oluşturmaktadır [29]. Patogenezi, viral zarfın hücre içine girmesini ve viral bulaşmayı en iyi derecede virüs yüzeyindeki proteinler sağlar [74]. Hücre girişin ilk adımı S proteininin konakçı hücre yüzeyindeki protein reseptörüne aktif bir şekilde bağlanmasıdır [29]. Hücre bağlanması, S1 biriminin yüzey reseptörleri ile etkileşim içine girmesi ve virüsü hücre içine alması, S2 biriminin ise viral zarf ve hücre zar kaynaşmasından sonra virüs çekirdeğinin hücre içine girmesini içerir [74]. S1 alt birimi reseptör bağlanması işlevini yapar. S1-NTD ve S1-CTD oluşan N- ve C- terminal alanları bulunmaktadır. S1-CTD konak hücreye girişi kolaylaştırır. S1-NTD konakçı hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşim oluşturarak virüs bağlanmasında rol alır [75] [76]. Yardımcı proteinlerin kullanımını destekleyen viral partiküllerin kaçışını sağlama potansiyeli bulunmaktadır. Bu durum viral parçacıkların, S proteinler olmadan birleşebilmesini açıklar. Yani yardımcı proteinlerin S proteinlerin yerini alabileceğini belirtir [77] [53]. SARS-CoV-2 konakçı hücrelere girmek için reseptör kullanır. Bu reseptör anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2) reseptörüdür [78] [79]. SARS-CoV-2'nin ACE-2 reseptörü ile solunum epitel hücrelerini hasta edebildiği görülmüştür [80]. S protein, özel olarak ACE-2 reseptörünü tanıyan bir reseptör bağlama alanı (RBD) içerir. Reseptör bağlama alanı (RBD) başak proteininin korunmuş bir bölümüdür. RBD' nin hedeflenmesi virüs kaçışını önlemenin en iyi yoludur [77] [53]. Zar füzyon proteinleri, viral zarf ve hücre zar arasında yapısal olarak kaynaşmayı sağlar. Zarf içeren başak proteini, konak hücrenin reseptörüne bağlanıp viral ve konak zarlarını kaynaştırarak virüsün konakçı hücrelere girmesine aracı olur [80]. SARS-CoV-2 endositoz yoluyla konakçı hücreye girer. Viral partiküller endozomlara geçer ve endozomlar ile birleşirler [81]. Endozomdaki konakçılar ile S proteininin etkileşime girmesi füzyon aktivitesini artırır [76]. SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye girişinin olması ve S proteinin hazırlanmasında transmembran serin proteaz-2 (TMPRSS-2) yer alır [78]. Zar füzyon proteini ortaya çıkarmak için S proteininin bölünmesi gerekir. Bu bölünmenin olabil-

mesi için reseptör etkileşiminin olması yeterlidir [81]. S proteini ve reseptör arasında bulunan etkileşimler, virüsün konak hücreye bağlanmasını sağlar [80]. Viral partiküllerin hücre içine alınmasından sonra endozomlarda bulunan glikoproteinler de oluşan konformasyonel değişimler, lizozomal proteaz olan katepsin L ve katepsin P tarafından S proteinlerin parçalanması koronavirüs patogenezinde görev alır. Bu durum virüs zarfının endozom zarları ile kaynaşmasına ve viral RNA'nın enfekte hücrenin sitozolüne salınmasına neden olur [81]. Koronavirüsler hedef aldığı ilk konakçı hücreleri hasta ettikten sonra, bu virüsler salınabilir ve başka konak hücreleri hasta edebilir [28].



Şekil 2.8. SARS-CoV-2'nin hücreye bağlanması, viral girişi ve replikasyonu [80]

2.6.6. Reseptör bağlama alanı ve ACE-2 reseptörü

SARS-CoV-2'nin başak proteini, özel olarak ACE-2 reseptörünü tanıyan bir reseptör bağlama alanı (RBD) içerir. RBD, antiviral bileşikler ve antikorlar için önemli bir hedeftir [82]. SARS-CoV-2 konakçı hücrelere girmek için reseptör kullanır. Bu reseptör anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2) reseptörüdür. CD209L gibi daha düşük afiniteye sahip reseptörlerde kullanırlar ve bu reseptörler virüsün hücreye girişini kolaylaştırır [78] [79] [83]. ACE-2 vücutta damar hücrelerinde, böbrek de, nöron hücrelerinde ve bağırsak hücrele-

rinde yaygın olarak bulunur [28]. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 virüslerindeki S proteinleri farklılık gösterse de, Xu ve diğerlerinin yaptığı çalışmada reseptör bağlanma alanının 3 boyutlu yapısının SARS- virüsleri ile bir olması S proteinin bağlanma afinitesini ACE-2' nin koruduğunu göstermiştir [84]. Başka bir çalışma da, S proteinindeki N501T adlı mutasyonunun SARS-CoV-2 virüsünün ACE-2 afinitesini yükselttiği gözlemlenmiştir [85]. ACE-2 akciğer hücrelerinde alveollerde daha fazla eksprese edilir. ACE-2 ekspresyonunda alt solunum yolundan alınan numunelerde yanlış negatif sonuçların daha az çıktığı rapor edilmiştir [86]. Farklı olarak ACE-2 reseptörüne bağlanan koronavirüsler üst solunum yolu hastalıklarına da neden olabilir. SARS-CoV-2'nin ACE-2 reseptörüne bağlanması, alveolar hücrelerde büyük hasarlara neden olur. Bu hücrelerde oluşan hasarlar ölümü tetikleyebilir [33]. SARS-CoV-2'nin reseptöre bağlanma kapasitesinin SARS-CoV'dan 10 ila 20 kat daha güçlü olduğu anlaşıldı. Bu durum virüsün bulaş riskini önemli ölçüde artırır [87].

2.6.7. SARS-CoV-2 hayat döngüsü

Virüsün hücreye girmesinin ilk adımı endozomal bir yolla hedef hücrelere hareket etmesidir. SARS-CoV-2 virüsünün S proteini hücresel reseptör anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE-2) hücresel giriş için özel olarak bağlanır. SARS-CoV-2 virüsünün reseptöre bağlandıktan sonraki ilk adımı, hücresel proteaz olan TMPRR-2 ve katepsinin pH etkenli gerçekleştirilen membranın füzyonuyla S proteininin bölünmesidir. Viral ve hücresel membran füzyonu zarf kaynaşımı yaparak viral alımını sağlar. Virüs hücreye girdikten sonra viral genom sitoplazmaya bırakılır [88]. Virüsün endositoz girişi ve genomun sitoplazmaya salınması ile, genom translasyonu pp1a ve pp1ab viral replikaz poliproteinlerini oluşturur [29]. Viral proteazlar tarafından poliproteinler küçük parçalara bölünürler. Oluşan pp1a ve pp1ab viral replikaz poliproteinleri protein üretimini ve viral replikasyonunu oluşturan yapısal olmayan proteinlere (NSPS) dönüştürür. Bu NSP'ler, viral genomun replikasyonu için replikaz-transkriptaz kompleksini (RTC) biçimlendirmek üzere vazifelendirilir. Viral NSP'ler, negatif iplikli RNA sentezine katılan bir RTC'de toplanır. Negatif iplikli model mRNA sentezi için modeldir. mRNA sentezinden sonra S, M ve E proteinleri üretilir. Yapısal proteinler endoplazmik retikuluma (ER) iletilir. Protein salarak Endoplazmik retikulum ve Golgi ara bölmesinden (ERGIC) geçer. N protein RNA'yı sarar. Yeni oluşan genomlar zarlardan tomurcuklanma yoluyla nükleokapsidlere paketlenir. Yeni virüsler ekzositoz yolu ile hücreyi terk eder [29], [88].

2.6.8. Yüzeylerde virüs dayanıklılığı

Bir virüsün yüzeylerde ve çevrede kalıcılığı virüslerin yayılması ve bulaşması için önemli faktörlerden biridir. Virüsün yayılma derecesini, hızını ve konakçıya ulaşmasını virüsün karakteristiği, bulaştığı ve biriktiği yüzeylerin çevresel özellikleri belirleyen ve etkileyen faktörlerdir. Bu sebeple SARS-CoV-2 solunum virüsünün fomitlerde uzun süre kalıcı olup olmadığı araştırılmıştır [89]. SARS-CoV-2'nin canlılığını havada ve yüzeylerde devam ettirdiğini kanıtlanmıştır. Chin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada maskenin dış katmanı üzerinde SARS-CoV-2 virüsünün 7 günden fazla kaldığı saptanmıştır [90]. Yapılan farklı araştırmalarda yapay tükürük ve doku kültürü ortamında virüsün 90 dakika canlı kaldığı gözlenmiştir [91]. COVID-19 virüsünün aerosollerde 3 saat, bakır üzerinde 4 saat, kartonda 24 saat ve plastikler üzerinde 2-3 gün stabil kaldığı gözlenmiştir. Paslanmaz çelik üzerinde 13 saat ve polipropilen üzerinde 16 saat stabil kalarak canlılık göstermiştir [37] [92]. SARS-CoV-2 virüsü nem, sıcaklık ve kimyasal yapı gibi ortama göre değişen parametrelere bağlı olarak metaller, plastikler, kumaşlar ve kağıt dahil olmak üzere cansız yüzeylerde uzun süre canlılığını koruyabilir. Gözenekli yüzeyler, gözeneksiz yüzeylere göre daha az derecede virüs bulaşması sağlar [59] [93].

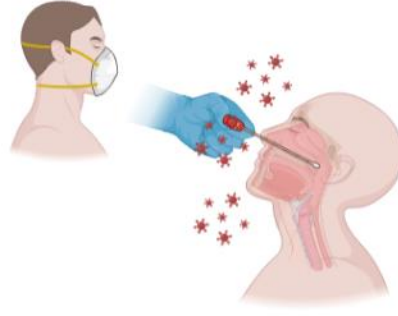
Tablo 2.3. SARS-CoV-2 virüsünün gözenekli ve gözeneksiz yüzeylerdeki stabilitesi

Yüzey	Virüs	Viral Titre	Sıcaklık	Bağıl Nem (%)	Canlı Kalma Süresi	Referanslar
Gözenekli Olmayan Yüzeyler						
Bakır	SARS-CoV-2	10 ⁵	21-23	40	4 saat	[37]
Paslanmaz çelik	SARS-CoV-2	10 ^{7.8}	22	65	7 gün	[90]
Plastik	SARS-CoV-2	10 ^{7.8}	22	65	7 gün	[90]
Gözenekli Yüzeyler						
Karton	SARS-CoV-2	10 ⁵	21-23	40	1 gün	[37]
Kumaş	SARS-CoV-2	10 ^{7.8}	22	65	2 gün	[90]
Maske, iç tabaka	SARS-CoV-2	10 ^{7.8}	22	65	7 gün	[90]
Maske, dış tabaka	SARS-CoV-2	10 ^{7.8}	22	65	> 7 gün	[90]

Tablo 2.3.'de gözenekli olmayan ve gözenekli yüzeylerde SARS-CoV-2 için stabilite süreleri gösterilmektedir. Gözenekli olmayan yüzeylerde gözenekli yüzeylere oranla daha yüksek kalıcılık olmuştur ve gözenekli olmayan yani pürüzsüz yüzeylerde virüs stabil olmaktadır [90]. Kişisel koruyucu donanımların yani koruyucu maskelerin geliştirilmesi virüsün yüzeyler üzerindeki hayatta kalma stabilitesini azaltmada önemli bir rol oynar.

2.6.9. Hastalardan numune alınması

Diğer koronavirüsler ve SARS-CoV-2 olan hastalardan solunum salgılarından (mukozal yol), terden, dışkıdan ve idrardan numune alınabilir. Virüs yüzeyde birikip maksimum 7 gün içerisinde insandan insana bulaşabilir. Üst solunum yolu için alınan numune, oral ve/veya nazal sürüntü şeklinde alınır. Entübe olmuş hastalar anestezi veya bronş fırçalamaları gerektirmesi sebebiyle alt solunum yolu numunelerinin alınması oldukça zor bir işlemdir. Alt solunum yolu numunesinin alınması bulaşıcı aerosol oluşturma riskleri içerir. Ayrıca hastanın yaralanmasına ve acı çekmesine sebep olur. Alt solunum yolu için uygun tek örnek doğal yoldan alınan akciğer balgamıdır [28]. Nazofaringeal (NP) sürüntüler, SARS-CoV-2'nin tespiti için başlıca alınan numunelerdir. Eğitimli kişiler tarafından alınan sürüntülerin toplanması sırasında hastada refleks olarak öksürük/hapşırmanın tetiklenmesi nedeniyle kişisel koruyucu donanımların kullanılması virüs bulaşmasını önlemek amacıyla gereklidir [56]. Tükürük, SARS-CoV-2 teşhis testi için alınan başka bir örnek türüdür. Alınan bu numune türünün avantajı toplama kolaylığının olması, hastalarda rahatsızlığa yol açabilecek bir şey olmaması ve hem hastalar hem de numuneyi alan kişiler için güvenli olması yer alır. Tükürük toplanması öksürük ve hapşırmaya gibi reflekslere neden olmadığı için virüs bulaşması olmaz ve KKD'lerin kullanılmasını gerektirmez [56] [94]. Tükürüğün bir diğer avantajı SARS-CoV-2'nin saptanması için, genel viral özellikleri yansıtır. Çünkü tükürük üst solunum yolunda ve mukozal hava yolu ile geçiş sağlayan alt solunum yolunda ağız boşluğunda birleşir [95]. Savelle ve ark. tarafından yapılan araştırmalara göre tükürük bazlı testlerin, toplanan burun delikleri sürüntüleri ile kıyaslandığında daha erken SARS-CoV-2 virüsünün tespit edebileceği ön görülmüştür [96].



Şekil 2.9. Nazofaringeal (NP) sürüntü numunesi alınması

2.6.10. SARS-CoV-2 için önleme taktikleri

SARS-CoV-2 gibi meydana gelen hastalıkların yaygınlaşmasına engel olmak için hasta olmuş kişilerin erken tespitini yapmak gerekir. Ülkeler tarafından koronavirüs tespiti için bu pandemi sürecinde nasıl bir yol izleneceğini gösteren ve bu sürecin nasıl yönetileceğini içeren acil durum içeriklerinin geliştirilmesi önemlidir. Her türlü yeni bulgunun değerlendirilmesi ve tedavi için yeni yöntemlerin bulunması bu yöntemler üzerine çalışılması gereklidir. Tüm dünyanın hastalıklara karşı korunmayı sağlama denemelerinde ülkelerin desteklenmesi gerekir [28]. Bunlara ek olarak virüsün kapalı ortamlarda, toplu taşımalarda, insan yoğunluğunun çok olduğu yerlerde ve hastanelerde hava yoluyla bulaşma etkisini indirmek için önleyici tedbirlerin yani cerrahi maske veya kişisel koruyucu donanımların (KKD) kullanılması gereklidir. Ayrıca havadaki partiküllerin temizlenmesini sağlayacak filtreler kullanılarak virüslerin havada yayılmasını önlemek gereklidir [59]. Kişisel koruyucu ekipmanlar, kişisel hijyen, koruyucu dezenfektanlar ve yüzey dezenfektanları temel önleme yollarıdır [97].

2.7. SARS-CoV-2’de Nanoteknoloji

SARS-CoV-2 için nanoteknoloji konakçının her koşulda virüsler ile mücadele etmesi için bir takım çözüm olanakları sunar. Nanoteknolojide farklı stratejiler kullanılarak COVID-19 salgını, özel antiviral yöntemler ve dezenfeksiyon yaklaşımları ile enfeksiyonun yayılma durumunun azaltılmasının yanı sıra etkili teşhis ve tedavi içinde birçok avantaj ve ilerleme sağlayacaktır. Bu stratejiler halkın ve sağlık çalışanlarının güvenliğini arttırmak ve virüsten korumak için güvenli kişisel koruyucu donanımların tasarımı, etkili antiviral dezenfektanların geliştirilmesi ve virüsü etkisiz hale getirebilen ve yayılmasını engelleyen yüzey kaplamaları, enfeksiyonu hızlı bir şekilde belirlemek için hassas, taşınabilir ve güvenli

sensörlerin geliştirilmesi, akciğerleri hedef alan yeni ilaçların üretilmesi ve var olan ilaçların bu yönde geliştirilmesi, antiviral etkili nanomalzemelerden yararlanılacak yeni aşılarda oluşturulmasıdır [98] [99].



Şekil 2.10. SARS-CoV-2 önleyici nanoteknoloji tabanlı stratejiler [98]

Kişisel koruyucu donanımlar içinde, cerrahi yüz maskeleri hasta ile ilgilenmesi durumunda vücut sıvılarının sıçramasına karşı güvenli koruma sağlaması için sağlık çalışanları tarafından kullanılır [100]. Enfekte hastaların öksürük ve hapsirlik damlacıklarını durdurup emebilen ve çok küçük olan damlacıkları ileri doğru hareket mesafelerini azaltmak için tıbbi maskeler takmaları gerekmektedir [61]. Ortamlarda kullanılan dezenfektanlar ve temizlik maddeleri ile yüzey temizliği, fomit yolu ile bulaşmayı azaltır ve mevcut olan fomitleri azaltarak damlacık veya aerosol yolunu bloke edebilir [57]. Yüzeyden virüs bulaşmasını indirmek için dezenfekte edici kimyasalları yavaş bir şekilde salabilen kendi kendini temiz tutan ve temizleyen yüzeyler üretmek faydalı olacaktır. Bu kaplamalar, dokunmaya, sürtünmeye ve yıkamaya karşı dayanımı yüksek olmalı, ömrü uzun olmalı ve toksik olmamalıdır. Metal nesne yüzeyleri için, bakır metali katyonları geniş spektrumlu antiviral etkilere ve insanlar için düşük toksisiteye sahiptir. Bu nedenle, yüzey bakırlaştırması, paslanmaz çeliğin hastanelerde ve kamusal alanlarda yaygın kullanımı nedeniyle fomit enfeksiyon oranlarını önemli ölçüde azaltabilen paslanmaz çelik nesnelere kendi kendini temizleme özellikleri sağlayabilir [61]. Havalandırma ve çeşitli filtreler

kullanmak, temiz hava sağlamak için kullanılır. Filtreler mekânlarda hava seyreltmesi aracılığıyla damlacık ve aerosol geçişini azaltmasını destekler [57]. Antiviral ilaçların geliştirilmesi, geliştirilen ilaçların dirence daha az yatkın olması ve farklı virüs çeşitlerine karşı etki sağlar. Nanoteknoloji ile geliştirilen nano alt yapılı biyosensörler, yüksek hassasiyet ile virüs enfeksiyonu için teşhiste kullanılmaktadır. Bir başka nanoteknoloji stratejisi ise, geliştirilen antijen, hedef iletimi ve kontrollü salım ile farklı türde nanomateryallere dayanan yeni yapılan aşılarıdır [99]. SARS-CoV-2'nin geniş çapta yayılması, yeni virüslerin meydana gelmesi var olan tedavi sistemlerinin aktivitesinde azalmaya neden oldu. Tedavi sınırlamalarını geliştirmek için daha geniş ve etkili yaklaşımlara gereksinim duyulur. Tespit ve teşhis araçları, kişisel koruma ekipmanları ve dezenfekte edici maddeler şeklindeki nanomalzemeler, SARS-CoV-2'ye karşı koruma sağlar [101].

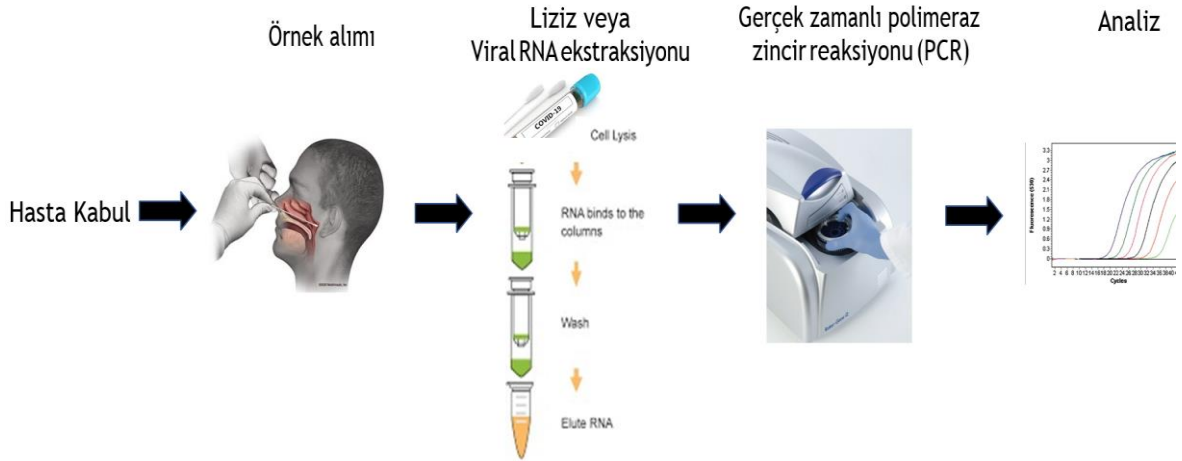
2.8. SARS-CoV-2'nin Teşhis Ve Tespit Yaklaşımları

Enfeksiyonların izlenmesi ve takip edilmesi için kontrol önlemlerinin alınması gereklidir. Teşhis ve tespit, hızlı bir şekilde katkı sağladıkları için COVID-19'un kontrol altına alınması için önemlidir [102]. COVID-19 tespiti, öncelikle ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PCR), göğüs röntgeni, bilgisayarlı tomografi (BT) taramaları ve kandaki biyobelirteçlerin tespitini içeren iki veya daha fazla tekniğin kombinasyonuna dayanmaktadır [103]. Nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerden virüsü tespit etmeye yönelik standart ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonuna (RT-PCR) dayanmaktadır. Özellikle COVID-19'un tespiti ve teşhisi için yapılan testler protein testi, özel nükleik asit testi ve bakım noktası testleridir [104] [98].

2.8.1. Polimeraz zincir reaksiyonu ve nükleik asit amplifikasyon testleri

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT) kullanılarak viral RNA'nın saptanması için, en yaygın NAAT yöntemi olan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) SARS-CoV-2 teşhisinde temel yapı haline gelmiştir [56]. PCR ağız boşluğu ve boğazdan alınan smear tekniğine dayanır [97]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) koronavirüsün varlığını belirlemek için önemli bir yöntemdir. Ek olarak ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) SARS-CoV-2'nin saptanması için iyi bir tekniktir. Yeni nesil dizileme, SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti için faydalıdır [105]. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), virüsler ve farklı organizmalardan nükleik asit bazlı genetik dizilerin var olduğunu teşhis etmek için kullanılan bir yöntemdir [106]. SARS-CoV-2 için

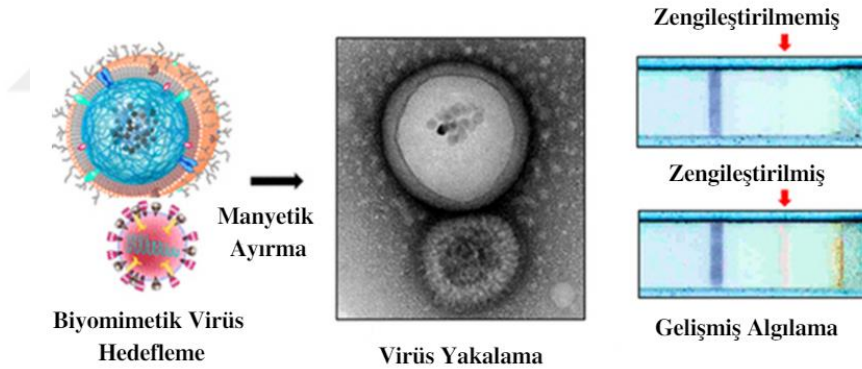
RT-PCR yapabilmek için virüs suşlarının bulunduğu biyolojik sıvı, üst ve alt solunum sıvısı toplanır. Numune toplanması çoğunlukla nazofaringeal ve orofaringeal sürüntülerden elde edilir [104]. Ardından toplanan numuneler içerisinde silika ve manyetik partikül içeren yöntemler ile viral RNA açığa çıkarılır[56]. Bu viral RNA'yı izole etmek için süzme ve ayırma adımlarından geçer. Ters transkriptaz enzimi kullanılarak viral RNA'dan tamamlayıcı tek sarmallı viral DNA (cDNA) üretilir. Amplifikasyon için cDNA'nın belirli özel bölgeleri bir polimeraz zincir reaksiyonuna girer. Bu işleminin gerçek zamanlı tespitini yapabilmek için cDNA'nın özel bölgesinin minik bir kısmı içinde hibritleşmek üzere oluşturulmuş ek bir DNA probu dahil edilir [107]. Açığa çıkarılan viral RNA'nın primerleri ve problemleri çeşitli reaktifler ile karıştırıldığı eşleştirilmiş bir floresan işaretleyici aracılığıyla virüs saptaması elde edilir [108]. RT-PCR tekniği nükleokapsid proteinin N1 ve N2 genlerine etki eder [109].



Şekil 2.11. PCR testinin akış şeması [110]

RT-PCR tabanlı testlerin avantajı, bir döngü eşiği (Ct) değeri oluşturmalarıdır [111]. Ct değeri, istenen diziyi ölçülebilir düzeye yükseltmek için gerekli olan PCR döngüsünün sayısını ifade eder. Çok fazla virüs içeren bir numune, pozitif bir sinyal oluşturmak için çok az PCR döngüsüne ihtiyaç duyacaktır. Bu sebeple düşük bir Ct değeri oluşacaktır. Bu durum asıl numunede yüksek viral yük anlamına gelir. PCR testinin dezavantajları arasında nadir bulunan ve maliyeti yüksek reaktiflere, pahalı laboratuvar aletlerine ve bilgili laboratuvar personeline gereksinim yer alır. Ayrıca fazla sayıdaki örneğin değerlendirilmesi zaman alıcıdır ve işlem adımları ile sonuçların üretilmesi uzun zaman alabilir. RT-PCR yöntemi testlerinin fazla duyarlı olması ve aktif (canlı) virüsler ile aktif olmayan (cansız) virüs arasında ayırım yapamamasıdır [112] [113]. Pahalı bir sistemdir. Ayrıca küçük yerleşim yer-

lerinde fazla örnek hacmini barındıracak alt yapı olmadığı için her yerde bulunması güçtür. Pandemi dolayısıyla RT-PCR kitleri ve reaktifleri artan talebi karşılayamamaktadır [114]. Alternatif bir yaklaşımda Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada virüs partiküllerinden viral RNA'yı ekstrakte (ayırma) yapmak için manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Gelişmiş algılama sağlamak adına virüs partiküllerini zenginleştirmek için biyomimetik nanopartiküllerin kullanılmıştır [115]. Biyomimetik manyetik nanopartiküller, konak hücre zarını taklit etti ve bu nanopartiküllere virüs bağlanmasına izin vermek için hedef reseptörler aracılığıyla fonksiyonelleştirilmiştir. Fonksiyonelleştirilen nanopartiküller, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPION) ile kapsüllenmiştir. Bu nanopartiküller, manyetik ayırma yoluyla hem virüsü zenginleştirmiştir hem de virüslerin gelişmiş tespitine yol açmıştır. İmmünokromatografik şerit testi, hücre bazlı tittering analizleri ve qRT-PCR (kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu) gibi çoklu virüs teşhis analizleri kullanılarak tespit edilebilir. Biyomimetik manyetik nanopartiküller ile virüs tespiti önemli ölçüde geliştirilmiştir. Bu sistem hızlı, kolay ve hassas viral tespit tekniklerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır [114].



Şekil 2.12. Biyomimetrik virüs hedefleme [114]

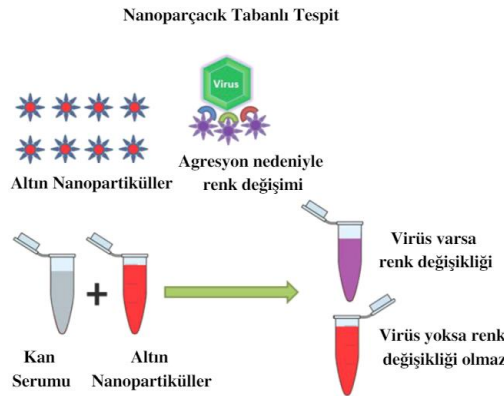
2.8.2. Bilgisayarlı tomografi

Bilgisayarlı tomografi (BT), Covid-19 enfeksiyonun tespiti için RT-PCR'den yanlış sonuçları doğrulamak için teşhis aracı olarak kullanılmaktadır [116]. Bu yöntemde, göğüs üzerinden kontrastlı üç boyutlu (3D) görüntü oluşturmak için açılardan çok sayıda X-ışını ölçümü alınır. Bu sonuçlar SARS-CoV-2'nin varlığını saptamak için radyologlar tarafından incelenir [107]. Bilgisayarlı tomografi SARS-CoV-2 virüsü sebebiyle akciğerlerde oluşan viral pnömoninin bir göstergesi olan buzlu cam opaklığını gösterir [117]. BT taramaları COVID-19'un erken teşhisinde en önemli araçlardan biridir. Fakat tanı koyan radyologlar

için büyük bir sorundur. COVID-19 semptomlarını diğer akciğer hastalıklarının semptomlarından ayırt etmek oldukça zordur. BT taramalarının maliyeti ise yüksektir. Ayrıca operasyon ve analiz için teknik beceri gerektirir. SARS-CoV-2 tespiti için yalnızca RT-PCR ile birlikte bakılır [107].

2.8.3. Bakım noktası teşhisi (POCT)

POCT testi, enfekte olmuş hastadan alınan örneklerin laboratuvarlara gitmeden teşhis edilmesine olanak sağlar [114]. Enfeksiyon kişiden kişiye hızlı ve kolayca geçebileceğinden, teşhisin deneyimli personele, komplike ve zaman alıcı prosedürlere ve gelişmiş laboratuvarlara ihtiyaç duymadan POCT'de olması daha avantajlıdır [118]. Hem canlı virüs taşıyan hem de taşıyıcı olan hastaların tespiti sağlar. Az numune miktarı kullanır ve 20 dakikadan daha kısa sürede tespit edilmektedir [119]. Bakım noktası RNA ve DNA tanımak için ve kompleks olmayan kolorimetrik ve floresan tahlillerin geliştirilmesi önemlidir [88]. Kolorimetrik biyosensörler, basit renk değişiklikleri aracılığıyla analitin saptanmasına izin verdikleri için çekici POCT'lerdir.



Şekil 2.13. Virüsün nanoparçacık tabanlı kolorimetrik tespiti [114]

Kim ve arkadaşları, MERS-CoV virüsünü saptamak için altın nanoparçacıkları kullanan bir kolorimetrik tahlil geliştirmiştir. Bu tahlilde iki tiyolle modifiye edilmiş prob ve sitrat başlıklı altın nanoparçacıklarını (AuNP'ler) kullanır. Problar, güçlü Au-S etkileşimleri yoluyla AuNP'lere konjuge edilir. Sonrasında AuNP'ler toplanır (pozitif elektrolit varlığında). Tuz AuNP'ler agregasyonuna neden olur. çıplak gözle görülebilen veya lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) kayması ile tespit edilebilen renk değişimine yol açar. Böylece hedef DNA belirlenmiş olur [120].

2.8.4. Hızlı antijen testleri (RAT)

Bir POCT şekli olan hızlı antijen testleri (RAT'ler) viral proteinlerin varlığını saptar. Bu tarz testlerin hepsi, hedef viral proteinler var ise test şeridi üzerinde bir floresan bant oluşturan yanal akışlı immünoanalizlerdir. Genellikle ucuz ve hızlıdır. Ticari olarak temin edilebilen RAT'ların çoğu viral nükleokapsid proteinini (N geni) yakalamayı amaçlasa da, spike proteini (S geni) hedefleyen az sayıda test mevcuttur. Antijen bazlı testleri performansında potansiyel etkiyi onaylayan herhangi bir çalışma yoktur [56].

2.8.5. SARS-CoV-2 için antikor testleri

Büyük ölçekli testlerde vücuttaki virüs tespiti için protein bazlı seroloji testleri, yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem virüs kaynaklı antijenlerin olmasına veya bağışıklık sisteminin antikorlara verdiği yanıtlarına dayanır. Testlerin doğruluğu, güvenilirliği, seçiciliği ve sürekli karşılaşılan antikorların yanlış olumlu çıkma riskini arttıran sorunlar (çapraz reaktivite yapması) ortaya çıkmaktadır. Testin bir diğer sıkıntısı ise enfekte bireylerin teşhisi veya başkalarına bulaştırma noktasında mutasyonların meydana gelmesidir [119] [99].

Enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) gibi biyokimyasal testler, SARS-CoV-2 virüsünün teşhisi için enfeksiyona bir cevap olarak viral antijen veya antikorları tespit etmek için kullanılmıştır [107]. Antijenlerin veya antikorların değerlerinin ölçülmesi, bu testte kolorimetrik ve spektrofotometrik yöntemler ile yapılır [88]. Hastadan alınan numuneler viral antijenlerle döşenmiş çoklu mikrotitre plakasının bir tüpüne ilave edilir. Antikor, renk değişmesine neden olacak bir enzime bağlanır. Burada rengin oluşması, hastadan alınan numunede viral antijene karşı bir antikorun bulunduğunu gösterir. Çoklu plaka tahlilleri, büyük ölçekli testlerin yapılmasına izin verir. Fakat pahalıdır ve bir laboratuvar ortamında yapılmalıdır [56]. Antikor testlerinin en büyük avantajı antikorların varlığında aşılarda verimini doğrulamasıdır. Fakat en büyük problemi, enfeksiyonun ilerlemesi sırasında viral yük miktarı değişmesidir [107].

2.8.6. Nanoteknoloji tabanlı sensörler

Yukarıda bahsedilen teşhislerin hepsinin kendine has özellikleri vardır. Olumlu noktaları olduğu gibi olumsuz noktaları da vardır. Olumsuz noktaları gidermek için biyosensörler geliştirilmiştir. Nanosensörler çok hassas, maliyeti az, hızlı ve basit ölçümleri birleştirebilen bir algılama sistemidir. Nanoteknoloji tabanlı sensörler, teşhis için daha kesin

ve hızlı bir yanıt sergilemek için çeşitli özelliklerin optik, manyetik, elektrokimyasal ve biyolojik gibi çeşitlerinden oluşmaktadır [121] [99]. Virüsün teşhis testleri için biyosensörler üzerinde, fotonik, elektriksel ve katalitik özelliklere sahip olmasından dolayı altın nanoparçacıklar çoğunlukla kullanılmıştır [120]. Sensörler için nanoteknoloji gelişmiştir. Seo ve arkadaşları grafen bazlı nanobiyosensör tasarladıklarını bildirmişler [122]. Hastadan alınan numunelerde SARS-CoV-2'yi tespit etmek için nanosensör tasarlanmıştır. Bu sensör, SARS-CoV-2'nin S proteinine karşı özel bir antikorla gömülü grafen nano tabakalar ile üretilmiştir. Sistem denemesi için COVID-19 hastalarından alınan antijenik protein ve nazofaringeal sürüntü numuneleri kullanılmıştır. Sensörlerin avantajı, son derece hassas olması, sensörün içinde asılı kalan SARS-CoV-2 spike antijen proteinini tespit edebilmesi, ve numunelere ön işlem uygulaması gerektirmemesidir. Geliştirilen nanosensörler, in vitro sistemlerin in vivo sistemlere dönüştürülmesinde önemli bir payı vardır [123].

2.9. Biyobelirteçler

Biyobelirteçler Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün anlamına göre, insan vücudunda veya malzemelerde ölçüm alınabilen, hastalığı veya hastalığın ortaya çıkış sıklığını bilen, hastalığı etkileyen madde, yapı yada proses olarak açıklanmıştır [124]. Biyobelirteçin bir diğer anlamı ise Ulusal Kanseri Enstitüsü (NCI)'den tanımlanmaktadır. Enstitüye göre insanların kanında, vücut sıvılarında veya dokularında bulunan hastalığın işareti olarak belirtilen biyolojik moleküllerdir [125]. Klinik biyobelirteçler tıbbi koşullarda hastalığın varlığının ve şiddetinin ölçülebilir biyolojik göstergeleridir [126].

2.9.1. SARS-CoV-2 virüsünde nükleokapsid (n) spesifik antijen

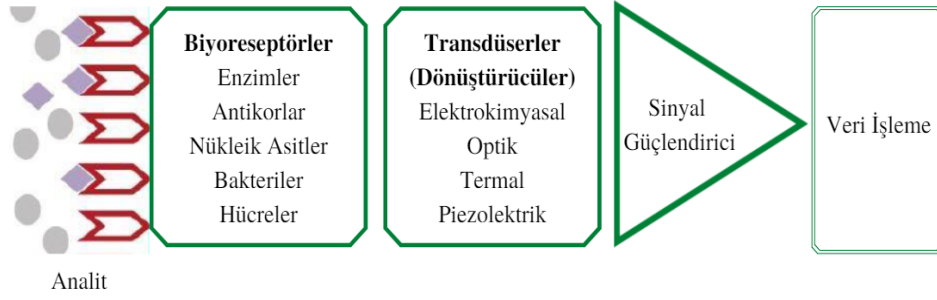
Nükleokapsid (N), SARS-CoV-2 enfeksiyonu anında yüzeyde en çok bulunan proteindir. Enfeksiyonun en yüksek ekspresyonu ilk 12 saatte gerçekleşir. Bu protein, koronavirüslerin enfeksiyon yaşamı döngüsünde çok önemli bir rol oynar. N proteini birçok amino asitten oluşmaktadır [127]. Viral enfeksiyondan sonra, viral RNA genomuna bağlanır. Viral RNA yapısını korur ve RNA'yı bir Ribonükleoprotein (RNP) kompleksi halinde paketleyen çok önemli bir bileşendir [111]. Ribonükleoprotein (RNP) çekirdeği oluşturur ve viral RNA genomunu RNP çekirdeğine paketler. Bu paketleme virüsün doğru bir şekilde kopyalanmasını ve kendi başına toplanmasını sağlar [128]. Yeni konakçıları hasta etmek için virüs replikasyonuna, virüsün birleştirilmesine ve konakçı hücrelerden salınmasına yardımcı olur [129]. Virüsün RNA'sı ile N proteinleri stabilite sağlar. N proteininin birden fazla işlevi vardır. Ana işlevleri ribonükleoproteinleri oluşturarak genomu korumak, replikasyon anında

viral RNA kopyalanmasını düzenlemek, RNA genomu ile etkiye girerek viral proteinlerin sentezini uyarmaktır [127]. RNP parçacıkları viral zarın içinde yer alır ve zarf proteinleri N proteinini sararak farklı bir katman oluşturur. RNP'lerin konumları, N ve M proteininin C-terminali etkileşimiyle desteklenebilir[128]. Yapısal proteinler arasında N proteini, enfeksiyon sırasında güçlü bir immünojendir [130]. Yapılan araştırmalarda hastalardaki antikor yanıtının nükleokapside özgü olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca yüksek hassasiyet ve uzun süre kalıcılık gösterdiği belirtilmiştir. S protein N proteinden sonra en sık hedeflenen protein olarak bilinmektedir [131]. COVID-19 hastalarından alınan plazma numuneleri veya serum antikorlarında yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin enfeksiyonunu erken tespit etmek için N proteinine özgü antikorların, S proteinine özgü antikorlara oranla daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir [132]. N proteinleri COVID-19 hastalığı teşhisi için güçlü antijenlerdir [133].

2.10. Biyosensörler

Sensörler, moleküllerin fiziksel bir özelliği veya ortam şartlarını algılayan daha sonra ölçen ve kayıt altına alan, sinyal şeklinde cevap oluşturan cihazlardır [134]. Biyosensörler kimyasal dönüştürücüler veya mikrosistemler ile incelenen biyolojik yapıları birleştirirler [135]. Biyosensörler, biyolojik reaksiyonlarda hedef analit (analiz edilecek madde) algılama özelliğine sahiptir. Biyokimyasal ve elektrokimyasal iki yapıdan oluşur. Biyosensörlerin biyokimyasal bölümü ile ilgili gerçekleşen durum analiz edilecek maddeyle etkileşime girer ve hedef maddenin tanınmasını sağlar. Elektrokimyasal bölümü ile ilgili gerçekleşen durum ise hedef maddeyi algılama ve tanıma sonucu elde edilen sinyalin ölçülebilir sayısal bir değere dönüşmesi sağlanır [136]. Kullanım alanlarına göre çeşitli sensörler mevcuttur. Günümüzde biyolojik molekülleri algılamalar yapıldığı için genellikle biyosensörler kullanılmaktadır.

Analizi yapılacak maddenin yani analitlerin, antikorlar gibi biyolojik algılayıcıların ve hassas seçiciliği ile etkileşimde bulunan elektrotlar gibi fizikokimyasal dönüştürücülerin bir araya getirilmesi aracılığıyla fiziksel sinyaller ölçülür. Ölçülen fiziksel sinyallerden elektriksel sinyaller elde edilir. Bu şekilde çalışma sergileyen yapılar biyosensör olarak adlandırılır [137].



Şekil 2.14. Biyosensör bileşenleri ve çalışma prensibi [138]

Biyoreseptörler biyosensörlerin en önemli kısmıdır. Analiti fark eden biyomoleküllerdir. Biyoreseptörler spesifik, kararlı ve sadece istenen analite uygun olmalıdır [139]. Transdüserler, reseptörlerin analitler ile meydana getirdiği biyolojik reaksiyonları ölçen ve sinyale dönüştüren yapılardır [136]. Sinyal güçlendiricilerde transdüserden gelen sinyallerin yükseltilmesini sağlar. Üretilen bir biyosensörün kullanılabilmesi ve kabul edilebilmesi için bazı parametrelerinin olması gerekir. Duyarlılık, seçicilik, ölçüm aralığı, ölçüm süresi, tutarlılığı, tespit sınırı, ömrü ve kararlılığı parametreleridir [139].

Biyosensörlerin avantajları;

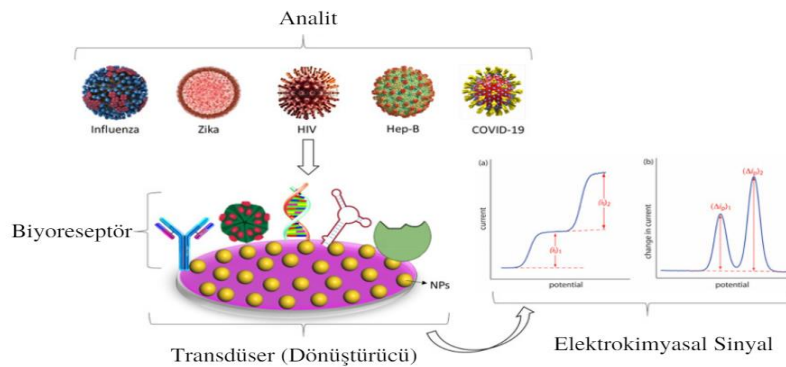
- Pratik olması,
- Hızlı cevap vermesi,
- Sürekli ölçüm olanağının olması,
- Biyoalgılayıcılardan dolayı yüksek seçicilik özelliğinin olması,
- Diğer cihazlarda ölçülemeyen küçük molekülleri ölçmesi,
- Ucuz olması,
- Modifiyesinin basit olması,
- Analiz öncesi numunelere ön işlem gerektirmemesi,
- Düşük analiz edilecek madde derişimlerini bile tayin edebilmesi,
- Cihaz küçültülmesine uygun olması,
- Ölçümlerin kolay yapabilmesi,
- Kullanıp atılabilir olması,
- Aynı anda birden fazla analit derişimini ölçebilmesi,
- Üretiminin kolay olmasıdır [134].

Antijen-Antikor, nükleik asitler ve reseptör ilişkilerinin kullanıldığı biyosensörler biyoafinite tabanlı sensör grubuna girmektedir. Biyoafinite tabanlı sensörler kullanılan trans-

düser yani dönüştürücü mekanizmasına göre 5'e ayrılır. Bunlar rezonans biyosensörler, optik biyosensörler, termal biyosensörler, iyon duyarlı biyosensörler ve elektrokimyasal biyosensörlerdir[140].

2.10.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyokimyasal bilgiyi sinyale dönüştüren, basit yapısı, yüksek hassasiyet, ucuz maliyeti ve yüksek minyatürleştirme olasılığı gibi avantajlara sahip elektrokimyasal dönüştürücü içeren biyoalgılama cihazlarıdır [1]. Elektrokimyasal biyosensör, antijen-antikor etkileşimi gibi biyokimyasal olayları elektrik sinyallerine (akım, voltaj, empedans gibi) dönüştüren cihazlardır[141] [142]. Elektrokimyasal biyosensörler genellikle, hareketi durdurulmuş biyomoleküller aracılığıyla elektron üretimini sağlayan ve çözeltinin elektriksel özelliklerini etki eden istenen hedef analit arasındaki enzimatik kataliz reaksiyonuna bağlıdır [143]. Elektrokimyasal biyosensörde, elektrotlar, biyomoleküllerin (enzim, antikor ve nükleik asit) immobilizasyonu için kullanılan önemli bir bileşendir. Böylece elektrot üzerindeki kimyasal gruplara bağlı olarak amin- ve karboksil (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid:EDC), aldehit- (hidrazid) ve tiyol (maleimid) üzerinden çeşitli kimyasal modifikasyon yöntemleri uygulanır [3]. Elektrokimyasal biyosensörler, istenen hedef analit konsantrasyonuna bağlı olarak meydana gelen indirgenme-yükseltgenme basamaklarını içeren sistemlerdir [140]. Elektrokimyasal biyosensörler hazırlanan çalışma elektrotlarından, Ag/AgCl oluşan referans elektrot ve platin telden oluşan karşıt elektrottan meydana gelmektedir. Elektrokimyasal biyosensörlerin genel amacı kimyasal tepkime ile meydana gelen iyon ya da elektronların kaybedilmesi veya kazanılmasıdır. Böylece çözeltinin elektriksel özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkar ve bu değişimler ölçülerek kullanılır [144]. Algılama prensibine ve uygulamasına bağlı olarak, elektrokimyasal biyosensör cihazları potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik, voltametrik ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi olarak ayrılır.



Şekil 2.15. Virüs tespiti için elektrokimyasal biyosensörlerin prensibi [1]

2.10.2. Potansiyometrik elektrokimyasal sensörler

Kontrollü akım yöntemleri olarak da adlandırılan potansiyometrik yöntemler, uygulanan bir akıma yanıt olarak bir elektrik potansiyelinin ölçüldüğü yöntemlerdir. Uygulanan akım tipik olarak düşük genliklidir. Kontrollü akım yöntemlerinin bir avantajı, kontrollü potansiyel yöntemler için gerekli olana göre düşük maliyetli ölçümleri kullanma yeteneğidir [2]. Bu sensörde elektrokimyasal tepkimenin indirgenme ve yükseltgenme potansiyeli ölçülmektedir. Çözeltideki bir elektroda gerilim uygulandığında elektrokimyasal tepkimelerden dolayı bir akım oluşur. Bu akımın incelenmesi potansiyometrik elektrokimyasal sensörler tarafından olmaktadır [145]. İyondaki konsantrasyon değişimleri tespit etmek için bir biyoreseptör ve bir dönüştürücü kullanılır. Biyosensörlerdeki yanıt, analitin konsantrasyon değişimini yansıtır [88].

2.10.3. Voltametri

Kontrollü potansiyel yöntemler denilen voltametrik yöntemler, indirgenme yükseltgenme reaksiyonlarını harekete geçiren ve sisteme elektrik potansiyel uygulanmasına yanıt olarak akımın ölçüldüğü yöntemlerdir. Ölçülen akım, numune içindeki hedef analitin konsantrasyonunun göstergesidir [2].

2.10.4. Döngüsel voltametri (CV) ve Kare dalga voltametrisi (SWV)

Döngüsel voltametri (CV), elektrik potansiyelinin tam veya kısmi döngülerde, ileri ve geri yönde yani yükseltgenme ve indirgenme basamaklarının tarandığı yaygın olarak kullanılan bir doğrusal tarama yöntemidir. CV, patojen tespiti için en yaygın kullanılan voltametrik yöntemdir[2]. Dönüşümlü Voltametri (CV) elektrokimyasal reaksiyonların nitel özellikleri hakkında bilgi verir. Elektriksel potansiyel taraması önce belli bir yönde görüntülenir ve bu taramanın sonundaki potansiyel değerinden ilk potansiyel değerine doğru ters yönde bir tarama daha yapılır. Bu işlemin avantajı ileri yöndeki taranırken meydana gelen elektron transfer tepkimelerinde ortaya çıkan ürünlerin geri tarama sırasında incelenebilmesidir. Ayrıca dönüşümlü voltametre redoks potansiyellerinin tanımlanmasında, elektrokimyasal tepkimelerden önce veya sonra oluşan kimyasal tepkimelerin saptanmasında kullanılan güçlü bir araçtır [144]. Kare dalga voltametrisi (SWV) nitel ve nicel analiz için kullanılır. SWV, bir merdiven potansiyel dalga biçimi üzerine bindirilmiş simetrik bir kare dalga darbesi uygulayan bir tür merdiven voltametrisidir. Dalga formunun ileri darbesi, merdiven basamağı ile çakışmaktadır. Bu yöntemlerde elektrota uygulanan gerilim sinyalinin zamanına bağlı olarak iki noktada akım

sinyalleri ölçülür. İki akım değeri arasındaki fark uygulanan DC potansiyelin fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Oluşan pikler elektrokimyasal hücredeki türlerin elektroaktifliğini gösterir. Bu akım farkının ana bileşeni elektrot yüzeyindeki indirgenme ve yükseltgenmeye bağlı olarak oluşan akımdır. Bu metotlarda sinyal/gürültü oranı DC metotlara oranla daha yüksektir[2] [145].

2.10.5. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), çözelti-elektrot ara yüzünde ortaya çıkan çok küçük değişiklikleri bile tespit edebilen verimli bir teknik olarak kabul edilir. Gerilim uygulanarak değişen akım ölçülmektedir. Bu nedenle, EIS, malzemeleri karakterize etmek ve bağlanmayı izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hızlı yanıt vermenin yanı sıra, düşük algılama sınırı (LOD), ve düşük maliyetli olması ve aynı zamanda birden fazla numunenin gerçek zamanlı izlenmesi, EIS yönteminin başlıca avantajlarıdır. Ayrıca, EIS, nanomalzemelerin elektriksel özelliklerini araştıran bir tekniktir [1]. Empedans tabanlı yöntemler kullanan ve empedans yanıtı eşdeğer devre modelleri kullanılarak modellenebilen biyosensörler, elektrikli çift katmanın kapasitansını hesaplamak için kullanılabilir [146].

3. MATERYAL METOD

Sunulan tez kapsamında düşük maliyetli, minyatürize edilmiş elektrokimyasal yapılar olan yüzey baskılı elektrotlar kullanılarak, bu elektrotların yüzeylerinin aşağıda belirtilen uygun biyokimyasal ajanlar ile dekore edilen ve hedeflenen COVID-19 N antijenini tanımayı sağlayan ve yerinde ölçümlere olanak sağlayacak olan bir sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bölümde kalem grafit elektrotların modifiye edilmesi ve süreç içinde her bir adımda alınan çıktıların fiziksel ve kimyasal olarak karakterizasyon (SEM-EDX) ile antiviral adımlarına değinilecektir.

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca iki aşamadan oluşmaktadır.

1. kısım kalem grafit elektrotlarının (PGE) hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmesi, 2.kısım ise PGE'lerin hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edildikten sonra COVID-19 Nükleokapsid proteini antikoru ile donatılması ve virüs antijeninin tespit edilmesidir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar

3.1.1. Kalem grafit elektrotlarının (PGE) hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar

PGE elektrotların HAP ve Bakır Oksit ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar Bakır(II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kalsiyum klorür (CaCl_2), diamonyum-fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) kimyasalları Merck firmasından kullanılmıştır. Sodyum hidroksit (NaOH) Sigma Aldric firmasından kullanılmıştır. Ayrıca deiyonize su kullanılmıştır.

3.1.2. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 Nükleokapsid proteini antikoru ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar

1.aşama ile modifiye edilen kalem grafit elektrotların Nükleokapsid protein N antikoru ile modifiye edilmesinde kullanılan kimyasallar bakır oksit çözeltisi ile N antikorumu bağlayabilmek için %25'lik Amonyak (NH_3)/ (NH_4OH) Carlo Erba Reagenti firmasından kullanılmıştır. Sodyum fosfat tamponu çözeltisini pH 7.4 yapmak için monosodyum fosfat (NaH_2PO_4), NaOH Merck firmasından kullanılmıştır. Sodyum fosfat (Na_2HPO_4) Fisher Scientific firmasından kullanılmıştır. HCl Meb-Ders Aletleri Yapım Merkezinden kullanıldı. N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, %98 saf-

lıkta) ve N-hydroxysuccinimide (NHS, %98 saflıkta) Sigma-Aldrich firmasından kullanıldı. Albumin (BSA) Amresco firmasından kullanıldı. 1.6 mg/ ml SARS-CoV-2 N protein (E. Coli, AG-0104) Synbiotik firmasından kullanıldı. Tavşandan elde edilmiş Poliklonol N antikoru kullanıldı.

Sinyal ölçümleri ve analiz için hazırlanan çözeltiler ($K_3Fe(CN)_6$) ve ($K_4Fe(CN)_6$) ve KCl kimyasalları Fisher firmasından kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tezimizde kalem grafit elektrot (KGE) olarak kalem ucu olarak Tombow (0.5 mm, 2B) markalı kalem uçları kullanılmıştır.

Çözelti hazırlamak için Merck'in Direct-Q modelinden saf su ve ultra saf su kullanılmıştır.

Çözeltilerin tartım işlemleri Weightlab Instruments markalı WL 303L modelli 0.001g'a kadar hassas ölçüm yapan terazi kullanılmıştır.

pH ölçümlerini kan değeri olan 7.4'e ayarlamak için Milwaukee markalı Mi 180 Bench meter modele sahip pH cihazı kullanıldı. Cihazın doğruluğundan emin olmak için pH ölçümü almadan önce pH'ını bildiğimiz pH 4-7-10 tamponları ile kalibre edilmiştir.

Kalem grafit elektrotlarının (PGE) hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmesinden sonra hazırlanan kalem grafit elektrotların yüzeyini inceleyip yüzeyde istediğimiz tutunmanın olup olmadığını görmek için SEM analizleri yapılmıştır. Boğaziçi Üniversitesi Kandilli Kampüsünde bulunan Thermoscientific markalı Quattro S ColorSEM modelli taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır.

Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 Nükleokapsid proteini antikoru ile modifiye edilmesi kısmında amonyağın kalem grafit elektrotlar üzerinde kurutulması için Nuve markalı FN 400 modelli etüv cihazı kullanılmıştır.

Sinyal ölçümlerini alabilmek ve voltametrik ölçümler elde edebilmek için Palm Sense 4 markalı potansiyostat/ galvonastat cihazı kullanılmıştır.

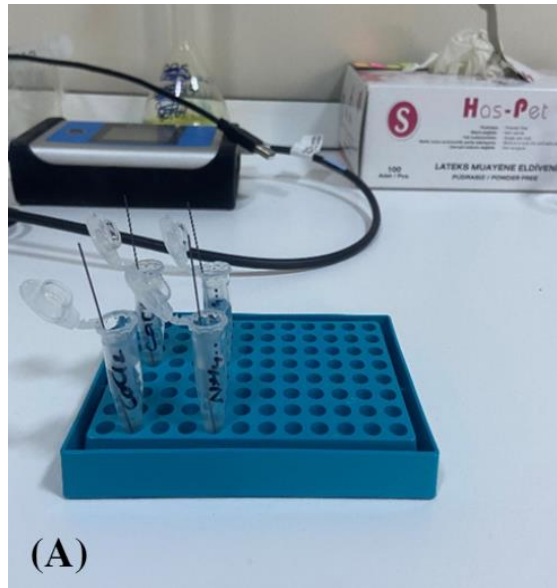
3.3. Elektrotların Modifikasyonu

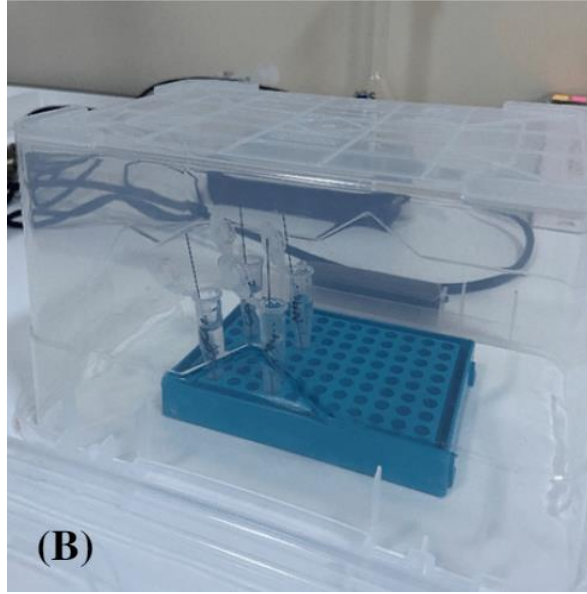
3.3.1. Hidroksiapatit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi/kaplanması

Kalsiyum fosfat bileşiklerinin (CaP) en önemli özelliklerinden birisi iyon değişimi yapabilmeleridir. Ayrıca yüzey alanını arttırma gibi bir durumu vardır. Yüzey alanı arttırma

sayesinde elektrokimyasal analizlerde iletkenlik artışı gözlemlenmektedir. İyon değişimleri kalsiyum fosfat kristallerinin yüksek yüzey alanına sahip olması ve kristal yüzeyindeki gevşek bağlar aracılığı ile sağlanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada HAP ların bu özelliklerinden yararlanılarak Cu^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Al^{+2} , Ni^{+2} gibi divalent metal iyonları ile çalışılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Yakın zamanlarda ağır metal gideriminde çok sık ihtiyaç duyulan kalsiyum fosfat tuzları, Cu^{+2} gibi metal iyonlarına karşı afinitesinin olduğu bildirilmiştir. CaP bileşikleri ile ağır metallerin adsorpsiyonunda CaP'nın yüzeyinde bozulma gerçekleşir ve bağlanan metal iyonları CaP içerisine çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçişi olur. CaP içindeki Ca^{+2} iyonlarının diğer metal iyonları ile yer değiştirerek tekrar CaP bünyesine tekrar yerleşir [147].

Edindiğimiz literatür bilgilerine dayanarak hidroksiapatit kullanmanın kalem ucu elektrotlarımızın yüzey alanını arttıracak düşünülürdü. 0.12 M CaCl_2 ve 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. 1ml olan küçük ependorflara bölüştürüldü. Kullandığımız kalem ucu elektrotlarımız (PGE) Tombow (0.5 mm, 2B) markalı kalem uçlarımızdır. Her bir kalem ucu grafit elektrodumuzun 1 cm'si çözeltiliye girecek şekilde daldırma işlemi uygulandı. Kalem ucu grafit elektrotlarımızı önce 0.12 M CaCl_2 çözeltisine daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisine daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemi gerçekleştirildi. Her bir kalem ucu grafit elektrodumuz için 5 dakika 0.12 M CaCl_2 çözeltisinde ve 5 dakikada 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisinde olacak şekilde daldırma süresi uygulandı. Daldırma ile yüzey kaplama işlemi yapılırken sistemin üzeri kapatıldı. Daldırma yöntemi ile kalem ucu elektrotlarımıza hidroksiapatit kaplayarak yüzey alanı artırılmış oldu.





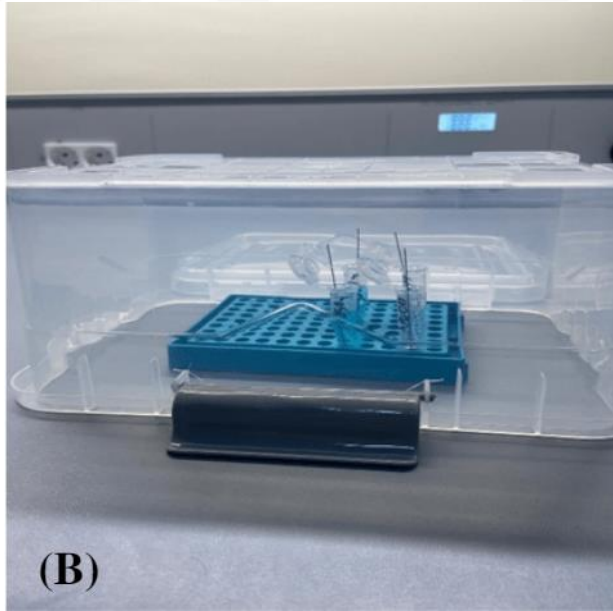
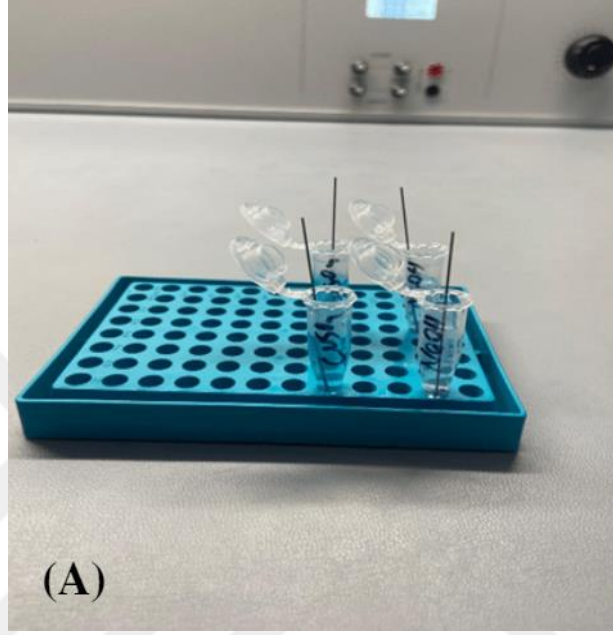
Şekil 3.1. (A) Hidroksiapatit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi ve (B) kapalı sistemin gösterilmesi

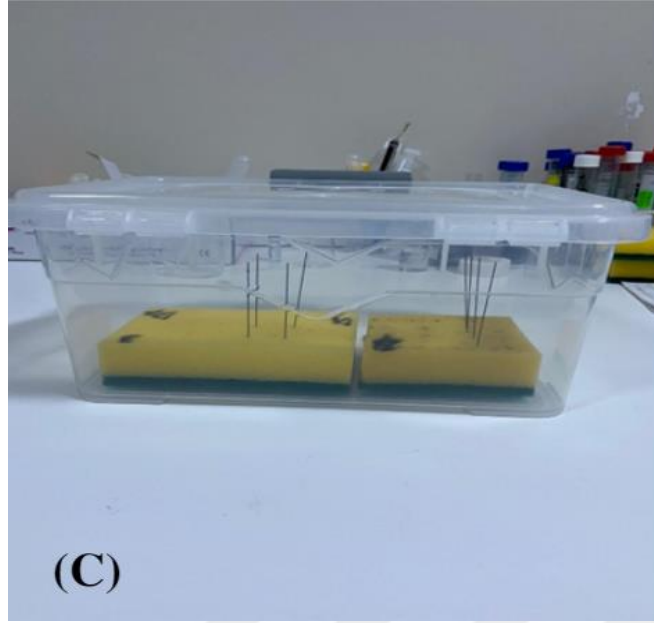
3.3.2. Bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi

Bakır farklı sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi sahip olduğu başarılı fiziksel ve kimyasal özelliklerindendir. Bakır aktif yüzey kaplama özellikleri sağlar. Bakır diğer metallere göre daha ekonomik ve mükemmel kararlılıktadır [97]. Nanoyapıya sahip CuO, üstün elektrokimyasal aktivitesi ve düşük bir potansiyelde elektron transferini teşvik etmesi nedeniyle, biyosensörlerin modifikasyonu için iyi bir adaydır[148]. Das ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yüzey aktif madde konsantrasyonunun CuO modifiye edilen biyosensörlerin performansıncı incelediklerinde konsantrasyondaki bir artışın duyarlılıkta bir artışa yol açtığını bildirdiler. Duyarlılıktaki artış iyi bir elektron transferinden ve yük aktarımından kaynaklıydı[149]. Kalem ucu grafit elektrotlarımızın yüzeyinde kolayca birikmesinden dolayı CuO kullanılmıştır.

Literatürden öğrendiğimiz bilgilere dayanarak bakır oksit çözeltisi kullanmanın kalem ucu grafit elektrotlarımızın yüzeyinde istenen derece birikme elde edileceğini göstermiş oldu. Literatürden edinilen bilgilerden CuSO_4 ve NaOH çözeltileri hazırlandı. Sistemi denemek adına 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5M NaOH çözeltisi 1:1 oranında hazırlandı. 1ml olan küçük ependorflara bölüştürüldü. Kullandığımız kalem ucu elektrotlarımız (PGE) Tombow (0.5 mm, 2B) markalı kalem uçlarıdır. Her bir kalem ucu grafit elektrodumuzun 1 cm'si çözeltiliye girecek şekilde daldırma işlemi uygulandı. 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve saf su karıştırılarak çözelti elde edildi. 0.5M NaOH ve saf su karıştırılarak çözelti elde edildi. Kalem ucu grafit elektrotlarımızı önce 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 0.5M NaOH çözeltisi 1:1 oranında daldır-

ma yöntemi ile yüzey kaplama işlemini gerçekleştirilmiş oldu. Her bir kalem ucu grafit elektrodumuz için 5 dakika 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinde ve 5 dakikada 0.5M NaOH çözeltisinde olacak şekilde daldırma süresi uygulandı. Daldırma ile yüzey kaplama işlemi yapılırken sistemin üzerini kapatıldı. 5 dakika sonunda kalem ucu grafit elektrotlarımızı çözelti içerisinde çıkararak 24 saat kapalı ortamda kurumaya bırakıldı. Bu durum kalem uçları üzerinde yüzey absorpsiyonunu etkinleştirmek için yapıldı.





Şekil 3.2. (A) Bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi, (B) kapalı sistemin gösterilmesi ve (C) elektrotların kurutulması

($K_3Fe(CN)_6$) ve ($K_4Fe(CN)_6$) kimyasalları hazırlanarak $5\text{ mM } Fe(CN)_6^{-3/-4}$ analit çözeltisi elde edilmiştir. Sinyal ölçümleri ve analiz için $5\text{ mM } Fe(CN)_6^{-3/-4}$ ve 0.1 M KCl kullanılmıştır. Modifiye ettiğimiz kalem ucu elektrotlarımız yukarıdaki gibi kapalı ortamda 1 gün bekletildikten sonra ölçüm almaya hazır oldu. Potansiyostat cihazımızdaki ölçüm parametrelerimiz literatürden bakılarak -0.5 V ile $+0.8\text{ V}$ arasında 1 V/s tarama hızı olarak ayarlandı. Grafit kalem elektrot ile modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal davranışı üzerinde çözücü tipinin etkisi, döngüsel voltametri (CV) yöntemi kullanılarak araştırıldı. CV ölçümlerimiz alındı. Her bir ölçüm 3 kez farklı uçlarla tekrarlandı.



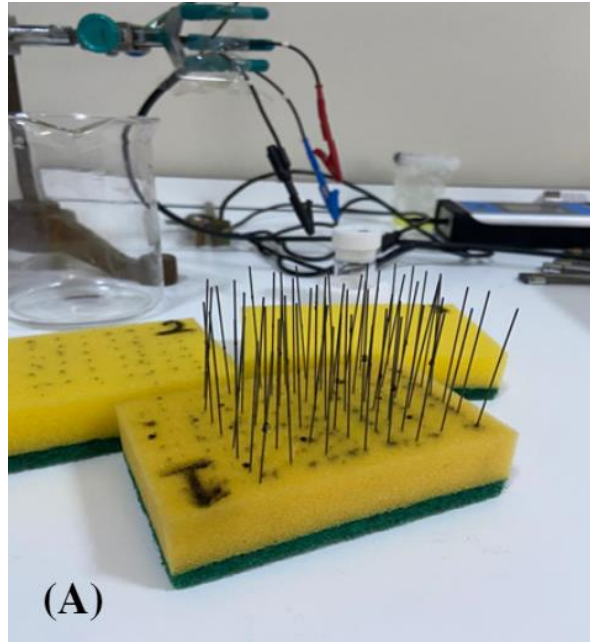
Şekil 3.3. CV ölçüm analizi deney düzeneği

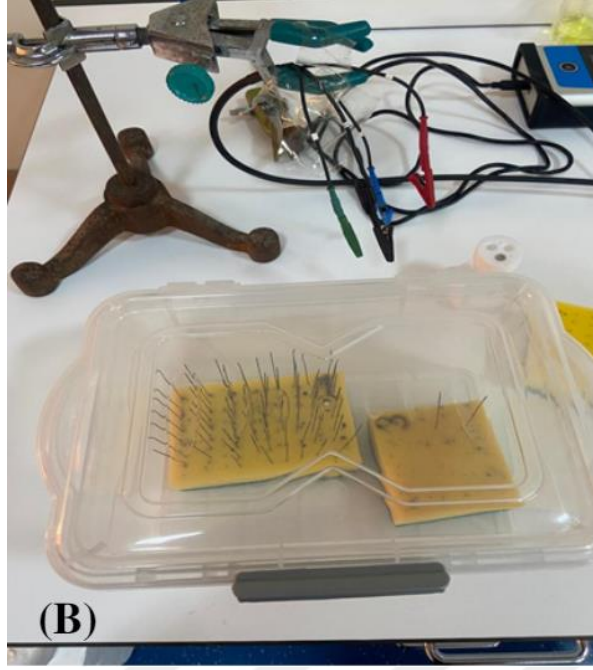
3.3.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile kalem ucu grafit elektrotların modifiye edilmesi/kaplanması

0.12 M CaCl_2 ve 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltileri hazırlandı. 1ml olan küçük ependorflara bölüştürüldü. Kalem ucu grafit elektrotlarımızı önce 0.12 M CaCl_2 çözeltisine daha sonra 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisine daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemi gerçekleştirildi. Her bir kalem ucu grafit elektrotlarımız ayrı ayrı 5'er dakika 0.12 M CaCl_2 çözeltisinde ve 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisinde olacak şekilde daldırma süresi uygulandı. Daldırma ile yüzey kaplama işlemi yapılırken sistemin üzeri kapatıldı. Daldırma yöntemi ile kalem ucu elektrotlarımıza hidroksiapatit kaplanarak yüzey alanı artırılmış oldu.

Sonraki adımda literatürden edinilen bilgilerden CuSO_4 ve NaOH çözeltileri hazırlandı. 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.05M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.1M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.3M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında; 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında; 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında hazırlandı. Bakır sülfat çözeltisinin sabit tutulup sodyum hidroksit çözeltisinin davranışı izlendi. Daha farklı konstrasyon işlemleride yapıldı. 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.05M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.1M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.3M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında; 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında; 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1M NaOH çözeltisi 1:1, 1:3, 1:5 oranında hazırlandı. Bu şekilde setler halinde CuSO_4 çözelti konsantrasyonları 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.5M, 0.7M ve 1M şeklindedir. NaOH çözelti konsantrasyonları 0.05M, 0.1M, 0.3M, 0.5M, 1M olarak belirlendi. Yukarıdaki setler şeklinde yapıldı. 1ml olan küçük ependorflara bölüştürüldü. Her bir kalem ucu grafit elektrodumuzun 1 cm'si çözeltiliye girecek şekilde daldırma işlemi uygulandı. Farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve saf su karıştırılarak çözeltiler elde edildi. NaOH ve saf su karıştırılarak çözeltiler elde edildi. Kalem ucu grafit elektrotlarımızı önce yukarıda belirtilen konstrasyonlarda bulunana $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra aynı işlemler NaOH çözeltisinin farklı oranlarında daldırma yöntemi ile yüzey kaplama işlemini gerçekleştirilmiş oldu. Her kalem ucu grafit elektrodun çözeltiler içinde bekleme süresi 5 dakika olarak belirlendi. Daldırma ile yüzey kaplama işlemi yapılırken sistemin üzerini kapatıldı. 5 dakika sonunda kalem ucu grafit elektrotlarımızı çözelti içerisinde çıkararak 24 saat kapalı ortamda kurumaya bırakıldı. Bu durum kalem uçları üzerinde yüzey absorpsiyonunu etkinleştirmek için yapıldı.

CaP tuzları yüzeye kaplandı. CuO hidroksiapatite tutundu ve yüzeyde Cu^{+2} iyonları birikmiş oldu. Sinyal ölçümleri ve analiz için ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN}_6)$) ve ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN}_6)$) kimyasalları hazırlanarak 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ analit çözeltisi elde edilmiştir. Modifiye ettiğimiz kalem ucu elektrotlarımız yukarıdaki gibi kapalı ortamda 1 gün bekletildikten sonra ölçüm almaya hazır oldu. Daha sonra 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ ve 0.1M KCl redoks probunda elektrotların elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. Potansiyostat cihazımızdaki ölçüm parametrelerimiz literatürden bakılarak -0.5 V ile +0.8 V arasında 1 V/s tarama hızı olarak ayarlandı. CV ölçümlerimiz alındı. Grafit kalem elektrot ile modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal davranışı üzerinde çözücü tipinin etkisi, döngüsel voltametri (CV) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Her bir ölçüm 3 tekrarlı olarak yapıldı. CV analizleri incelenerek Çıplak kalem grafit elektrot ve modifiye edilen kalem grafit elektrotlarda redoks tepeleri gözlemlendi. Modifiye edilen kalem grafit elektrotlar çıplak elektrotla karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından sonra, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlendi. Bu, kolaylaştırılmış elektron transfer sürecini ve daha büyük elektrot yüzey alanını gösterir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş HAP + 0.5 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5 M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.465 mA'ya yükselmiştir. Böylece, HAP + 0.5 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5 M NaOH 1:5 oranda çözelti elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir.





Şekil 3.4. (A) HAP ve CuO modifiyeli kalem grafit elektrotların hazırlanması ve (B) HAP ve CuO modifiyeli kalem grafit elektrotların kapalı ortamda 24 saat bekletilmesi

3.3.4. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların

COVID-19 nükleokapsid antikoruna ile fonksiyonelleştirilmesi

Yukarıdaki 3.3.3. başlığı altında belirtilen hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların nükleokapsid protein ile modifiye edilmesinde aşağıdaki adımları oluşturduk.

1.adım: Önceki adımlarla hazırlanmış hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem ucu grafit elektrotun yüzeyine antikor bağlanabilmesi için yüzeyde amin gruplarının oluşması gereklidir. Hidroksiapatit üzerinde oluşan Cu partikülleri amonyak (NH_3) ile etkileşime girerek amin gruplarını oluşturur. Böylece, serbest pozitif yükler üreten amin grupları arasındaki elektrostatik itme süreci nedeniyle CuNP'lere daha fazla stabilite sağlar ve N antikorunun sabitlenmesi amacıyla kullanılır.

1.adım işlemi: hidroksiapatit ve bakır oksit modifiyesi ile hazırlanan kalem ucu grafit elektrotlarımız 15 dakika amonyak içerisinde bekletildi. Hazırlanan elektrotların 1cm'lik kısımlarının yüzeyleri daldırma yöntemi ile amonyak kaplandı.

2 adım işlemi: Kalem ucu grafit elektrot amonyak ile modifiye edildikten sonra 60-70 °C'lık etüvde 15 dakika kurutuldu. 0.1M PBS (pH= 7.4 tampon çözeltisi) hazırlandı. Kalem grafit elektrot etüvde kurutulduktan sonra PBS (pH= 7.4 tampon çözeltisi) içerisinde daldırıp çıkarma yöntemi ile yıkandı.

3 adım: 0.1 M PBS (pH = 7.4) içinde seyreltilmiş 0.05 M N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, %98 saflıkta) ve 0.025 M N-hydroxysuccinimide (NHS, %98 saflıkta) hazırlandı. Modifiyeli elektrotumuz aminlerin aktive edilmesi için EDC-NHS çapraz bağlayıcı çözeltisi içerisinde daldırma yöntemi ile 15 dakika inkübe edildi.

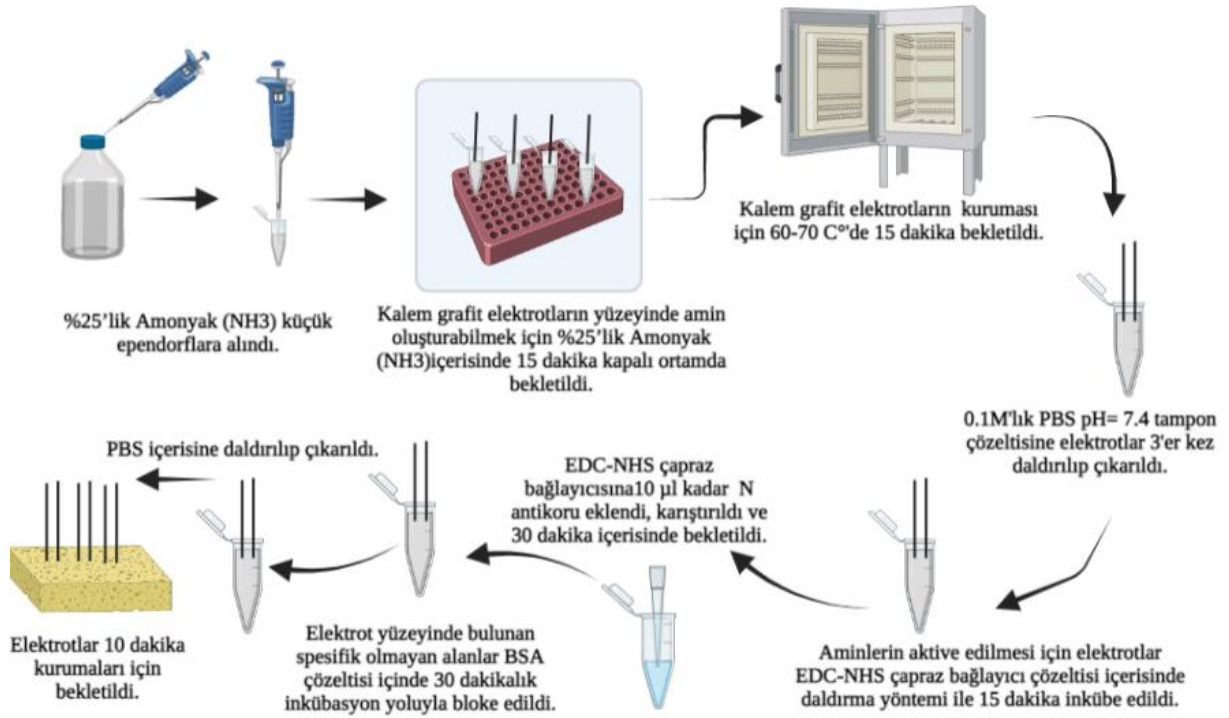
4 adım: 15 dakikanın sonunda EDC-NHS çapraz bağlayıcılara 10 µl kadar tavşandan elde edilmiş Poliklonol N antikoru eklendi. Karıştırıldıktan sonra elektrotlara antikorun bağlanabilmesi için elektrotlar 30 dakika boyunca daldırma yöntemi ile inkübe edildi.

- EDC ve NHS çapraz bağlayıcıları varlığında, N antikorunun karboksil grubu, bir kovalent bağ yoluyla amonyak vasıtasıyla bakırda oluşan amin grubuna bağlanır. Karboksil grupları ve EDC-NHS arasındaki reaksiyon, elektrot yüzeyinde (CuNP-(NH₄)) bulunan amin grupları ile nükleofilik yer değiştirmeye maruz kalan kararlı bir ester oluşumuyla ve değiştirilmiş PGE/CuNP-(NH₄) yüzeyi ve antikor arasında bir amid bağının oluşmasıyla sonuçlanır.

5 adım: %10'luk w/v BSA çözeltisi PBS ile hazırlandı. 30 dakika boyunca antikorun bağlanmasından sonra son adım elektrot yüzeyi üzerinde bulunan spesifik olmayan alanlar amin gruplarının kapatılması için BSA çözeltisi içinde inkübasyon yoluyla bloke edildi.

- BSA, biyosensör gelişimi için yaygın olarak kullanılan, yüksek yoğunluklu yüzeyel lizin kalıntılarına sahip, işlevsel olarak etkisiz bir proteindir. Elektrot yüzeyinde klinik numune ve biyosensör arasındaki spesifik olmayan etkileşimlerin önlenmesi amacıyla kullanılır.

Kalem grafit elektrot BSA çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildikten sonra önceden hazırlanan PBS (pH= 7.4 tampon çözeltisi) içerisinde 3 kez daldırıp çıkarma yöntemi ile yıkandı. Elektrotlar sünger üzerinde kapalı bir ortam da kuruması için 10 dakika bekletildi. Yapılan işlemler şekil 3.5.'de görselleştirilmiştir.



Şekil 3.5. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların COVID-19 nükleokapsid antikoruna ile fonksiyonelleştirilmesinin adımları

3.3.5. COVID-19 nükleokapsid antikoruna ile fonksiyonelleştirilmiş kalem grafit elektrotlar ile antijen tespiti

Antikor ile fonksiyonelleştirilmiş kalem grafit elektrotun antijen tespitinde 2 farklı parametre değerlendirildi. 1. Parametre antikor ile fonksiyonelleştirilmiş elektrot ile antijenin inkübasyon süresidir. Süreler 1 dakika, 5 dakika ve 10 dakika olarak belirlendi. 2. parametre antijenlerin farklı derişimlerinin tespit edilmesidir. $6,4 \times 10^{-14}$ ile 1×10^{-9} g/mL arasında artan derişimleri ile gerçekleştirilmiştir.

Derişimlerin hazırlanması SARS-CoV-2 Nükleokapsid protein N antijeni ile sağlandı. Elimizde bulunan stok antijenimizden alınıp $6,4 \times 10^{-14}$ ile 1×10^{-9} g/mL arasında artan derişimler elde edildi. 1 mL'lik ependorflara farklı derişimlerde bulunan antijenler eklendi. Kalem grafit elektrotlar belirlenen 1,5 ve 10 dakika boyunca farklı antijen derişimlerin de daldırma yöntemi ile tutuldu. İnkübasyon sürelerinden sonra elektrotlarımıza, bağlanmamış virüs veya numuneyi uzaklaştırmak için 0.1M PBS (pH = 7.4) ile yıkandı. 5 dakika kapalı ortamda kurumaya bırakıldı. Voltametrik ölçümler için, redoks prob çözeltisi 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 0.1M KCl içinde elektrotların sinyal ölçümü ve analizi yapıldı. Elektrokimyasal tepki için SWV tekniği kullanılarak ölçüm alındı. Ayrıca elektrotun verdiği tepkiyi görmek için CV ölçümü alındı. Hem CV hem de SWV ölçüm analizlerinde akımın düşmesi gözlemlendi. SARS-CoV-2 NP'nin elektrota bağlanmasından kaynaklanan akım baskı-

lanması meydana geldi. NP'nin elektrot yüzeyine bağlanması, elektrot yüzeyindeki elektroaktif bölgeleri kısmen bloke etti. Bu durumda akımın baskılanmasına yol açtı ve SARS-CoV-2 NP'nin varlığının göstergesi olan pozitif bir sonuç verdi. Farklı derişimler de elde edilen SWV sinyalleri için 3 farklı elektrot kullanılarak ölçüm alındı. Hazırlanan elektrotlar 8mL HCF çözeltisi içinde ölçüm değerleri frekans 80 Hz, genlik 75 mV, step potansiyeli 80 mV, başlangıç ve bitiş değerleri sırasıyla -0,2 ile 1 mV arası olarak ayarlanmıştır.

Düşük maliyeti ve doğruluk özellikleri düşünüldüğünde elektrotların modifikasyonu toplu olarak ve basit bir yöntemde gerçekleştirilebilir. Böylece pandemi oluşturan salgınlar kontrol altına alınabilir. Hızlı sonuç vermesi, modifikasyonun ve kullanımının kolay olması hazırlanan biyosensörün avantajını gösterir. Elektrot sisteminde farklı hastalıklar da bulaşıcı ajan ve reseptörü bulunduğu takdirde patojenlerin tespiti için sağlanabilir[150].

3.4. Hazırlanan Elektrotların Elektrokimyasal Biyosensör Uygulamaları

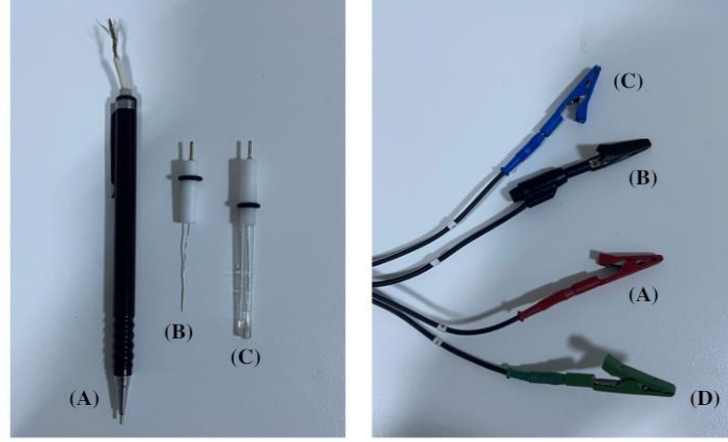
3.4.1. Hazırlanan elektrotlarla elektrokimyasal çalışmalar ve analiz

Elektrokimyasal ölçümler, PS Trace 5.6 yazılımı tarafından kontrol edilen PALM SENSE 4 potansiyostat cihazı ve bu cihaza bağlı kişisel bir bilgisayar kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmalarda Tombow marka 0.5 mm çapında 2B kalem uçları elektrot olarak kullanıldı. Kalem uçlarının 1 cm'lik uç kısımları hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edildikten sonra COVID-19 Nükleokapsid proteini antikoru ile modifiye edildi. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Çözeltilerin elektrot yüzeyine bağlanması ve yüzeyi aktifleştirilmesi sağlandı. Ardından antijen tespiti için hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltilere daldırılıp belirlenen sürelerde bekletildi. Hazırlanan kalem uçları çalışma elektrodu olarak kullanıldı. Elektrokimyasal sinyal analizi olarak dönüşümlü voltametri ve kare dalga voltametri çalışmaları yapıldı.

3.4.2. Elektrokimyasal hücre

3 elektrot içeren elektrokimyasal hücre sistemi çalışma elektrodu (PGE), platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl referans elektrodundan oluşmaktadır. Referans elektrot ve karşıt elektrot kriyojenik şişeler içerisinde durmaktadır. Referans elektrot kullanılmadığı süre boyunca 3M KCl çözeltisi için bekletilmektedir. Düzenekte bağlantılı kablolardan üçü elektrotlara bağlıdır. Diğerleri ise topraklama kablosudur. Çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot olarak Tombow marka 0.5 mm 2B kurşun kalem ucu kullanıldı. Rotring marka uçlu kalemin iç haznesi çıkartılıp basma kısmından uç kısmındaki

kalem ucuna yani çalışma elektroduna degecek şekilde döşenen bakır tel yardımı ile potansiyostat bağlantısı yapılmıştır. Analizler cam şişelerde 8 mL HCF çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Çalışma Elektrodu=(A) Karşıt Elektrot=(B) Referans Elektrot=(C)
(D)Toprak elektrotudur

Şekil 3.6. Üçlü elektrot sistemi ve kabloların bağlanmasının gösterilmesi

3.4.3. Çözeltilerin hazırlanması

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi: 5 mM ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ve ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) çözeltisi 0,1 M KCl 250 mL deiyonize su ile hazırlandı.

HAP çözeltisi: 0.12 M CaCl_2 ve 0.06 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltileri 10 mL deiyonize su ile hazırlandı.

CuO çözeltisi: Farklı konsantrasyonlar da CuSO_4 ve NaOH çözeltileri 10 mL deiyonize su ile hazırlandı.

Antijen ve antikor çözeltileri: Ticari SARS-CoV-2 N proteini antijen ve antikor çözeltileri uygun miktarlarda PBS içerisinde seyreltilerek kullanıldı.

PBS çözeltisi: 0.1M fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH: 7,4) hazırlamak için 500 mL deiyonize su içerisinde çözelti çözüldü ve kullanıldı.

EDC-NHS çözeltisi: 0.05M EDC ve 0.025 M NHS çözeltileri 10 mL 0.1M PBS içerisinde hazırlandı.

BSA çözeltisi: %10 (m/v) BSA çözeltisi 10 mL 0.1M PBS içerisinde hazırlandı.

3.4.4. Elektrotların davranışlarının incelenmesi

Modifiye edilmemiş çıplak kalem grafit elektrotlar, bakır oksit modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar ve hidroksiapatit ve bakır oksit fonksiyonelleştirilmiş kalem grafit elektrotların davranışlarına bakmak amacıyla elektrotların $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisinde

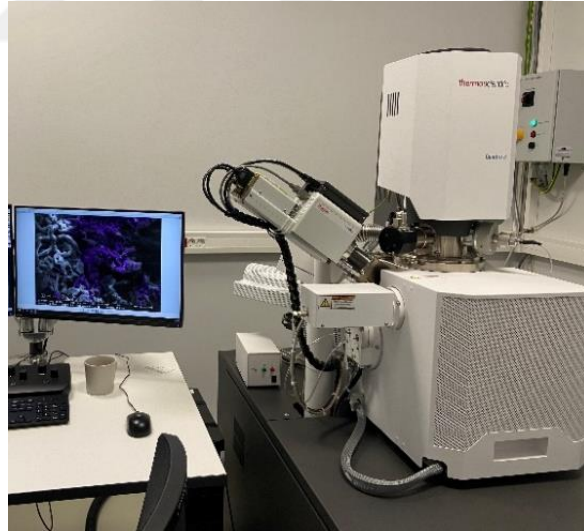
dönüşümlü ve voltamogramları alınmıştır. Bu sinyal sonuçlarından elde edilen ideal cevaba gelen modifiye parametrelerin belirlenmiş tezin ikinci kısmı bu şekilde yapılmıştır.

Antijen tespiti kısmında ise modifiye edilmemiş çıplak kalem grafit elektrotlar, hidroksiapatit, bakır oksit ve antikör fonksiyonelleştirilmiş kalem grafit elektrotların davranışlarına bakmak amacıyla elektrotların $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi içerisinde kare dalga voltamogramları alınmıştır. Farklı derişim ve sürelerde hazırlanan elektrotların davranışlarına bakılmıştır.

3.5. Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu

3.5.1. Hazırlanan elektrotların morfolojik karakterizasyonu

Modifiye edilmemiş elektrotlar, Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotlar ve hem hidroksiapatit ile fonksiyonelleştirilmiş hemde bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların morfolojik özellikleri ThermoScientific markalı Quattro S ColorSEM modeli Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SEM cihazı ile birlikte çalışan Elektron Dağılım Spektroskopisi (EDX) elektrotların üzerinde biriken kimyasalları her element için renkli bir şekilde görselleştirmiştir. Elde edilen SEM ve EDX fotoğraflarından yola çıkarak, çözeltilerin elektrot uçlarındaki birikme durumları incelenmiştir.



Şekil 3.7. SEM-EDX cihazı

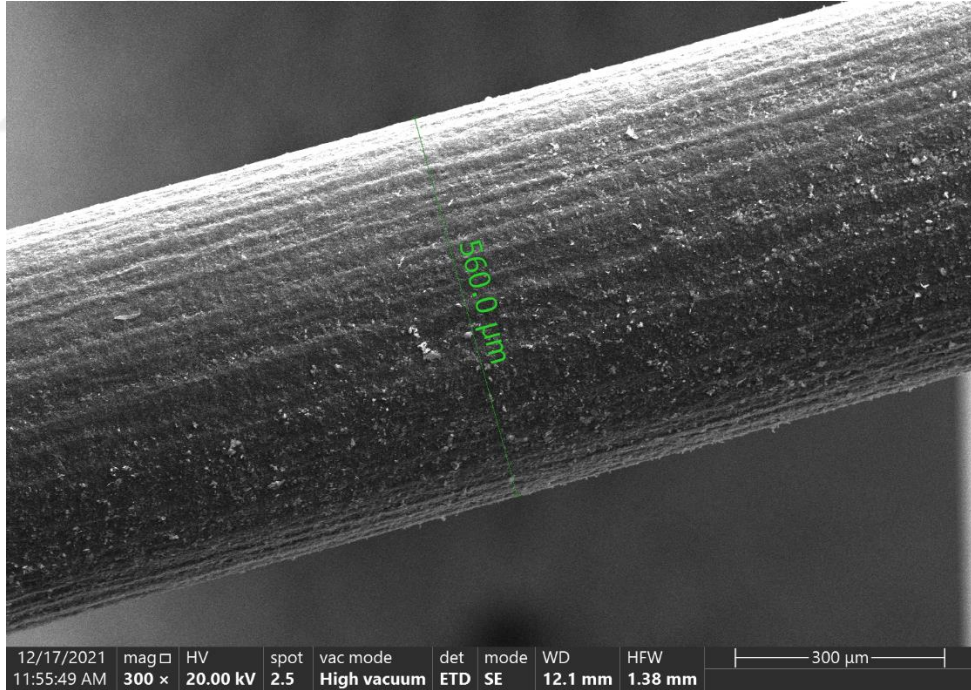
4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Hazırlanan Elektrotların Morfolojik Karakterizasyonu

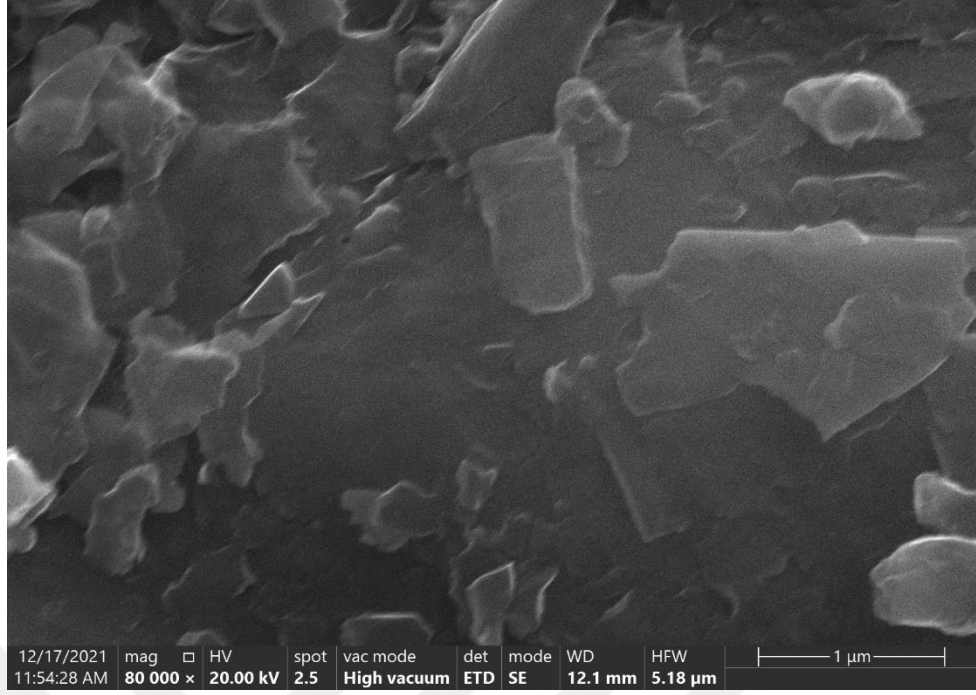
Modifiye edilmemiş elektrotlar, bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotlar ve hem hidroksiapatit ile fonksiyonelleştirilmiş hemde bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların morfolojik karakterizasyonu SEM kullanılarak yapılmıştır. Hidroksiapatit ve bakır oksit bileşiklerinin elektrot yüzeyi üzerindeki varlığı ise EDX kullanılarak tespit edilmiştir.

4.1.1. Modifiye edilmemiş elektrotların karakterizasyonu

Modifiye edilmemiş elektrodun morfolojik karakterizasyonu SEM kullanılarak görüntülenmiştir. Kalem grafit elektrotların yüzeyinde herhangi bir madde olmadığı görülmüştür. EDX görüntüleri incelendiğinde Tombow marka uçlarda bol miktarda silisyum ve karbon elementinin olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.1.'de modifiye edilmemiş kalem grafit elektrota ait SEM görüntüleri yer almaktadır. Şekil 4.2.'de modifiye edilmemiş kalem grafit elektrota ait EDX görüntüleri yer almaktadır.

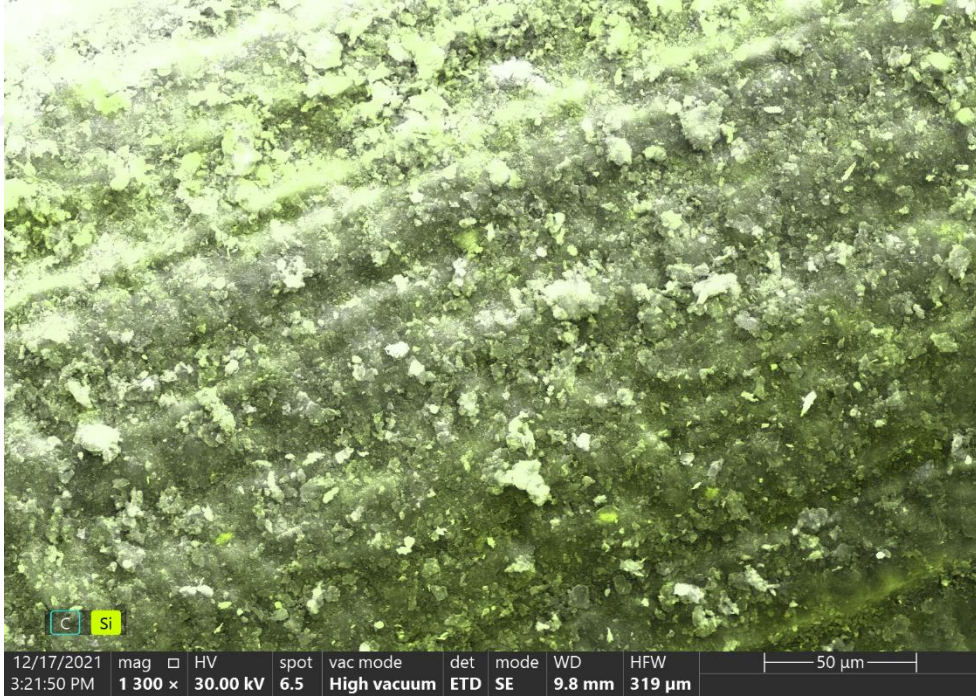


(A)



(B)

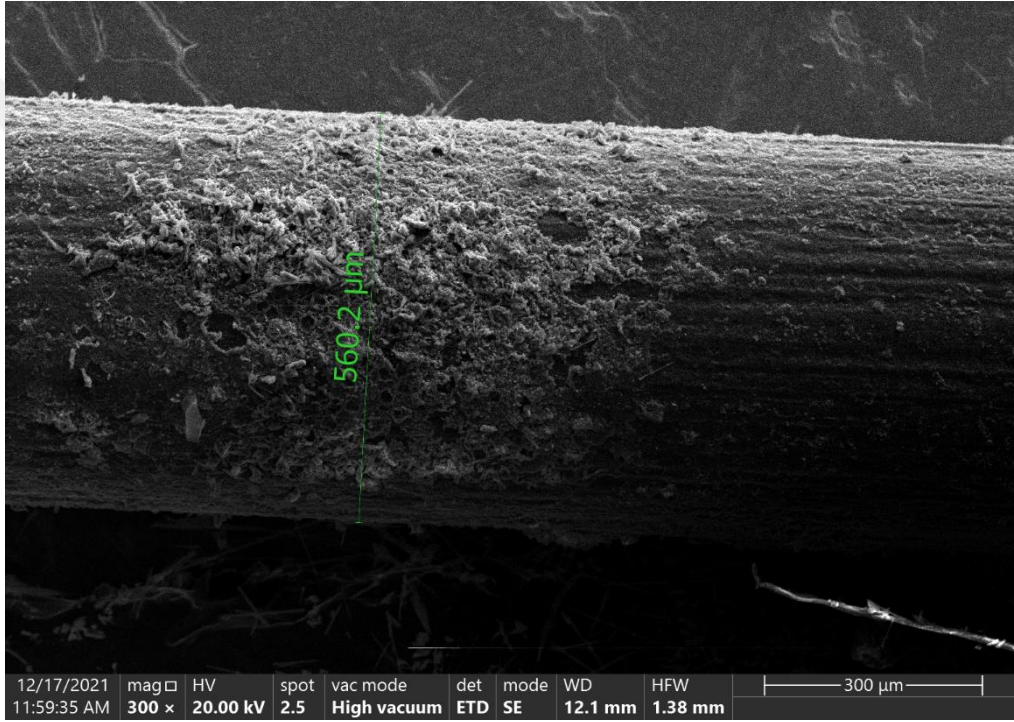
Şekil 4.1. Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun SEM görüntüleri (A) büyütme oranı 300 x, (B) büyütme oranı 80 000 x



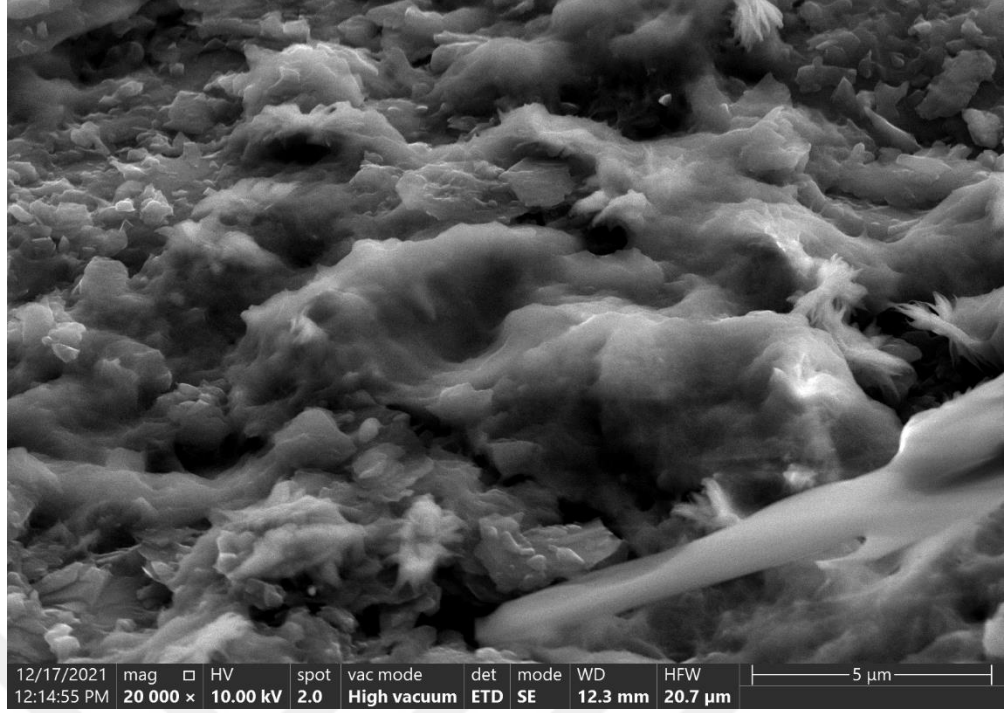
Şekil 4.2. Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrodun EDX görüntüsü silisyum elementinin varlığı, büyütme oranı 1 300 x

4.1.2. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların karakterizasyonu

Bakır oksit ile hazırlanan kalem grafit elektrotun yüzeyi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. CV grafiklerinden yararlanılarak 0.5 M CuSO_4 ve 0.5 M NaOH 1:5 orandaki modifiyenin en iyi sonuç olduğu gözlenmiştir. 0.5 M CuSO_4 ve 0.5 M NaOH 1:5 oranda modifiyeli kalem grafit elektrodun SEM görüntülerinde PGE yüzeyi Şekil 4.3. (A)'da, bakır yapıları ile etkileşimi görülmekte olup Şekil 4.3. (B) 'de, modifikasyonun başarılı şekilde gerçekleştiği görülmektedir. Kalem grafit elektrot yüzeyindeki birikmenin bakır iyonlarına ait olduğu ise EDX kullanılarak öğrenilmiş oldu. Şekil 4.4.'de EDX görüntülerinde elektrot yüzeyinde bakırın homojen bir şekilde birikmiş olduğu gözlemlendi.

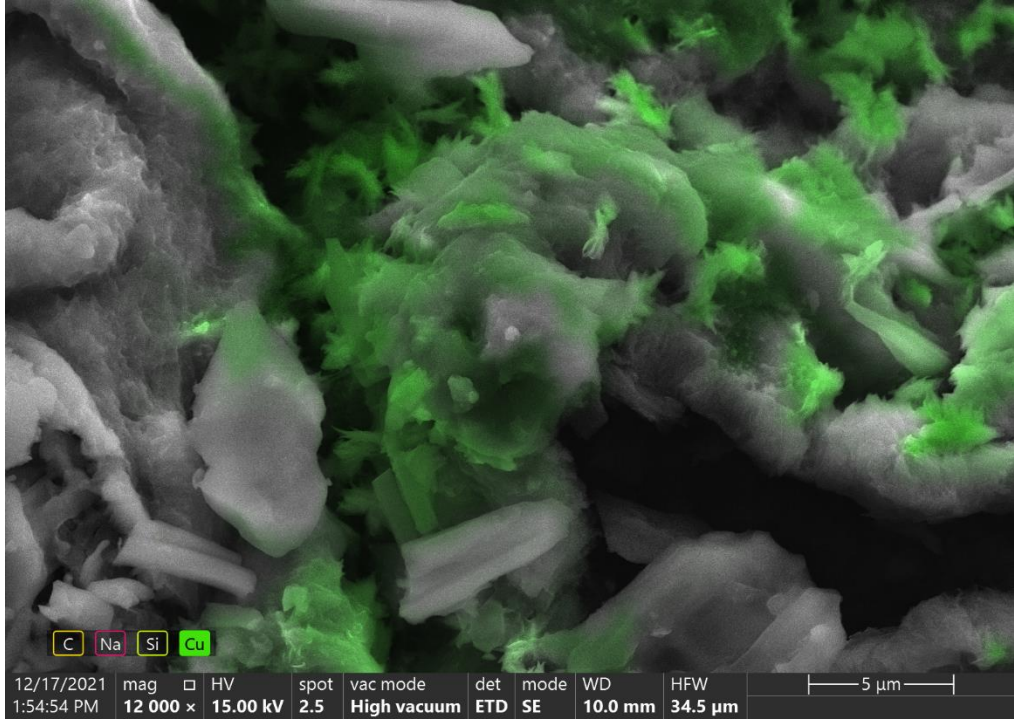


(A)



(B)

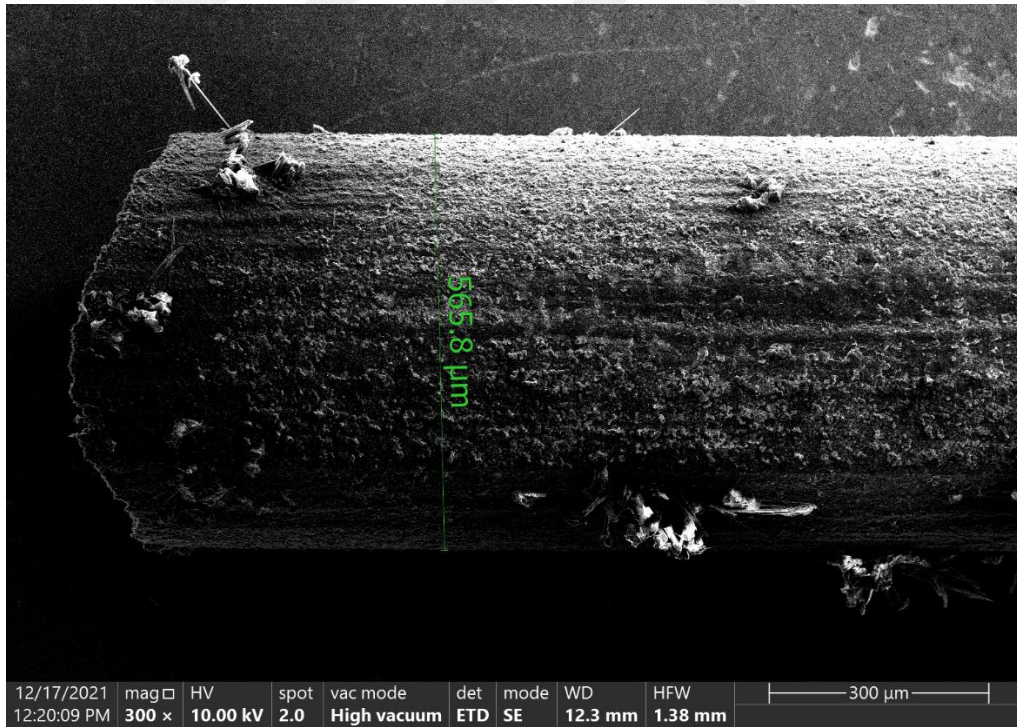
Şekil 4.3. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrodun SEM görüntüsü (A) büyütme oranı 300 x, (B) büyütme oranı 20 000 x



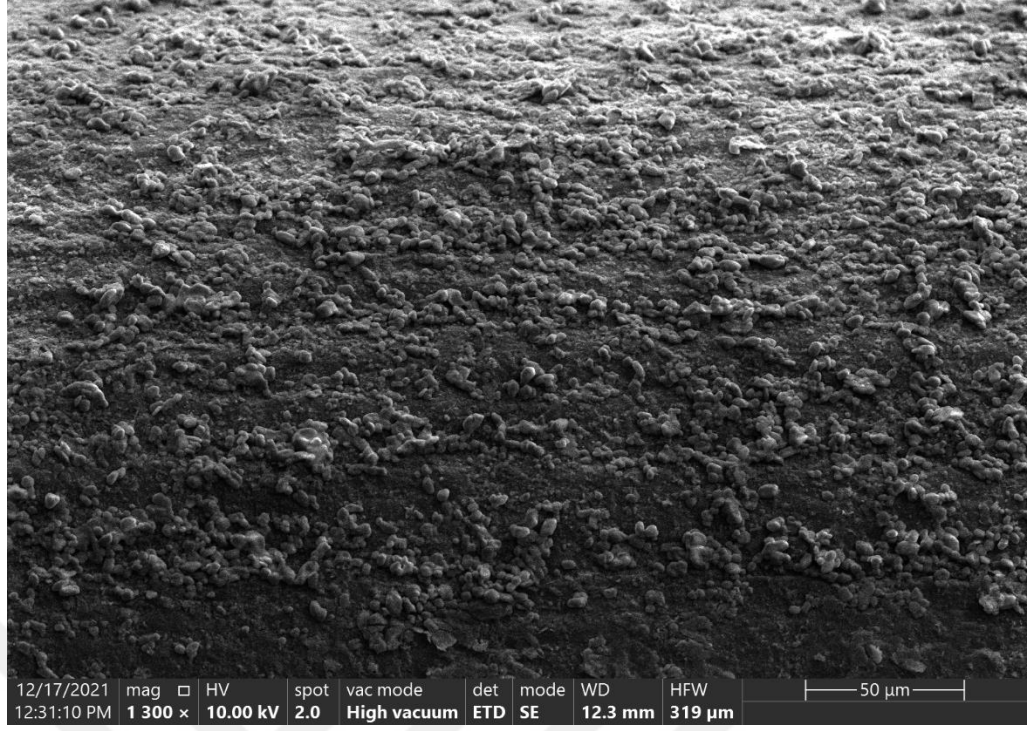
Şekil 4.4. Bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların EDX görüntüsü, büyütme oranı 12 000 x

4.1.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların karakterizasyonu

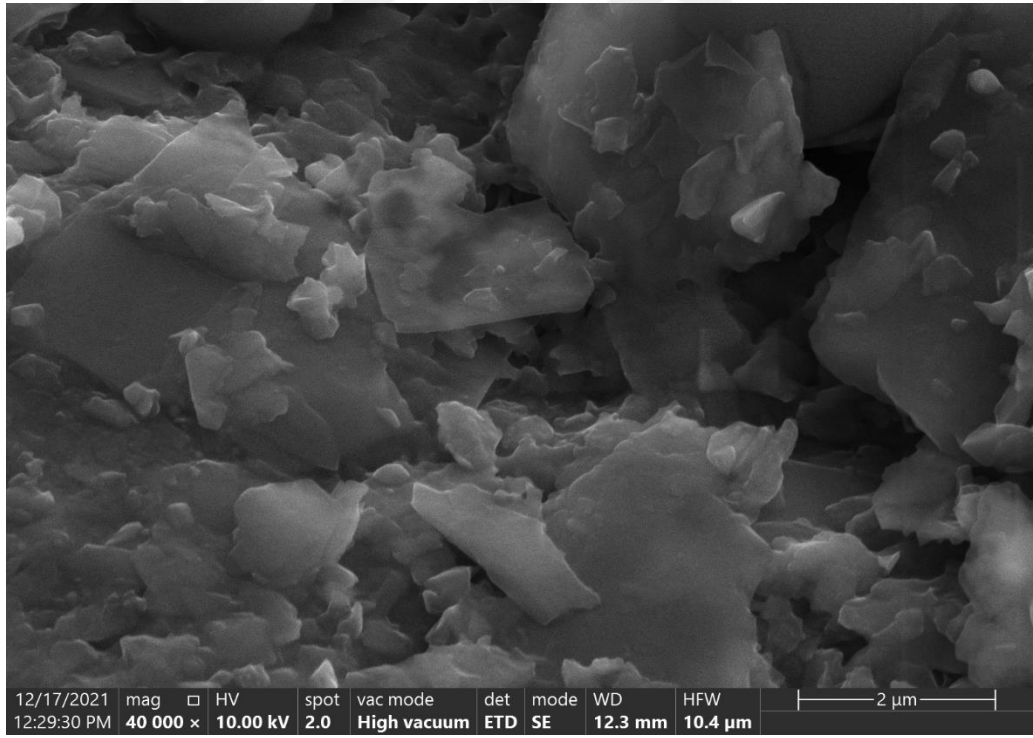
Elektrodu bakır ile modifiye etmeden önce yüzeyi hidroksiapatit ile fonksiyonelleştirmek yani CaP tuzlarını yüzeye çöktürme sonucunda yüzey alanının arttığı gözlemlenmiştir. SEM görüntülerinde hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde, modifiye edilmemiş çıplak elektrot yüzeyine göre daha pürüzlü bir yapı olduğu ve bu sebeple yüzey alanının artırıldığı düşünülmektedir. Bakır iyonuna afinitesi olduğu bilinen hidroksiapatit bileşikler çöktürülmüş elektrot, 0.5 M CuSO₄ ve 0.5 M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiştir. Hidroksiapatit bileşiklerinin bakır iyonunu daha çok yüzeyde tuttuğu şekil 4.5.'de çekilen SEM görüntüsünde anlaşılmaktadır. Hidroksiapatit bileşiklerinin elektrot üzerinde yüzey alanını artırması sayesinde elektrokimyasal analizlerde iletkenlik artışı gözlemlenmektedir. Şekilde 4.6.'da CaP tuzları ile bakır modifiye edilmiş elektrotların EDX görüntüleri bakırın fazlaca biriktiğini göstermektedir. EDX görüntülerinde bakır iyonlarının homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir.



(A)

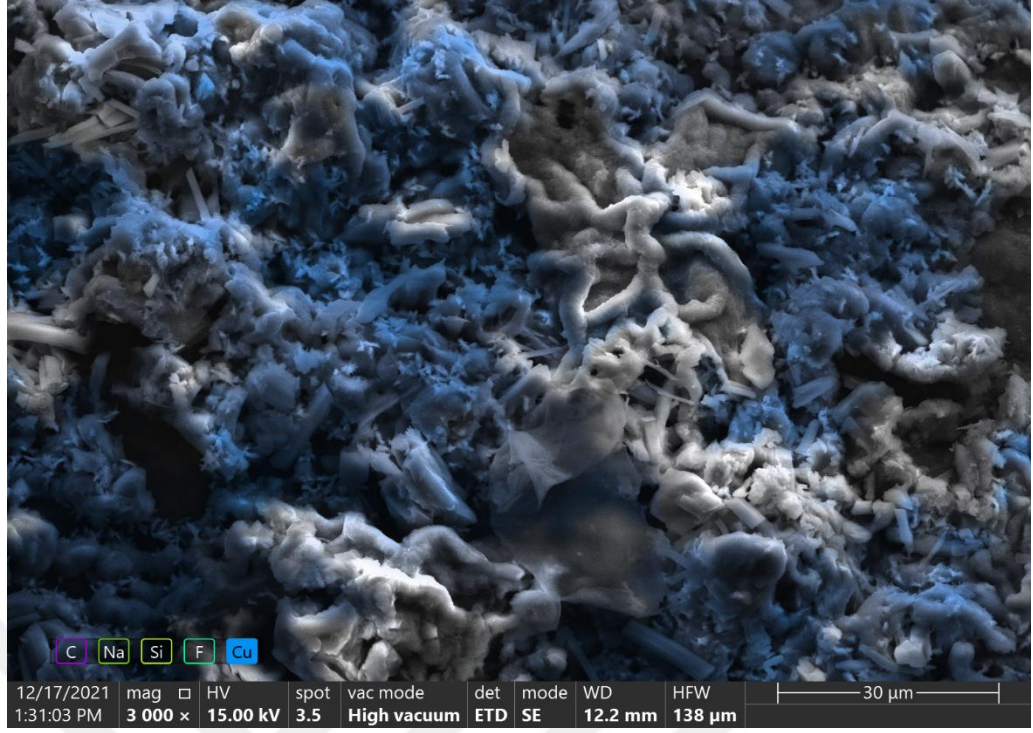


(B)

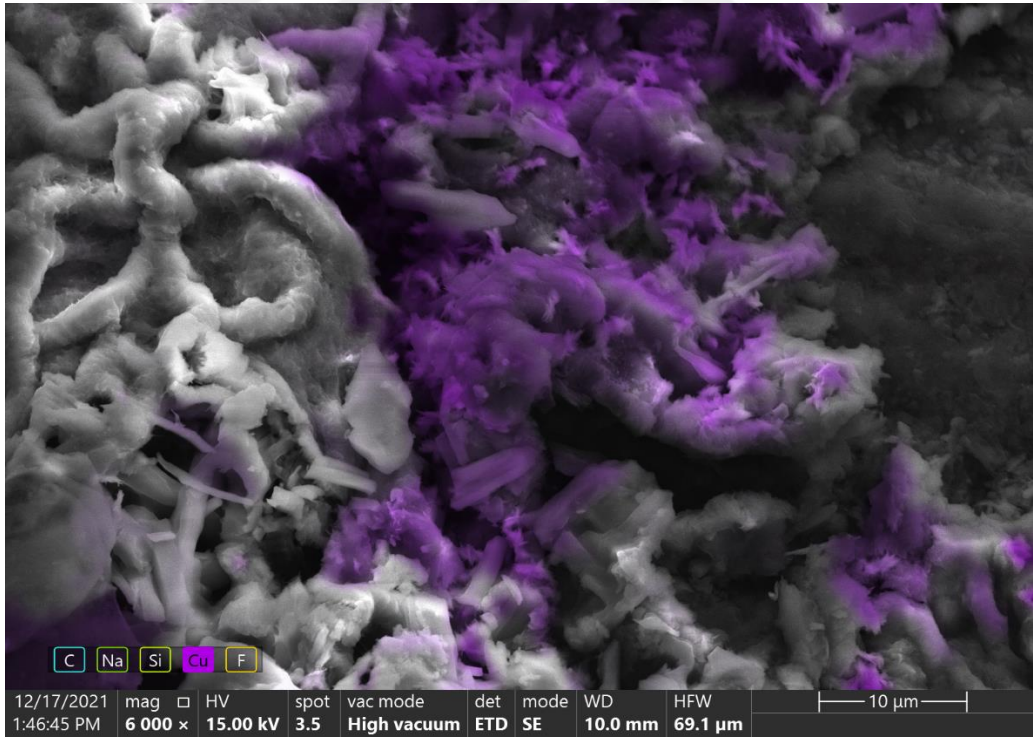


(C)

Şekil 4.5. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrodun SEM görüntüleri, büyütme oranları
(A) 300 x, (B) 1 300 x, (C) 40 000 x



(A)



(B)

Şekil 4.6. CaP tuzları ile bakır modifiye edilmiş elektrotların EDX görüntüleri, büyütme oranları (A) 3 000 x, (B) 6 000 x

4.2. Elektrokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. Dönüşümlü voltametre analiz sonuçları

Sunulan tez kapsamında 1. kısımda gerçekleştirilen çalışmalar kalem grafit elektrotlarının (PGE) sadece bakır oksit ile kaplanması ve hem hidroksiapatit hem de bakır oksit ile modifiye edilmesinin sonuçlarının incelenmesi elektrokimyasal analiz karakterizasyonu olan dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ çözeltisi ve 0.1 M KCl içerisinde modifiye edilmemiş kalem grafit elektrotlar, 5 dakika boyunca bakır oksit kaplanması için belirlenen konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH çözeltisinde içerisinde bekletilmiş kalem grafit elektrotlar ve literatürden bakılan hidroksiapatit ile bakır oksit modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların dönüşümlü voltametrik davranışları grafiklerden incelenmiştir. CV ölçümlerinden en iyi kaplama sonucu elde edilip tezin 2.kısımında bu kaplamadan yararlanılmıştır.

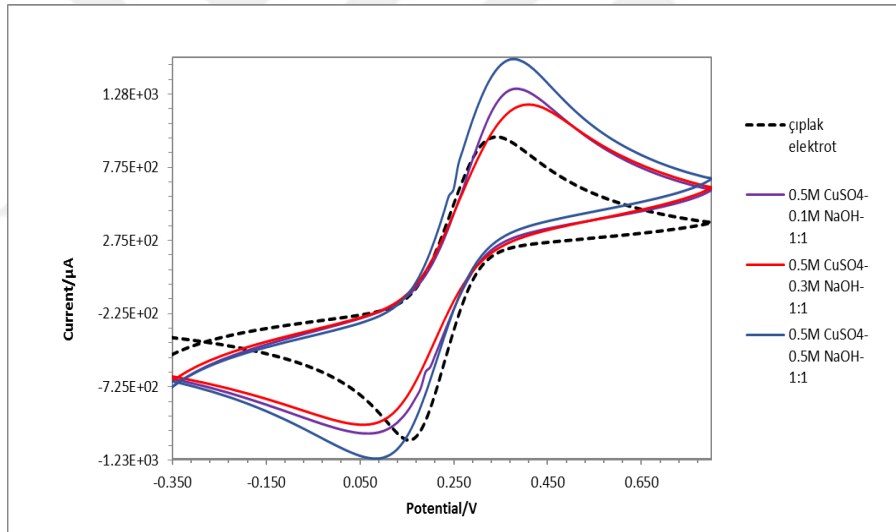
4.2.2. Bakır oksit modifiye edilmiş elektrotların CV analiz sonuçları

4.2.2.1. Bakır oksit içerisindeki NaOH derişiminin elektrot cevabına etkisi ve analiz sonuçları

Hazırlamış olduğumuz çözeltilerin miktarı elektrokimyasal sinyallerimizin iyi sonuç vermesi açısından önemli parametrelerdir. Farklı derişimler de ($0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.1\text{M NaOH}$ 1:1, $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.3\text{M NaOH}$ 1:1 ve $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1) çözeltiler hazırlanmıştır. Bakır sülfat çözeltisinin konsantrasyonu sabit tutulup sodyum hidroksit çözeltisinin konsantrasyon değişimlerinin elektrot yüzeyinde oluşan kaplamaya etkisi araştırılmıştır. Bakır sülfat ile sodyum hidroksit birleştirilip CuO oluşturuluyor. Bu sebeple $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve NaOH kullanılıyor[151]. Oranlar sabit tutulmuştur. Hazırlamış olduğumuz çözeltilerinin içerisine kalem grafit elektrotların 1cm'lik kısmı daldırılarak 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Elektrotların 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ ve 0.1 M KCl analit çözeltisi içerisinde -0.5V ile +0.8V arasında 1V/s tarama hızında alınan dönüşümlü voltametrik davranışları grafiklerimizden incelenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotlar ve modifiye edilen kalem grafit elektrotların redoks tepeleri gözlemlenmiştir. $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir[152]. Bu, kolaylaştırılmış elektron transfer sürecini ve daha büyük elektrot yüzey alanını göstermektedir. En iyi sonuç

veren en yüksek pik akımı $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisine daldırılarak modifiye edilen kalem grafit elektrotlar ile elde edilmiştir. $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 derişimin de hazırlanan çözeltinin elektrot cevabı artmıştır. $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisi pik akımı incelenen diğer elektrotlara göre daha fazla çıkmıştır.

Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:1 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 1.557 mA'ya yükselmiştir. Böylelikle, 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:1 oranda çözeltili elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Her elektrot değeri için 3 ölçüm alınıp ortalaması alınmıştır. Şekil 4.7'de modifiye edilmemiş elektrodun, $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.1\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun, $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.3\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun ve $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun CV grafikleri bulunmaktadır. En iyi elektrot cevabının $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltisine ait olduğu CV grafiğinden anlaşılmıştır.



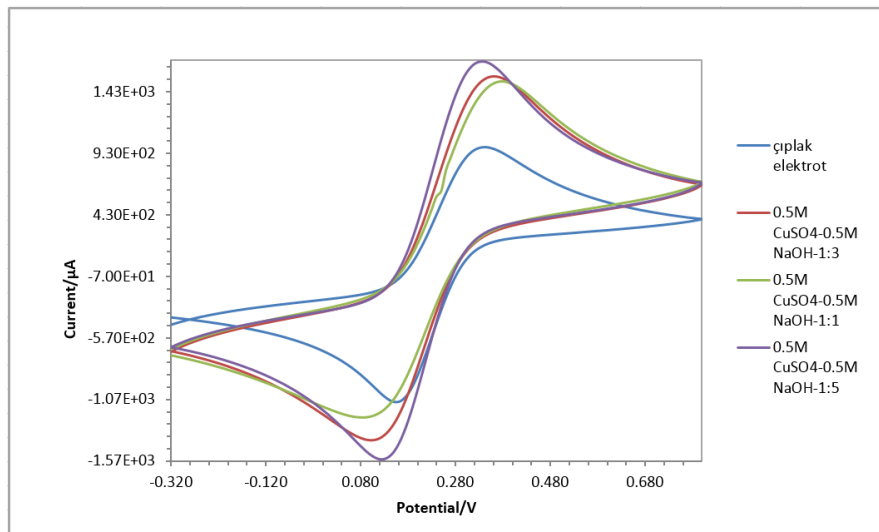
Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş elektrot, $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.1\text{M NaOH}$ 1:1, $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.3\text{M NaOH}$ 1:1, $0.5\text{M CuSO}_4 + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1 çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

4.2.2.2. Bakır oksit içerisindeki NaOH çözeltisi oranlarının elektrot cevabına

etkisi ve analiz sonuçları

Farklı derişimler de ($0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:1, $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:3 ve $0.5\text{M CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{M NaOH}$ 1:5) çözeltiler hazırlanmıştır. Bakır sülfat ve sodyum hidroksit çözeltisinin konsantrasyonu sabit tutulup sodyum hidroksit çözeltisinin konsantrasyon oranları değiştirilerek gözlemlenmiştir. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. -0.5 ile +0.8 arasında 1V/s tarama hızında dönü-

şümlü voltametrik sinyalleri alınmıştır. Sinyal davranışları grafiklerden incelenmiştir. Değerlendirmeler modifiye edilmemiş çıplak elektrot sinyallerini ne kadar yükselttiğine bakılıp karar verilmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotlar ve modifiye edilen kalem grafit elektrotların redoks tepeleri gözlemlenmiştir. 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:1 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Bu, kolaylaştırılmış elektron transfer sürecini ve daha büyük elektrot yüzey alanını gösterir. En iyi sonuç veren en yüksek pik akımı 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 çözeltisine daldırılarak modifiye edilen kalem grafit elektrotlar ile elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş kalem grafit elektrot ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 derişim de hazırlanan çözeltinin elektrot cevabının arttığı gözlenmiştir. 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 çözeltisi pik akımı incelenen diğer elektrotlara göre daha fazla olmuştur. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 1.816 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözeltili elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Her parametre için 3 farklı ölçüm alınıp ortalaması alınmıştır. Şekil 4.8.'de modifiye edilmemiş elektrodun, 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:1 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun, 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:3 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun ve 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrodun CV grafikleri bulunmaktadır. En iyi elektrot cevabının 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:5 çözeltisine ait olduğu CV grafiğinden anlaşılmıştır.



Şekil 4.8. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:1, 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:3, 0.5M CuSO_4 +0.5M NaOH 1:5 çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

CV grafiklerini incelediğimizde NaOH derişimlerinden 1:5 oranında olan elektrot cevabının daha yüksek bir pik akımı oluşturduğu görülmektedir. Hidroksiapatit ile yapılacak çalışmalarda NaOH derişiminin 1:5 oranında kullanılacaktır.

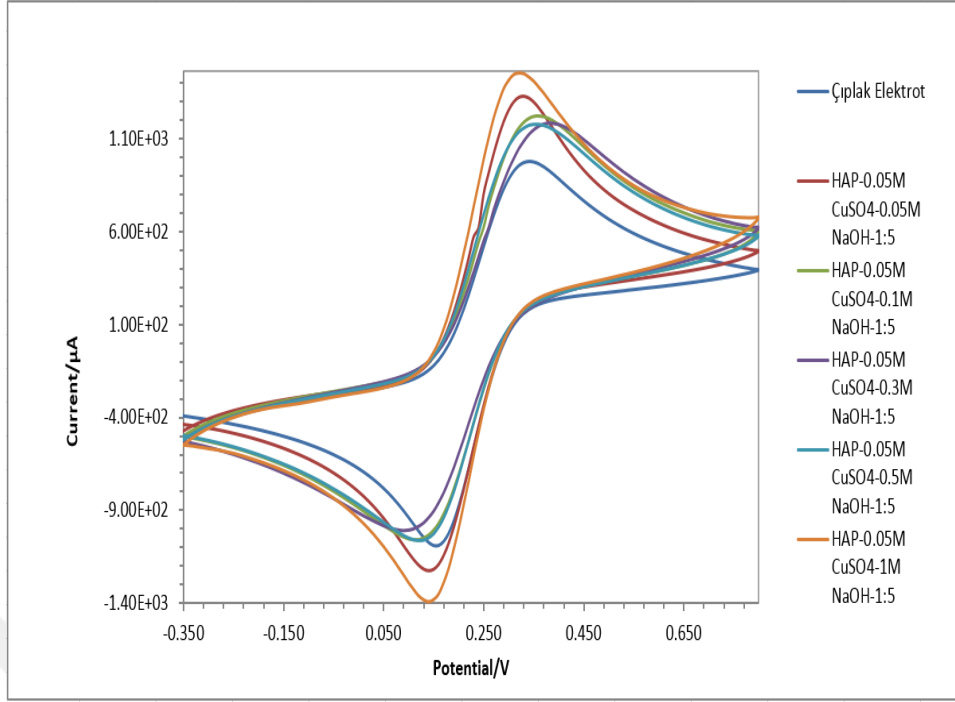
4.2.3. Hidroksiapatit ve bakır oksit ile modifiye edilmiş elektrotların CV analizi

Elektrodu bakır ile modifiye etmeden önce yüzeyi hidroksiapatit ile fonksiyonelleştirmenin yüzey alanını arttığı gözlemlenmiştir. Daha sonra bakır ile modifiye edildiğinde hidroksiapatitin bakır iyonlarını tuttuğu bilinmektedir. Bakırın ne derecede tutulduğunu bilmek için elektrodun farklı konsantrasyonlarda çözeltiler ile modifiye edilmesi gerekir. Aşağıda bu çalışmalar anlatılmaktadır.

4.2.3.1. Hidroksiapatit ve bakır oksit içerisindeki CuSO_4 ve NaOH derişiminin

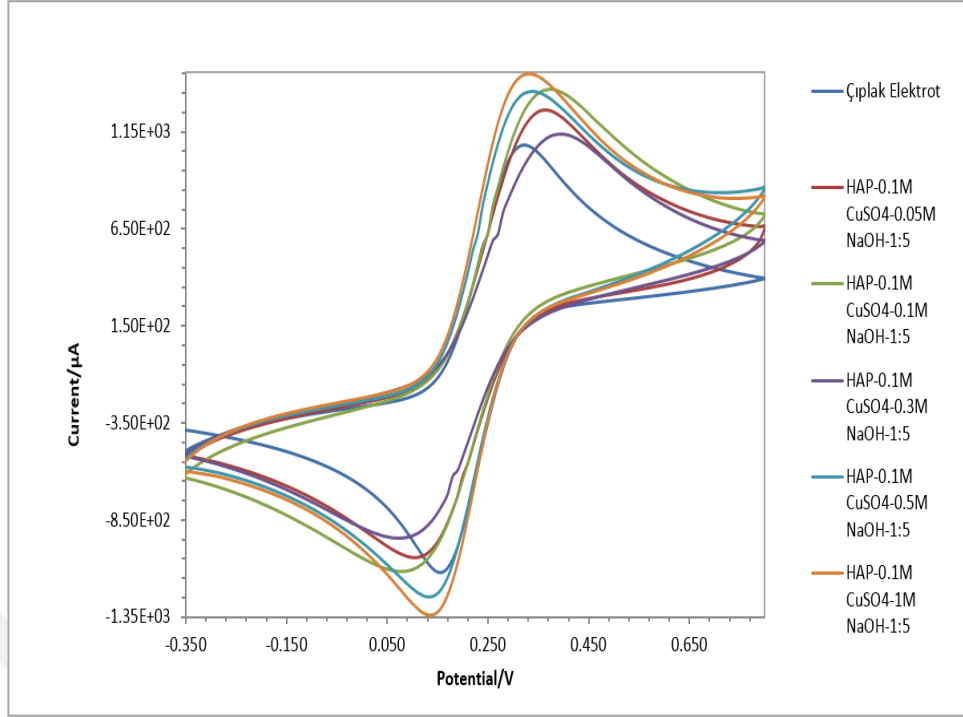
elektrot cevabına etkisi ve analiz sonuçları

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.05M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.05M NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.3M NaOH 1:5, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:5 ve 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1.'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. -0.5 ile +0.8V arasında 1V/s tarama hızında dönüşümlü voltametrik sinyalleri alınmıştır. Sinyal davranışları grafiklerden incelenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotlar ve modifiye edilen kalem grafit elektrotların redoks tepeleri gözlemlenmiştir. 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +1M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.05M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 1.817 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.05M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.9.'da modifiye edilmemiş elektrot, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.05M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrot, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.1M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrot, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.3M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrot, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +0.5M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrot ve 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ +1M NaOH 1:5 çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



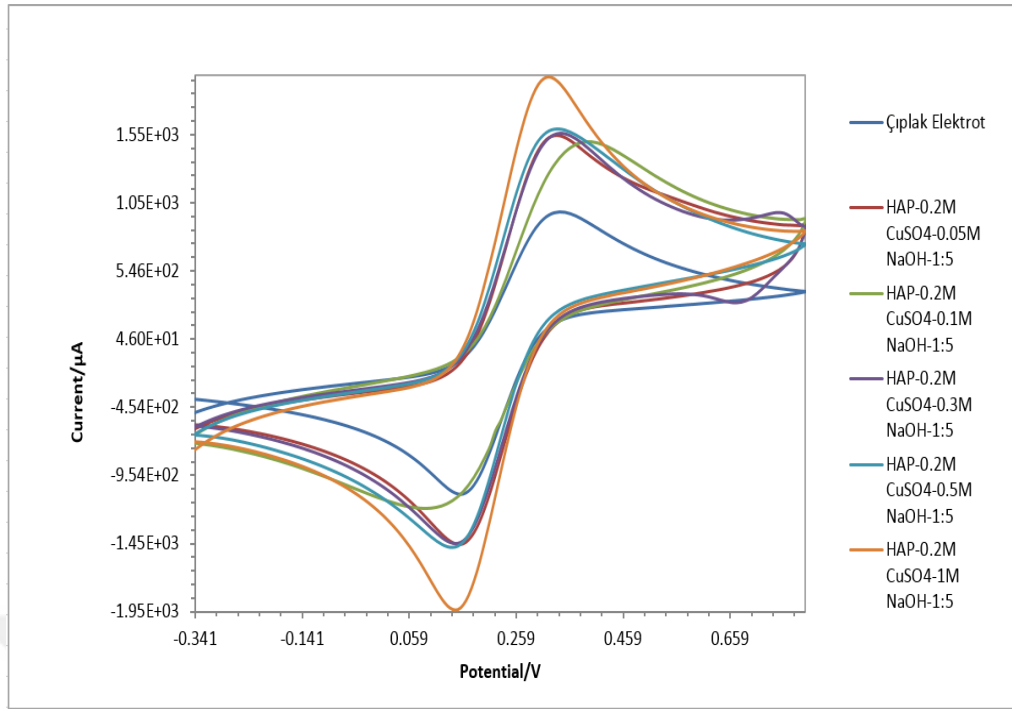
Şekil 4.9. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.05M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.1M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1.'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.1M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 1.502 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.1M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.10.'da modifiye edilmemiş elektrot, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



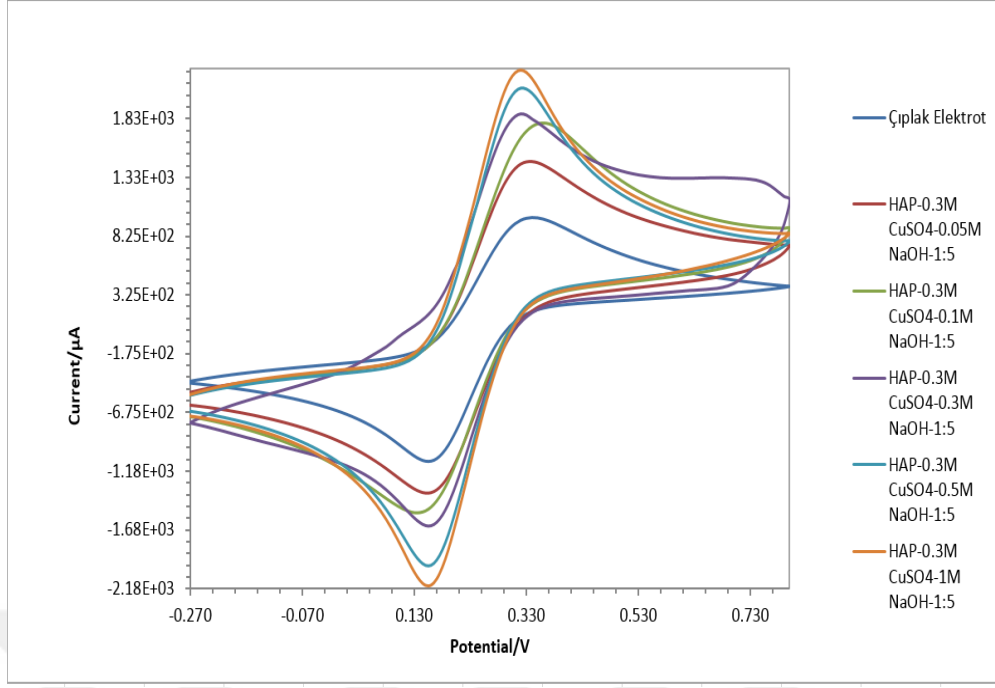
Şekil 4.10. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.2M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.2M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.119 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.2M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.11.'de modifiye edilmemiş elektrot, 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



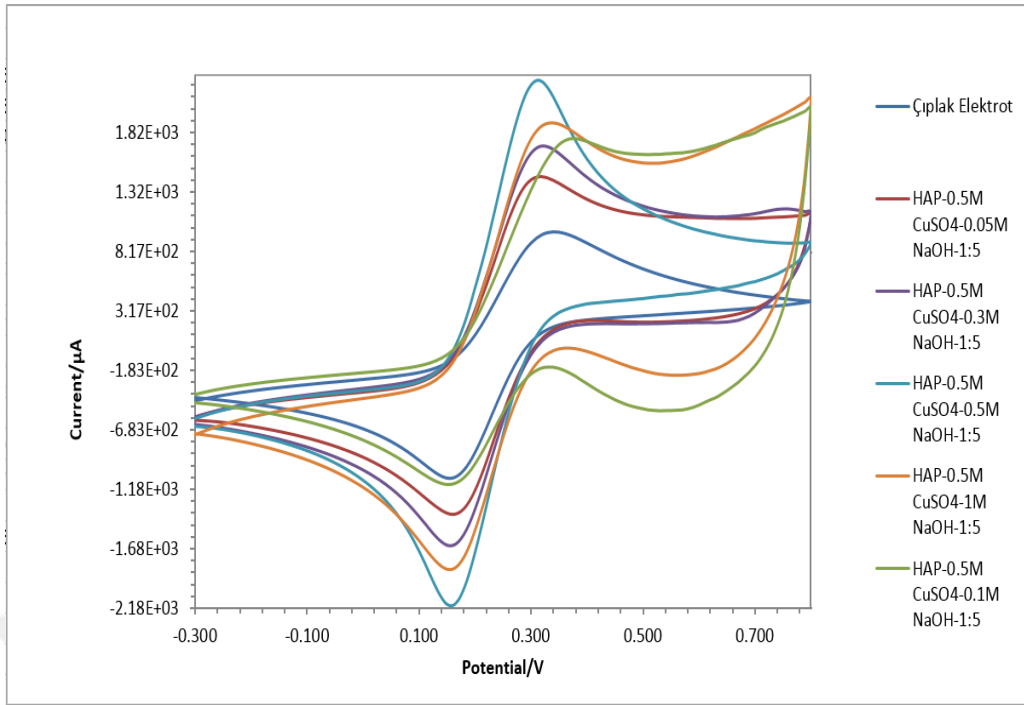
Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.2M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.3M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.3M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.397 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.3M CuSO_4 ve 1M NaOH 1:5 oranda çözelti elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.12.'de modifiye edilmemiş elektrot, 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



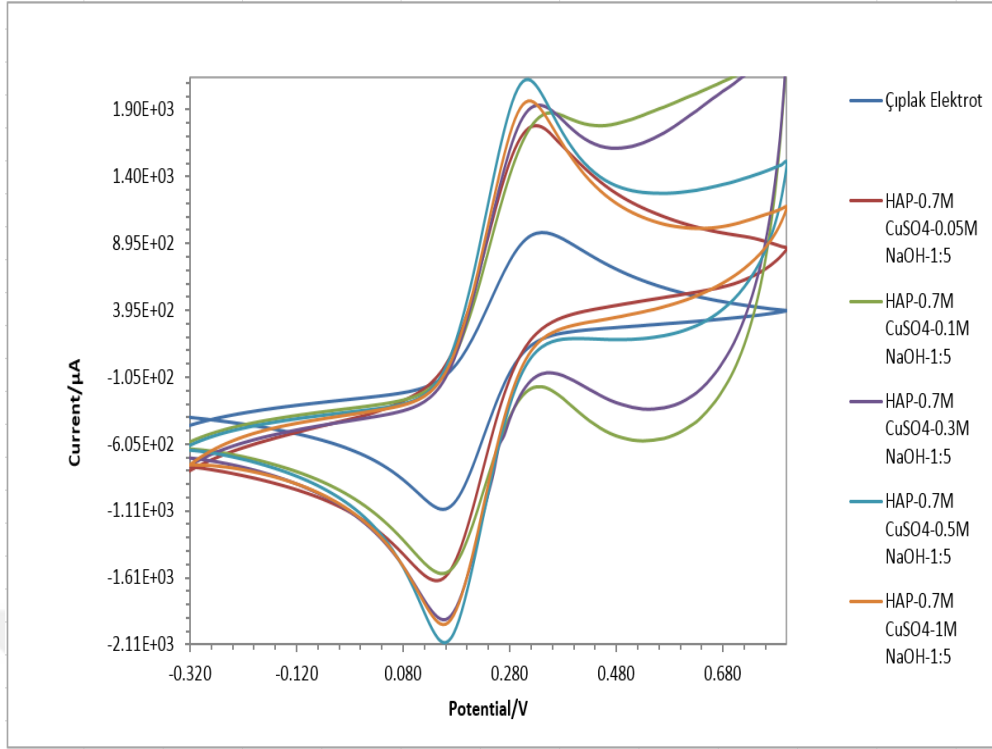
Şekil 4.12. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.3M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.5M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.465 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.13.'de modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



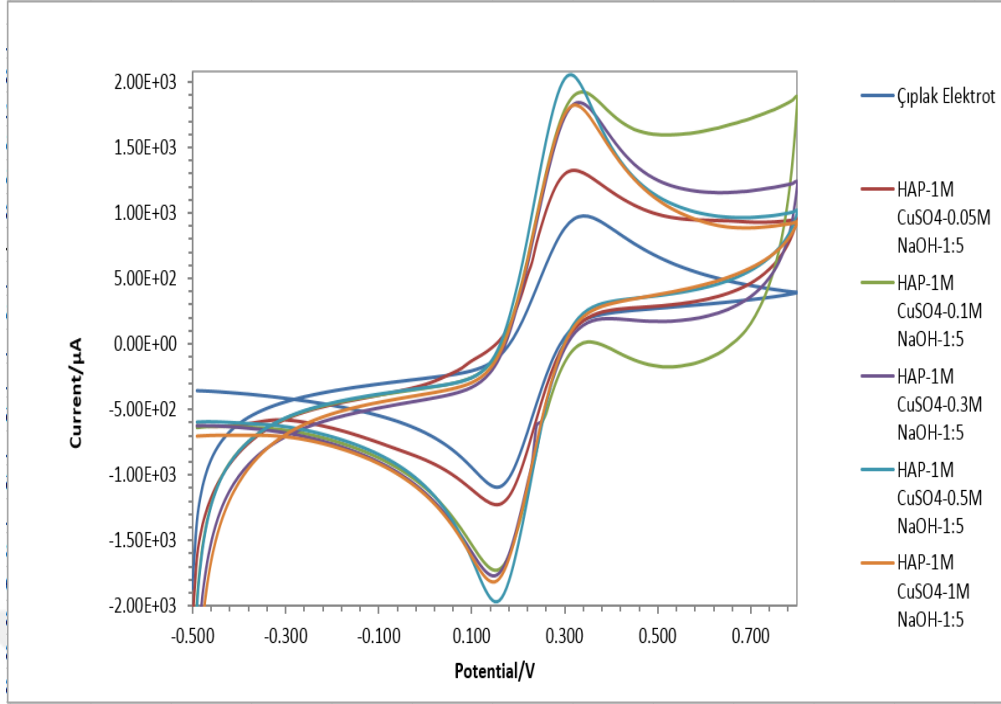
Şekil 4.13. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 0.7M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 0.7M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.324 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 0.7M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.14.'de modifiye edilmemiş elektrot, 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



Şekil 4.14. Modifiye edilmemiş elektrot, 0.7M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Elektrotlar hidroksiapatit ile modifiye edildikten sonra bakır sülfat konsantrasyonu 1M'da sabit tutulmuş farklı derişimler de sodyum hidroksit (1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.05M NaOH 1:5, 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.1M NaOH 1:5, 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.3M NaOH 1:5, 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 ve 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 1M NaOH 1:5) çözeltileri hazırlanmıştır. Konu başlığı 4.2.2.1'deki daldırma ve analiz bilgileri uygulanmıştır. 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1:5 derişimi ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrodun çıplak elektrotla ve diğer modifiyeli elektrotlar ile karşılaştırıldığında yüzeylerinde birikme olmasından dolayı, artan redoks tepe akımları ve azalan tepeden tepeye ayrılma gözlemlenmiştir. Çıplak kalem grafit elektrotun pik değeri 1.093 mA iken en iyi seçilmiş 1M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli kalem grafit elektrotun pik değeri 2.239 mA'ya yükselmiştir. Böylece, 1M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 oranda çözelti ile modifiyeli elektrotun elektrokimyasal aktivitesi üzerinde bariz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.15.'de modifiye edilmemiş elektrot, 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ derişimi sabit tutulmuş, farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri yer almaktadır.



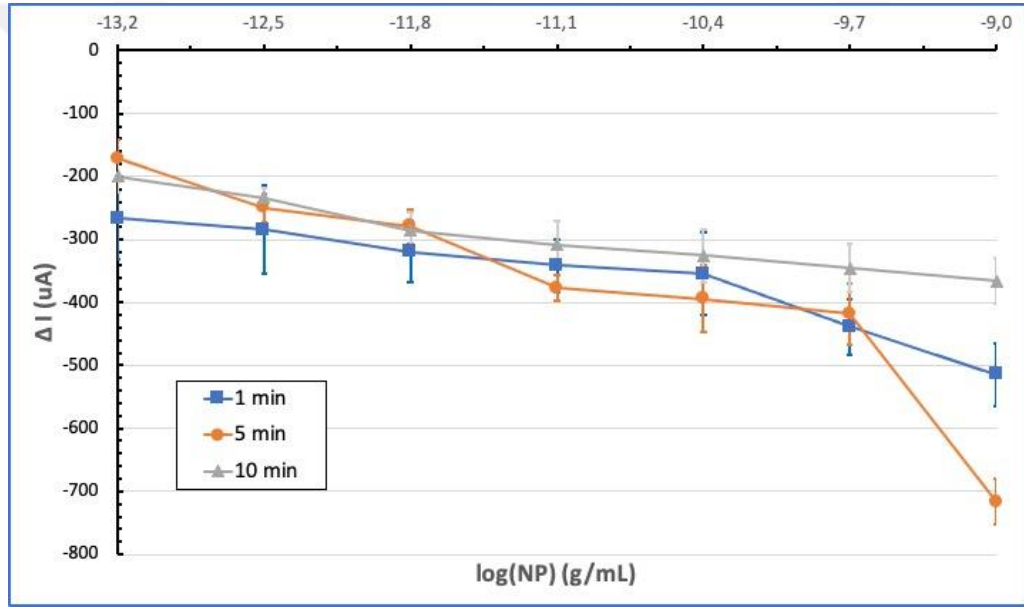
Şekil 4.15. Modifiye edilmemiş elektrot, 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ile farklı derişimlerde NaOH çözeltisi ile modifiye edilmiş elektrotların CV grafikleri

Yukarıda verilen 7 CV grafiği incelendiğinde hidroksiapatitli hem bakır sülfat bileşiklerinin hem de sodyum hidroksit bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların elektrokimyasal analizi incelenmiştir. Bütün parametreler incelenerek en iyi sinyal sonucunun HAP + 0.5M CuSO_4 ve 0.5M NaOH 1:5 derişimli elektrot olduğu anlaşılmıştır.

4.2.4. Elektrokimyasal yöntem ile antijen tespiti

Sunulan tez çalışmaları kapsamında SARS-CoV-2'nin elektrokimyasal tespitinde Kare Dalga Voltametri (Square Wave Voltammetry) tekniği kullanılmıştır. Bu teknik potasyum ferrisiyanit ve potasyum ferrosiyanit gibi dönüşümlü redoks türlerinin tespitinde oldukça yüksek hassasiyet sunmaktadır. Elektroanalitik teşhis yöntemimiz SARS-CoV-2 virüsüne ait spesifik antijen-antikor etkileşiminin sebep olduğu sinyal baskılanmasının ölçümü temeline dayanmaktadır. Buna göre, analit içindeki nükleokapsid proteinindeki (NP) artış, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/-4}$ redoks probunun akım sinyalinde ters orantılı olarak bir düşüşe neden olmaktadır. Yani, spesifik antijen-antikor etkileşimi redoks probunun çalışma elektrodu yüzeyine erişimini bloke etmektedir. Tüm ölçümlerde literatürle uyumlu olarak cihaz parametreleri şu şekilde belirlenmiştir. Çalışma frekansı 80,0 Hz, potansiyel genliği 75,0 mV ve potansiyel adımı 8,0 mV [153]. İlk olarak, SARS-CoV-2'ye ait oldukça düşük NP

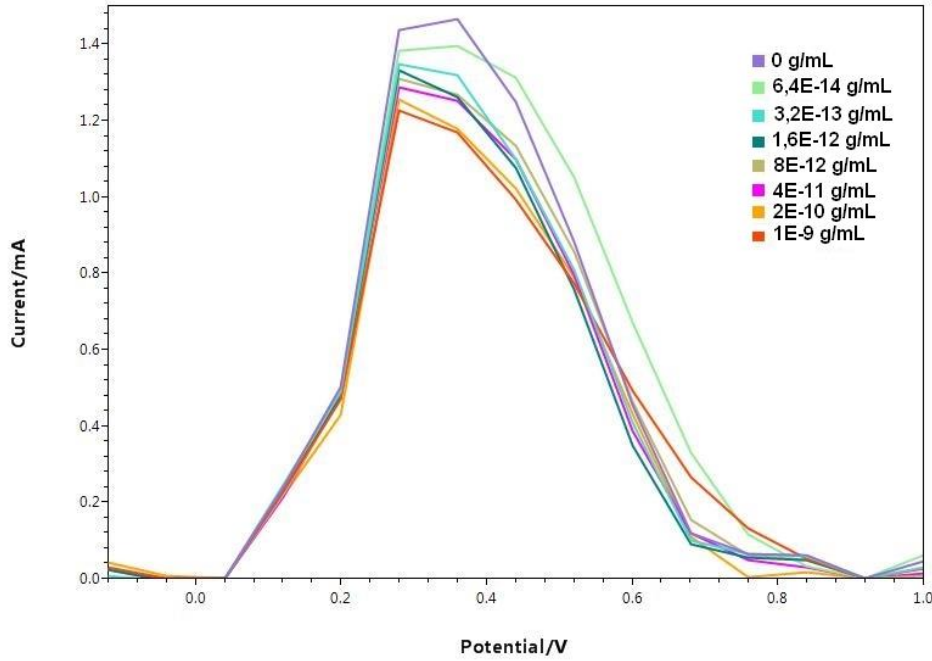
derişimlerinde modifiye elektrodun inkübasyon süresinin elektrot cevabı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir (Şekil 4.16.). Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak NP'in $6,4 \times 10^{-14}$ ile 1×10^{-9} g/mL arasında artan derişimleri ile gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçüm için yeni elektrotlar kullanılmıştır. Sonuçlar $\Delta I = I - I_0$ olarak ifade edilmektedir. Burada, I elektrot yüzeyine NP inkübasyonundan sonra $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu için kaydedilen akımı, I_0 ise modifiye elektrot NP ile etkileştirilmeden önce redoks probu için kaydedilen akımı ifade etmektedir. SWV analizlerinin sonuçları incelendiğinde en iyi analitik hassasiyet ve doğrusallık antikor ile modifiye edilmiş elektrot ve virüs antijeninin 10 dakika inkübe edilmesiyle elde edilmiştir. SARS-CoV-2 NP ve elektrot yüzeyine immobilize edilmiş antikor arasındaki bağlanma kinetikleri 10 dakika inkübasyon ile anlamlı bir etkileşim oluşturduğu için, bundan sonraki deneylerde optimum inkübasyon süresi 10 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. $6,4 \times 10^{-14}$ ile 1×10^{-9} g/mL aralığında farklı NP derişimleri ve farklı sürelerde (1, 5 ve 10 dakika) inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunda kaydedilmiş SWV akım baskılanmasının (ΔI) NP derişimlerinin logaritmik fonksiyonuna karşı grafiği.

Şekil 4.17.'de 0,1 M fosfat tamponu (PBS) (pH=7,4) içerisindeki NP'nin farklı derişimlerinde 10 dakika inkübe edilmiş modifiye elektrotların kare dalga voltametri sonuçları verilmiştir. Buna göre, NP derişimi arttıkça $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu için SWV cevabı azalmaktadır. Bu sonucun elektrot yüzeyindeki antikor modifikasyonu ile NP arasındaki spesifik etkileşimin analitik sinyali baskılamasından kaynaklandığı düşünülmektedir[153][154]. Nükleokapsit proteininin biyosensör yüzeyindeki antikorlara bağlanması modifiye elektrot yüzeyindeki elektroaktif kısımların kapanmasına ve SWV

sinyalinin bloke olmasına neden olmaktadır. Böylelikle ölçülen akım baskılanmakta ve SARS-CoV-2 varlığını gösteren pozitif sonuç olarak yorumlanmaktadır.

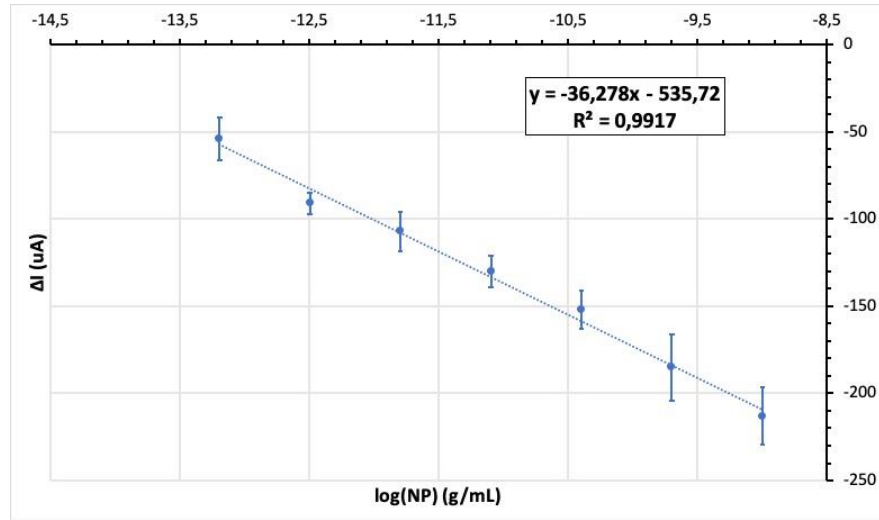


Şekil 4.17. Farklı NP derişimlerinde 10 dakika inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunda kaydedilmiş baseline düzeltilmiş kare dalga voltametrileri.

Her bir NP derişiminde elde edilen SWV sinyal baskılanmasının NP derişimlerin logaritmik fonksiyonuna karşı elde edilen kalibrasyon grafiğı Şekil 4.18.'de verilmektedir ($n=3$). Bu grafiğı göre, ölçümler $6,4 \times 10^{-14}$ ile 1×10^{-9} g/mL NP derişimi aralığında yüksek korelasyon katsayısıyla ($R^2=0,9917$) doğrusallık göstermektedir.

Tasarlanan elektrot sisteminin tespit sınırı (limit of detection, LOD) ve ölçüm sınırı (limit of quantification, LOQ) kalibrasyon grafiğinin doğrusal regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Buna göre, LOD $5,08 \times 10^{-10}$ g/mL, yani 508 pg/mL olarak hesaplanmıştır. LOQ ise, $1,54 \times 10^{-9}$ g/mL, yani 1,54 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, tasarladığımız modifiye elektrot sistemi çok kolay erişilebilir bir malzeme olan kalem ucu ile oldukça düşük derişimlerde (1 mL'de nanogramdan daha az olsa bile) SARS-CoV-2 virüsüne ait N proteinin hızlı tespitine yönelik oldukça hassas ölçüm sağlamaktadır.

Modifiye elektrotların örnek ile inkübasyon süresi (10 dk) ve inkübasyondan önce ve sonra olmak üzere 2 SWV ölçümlerinin alınması için geçen süre (1 dk) olmak üzere test süresi toplamda 11 dk zaman almaktadır. Yani, tasarlanan teşhis yöntemi SARS-CoV-2 virüsünün tespitine yönelik hızlı ve ucuz bir yöntem sunmaktadır.



Şekil 4.18. Kalibrasyon grafiği: farklı NP derişimlerinde 10 dakika inkübe edilmiş modifiye elektrotların 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probunda kaydedilmiş akım sinyali baskılanmasının (ΔI) NP derişiminin logaritmik fonksiyonuna karşı çizilen analitik eğrinin doğrusal regresyonu.

Tablo 4.1. Literatürde daha önce geliştirilmiş elektrokimyasal SARS-CoV-2 sensörleriyle karşılaştırma

Sensor	LOD	Hedef	Elektro kimyasal	Değerler	Zaman (dk)	Referans
HA-Cu PGE/SARS-CoV-2 antibody	5,08x10-10 g/mL	N-Protein	SWV	6,4x10-14 ile 1x10-9 g/mL	11.0	Bizim çalışma mız
LEAD	1.96 x10-13 g mL-1	SP	SWV	1x10-14 - 1x10-9 g mL-1	6.5	[153]
Multiplex RCA	1 copy μL^{-1}	N ve S geni	DPV	1 - 1x109 kopya μL^{-1}	31.0	[155]
Paper/GO/SARS-CoV-2 antibody	9.6 x10-10 g mL-1	SARS-CoV-2 IgG ve IgM	SWV	1x10-9 -1x10-6 g mL-1	46.0	[156]
SPE/CB/ SARS-CoV-2 antibody	19 x10-9 g mL-1	N ve S protein	DPV	0.5x10-4 - 20x10-6 g mL-1	31.0	[157]
Au@SCX8-TB-RGO-LP-Target/Au@Fe3O4	200 kopya mL-1	SARS-CoV-2 RNA	DPV	1x10-17 - 10-12 mol L-1	180.0	[158]
Cotton-tipped electrode/SARS-CoV-2 antibody	8.0 x 10-13 g mL-1	N protein	SWV	1x10-12 - 1x10-6 g mL-1	21.0	[159]

5. SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında; viral yapıların tespitinde kullanılmak üzere elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçüm esaslı bir elektrokimyasal sistemin parçalarından olan kalem grafit elektrodun (PGE) modifiye edilmesi ve devamlı kullanılabilirliğinin ölçülmesi hedeflenmiştir.

Virüs tespiti amacıyla, PGE'ların üzerine hidroksiapatit (HAP) kristallerinin çöktürülmesi ile yüzey alanının artırılması ve gözeneklerin oluşturulması sağlanmıştır.

HAP ile kaplanmış kalem grafit elektrotların yüzeyleri farklı konsantrasyonlarda bakır oksit kaplanması modifiye edilmesi şeklinde ilerlenmiştir. Böylece kalem grafit elektrotlar farklı konsantrasyonlarda bakır sülfat, farklı derişim ve oranlarda sodyum hidroksit ile modifiye edilerek bahsi geçen mikro/nano kristalli yapıların bakır oksit çözeltisi şeklinde elektrotların yüzeyinde biriktirilmesi sağlanmıştır. Modifiye edilmiş elektrotlar SEM ile morfolojik olarak incelenmiştir; elektrot yüzeyinde HAP kristallerinin biriktirilmesi, hedeflenen yüzey alanının artırılması ile bakır oksitlerin HAP kristallerine tutunarak elektrot yüzeyinde birikmesiyle yeterli iletkenlik kazandığı gözlenmiştir. İletkenlik ölçümlerinde fark yaratacak bir artış meydana gelmektedir.

Tez çalışmalarının elektrokimyasal karakterizasyon kısmında; hiçbir şekilde modifiye edilmemiş kalem grafit elektrotlar ile farklı çözelti konsantrasyonlarında ve farklı oranlarda gerçekleştirilen modifikasyonlar ile geliştirilen kalem grafit elektrotlar dönüşümlü voltametri (Cyclic voltametry) sinyalleri ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda hidroksiapatit ile farklı konsantrasyonlarda $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, farklı konsantrasyonlarda ve farklı oranlarda NaOH 1/1, 1/3 ve 1/5 çözeltileri kullanılmış ve en iyi performansın elde edildiği elektrot CV grafiklerinden belirlenmiştir. Optimum sonuç veren önce hidroksiapatit çöktürülmüş daha sonra 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 0.5M NaOH 1/5 oranı ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot baz alınarak deneyin diğer aşamalarında seçilen bu elektrot ile uygulamaya devam edilmiştir.

Yapılan tezin diğer aşamasında HAP kristalleri ve 0.5M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 0.5M NaOH 1/5 oranı ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar kullanılmıştır. Bu çalışmalarda COVID-19 virüs tespiti yapılmıştır. SARS-CoV-2 Nükleokapsid protein ele alınmış ve fosfat tampon çözeltisi yardımıyla farklı derişimlerde antijen çözeltileri hazırlanarak geliştirilen kalem grafit elektrotlar yardımıyla kalibrasyon grafiği çizdirilmiştir.

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre HAP ve sonrasında bakır oksit modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar ile yapılan antijen tespiti çalışmalarında tasarlanan elektrot sisteminin tespit sınırı (LOD) $5,08 \times 10^{-10}$ g/mL ve lm sınırı (LOQ) ise, $1,54 \times 10^{-9}$ g/mL olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, tasarladığımız modifiye elektrot sistemi çok kolay erişilebilir bir malzeme olan kalem ucu ile oldukça düşük derişimlerde (1 mL’de nanogramdan daha az olsa bile) SARS-CoV-2 virüsüne ait N proteinin hızlı tespitine yönelik oldukça hassas lm sağlamaktadır.

Modifiye elektrotların örnek ile inkübasyon süresi (10 dk) ve inkübasyondan önce ve sonra olmak üzere 2 SWV lmlerinin alınması için geçen süre (1 dk) olmak üzere test süresi toplamda 11 dk zaman almaktadır. Yani, tasarlanan teşhis yöntemi SARS-CoV-2 virüsünün tespitine yönelik hızlı ve ucuz bir yöntem sunmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] M. Z. H. Khan, M. R. Hasan, S. I. Hossain, M. S. Ahommed, and M. Daizy, “Biosensors and Bioelectronics Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor : State of the art,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 166, no. April, p. 112431, 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112431.
- [2] E. Cesewski and B. N. Johnson, “Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensors for pathogen detection,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 159, no. April, p. 112214, 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112214.
- [3] I. Cho, D. H. Kim, and S. Park, “Electrochemical biosensors : perspective on functional nanomaterials for on-site analysis,” pp. 1–12, 2020.
- [4] L. A. Layqah and S. Eissa, “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*, 2019.
- [5] H. D. Isenberg, “Pathogenicity and virulence: another view,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 40–53, 1988, doi: 10.1128/CMR.1.1.40.
- [6] A. Casadevall and L. A. Pirofski, “What is a pathogen?,” *Ann. Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 2–4, 2002, doi: 10.1080/078538902317338580.
- [7] L. Dethlefsen, M. McFall-Ngai, and D. A. Relman, “An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease,” *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 811–818, 2007, doi: 10.1038/nature06245.
- [8] A. Casadevall and L. A. Pirofski, “Host-pathogen interactions: Redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity,” *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 8, pp. 3703–3713, 1999, doi: 10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999.
- [9] A. Casadevall and L. anne Pirofski, “Host-pathogen interactions: The attributes of virulence,” *J. Infect. Dis.*, vol. 184, no. 3, pp. 337–344, 2001, doi: 10.1086/322044.
- [10] E. C. Keen, “Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 2, no. December, p. 161, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00161.
- [11] J. R. Perfect, “Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, no. 7, pp. 1577–1583, 1996, doi:

10.1128/aac.40.7.1577.

- [12] B. Henderson, S. Poole, and M. Wilson, "Bacterial modulins: A novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis," *Microbiol. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 316–341, 1996, doi: 10.1128/mmbr.60.2.316-341.1996.
- [13] I. G. Y, P. A. Ward, and J. Varani, "Can we learn from the pathogenetic strategies of group A hemolytic streptococci how tissues are injured and organs fail in post-infectious and in inflammatory sequelae?," vol. 25, 1999.
- [14] F. Balloux and L. van Dorp, "Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us?," *BMC Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 4–9, 2017, doi: 10.1186/s12915-017-0433-z.
- [15] W. P. Hanage, H. T. H. Chan, and P. Health, "Pathogen Epidemiology," *Encycl. Evol. Biol.*, vol. 3, pp. 225–231, 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-800049-6.00228-6.
- [16] E. Cesewski and B. N. Johnson, "Electrochemical biosensors for pathogen detection Biosensors and Bioelectronics Electrochemical biosensors for pathogen detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 159, no. April, p. 112214, 2020, doi: 10.1016/j.bios.2020.112214.
- [17] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and W. Peter, *The Molecular Biology of the Cell*. 2002.
- [18] P. O. Méthot and S. Alizon, "What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions," *Virulence*, vol. 5, no. 8, pp. 775–785, 2014, doi: 10.4161/21505594.2014.960726.
- [19] E. A. Almand, M. D. Moore, and L. A. Jaykus, "Virus-bacteria interactions: An emerging topic in human infection," *Viruses*, vol. 9, no. 3, pp. 1–10, 2017, doi: 10.3390/v9030058.
- [20] X. Zeng et al., "Higher Risk of Stroke Is Correlated With Increased Opportunistic Pathogen Load and Reduced Levels of Butyrate-Producing Bacteria in the Gut," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 9, no. February, pp. 1–12, 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00004.
- [21] J. F. Staab, *Fungal Infections, Systemic*, no. July. Elsevier Inc., 2014.

- [22] G. A. Fund, F. Infections, and G. Report, “Stop neglecting fungi,” no. July, 2017, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.120.
- [23] A. J. P. Brown, N. A. R. Gow, A. Warris, and G. D. Brown, “Memory in Fungal Pathogens Promotes Immune Evasion , Colonisation , and Infection,” *Trends Microbiol.*, vol. xx, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1016/j.tim.2018.11.001.
- [24] J. E. Kohlmeier and D. L. Woodland, “Immunity to respiratory viruses,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 61–82, 2009, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132625.
- [25] T. Horimoto and Y. Kawaoka, “Pandemic threat posed by avian influenza A viruses,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 129–149, 2001, doi: 10.1128/CMR.14.1.129-149.2001.
- [26] I. Moriyama, Hugentobler, “Seasonality of Respiratory Viral Infections,” *Annu. Rev. Virol.*, 2020, doi: 10.3389/fpubh.2020.567184.
- [27] J. S. M. Peiris et al., “Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome,” *Lancet*, vol. 361, no. 9366, pp. 1319–1325, 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
- [28] A. O. Docea, A. Tsatsakis, D. Albuлесcu, and O. Cristea, “A new threat from an old enemy : Re - emergence of coronavirus (Review),” pp. 1631–1643, 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4555.
- [29] A. H. de Wilde, E. J. Snijder, and M. Kikkert, *Host Factors in Coronavirus Replication*, no. June 2017. Springer International Publishing, 2018.
- [30] J. Cui, F. Li, and Z. Li Shi, “Origin and evolution of pathogenic coronaviruses,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. March, pp. 181–192, 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- [31] J. F. Chan et al., “A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission : a study of a family cluster,” *Lancet*, vol. 395, no. 10223, pp. 514–523, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
- [32] B. Chen et al., “Overview of lethal human coronaviruses,” no. May, 2020, doi: 10.1038/s41392-020-0190-2.
- [33] P. Sun, X. Lu, C. Xu, W. Sun, and B. Pan, “Understanding of COVID - 19 based on

- current evidence,” *J. Med. Virol.*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25722.
- [34] H. F. Florindo et al., “Immune-mediated approaches against COVID-19,” *Nat. Nanotechnol.*, vol. 15, no. August, 2020, doi: 10.1038/s41565-020-0732-3.
- [35] C. I. Paules, H. D. Marston, and A. Fauci, “Coronavirus Infections — More Than Just the Common Cold,” vol. 2520, pp. 2020–2021, 2020, doi: 10.1007/82.
- [36] T. S. Fung and D. X. Liu, “Human Coronavirus : Host-Pathogen Interaction,” pp. 529–560, 2019.
- [37] N. van Doremalen and T. Bushmaker, “Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1,” *new engl J. Med.*, 2020.
- [38] S. K. Vashist, “In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19 : Recent Advances and Emerging Trends,” 2020.
- [39] M. Wang, R. Zhao, L. Gao, X. Gao, D. Wang, and T. Gallagher, “SARS-CoV-2 : Structure , Biology , and Structure-Based Therapeutics Development,” vol. 10, no. November, pp. 1–17, 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.
- [40] J. Lan et al., “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor,” *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 215–220, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- [41] Q. Wang et al., “Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2,” *Cell*, vol. 181, no. 4, pp. 894-904.e9, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- [42] L. Du, Y. He, Y. Zhou, S. Liu, and B. J. Zheng, “The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development,” vol. 7, no. March, 2009, doi: 10.1038/nrmicro2090.
- [43] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, and S. Lu, “Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no. 2, pp. 102–108, 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2020.03.001.
- [44] C. Sun, L. Chen, J. Yang, C. Luo, Y. Zhang, and J. Li, “SARS-CoV-2 and SARS-CoV Spike-RBD Structure and Receptor Binding Comparison and Potential Implications on Neutralizing Antibody and Vaccine Development,” no. December 2019, pp. 1–18, 2020.

- [45] A. C. Walls et al., “Structure , Function , and Antigenicity of the SARS- Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 281-292.e6, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
- [46] G. Mariano, R. J. Farthing, S. L. M. Lale-Farjat, and J. R. C. Bergeron, “Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, no. December, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.605236.
- [47] Y. Huang, C. Yang, X. feng Xu, W. Xu, and S. wen Liu, “Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 41, no. 9, pp. 1141–1149, 2020, doi: 10.1038/s41401-020-0485-4.
- [48] Y. Chen, Q. Liu, and D. Guo, “Emerging coronaviruses : Genome structure , replication , and pathogenesis,” *J. Med. Virol.*, 2020, doi: 10.1002/jmv.25681.
- [49] J. Li et al., “Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis,” *Med*, vol. 2, no. 1, pp. 99-112.e7, 2021, doi: 10.1016/j.medj.2020.07.002.
- [50] B. W. Neuman et al., “A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology,” *J. Struct. Biol.*, vol. 174, no. 1, pp. 11–22, 2011, doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
- [51] R. Mahtarin, S. Islam, M. J. Islam, M. O. Ullah, M. A. Ali, and M. A. Halim, “Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2,” *J. Biomol. Struct. Dyn.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1080/07391102.2020.1861983.
- [52] A. Naskalska, A. Dabrowska, A. Szczepanski, A. Milewska, K. P. Jasik, and K. Pyrc, “Membrane Protein of Human Coronavirus NL63 Is Responsible for Interaction with the Adhesion Receptor,” *J. Virol.*, vol. 93, no. 19, 2019, doi: 10.1128/jvi.00355-19.
- [53] D. Schoeman and B. C. Fielding, “Coronavirus envelope protein : current knowledge,” vol. 0, pp. 1–22, 2019.
- [54] N. Satija and S. K. Lal, “The Molecular Biology of SARS,” vol. 38, pp. 26–38, 2007, doi: 10.1196/annals.1408.002.
- [55] Q. Zeng, M. A. Langereis, A. L. W. Van Vliet, E. G. Huizinga, and R. J. De Groot, “Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution,” no. 7, 2008.

- [56] M. R. Gitman, M. V Shaban, and A. E. Paniz-mondolfi, "Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 Pneumonia," pp. 1–17, 2021.
- [57] N. Leung, "Transmissibility and transmission of respiratory viruses," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. August, 2021, doi: 10.1038/s41579-021-00535-6.
- [58] R. Du et al., "Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS- CoV-2 : a prospective cohort study," 2020, doi: 10.1183/13993003.00524-2020.
- [59] E. Ruiz-hitzky et al., "Nanotechnology Responses to COVID-19," vol. 2, pp. 1–26, 2020, doi: 10.1002/adhm.202000979.
- [60] K. A. Prather, C. C. Wang, and R. T. Schooley, "Reducing transmission of SARS-CoV-2," vol. 368, no. 6498, 2020.
- [61] H. Huang et al., "COVID-19: A Call for Physical Scientists and Engineers," 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c02618.
- [62] S. Tang et al., "Aerosol transmission of SARS-CoV-2 ? Evidence , prevention and control," vol. 144, no. May, 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.106039.
- [63] M. Zietsman, L. T. Phan, and R. M. Jones, "Potential for occupational exposures to pathogens during bronchoscopy procedures," *J. Occup. Environ. Hyg.*, vol. 16, no. 10, pp. 707–716, 2019, doi: 10.1080/15459624.2019.1649414.
- [64] G. Buonanno, L. Stabile, and L. Morawska, "Estimation of airborne viral emission : Quanta emission rate of SARS-CoV-2 for infection risk assessment," *Environ. Int.*, vol. 141, no. May, p. 105794, 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105794.
- [65] M. L. Holshue et al., "First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States," *new engl J. Med.*, pp. 929–936, 2020, doi: 10.1056/NEJMoa2001191.
- [66] M. M. Lamers, J. Beumer, W. J. Van De Wetering, M. De Graaf, M. Koopmans, and E. Cuppen, "SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes," vol. 3, no. July, pp. 50–54, 2020.
- [67] J. Sun et al., "Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient," 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1760144.
- [68] G. Brankston, L. Gitterman, Z. Hirji, C. Lemieux, and M. Gardam, "Transmission of influenza A in human beings," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 257–265, 2007,

doi: 10.1016/S1473-3099(07)70029-4.

- [69] N. R. Jones, Z. U. Qureshi, R. J. Temple, J. P. J. Larwood, and T. Greenhalgh, “Two metres or one : what is the evidence for physical distancing in past viruses , argue Nicholas R Jones and colleagues,” pp. 1–6, 2020, doi: 10.1136/bmj.m3223.
- [70] C. Huang et al., “Articles Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan , China,” pp. 497–506, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [71] H. Lu and C. W. Stratton, “Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan , China : The mystery and the miracle,” 2020, doi: 10.1002/jmv.25678.
- [72] Y. Liu, B. Mao, and L. S, “Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19,” 2020, doi: 10.1183/13993003.01112-2020.
- [73] Y.-Y. Zheng, “COVID-19 and the cardiovascular system,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 17, no. May, p. 259, 2020, doi: 10.1038/s41569-020-0360-5.
- [74] F. Li, “Evidence for a Common Evolutionary Origin of Coronavirus Spike,” *J. Virol.*, pp. 2–4, 2012, doi: 10.1128/JVI.06882-11.
- [75] R. J. G. Hulswit, C. A. M. De Haan, and B. Bosch, *Coronavirus Spike Protein and Tropism Changes*, 1st ed., vol. 96. Elsevier Inc., 2016.
- [76] F. Li, “Structure , Function , and Evolution of Coronavirus Spike Proteins,” pp. 237–264, 2016, doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
- [77] C. Liu et al., “Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases,” 2020, doi: 10.1021/acscentsci.0c00272.
- [78] M. Hoffmann et al., “SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Article SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor,” pp. 271–280, 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [79] P. Zhou et al., “A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin,” *Nature*, vol. 579, no. March, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [80] M. Hasöksüz, S. Kiliç, and F. Saraç, “Coronaviruses and SARS-COV-2,” pp. 549–556, 2020, doi: 10.3906/sag-2004-127.

- [81] G. Simmons, D. N. Gosalia, A. J. Rennekamp, J. D. Reeves, S. L. Diamond, and P. Bates, "Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry," vol. 102, no. 33, 2005.
- [82] M. Letko, A. Marzi, and V. Munster, "Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses," *Nat. Microbiol.*, vol. 5, no. March, 2020, doi: 10.1038/s41564-020-0688-y.
- [83] W. K. Leung, K.-F. To, P. Chan, N. Lee, K. Y. Yuen, and J. J. Y. Sung, "Enteric Involvement of Severe Acute Respiratory Syndrome –," vol. 5085, no. 03, pp. 1011–1017, 2003, doi: 10.1053/S0016-5085(03)01215-0.
- [84] X. Xu and P. Chen, "Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission," vol. 63, no. 3, pp. 457–460, 2020.
- [85] C. Wang, P. Horby, F. Hayden, and G. Gao, "A novel coronavirus outbreak of global health concern," vol. 395, pp. 15–18, 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.
- [86] W. Wang, Y. Xu, R. Gao, and R. Lu, "Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens," vol. 323, no. 18, pp. 2020–2021, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.1585.
- [87] D. Wrapp et al., "Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation," vol. 1263, no. March, pp. 1260–1263, 2020.
- [88] Y. Orooji, H. Sohrabi, N. Hemmat, and F. Oroojalian, "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.*, no. 0123456789, pp. 1–30, 2021, doi: 10.1007/s40820-020-00533-y.
- [89] H. A. Aboubakr, "Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions : A review," no. April, pp. 1–17, 2020, doi: 10.1111/tbed.13707.
- [90] A. W. H. Chin et al., "Correspondence Stability of SARS-CoV-2 in different environmental," *The Lancet Microbe*, vol. 1, no. 1, p. e10, 2020, doi: 10.1016/S2666-5247(20)30003-3.
- [91] S. J. Smither et al., "Experimental aerosol survival of SARS-CoV-2 in artificial saliva

- and tissue culture media at medium and high humidity culture media at medium and high humidity,” 2020, doi: 10.1080/22221751.2020.1777906.
- [92] S. W. X. Ong, Y. K. Tan, and P. Y. Chia, “Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) From a Symptomatic Patient,” pp. 2020–2022, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.3227.
 - [93] S. B. Kasloff, A. Leung, J. E. Strong, D. Funk, and T. Cutts, “Stability of SARS - CoV - 2 on critical personal protective equipment,” *Sci. Rep.*, pp. 1–7, 2021, doi: 10.1038/s41598-020-80098-3.
 - [94] K. K. To et al., “Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva,” vol. 71, pp. 841–843, 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa149.
 - [95] N. Huang et al., “SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva,” vol. 27, no. May, 2021, doi: 10.1038/s41591-021-01296-8.
 - [96] E. S. Savela et al., “Quantitative SARS-CoV-2 viral-load curves in paired saliva and nasal swabs inform appropriate respiratory sampling site and analytical test sensitivity required for earliest viral detection,” pp. 1–37, 2021.
 - [97] A. T. Yayehrad, “Could Nanotechnology Help to End the Fight Against COVID-19 ? Review of Current Findings , Challenges and Future Perspectives,” no. July, 2021.
 - [98] C. Weiss et al., “Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic,” 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c03697.
 - [99] E. V. R. Campos et al., “How can nanotechnology help to combat COVID - 19 ? Opportunities and urgent need,” *J. Nanobiotechnology*, pp. 1–23, 2020, doi: 10.1186/s12951-020-00685-4.
 - [100] E. Y. C. Shiu, N. H. L. Leung, and B. J. Cowling, “Controversy around airborne versus droplet transmission of respiratory viruses : implication for infection prevention,” vol. 32, no. 4, pp. 372–379, 2019, doi: 10.1097/QCO.0000000000000563.
 - [101] M. Rai et al., “Nanotechnology as a Shield against COVID-19 : Current,” 2021.
 - [102] V. Nikhra, “Exploring pathophysiology of COVID-19 infection : Faux espoir and dormant therapeutic options,” pp. 34–40, 2020, doi: 10.29328/journal.ijcv.1001013.

- [103] T. Ai and W. Lv, "Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China : A Report of 1014 Cases," vol. 2019, 2020.
- [104] B. Udugama et al., "Diagnosing COVID-19 : The Disease and Tools for Detection," 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c02624.
- [105] M. Rai et al., "Nanotechnology-based promising strategies for the management of COVID-19 : current development and constraints," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2021, doi: 10.1080/14787210.2021.1836961.
- [106] J. Wu et al., "Detection and analysis of nucleic acid in various biological samples of COVID-19 patients," *Travel Med. Infect. Dis.*, vol. 37, no. April, p. 101673, 2020, doi: 10.1016/j.tmaid.2020.101673.
- [107] N. Bhalla, Y. Pan, Z. Yang, and A. F. Payam, "Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19," 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c04421.
- [108] S. A. Bustin, "RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2 : A Primer," 2020.
- [109] T. Kilic, R. Weissleder, and H. Lee, "iScience II Molecular and Immunological Diagnostic Tests of COVID-19 : Current Status and Challenges," *ISCIENCE*, vol. 23, no. 8, p. 101406, 2020, doi: 10.1016/j.isci.2020.101406.
- [110] D. P. Tulay and D. Ph, "COVID-19 PCR Testleri İşleyiş Şeması," 2020.
- [111] M. R. Tom and M. J. Mina, "To Interpret the SARS-CoV-2 Test , Consider the Cycle Threshold Value," vol. 02115, no. 16, pp. 2252–2254, 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa619.
- [112] P. Habibzadeh, M. Mofatteh, M. Silawi, and M. A. Faghihi, "Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Molecular diagnostic assays for COVID-19 : an overview," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 58, no. 6, pp. 385–398, 2021, doi: 10.1080/10408363.2021.1884640.
- [113] G. Antonelli, S. Stefani, and M. Pistello, "SARS-CoV-2 diagnostics: Some reflections on current assays," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2021.
- [114] S. Jindal and P. Gopinath, "Nanotechnology based approaches for combatting COVID-19 viral infection Nanotechnology based approaches for combatting COVID-19 viral infection," 2020.

- [115] H. Chen et al., “Targeting and Enrichment of Viral Pathogen by Cell Membrane Cloaked Magnetic Nanoparticles for Enhanced Detection,” pp. 39953–39961, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b09931.
- [116] W. Yang and F. Yan, “Patients with RT-PCR-confirmed COVID-19 and Normal Chest CT,” p. 2020, 2020.
- [117] P. Lei, B. Fan, J. Mao, J. Wei, and P. Wang, “Running title: The CT progression of COVID-19 pneumonia,” no. January, pp. 19–21, 2020.
- [118] S. P. Varahachalam, B. Lahooti, T. Chhibber, K. Morris, N. Kim, and A. Kaushik, “Nanomedicine for the SARS-CoV-2 : State-of-the- Art and Future Prospects,” pp. 539–560, 2021.
- [119] P. Moitra, M. Alafeef, K. Dighe, M. B. Frieman, and D. Pan, “Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV - 2 Mediated by N Gene Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles,” 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c03822.
- [120] H. Kim, M. Park, J. Hwang, J. H. Kim, and D. Chung, “Development of Label-Free Colorimetric Assay for MERS-CoV Using,” 2019, doi: 10.1021/acssensors.9b00175.
- [121] A. Solaimuthu, A. N. Vijayan, P. Murali, and P. S. Korrapati, “ScienceDirect Nano-biosensors and their relevance in tissue engineering,” *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, vol. 13, pp. 84–93, 2020, doi: 10.1016/j.cobme.2019.12.005.
- [122] G. Seo et al., “Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor- Based Biosensor,” 2020, doi: 10.1021/acsnano.0c02823.
- [123] I. Santiago, “Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing,” pp. 2880–2889, 2020, doi: 10.1002/cbic.202000250.
- [124] “Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation,” 2001.
- [125] N. L. Henry and D. F. Hayes, “Cancer biomarkers,” vol. 6, pp. 0–6, 2012, doi: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.
- [126] L. Zhang and H. Guo, “Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2,” *Adv. Biomark. Sci. Technol.*, no. January, 2020.
- [127] R. McBride, M. van Zyl, and B. C. Fielding, “The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein,” *Viruses*, vol. 6, no. 8, pp. 2991–3018, 2014, doi:

10.3390/v6082991.

- [128] C. K. Chang, M. H. Hou, C. F. Chang, C. D. Hsiao, and T. H. Huang, “The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions,” *Antiviral Res.*, vol. 103, no. 1, pp. 39–50, 2014, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.12.009.
- [129] W. Ji et al., “Effect of underlying comorbidities on the infection and severity of COVID-19 in Korea: A nationwide case-control study,” *J. Korean Med. Sci.*, vol. 35, no. 25, pp. 1–15, 2020, doi: 10.3346/JKMS.2020.35.E237.
- [130] T. Mohammad et al., “Genomic Variations in the Structural Proteins of SARS-CoV-2 and Their Deleterious Impact on Pathogenesis: A Comparative Genomics Approach,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 11, no. October, pp. 1–14, 2021, doi: 10.3389/fcimb.2021.765039.
- [131] J. Garcia et al., “Recombinant Protein Expression and Purification of N , S1 , and RBD of SARS-CoV-2 from Mammalian Cells and Their Potential Applications,” vol. 2, pp. 1–14, 2021.
- [132] P. D. Burbelo et al., “Sensitivity in Detection of Antibodies to Nucleocapsid and Spike Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Patients With Coronavirus Disease 2019,” vol. 222, 2020, doi: 10.1093/infdis/jiaa273.
- [133] J. Wu et al., “SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19,” *Nat. Commun.*, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22034-1.
- [134] Ö. Çolak, “Sakkaroz Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması,” 2014.
- [135] T. Vural, “Karbon Nanotüp Esaslı Biyosensörlerin Geliştirilmesi Development Of Carbon Nanotube Based,” 2009.
- [136] Z. Tüylek, “Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim Biosensors and Nanotechnological Interaction,” vol. 6, no. 2, pp. 71–80, 2017.
- [137] U. Aykut and H. Temiz, “Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı,” vol. 2006, no. 3, pp. 51–59, 2006.
- [138] T. Vural, “İmmünobiyosensör Geliştirilmesi Development Of Electrochemical Immunobiosensor For Cancer Diagnosis,” 2016.
- [139] B. Boz, İ. C. Paylan, M. Z. Kizmaz, and S. Erkan, “Biyosensörler ve Tarım Alanında

- Kullanımı,” vol. 13, no. 3, pp. 141–148, 2017.
- [140] B. S. Cihangiroğlu, “Malzemelerin, Uyuşturucuların/Bağımlılık Yapan (Pge’ler), Test Edilmesi/Analizi İçin Mikro/Nano Platformlar Olarak Yüzey Modifiye Kalem Grafit Elektrotlar,” 2021.
- [141] H. Li, X. Liu, L. Li, X. Mu, R. Genov, and A. J. Mason, “CMOS Electrochemical Instrumentation for Biosensor Microsystems: A Review,” 2016, doi: 10.3390/s17010074.
- [142] H. Zheng et al., “Analytical Methods sequence-specific recognition of double-stranded DNA,” pp. 5005–5009, 2013, doi: 10.1039/c3ay40972d.
- [143] T. L. Kamikawa et al., “Biosensors and Bioelectronics Nanoparticle-based biosensor for the detection of emerging pandemic influenza strains,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 4, pp. 1346–1352, 2010, doi: 10.1016/j.bios.2010.07.047.
- [144] B. B. Pala, “Karakterizasyonu Preparation And Characterization Of Peptide- Protein Nanotubes,” 2010.
- [145] A. J. Bard, L. R. Faulkner, E. Swain, and C. Robey, *ELECTROCHEMICAL METHODS Fundamentals and Applications*. 2001.
- [146] F. Lisdat and D. Schäfer, “The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing,” *Anal Bioanal Chem*, pp. 1555–1567, 2008, doi: 10.1007/s00216-008-1970-7.
- [147] E. Yalçın, “Sulardan Ağır Metal Giderimi İçin Nanofibriler Filtrelerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu The Preparation And Characterization Of Nanofiber Filters For Removal Heavy Metal From Waste Water,” 2012.
- [148] C. H. Voon and S. T. Sam, *Physical surface modification on the biosensing surface*. Elsevier Inc., 2018.
- [149] G. Das and H. H. Yoon, “Spherulitic copper – copper oxide nanostructure- based highly sensitive nonenzymatic glucose sensor,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 165–178, 2015.
- [150] L. Ferreira et al., “Applied Surface Science Development of a novel biosensor for Creatine Kinase (CK-MB) using Surface Plasmon Resonance (SPR),” vol. 554, no. March, 2021, doi: 10.1016/j.apsusc.2021.149565.

- [151] K. Vijayashree, K. Rai, and T. Demappa, "Synthesis of nanosized copper oxide by assimilating microwave radiation and its characterizations," *Indian J. Adv. Chem. Sci.*, vol. S1, pp. 6–9, 2016.
- [152] B. Bozdogan, "Disposable pencil graphite electrode modified with peptide nanotubes for Vitamin B 12 analysis," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 303, 2014.
- [153] L. F. De Lima, A. L. Ferreira, M. D. T. Torres, and W. R. De Araujo, "Minute-scale detection of SARS-CoV-2 using a low-cost biosensor composed of pencil graphite electrodes," pp. 1–9, 2021, doi: 10.1073/pnas.2106724118/-/DCSupplemental.Published.
- [154] J. Yang et al., "Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18319-6.
- [155] T. Chaibun et al., "Rapid electrochemical detection of coronavirus SARS-CoV-2," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21121-7.
- [156] A. Yakoh, U. Pimpitak, S. Rengpipat, N. Hirankarn, O. Chailapakul, and S. Chaiyo, "Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 176, no. December 2020, p. 112912, 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112912.
- [157] L. Fabiani et al., "Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 171, no. October 2020, 2021, doi: 10.1016/j.bios.2020.112686.
- [158] H. Zhao et al., "Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 327, no. September 2020, p. 128899, 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.128899.
- [159] S. Eissa and M. Zourob, "Development of a low-cost cotton-tipped electrochemical immunosensor for the detection of SARS-CoV-2," *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 3, pp. 1826–1833, 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.0c04719.

