



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



COVID-19 RNA'SI VE IGM TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

Doktora Tezi

Sinan Şaban AKKURT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

COVID19 RNA'SI VE IGM TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ GELİŞTİRİLMESİ

Sinan Şaban AKKURT

Danışman
Prof. Dr. Yasemin AKÇAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Yasemin AKÇAY

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Ferhan SAĞIN

Üye : Prof. Dr. Şölen HİMMETOĞLU

Üye : Doç. Dr.Mert ÖZGÖNÜL

Üye : Doç. Dr. Soycan MIZRAK

Üye :Dr.Öğr.üyesi. Yusuf Ali ALTUNCI

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Tıp Fakültesini bitirdiğim zaman hayatımın en güzel duygularını yaşamaya başlamıştım. Artık 6 yıllık serüvenim bitmiş ve bilimin ışığında aldığım bilgileri tıbbi sorunu olup bana başvuran herkesle paylaşıp şifa sağlayabilecektim. Nitekim mesleki bilgilerimi herkesle kullanıp elimden geldiğince faydalı olmaya çalıştım. Bu süreçte bir çok farklı eğitim de alıp mesleki öngörüme katkı sağladım. Ancak Tıp bilimi sürekli dinamik ve yeniliklere açık olarak sürekli geliyor ve bizimde bunu yakalamamız gerektiği gerçeğiyle Tıbbi Biyokimya Doktorası yapmaya karar verdim. Ve Ege Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Kürsüsüne kabul edildim. Tıbbi Biyokimya Doktora eğitimim boyunca hastalıklara yaklaşımda hızlı ve kanıta dayalı teşhisin tedavilerde ne kadar önemli olduğunu gördüm.

Bu süreçte Covid-19 pandemisi ile de mücadele başlayınca teşhiste zaman kavramının ve doğru metodlarla teşhis koymanın ne kadar önemli olduğu gerçeğiyle tekrar yüzleştim. Bu tez çalışmamda biyosensörlerle çalışıldığında hem hızlı ve pratik hem de doğru tanı koyma açısından hayatımıza önemli katkılar sağlayabileceğini düşünerek hareket ettim. Hele ki pandemide bir çok meslekdaşımızı, yakınımızı ve insanımızı kaybetmişken çalışmamın bu doğrultuda ülkeme ve bundan sonraki olası pandemilere faydalı olmasını diliyorum.

Doktora tezimin, bilim dünyasına katkı sağlayarak özgün çalışmalara ışık tutmasını dilerim.

İzmir, 8.12.2022

Sinan Şaban AKKURT

Özet

COVID19 RNA'sı ve IgM Tayinine Yönelik Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi

COVID-19 çok ciddi bir solunum yolu hastalığıdır. Tanı konması ise alınan örnek içerisindeki genomunun analizini gerçekleştiren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile mümkündür. Bu analiz ise yaklaşık 4 saat sürmektedir. Bu nedenle gerçekleştirdiğimiz çalışmada PCR reaksiyonu yerine sadece COVID-19 hedef virüsünde bulunan RNA'nın tayini için kapasitif temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. pM düzeyinde ve duyarlı bir analiz gerçekleştirebilmeyi başarmakla birlikte, biyosensör performans testleri de gerçekleştirilmiştir. Bu genosensörde biyotanıma ajanı olarak COVID-19 prob RNA'sı kullanılmıştır. COVID-19 RNA primeri ise https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome programı ile online olarak benzerlik taraması yapılarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile prob RNA dizisi olarak 5'CAGAUUCAACUGGCAGUAACCAGA'3 olarak komplementeri belirlenmiştir. Bunun yanında ikincil bir biyobelirteç olan IgM ölçümü de COVID-19 belirtilerini doğrulamak için çalışılmıştır ve biyotanıma ajanı olarak anti-IgM kullanılarak iki farklı biyosensör geliştirilmiştir. Ölçümlerde kapasitans (C) kullanılmıştır kullanılacaktır. Kapasitif ölçümler tek moleküle kadar duyarlı ölçümler sağlayabilmeleri sayesinde duyarlılık için tercih edilmiştir. Bu şekilde ülkemize katma değer sağlayabilecek bir ürünün ilk aşamaları geliştirilerek konsept bir virüs biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler; COVID-19, IgM, RNA, Kapasitans, Biyosensör

Abstract

Development of biosensor systems for COVID19 RNA and IgM detection

COVID-19 is a very serious respiratory disease. Diagnosis is possible with Polymerase Chain Reaction (PCR), which analyzes the genome in the sample. This analysis takes about 4 hours. Therefore, in our study, a capacitive-based biosensor was developed for the determination of RNA only in the COVID-19 target virus, instead of the PCR reaction. Biosensor performance tests were also carried out, although we were able to perform a sensitive analysis in the pM array. COVID-19 probe RNA was used as a biorecognition agent in this genosensor. The COVID-19 RNA primer was determined by online similarity scanning with the https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome program. In this study, the complement of 5'CAGAUUCAACUGGCAGUAACCAGA'3 was determined as the probe RNA sequence. Besides, measurement of IgM, a secondary biomarker, has also been studied to confirm the symptoms of COVID-19, and two different biosensors have been developed using anti-IgM as a biorecognition agent. Capacitance (C) will be used in the measurements. Capacitive measurements have been preferred for sensitivity as they can provide sensitive measurements up to a single molecule. In this way, a concept virus biosensor system was developed by developing the first stages of a product that can add value to our country..

Keywords; COVID-19, IgM, RNA, Capacitance, Biosensor

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet	III
Abstract.....	IV
İçindekiler.....	V
Tablolar Dizini	VI
Şekiller Dizini	VII
Kısaltma Listesi.....	VIII
Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi	3
1.2. Araştırmanın Sorusu	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	4
1.4. Araştırmanın Varsayımları	4
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	4
1.6. Araştırmanın Amacı.....	4
Genel Bilgiler.....	6
Gereç ve Yöntem.....	11
Bulgular	15
Tartışma.....	46
Sonuç ve Öneriler.....	52
Kaynaklar	53
Teşekkür	57
Özgeçmiş.....	58

Tablolar Dizini

Tablo 1. Biyosensör geliştirme adımlarının optimizasyonu	23
Tablo 2. Tekrarlanabilirlik testlerinin gösterimi.....	26



Şekiller Dizini

Şekil 1. Biyosensörlerin yüzeyinin elektriksel devre modeli	13
Şekil 2. COVID19 RNA biyosensör immobilizasyonlarının kapasitif olarak gösterimi	16
Şekil 3. Pirol ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (100um).....	17
Şekil 4. Pirol ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (1um).....	18
Şekil 5. Pirol, RNA ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (100um)	19
Şekil 6. Pirol, RNA ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (10um)	20
Şekil 7. RNA ölçüm zamanının kronoimpedimetrik ölçüm ile belirlenmesi	22
Şekil 8. COVID-19 RNA biyosensörünün standart grafiğinin kapasitif olarak gösterimi (mavi kapasitans verisi RNA biyosensörü baselinesıdır).....	24
Şekil 9. COVID-19 RNA biyosensörünün standart grafiğinin gösterimi (10-1000 fM)	25
Şekil 10. COVID-19 RNA biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin kapasitans ile gösterimi	27
Şekil 11. COVID-19 RNA biyosensörünün geri elde değerlerinin karşılaştırılması. 29	
Şekil 12. Depo kararlılığının sütun grafikte gösterimi.....	30
Şekil 13. Altın IgM biyosensörünün modifikasyon tabakalarının gösterimi	32
Şekil 14. Altın elektrotun AFM ile gösterimi	34
Şekil 15. AuE-PPy elektrotun AFM ile gösterimi	35
Şekil 16. AuE-PPy-PAMAM elektrotun AFM ile gösterimi.....	36
Şekil 17. IgM biyosensörünün AFM ile gösterimi	37
Şekil 18. IgM'nin biyosensör yüzeyine bağlanmasının kapasitif olarak izlenmesi ...	39
Şekil 19. IgM biyosensörünün standart grafiğinin kapasitif olarak gösterimi.....	41
Şekil 20. IgM biyosensörünün standart grafiği.....	42
Şekil 21. IgM biyosensörünün seçiciliğinin gösterimi	44
Şekil 22. IgM biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin gösterimi.....	45

Kısaltma Listesi

SARS-COV	: severe acute respiratory syndrome coronavirus
COVID-19	: Corona virus diseases 2019
Ig	: İmmünglobulin
C	: Kapasitans
APBA	: Aminofenil boronik asit
Py	: Prol
fM	: femtomolar
mF	: milifaraday

Giriş

Küresel koronavirüs hastalığı salgını 2019 (COVID-19), dünya çapında halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturdu. COVID-19, ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan Şehrindeki bir deniz ürünleri pazarında maruz kalan hastalarda izole edilen ve tanımlanan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) enfeksiyonunun sonucu olduğu görülmüştür (Zhu ve diğerleri, 2020). SARS-CoV (Rota ve diğerleri, 2003) ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) (Zaki, van Boheemen, Bestebroer, Osterhaus ve Fouchier, 2012) ile ilgili bulgulara benzer şekilde, SARS-CoV-2'nin birincil insan enfeksiyonlarını başlatmak için insandan insana bulaşma yoluyla geçtiğine inanılmaktadır. Koronavirüslerin dört ana alt grubu vardır (α , β , γ ve δ). İnsan patojenleri Cov-229E ve CoV-HKU1 dahil olmak üzere α koronavirüs grubunun altı üyesi vardır. β koronavirüs grubu, insan patojenleri CoV-OC43, SARS-CoV ve MERS-CoV'yi içerir (Van Der Hoek ve diğerleri, 2004). Koronavirüs viryon partikülü tipik olarak yuvarlak veya çok biçimlidir. 120-160 nm çapında ve koronavirüslerin ortak bir özelliği olan üçlü Spike (S) proteininden oluşan taç şeklinde bir görünüm içerir. S proteini, enfeksiyon sırasında virüs bağlanmasına ve membran füzyonuna aracılık eder (King ve diğerleri, 2012). Karakteristik S proteinine ek olarak, koronavirüs genomları genellikle Membran (M) proteini, Zarf (E) proteini ve Nükleokapsid (N) proteini dahil olmak üzere üç ek yapısal proteini kodlar. Koronavirüs M proteini, 218-263 amino asit (aa), bir O- veya N ile modifiye edilmiş bir N-terminaline glikan ve bir hidrofilik C-terminal kuyruğuna sahiptir. E proteini, 74–109 aa, virülansın teşvik edilmesinde rol oynayabilir ve virion başına tipik olarak bu proteinin yaklaşık 20 kopyası vardır. Koronavirüs N proteini, 349 ila 470 aa, genomik RNA'nın nükleokapsid içine uygun şekilde katlanmasını kolaylaştıran, RNA'ya bağlı bir fosforile proteindir (Woo, Huang, Lau ve Yuen, 2010) (King ve diğerleri, 2012). SARS-CoV-2 virionunun çapı 60-140 nm'dir ve pozitif duyarlı, tek sarmallı 29 891 bp RNA genomu (Zhou P ve diğerleri, 2020b). Genom sekans hizalaması, SARS-CoV-2 ve SARS-CoV arasında % 79.5 sekans özdeşliği ile Yunnan Eyaleti, Çin bölgesinde görülen bir yarasadan (*Rhinolophus affinis*) izole edilmiş RaTG12 virüsünün sekansı ile dikkate değer bir (% 93,1) özdeşlik ortaya çıkarmıştır (Zhou P vd., 2020b). Öncelikle pangolinden (Order, Pholidota; Family, Manidae) izole edilmiş bir koronavirüsün S proteininde tanımlanan sekans eklentilerine dayanan karşılaştırmalı genomik analiz, bu

memelilerin büyük olasılıkla çapraz tür aktarımı için ara konakçılar olduğunu öne sürmüştür (Zheng ve diğerleri, 2020). Nihayetinde SARS-CoV için bulunana benzer şekilde, SARS-CoV-2 S proteininin hücre yüzeyi reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanması, viral girişi insan akciğerindeki tip II pnömositlerde başlatır (Calfee, Gallagher, Abbott, Thompson ve Matthay, 2012). Bu nedenle, S proteini, SARS-CoV-2'nin ilk bulaşmasında ve devam eden enfeksiyonunda merkezi bir rol oynar. Fakat bu biyomolekül ölçümü spesifik olmamakla birlikte COVID tanısı konmasını da imkansızlaştırır. Bu nedenle genetik düzeyde bir ölçümün daha doğru sonuçlar vereceği bilinmektedir.

Antikorlar, bağışıklığın doğuştan gelen ve adaptif dallarını birbirine bağlayan anahtar bileşenlerdir ve normalde konakçı korumasına aracılık etmek için yabancı bir antijene yanıt olarak üretilir. Antikor yanıtının tanımlayıcı bir özelliği poliklonalitesidir; antikorlar, somatik rekombinasyon ve mutasyon yoluyla Fab alanlarının neredeyse sınırsız çeşitlendirilmesi yoluyla görünüşte sınırsız bir antijen dizisini hedefleme kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, antikor tepkisinin poliklonalitesinin, aynı zamanda antikor-antijen kompleksi tarafından angaje olan efektör moleküller için de geçerli olduğu giderek daha açık hale gelmektedir. Bu nedenle, Fab-antijen etkileşimleri, antikor yanıtının özgüllüğü için çok önemliyken, Fc alanı için antijen tanıma tarafından tetiklenen çeşitli efektör özelliklere aracılık etmede çok önemli bir rolü vardır (Bournazos, Chow, Abboud, Casadeval ve Ravetch, 2014). Immünoglobulin G (IgM), plazma proteininin yaklaşık % 10-20'sini oluşturan insan serumunda en bol bulunan proteinlerden biridir. İnsanda IgM, IgD, IgM, IgA ve IgE olmak üzere beş immünoglobulin sınıfının ana sınıfıdır. % 82-96 protein ve % 4-18 karbonhidrattan oluşan bu glikoproteinler, ağır zincir yapısı bakımından farklılık gösterir ve farklı efektör fonksiyonlara sahiptir. Amino asit seviyesinde % 90'dan fazla özdeş olmalarına rağmen, her alt sınıf, antijen bağlanması, bağışıklık kompleksi oluşumu, tamamlayıcı aktivasyonu, efektör hücrelerin tetiklenmesi, yarı ömür ve plasental taşıma açısından benzersiz bir profile sahiptir (Schur, 1987). IgM, B hücreleri ve plazma hücreleri tarafından salgılanan birincil antikor türüdür ve adaptif immün yanıtlarda rol oynayan baskın izotiptir. IgM antikorlarının aktivitesi, antijene bağlanan Fab alanı ve in vivo için gerekli olan hücresel efektör fonksiyonlarına aracılık etmek için farklı reseptör türleri (Fcγ reseptörleri; FcγR'ler) aracılığıyla sinyal veren Fc alanı tarafından belirlenir. Birçok enfeksiyon ve maligniteye karşı koruma ve doğrudan

koruyucu bağışıklık fonksiyonlarına aracılık etmeye ek olarak, IgM bağışıklık kompleksleri, uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini modüle etmek, T-hücreleri aktivasyonunu ve yüksek afiniteli B hücrelerinin seçimini arttırmak için FcγR'ler aracılığıyla sinyal verir. FcγR'lerin çoğu, monomerik IgM için düşük afinite sergilediğinden, IgM molekülleri tarafından sinyale, avidite bazlı Fc-FcγR etkileşimlerini ve dolayısıyla FcγR kümelenmesini ve sinyalleşmesini sağlayan multivalent IgM-antijen immün kompleksleri aracılık eder (Nimmerjahn ve Ravetch, 2005). Savunma sisteminde de özellikle COVID-19 testlerinde de hızlı tanı kiti olarak IgM değerleri önemli olmaktadır.

1.1. Araştırmanın Problemi

Teknolojideki gelişimlerin çok hızlı bir şekilde arttığı ve medikal uygulamaların da buna paralel olarak artışı hızlı olmaktadır. Günümüzde COVID-19 tanısı konmasında kullanılan rutin test ise PCR testidir. PCR testi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) adı verilen hedef RNA dizisinin çoğaltılarak ölçülmesi ile çalışan bir yöntemdir. Bu yöntemin doğruluğu ise günümüzde tartışılmaktadır. Çünkü nazal ölçümler çoğunlukla yanlış pozitif cevap vermekte, hasta kişi aslında pozitif olsa da semptom göstermemektedir. Bu nedenle daha hızlı ve daha etkili yeni nesil ölçüm sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle SARS-CoV-2 genomik dizisi üzerindeki belli bir RNA dizisi hedef olarak seçilerek yeni nesil bir elektrokimyasal genosensör geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu genosensör ile PCR'dan daha hızlı ve düşük maliyetli bir genosensör geliştirilmiştir.

Diğer taraftan afinite temelli Biyosensör sistemlerinde özellikle Immunglobulinlerin ölçülmesi de seçicilik olarak zor olmaktadır. Bu nedenle aminoasit zincirinin değişikliği göz önüne alındığında, toplam yükü gösteren ölçümle daha seçici olarak belirlenmesi gerekmektedir. Ölçümün kapasitif olması IgM moleküllerinin ikincil bir işaretçi moleküle ihtiyaç duymaması ve hızlı ölçümü ile direkt olarak ölçülmesi ile COVID tanısını kolaylaştıracaktır.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Bu tez çalışması aşağıdaki sorulara cevap aranması ile kurgulanmıştır.

- COVID-19 tanısı konmasında kullanılan moleküler tekniklerdeki zorluklar nelerdir?
 - o COVID tanısında RNA analizi mümkün mü?

- o COVID tanısında seçici bir IgM ölçümü mümkün mü?
- COVID tayininde yeni nesil bir ölçüm sistemi geliştirilebilir mi?
- o RNA hibridi biyosensörlerine göre avantajlı bir Biyosensör sistemi geliştirilebilir mi??
- o IgM ölçümü daha spesifik olarak yapılabilir mi?
- o Bu kapsamda geliştirilen bir biyosensör;
 - ☐ ne kadar doğrulukta analiz yapabilir?
 - ☐ performans parametreleri nelerdir?
 - ☐ ölçüm süresi ne kadardır?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Hipotez 1: RNA fosfat grupları üzerinden elektrot yüzeyine bir polimer ile immobilize edilirse daha seçici ve duyarlı bir biyosensör geliştirilebilir.

Hipotez 0: IgM protein-A üzerine bağlandığında daha seçici bir sinyal elde edebilmek için molekülün elektriksel yükü ile bir ölçüm gerçekleştirilirse daha seçici bir biyosensör geliştirilebilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Bu araştırmada COVID RNA dizisi primer yerine direkt biyotanıma ajanı-polimer çevresine yerleştirilmiştir. Buna göre RNA ve IgM'nin biyoalgılama aracı üzerinden, elektrot yüzeyinin elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ile ölçülecektir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Hedef biyobeliteler çok hassas olduğundan, Nükleaz olmayan sarf malzemeleri kullanılmıştır,
- Biyosensörün hedef olan RNA'ya özel olarak geliştirilmiş olması,
- Araştırma bütçesinin yüksek olması ve medikal teknoloji geliştirme aşamalarının maliyetli ve zaman alıcı olması kısıtlamalar arasındadır.

1.6. Araştırmanın Amacı

COVID-19 çok ciddi bir solunum yolu hastalığıdır. Tanı konması ise alınan örnek içerisindeki genomunun analizini gerçekleştiren Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile mümkündür. Bu analiz ise günümüzde 4 saat sürmektedir. Bu nedenle gerçekleştirdiğimiz gerçekleştireceğimiz çalışmada PCR reaksiyonu yerine sadece

COVID-19 hedef virüsünde bulunan RNA'nın tayini için kapasitans temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu genosensörde biyotanıma ajanı olarak COVID-19 prob RNA'sı kullanılmıştır. COVID-19 RNA primeri ise https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1950483697 programı ile online olarak benzerlik taraması yapılarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile prob RNA dizisi olarak 5' CAGAUUCAACUGGCAGUAACCAGA'3 olarak belirlenmiştir. Bu prob çevresine ise fenilboronik asit monomerleri kaplanarak ölçüm ve prob RNA'nın yüzeye tutulması artırılmıştır. Ölçümlerde yüzey kapasitansı kullanılmıştır. Bir diğer parametre ise COVID-19 pandemisi ile artan arge çalışmalarına ek olarak kapasitif IgM biyosensörü geliştirilmiştir. Ölçümün kapasitif olması IgM moleküllerinin ikincil bir işaretçi moleküle ihtiyaç duymaması ve hızlı ölçümü ile direkt olarak ölçülmesi ölçümün kolaylığını yansıtacaktır. Bu şekilde ülkemize katma değer sağlayabilecek bir ürünün ilk aşamaları geliştirilmiştir.

Genel Bilgiler

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) dünyanın neredeyse her köşesine yayılarak toplumsal istikrarsızlığa neden olmuştur. Ortaya çıkan koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19), ateş, boğaz ağrısı, öksürük, göğüs ve kas ağrısı, nefes darlığı, konfüzyon, anozmi, yaşlanma ve baş ağrısına yol açar. Bunlar, kalbi, böbrekleri, karaciğeri ve sinir sistemlerini de etkileyen yaşamı tehdit eden solunum yetmezliğine kadar ilerleyebilir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun teşhisi genellikle grip ve mevsimsel üst solunum yolu viral enfeksiyonları ile karıştırılır. Mevcut tedavi stratejileri ve gerekli önlemler nedeniyle hızlı teşhis zorunludur.

Tümü mevsimsel üst solunum yolu enfeksiyonları sırasında görüldüğü gibi, kesin tanı testleri viral nükleik asitleri ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunu doğrulamak için serolojik testler gerekir (Wang ve diğerleri, 2020). Göğüs bilgisayarlı tomografisi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI) hastalık belirtilerini doğrular ("Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19 | CDC", y.y.). COVID-19'un imzası ise yaşamı tehdit eden akut solunum sıkıntısı sendromudur (ARDS). Akciğer birincil viral hedef olsa da, kardiyovasküler, beyin, böbrek, karaciğer ve bağışıklık sistemleri genellikle enfeksiyon ile tehlikeye girer. Bu nedenle hastalığın teşhisi son derece önemlidir.

COVID-19'u yönetmede ilk adım, online ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile sağlanan SARS-CoV-2'nin hızlı ve doğru tespitidir (R. Liu ve diğerleri, 2020). RT-PCR, nazofaringeal sıvılarda bulunan SARS-CoV-2 nükleik asitlerini tespit etmektedir. Test, viral yayılımı istemeden enfeksiyonu yaşlılara ve hastalık komorbiditeleri bulaştırabilen asemptomatik enfekte kişileri içeren kişiler ve topluluklar arasında bulaşıcı yayılmayı önlemek için kullanılır. Doğru viral tespit, COVID-19 salgınının kontrol altına almak için bir başlangıç noktasıdır. Hatalı testler, toplumu etkiler ve test sonuçlarının yardımıyla enfeksiyonun yayılmasını sağlar. Test duyarlılığının ve özgüllüğünün iyileştirilmesi acil bir ihtiyaç olmaya devam etmektedir. Serolojik testler, terapötik kazanç için kullanılabilecek geçmiş enfeksiyonu gösteren virüs tespiti tamamlar. Antikorlar, IgG veya IgM antikorlarının kalitatif bir tespiti kullanılarak enzime bağlı immünosorbent testi ile tespit edilir. Bu tür testler, viral başak (S) proteinine karşı bir bağışıklık tepkisi belirler ve sonraki viral maruziyete karşı korumayı değerlendirmek ve/veya temas izleme amaçları için yardımcı olabilir. Bu nedenle, bu tür testlerin önemi göz ardı edilemez. Bu aynı

zamanda epidemiyolojik değerlendirmeler ve geniş küresel terapötik ihtiyaçlar için de geçerlidir.

SARS-CoV-2 pandemisi için mevcut teşhis testleri nükleik asit, antikor ve protein bazlı tespitleri kullanır, ancak RT-PCR ile viral nükleik asit tespiti altın standart olarak bilinmektedir. Nükleik asit testleri, şu anda mevcut olan serolojik testlere göre viral tespit için gelişmiş hassasiyet ve özgüllüğe sahiptir. SARS-CoV-2'nin yaygın solunum yolu patojenleri üzerinde tanınması, hassas, kesin ve spesifik viral tespit işlevi gören RT-PCR'ye bağlıdır. Testin doğruluğuna rağmen, sonuçlar henüz viral enfeksiyonun kontrol altına alınmasını sağlayamamıştır. şubat 2020'de ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), lisanslı laboratuvarların kurum içi SARS-CoV-2 teşhis testlerini raporlamasına izin vermiştir. Prosedür, viral RNA'nın izolasyonu ve tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesiyle başlar. Daha sonra cDNA, Taq DNA polimeraz kullanılarak amplifiye edilir. Toplam geri dönüş süresi 2 günü açabilir ve çapraz kontaminasyon yoluyla özgüllüğün azalması riskini taşır. Testler genellikle hastane laboratuvarlarında yapılır. Farklı viral genom parçalarını hedefleyen primerlerin kullanıldığı gerçek zamanlı RT-PCR'den elde edilen sonuçlar, viral RNA dizisi varyasyonundan etkilenebilir. Ayrıca, viral evrim nedeniyle yanlış sonuçlar ortaya çıkabilir. RT-PCR testlerinin diğer sınırlamaları, numune depolama, düşük kaliteli nükleik asit saflaştırma, maliyet ve bekleme sürelerini içerir. Bu sınırlamalara rağmen, RT-PCR testi SARS-CoV-2 teşhisi için altın standart olmaya devam etmektedir. Alternatif in situ hibridizasyon ve immünohistokimya için büyük miktarlarda numune toplanması gerekir ve bu aerosoller ve güvenlik sınırlamaları oluşturabilir. İmmünohistokimya, antikorun seçimine ve özgüllüğüne ve numune kalitesine bağlıdır.

SARS-CoV-2'ye karşı antikorların sentezi, enfeksiyona karşı birincil bir bağışıklık tepkisidir. Nötralize edici antikorlar, 7. günde enfekte olmuş kişilerin %50'sine kadar ve 14. günde tüm enfekte olmuş kişilerde bulunur. Serolojik alışmalar, SARS-CoV-2 teşhisi için RT-PCR'ye bir alternatiftir. Gerçek zamanlı PCR ve serolojik testlerin birleştirilmesi, pozitif viral tespit oranlarını önemli ölçüde artırır. IgM seviyeleri SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonraki ilk hafta yükselir, 2 hafta sonra zirve yapar ve çoğu bireyde arka plana yakın seviyelere geri döner. IgG 1 hafta sonra saptanabilir ve uzun süre yüksek seviyede tutulur 56. Buna karşılık, IgG 1 hafta sonra saptanabilir hale gelir, uzun bir sre, hatta bazen 48 günden fazla yüksek kalır ve

yeniden enfeksiyona karşı koruma işlevi görebilir. IgA yanıtları enfeksiyondan 4 ila 10 gün sonra ortaya çıkar. Özellikle, bir tanısal öngörücü, serum IgA'nın yanı sıra IgG ve IgM'nin varlığıdır. SARS-CoV-2 antikorlarının spektrumu, kısmen farklı hedef antijenlerle açıklanmaktadır. Antikor titreleri enfeksiyondan 7 gün sonra düşebilir.

Şu anda, COVID-19'un 'klinik teşhisi', göğüs BT ve RT-PCR sonuçlarının bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Klinik ortamın dışında, RT-PCR testi, işyerinde veya okullarda yapılan gözetim testlerinin büyük çoğunluğunu içerir. RT-PCR testinin her yerde bulunması nedeniyle, bu testin hem klinisyenlere hem de politika yapıcılara sunduğu bilgileri incelemek önemlidir. Bu test platformunun eksikliklerini belirleyerek, gelecekteki tespit yöntemleri mevcut model üzerinde iyileştirme sağlayabilir. Nükleik asit amplifikasyon testleri, kötü zamanlanmış numune toplama, düşük kaliteli numune toplama, eğitilmiş laboratuvar teknisyenleri gereksinimi ve sonuçları oluşturmak için uzun bekleme süreleri nedeniyle sorunlu olabilir. Altın standart RT-qPCR (kantitatif PCR) zaman alıcıdır (4-6 saat), örneklerin laboratuvara taşınması için gereken süre dahil değildir, çok örnek bulunduğunda günler sürebilir. RT-PCR sonuçları ayrıca büyük ölçüde alınan örneğin tipine bağlıdır: pozitif örnekleme oranları orofaringeal sürüntüler için (%32-48), nazofaringeal sürüntüler (%63), bronkoalveolar lavaj sıvısı (%79-93), balgam (72- %76) ve dışkı (%29). Testleri çalıştırmak için gerekli olan primerler ve diğer reaktiflerin de düşünülmesi gerekmektedir. RT-PCR testinin getirdiği sınırlamalara yanıt olarak, yeni platformlar aktif olarak takip edilmektedir. Antikor tespit testleri üzerine araştırmalar devam etmektedir, ancak sınırlıdır. İmmünoagnostik yaklaşımlar için mevcut sorunlar arasında, farklı CoV türleri arasında iyi korunan antijenlerden alınan yanlış pozitif sonuçlara ve otoimmün hastalıklarda otoantikorlarla çapraz reaksiyonlara bağlı özgünlük eksikliği bulunmaktadır. İmmünoagnostik yaklaşımlar, maruziyetten 7-11 gün sonra en uygulanabilir ve bu nedenle akut enfeksiyon tanısında daha az faydalıdır. Test platformunun fiziksel sınırlamaları dışında, hem nükleik asit amplifikasyon testi hem de seroloji testi tarafından üretilen bilgiler, bir bireyin bulaşıcı olduğu süre veya belirli haplotiplerin bir popülasyondaki prevalansı gibi COVID-19'un önemli ölçümünü yakalayamamaktadır. Bu amaçlara yönelik olarak, nükleik asit amplifikasyon teknikleriyle birlikte kullanılan metagenomik saptama prosedürleri, hem klinisyenler hem de epidemiyologlar için yeni anlayışlara yol açabilir. RT-qPCR, nükleik asitlerin saptanması için mevcut standart olmasına rağmen, pulse kontrollü

amplifikasyon gibi yeni yöntemler değerlendirilmektedir. Nabız kontrollü amplifikasyon RNA ekstraksiyonu gerektirmez ve küçük bir cihazla 10 dakikada gerçekleştirilebilir. Yeni tanı platformlarının geliştirilmesine yönelik çabalar, eğer testler doğru, spesifik ve çalıştırılması kolaysa, kısa sürede sonuç veriyorsa ve seri üretim için ucuzsa verimli olabilir. Mevcut test platformlarının hem güçlü yönleri hem de sınırlamaları ve tekil çıktı değerleri göz önüne alındığında, klinik ve klinik olmayan ortamlarda karar vermeden önce test sonuçlarının sağladığı bilgiler dikkatlice incelenmelidir. Bu gereksinimleri karşılayacak güçlü özellikler sunan Biyosensör sistemleri bu testlerin gerçekleştirilmesi için son derece uygundur. Bir biyosensör bir biyotanıma ajanı ve fizikokimyasal iletici (transducer) bir araya getirilmesi sonucu geliştirilen mini analizörlerdir. Hedef molekülü analizine göre katalitik veya afinite temelli olarak adlandırılmaktadırlar.

Afinite biyosensörleri iki ana gruba ayrılabilir: hedef molekül ile sensör üzerindeki afinite yüzeyi arasındaki doğrudan bağlanmayı ölçenler (label-free) ve etiketli (label) reaktifler kullanılarak bağlanma deneylerine uyarlanan biyosensörler. Etiketli afinite reaktifleri ile çalışan biyosensörler, hedef molekülleri işaretlemek için genellikle işaret ajanları olarak floresan işaretleyiciler, aktif enzimler, manyetik boncuklar, radyoaktif türler veya kuantum noktalarının kullanıldığı geleneksel immünolojik test teknolojisinin varyasyonlarıdır. İşaretleme genellikle sinyal oluşumunu önemli ölçüde kolaylaştırmak ve prob ile hedef moleküller arasındaki etkileşimi doğrulamak için kullanılır. İşaretli reaktifleri kullanmanın önemli bir özelliği, kayıtlı sinyallerin amplifikasyonu ve dolayısıyla ulaşılabilecek hassasiyettir. İşaretli reaktiflerin kullanımına dayalı testler zaman alıcıdır ve işaretli reaktifler genellikle pahalıdır. Ayrıca, işaretli reaktiflere sahip testler genellikle çok adımlı işlemlerdir ve gerçek zamanlı ölçümler için uygulamalarını sınırlar. İşaretsiz afinite tabanlı biyosensörlerin tasarımı, güncel araştırmaların çoğunun hedefidir. Amaçlar, ticari ELISA bazlı immünolojik testlere alternatif yöntemler oluşturmaktır. Bu tip biyosensörlerin en çekici özellikleri, analitlerin doğrudan ve gerçek zamanlı olarak izlenmesine izin vermeleridir.

Biyosensörlerin farklı türleri arasında, elektrokimyasal biyosensörler, özellikleri nedeniyle özel ilgi görmüştür. Bu biyosensörler, taşınabilir entegre sistemlere ihtiyaç duyan birçok uygulama için çok önemli olan minyatürleştirilebilir. Minyatürleştirme, yalnızca bakım noktasında, klinikte, doktor muayenehanesinde

veya evde kullanıma izin vermekle kalmaz, aynı zamanda teşhis testlerinin maliyetini de düşürür. Elektrikli biyosensörler hızlı, ucuz, taşınabilir, minyatür ve etiketsiz cihazlar olarak bu amaçları yerine getirmektedir. Elektrik biyosensörleri amperometrik, voltametrik empedans veya kapasitif sensörler olarak sınıflandırılabilir.

Kapasitif biyosensörler, empedans biyosensörlerinin alt kategorisine aittir. Kapasitif biyosensörler, bir analit, yalıtkan dielektrik katman üzerinde hareketsiz hale getirilmiş reseptör ile etkileşime girdiğinde, elektrolit-elektrot arayüzünde dielektrik özelliklerindeki ve/veya dielektrik katmanın kalınlığındaki değişimi ölçer. Çalışma elektrodu (bir elektrolitik kapasitör/birinci plaka) ile elektrolit (ikinci plaka) arasındaki elektrik kapasitansı ölçmektedir. $C = (\epsilon_0 \epsilon A)/d$ olarak bilinen denklemde, ϵ plakalar arasındaki ortamın dielektrik sabitidir, ϵ_0 boş alanın geçirgenliğidir (8.85×10^{-12} F/m), A plakaların yüzey alanıdır (m^2) ve d plakaların kalınlığıdır. Verilen denkleme göre, plakalar arasındaki mesafe arttıkça toplam kapasitans azalır. Başka bir deyişle, bu tip kapasitif biyosensörlerin deney prensibinde, bir hedef molekül reseptöre bağlandığında, kapasitif elektrot etrafındaki karşı iyonların yer değiştirmesi kapasitansta bir azalmaya neden olur. Reseptöre bağlanan hedef molekül miktarı ne kadar yüksek olursa, elde edilen yer değiştirme ve kayıtlı kapasitanstaki azalma o kadar büyük olur.

Bu nedenle kapasitif ölçümün duyarlılığı, biyosensörlerin avantajları bir araya getirildiğinde, yeni nesil bir RNA ve IgM biyosensörü geliştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF), Tıbbi Biyokimya Araştırma ve Uygulama Hastanesi Laboratuvarında yürütülmüştür.

Kimyasal Sarf Malzemeler ve Çözeltilerin Hazırlanışı

Bu çalışmada kullanılan sarf malzemeleri Metabion ve Merck firmasından temin edilmiştir (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya).

- Potasyum klorür (KCl)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)
- Sistamin (Cys)
- Glutaraldehit (%25)
- COVID RNA dizisi 5'CAGAUUCAACUGGCAGUAACCAGA'3
- Amidofenilboronik asit (APBA)
- Pirol
- Etanol
- Metanol
- Sülfürik Asit %98 (H_2SO_4)

Çözeltiler

- Fosfat Tamponu: 50 mM dihidrojen fosfat (toplamda 1000 mL), sodyum hidroksit ile pH metrede pH= 6,8; 7; 7,4 olacak pH'larda hazırlanmıştır.
- Redoks Probu: 5 mM $\text{K}_4/3\text{Fe}(\text{CN})_6$, içerecek şekilde 100 mM potasyum klörür ve 50 mM dihidrojen fosfat karıştırılarak pH 7'ye ayarlanarak 1000 mL hazırlanmıştır.
- Sistamin Çözeltisi: 30 mililitre etanol içerisine toplamda 0,1M olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Glutaraldehit çözeltisi: Saf suda, % 25'lik stok çözeltiden % 5'e seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Sülfürik asit çözeltisi (2M): Stok sülfürik asit çözeltisi çözeltisi seyreltilmiştir.
- Yapay plazma: İçerisinde 4,5 mM potasyum klörür, 5 mM kalsiyum klörür, 1,6 mM magnezyum klörür, 2,5 mM üre, 0,1% albumin ve 150 mM sodyum klörür içeren fosfat tamponu (pH=7,4).
- APBA Çözeltisi: 40mM olacak şekilde 200mM NaF içeren 100mM H_2SO_4 içerisinde

- PiroL çözeltisi: 100 mM olacak şekilde 100mM KCl içeren pH=7 50 mM fosfat tamponunda hazırlanacaktır.

RNA Çözeltisinin Hazırlanması

Bu aşamada kullanılan tüm sarf malzemeleri ve pipet uçları nükleaz free olarak kullanılmıştır.

- RNA 10 nM olacak şekilde 50 µL olarak porsiyonlanmıştır.

Cihazlar

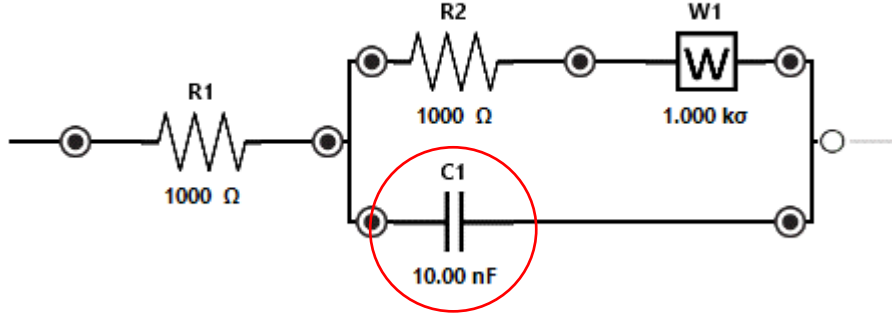
- Biyosensör sisteminde temel elektrot materyali olarak kullanılan yüzey baskılı elektrotlar (screen printed electrodes, SPE) kullanılmıştır. Biyosensör olarak karbon elektrot (110-C) elektrotlar Dropsens firmasından tedarik edilmiştir (Metrohm Dropsens, Oviedo, İspanya). Yardımcı elektrot olarak bu sistemin üzerinde platin elektrot ve referans elektrot olarak gümüş ve gümüş körür (Ag/AgCl) elektrodu kullanılmıştır.
- Emstat 4SLR potansiyostat (PalmSens B.V., Houten, Hollanda) kullanılmıştır. Döngüsel voltammetri (CV) ve kapasitans ölçümleri bu cihaz ile gerçekleştirilmiştir. PSTrace 5.9 programı ölçümlerde kullanılmıştır.
- Yüzey görüntülemesi için kullanılan taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) yüzey ölçümlerinde kullanılmıştır.

Yöntem

Biyosensörlerin Geliştirilmesi

Polimerlerin kolayca tutturulmasının sağlanması için karbon elektrotlar bu projede kullanılmıştır. Burada elektrotlar öncelikle pirol ile kaplanmıştır. Ardından pirol sonrasında elektrik akımı uygulanarak RNA prıbu yüzeye fosfat grupları üzerinden elektrostatik olarak adsorbe edilmiştir. Bundan sonra RNA üzerindeki şeker grupları ile bağ yapabilecek APBA polimerizasyonu gerçekleştirilerek RNA imprinte edilmiştir. Bu şekilde hedef RNA ölçümü için hazır hale getirilmiş olan Biyosensör kapasitif olarak çalışacaktır. Diğer bir metot ise elektrot yüzeyinde oluşturulan polipirol tabakasının üzerine glutaraldehit aracılığı ile anti-IgM antikorlar yüzeye immobilize edilmiş ve bu şekilde Biyosensör ölçüm için hazır hale getirilmiştir.

Kapasitif ölçümler için kapasitans değerleri PSTrace 5.9.01 yazılımı ile bulunmuştur. Biyosensörlerin yüzey devre modeli ise şekildeki elektrokimyasal devre modeli olarak Elektrokimyasal devre modeli Şekil 1’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Biyosensörlerin yüzeyinin elektriksel devre modeli

Kapasitans parametreleri olarak 10 kHz ile 0,05 Hz arasında frekans taraması için elektrotta 180 mV potansiyel (direct current-DC) uygulanmıştır. Frekanslı akım oluşturabilmek için alternatif akım (alternative current-AC) potansiyel 5 mV olarak belirlenmiştir.

CV ölçümleri ise elektrot yüzeyinde kalitatif doğrulamalar için -0,2 ile başlayarak 0,5 V arasında 100 mV/sn tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

A. Karbon elektrot ile RNA biyosensörünün gerçekleştirilmesi

- Kullanılmadan önce elektrotlar kullanmadan önce 2 M H₂SO₄ çözeltiye daldırılmıştır. Ardından elektrotlara -1,2 ile 1,2 volt arasında potansiyel uygulanarak 100mV/s arasında CV ile elektrokimya olarak temizlenmiştir.
- Elektrot sonrasında 100mM pirol ile -0,1V ile 0,9 V arasında 10mV/s hızında 10 döngü olarak elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Bu adımdan sonra Hedef COVID-19 RNA probu yüzeye 100uL olarak damlatılarak -100 mV akım 100 saniye boyunca uygulanmıştır.
- Ardından elektrot yıkanarak 40mM APBA çözeltisi içerisinde -0,2 V ile 1,1 V arasında 40 döngü olacak şekilde elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Ardından elektrot 10 dakika boyunca 6M üre içerisinde bekletilerek komplementer RNA yüzeyden uzaklaştırılarak Biyosensör ölçüme hazır hale getirilmiştir.

B. IgM biyosensörünün hazırlanması

- a) Kullanılmadan önce elektrotlar kullanmadan önce 2 M H₂SO₄ çözeltiye daldırılmıştır. Ardından elektrotlara -1,2 ile 1,2 volt arasında potansiyel uygulanarak 100mV/s arasında CV ile elektrokimyasal olarak temizlenmiştir.
- b) Sonrasında 100mM pirol ile -0,1V ile 0,9 V arasında 10mV/s hızında 10 döngü olarak elektropolimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- c) Pirol üzerine anti-IgM bağlanması için elektrot yüzeyine 50uL %2,5 olarak suda çözünmüş glutaraldehit damlatılarak 30 dakika bekletilmiş ardından 1mg/mL 100uL anti-IgM çözeltisi damlatılarak ölçüme hazır hale getirilmiştir.

COVID-19 RNA'sı ve IgM'nin kapasitif olarak ölçülmesi

RNA dizileri fM düzeyine seyreltildikten sonra biyosensörün yüzeyine damlatılarak kronoimpedimetrik olarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Bunun için hedef RNA yüzeye damlatılmıştır. Aynı metot ile IgM 1pg/mL düzeyinde yüzeye damlatılarak kronoimpedimetrik olarak ölçülmüştür.

Bağlanma süreleri kronoimpedimetrik olarak ölçüldükten sonra bulunan sürelerde kapasitif ölçüm gerçekleştirilmiştir.

- a. Bu ilk aşamalardan sonra kalibrasyon grafiğinin hazırlanması adımı farklı konsantrasyonlarda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Standart grafik her Biyosensör için beşer defa çizilmiştir. Bu şekilde tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik, regresyon katsayısı kapasitif eğriler ile hesaplanmıştır. Standart grafikte y ekseninde kapasitans, x ekseninde ise RNA/IgM konsantrasyonu grafiğe karşı hesaplanarak kalibrasyon grafikleri üretilmiştir.
- b. Bu işlemlerden sonra hazırlanan yapay serumlarda ise gerçek örnek denemesi, matrix etkisi ve geri elde ölçümleri gerçekleştirilerek tez çalışması tamamlanmıştır.

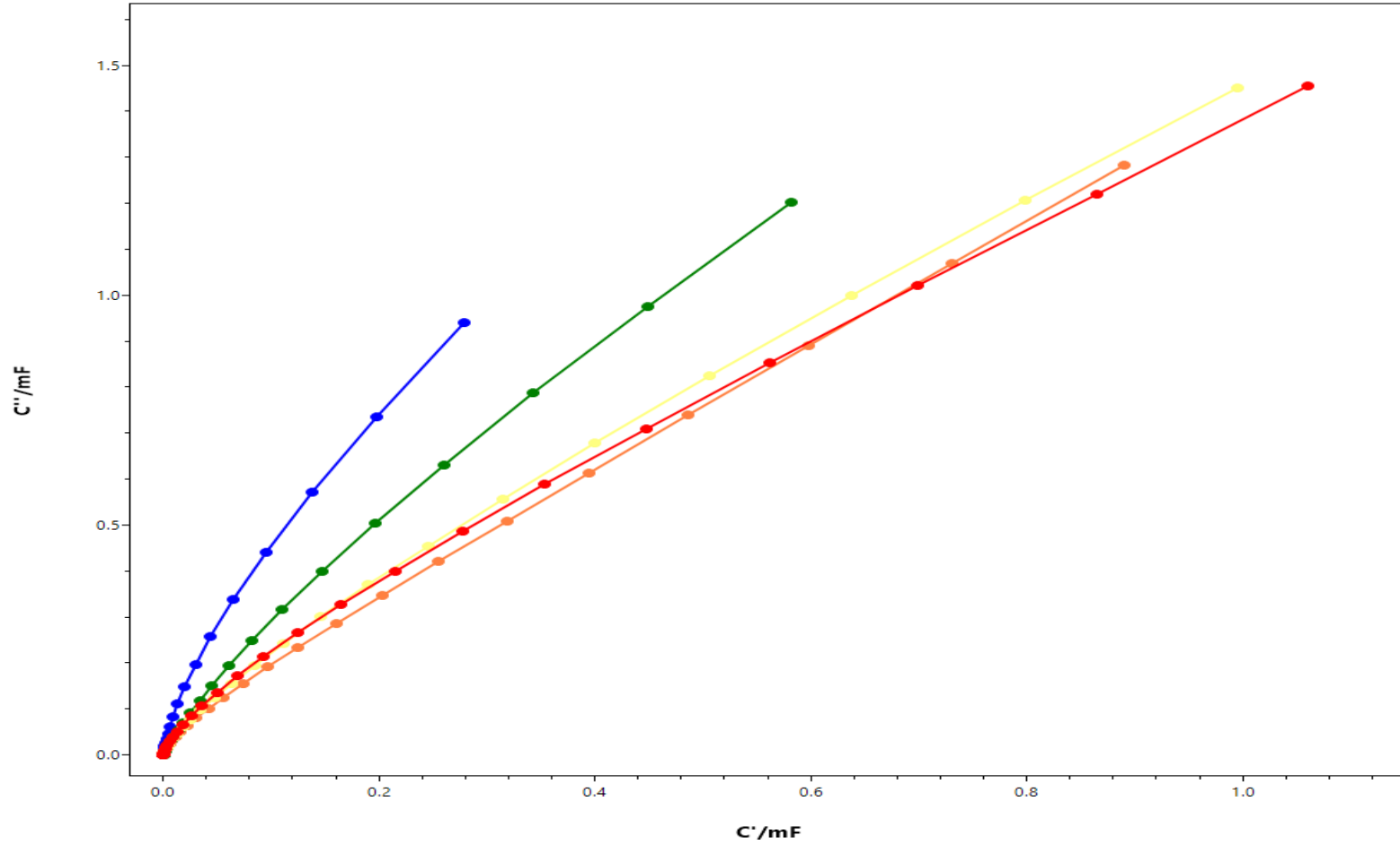
Bulgular

Bulgular kısmında ise geliştirdiğimiz biyosensörlerin farklı optimizasyonları gösterilmiştir. Buna göre öncelikle COVID-19 RNA biyosensörünün bulguları paylaşılmıştır.

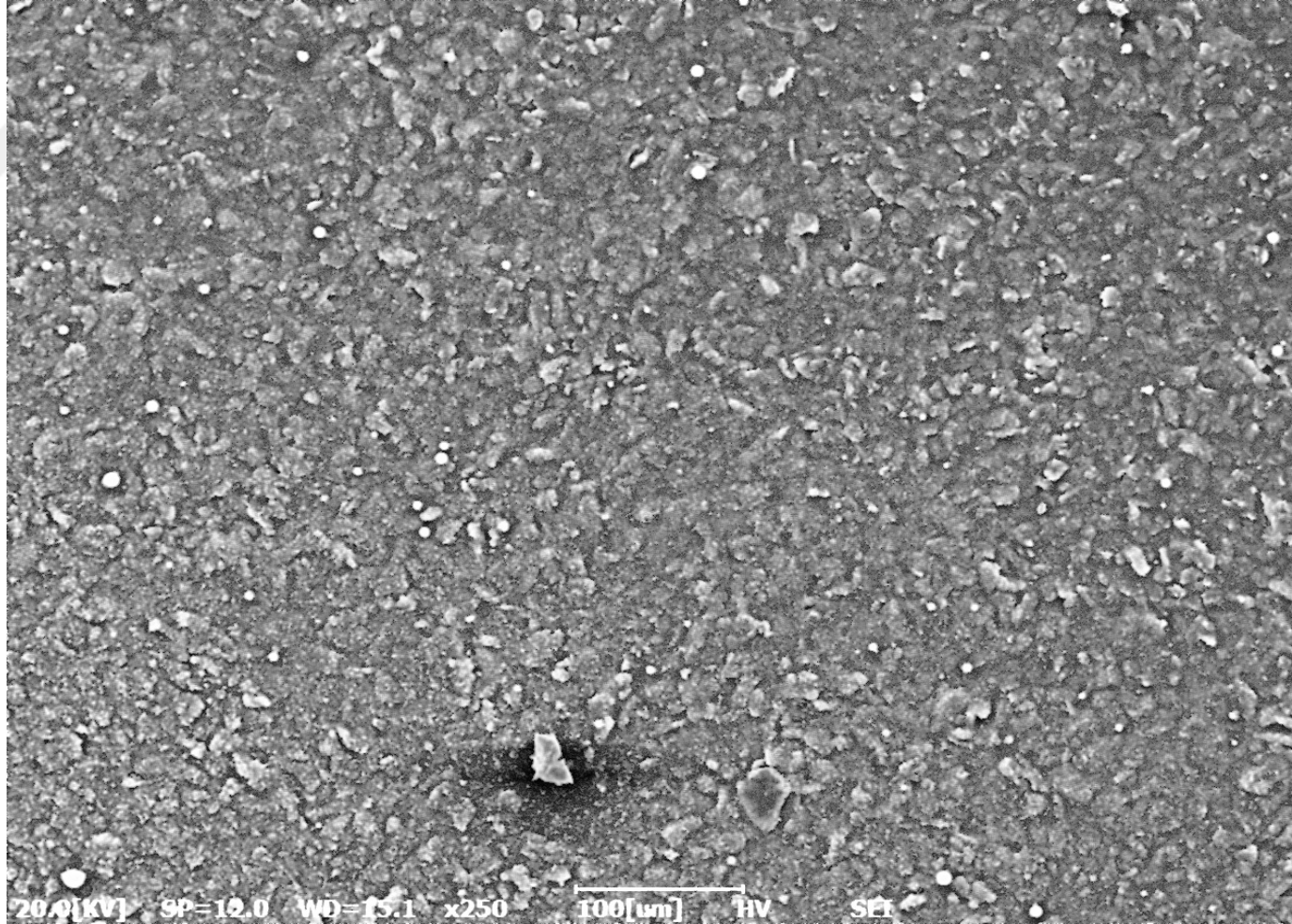
COVID-19 RNA biyosensörünün geliştirilmesi

İlk olarak elektrot için yüzey modifikasyonları kapasitans ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Karbon elektrot (Yeşil) üzerine pirol kaplanmıştır (kırmızı). Ardından RNA yüzeye adsorbe edilmiş (Turuncu) ve bu yapı APBA ile kaplanmıştır (sarı). Ardından RNA yüzeyden uzaklaştırılarak negatif yüklerin fazla olduğu bir yüzey elde edilmiş ve ölçüme hazır hale getirilmiştir (mavi). Burada görülmesi gereken ise kapasitif akımın x eksenine düşüşüdür. Yüzeyde immobilizasyon ile kapasitif akımda düşüş görülmektedir (Şekil 2).

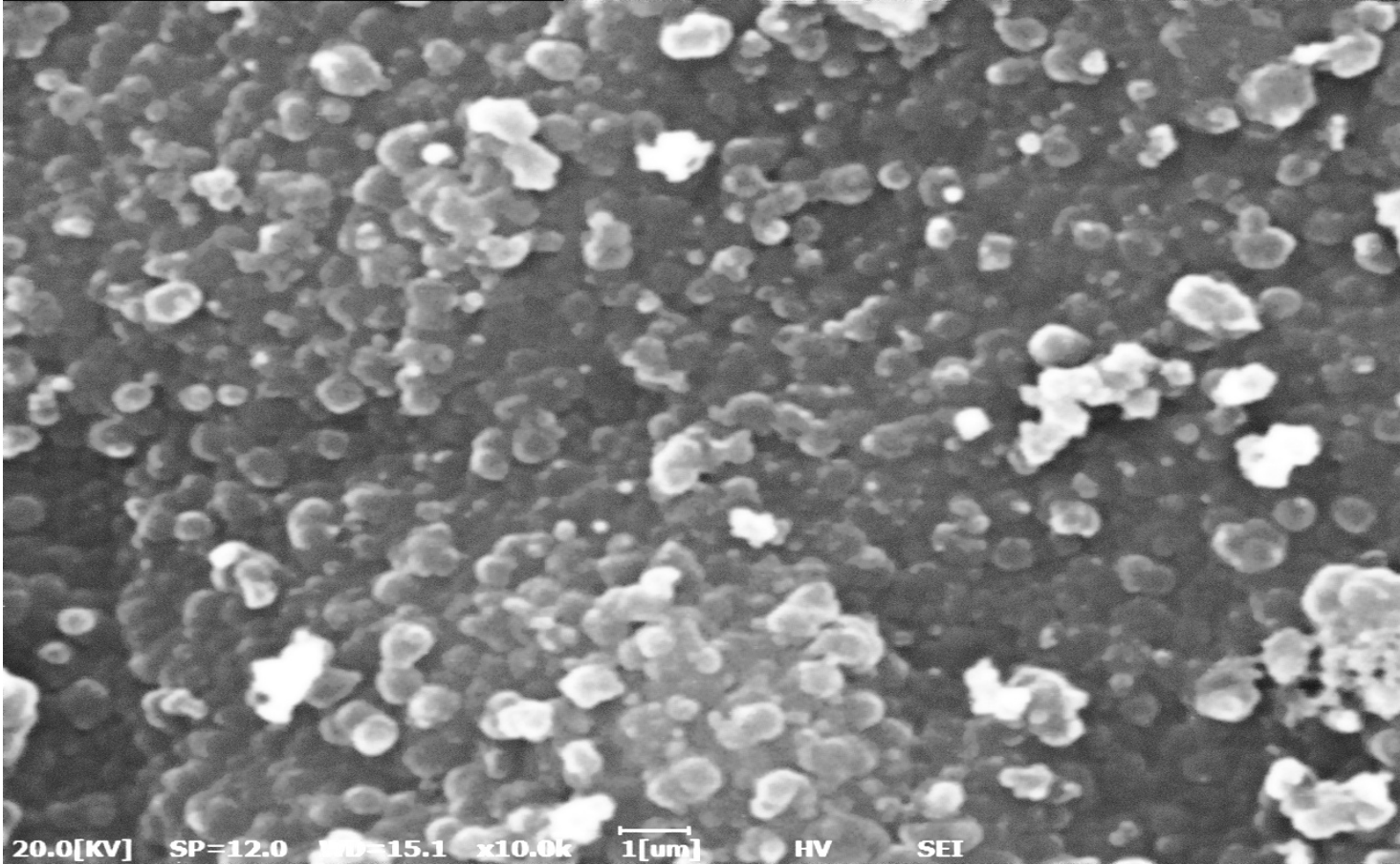
Bu modifikasyon tabakalarının doğrulanması ve RNA'nın yüzeye immobilizasyonunun görülmesi için taramalı elektron mikroskopisi resimleri kullanılmıştır. Bu resimlerde, polimerleri RNA içermeyen ve içeren şekilde yüzeyde oluşturduk. Şekil 3 ve 4 RNA içermeyen polimerleri gösterirken, 5 ve 6 ise yüzeyde RNA varken ki polimerleri göstermektedir (Şekil 3-6). 3 ve 4'de farklı çözünürlükteki RNA içermeyen ile 5 ve 6'de ise yüzeyde RNA içeren polimerli Biyosensör yüzeyini görebilmekteyiz.



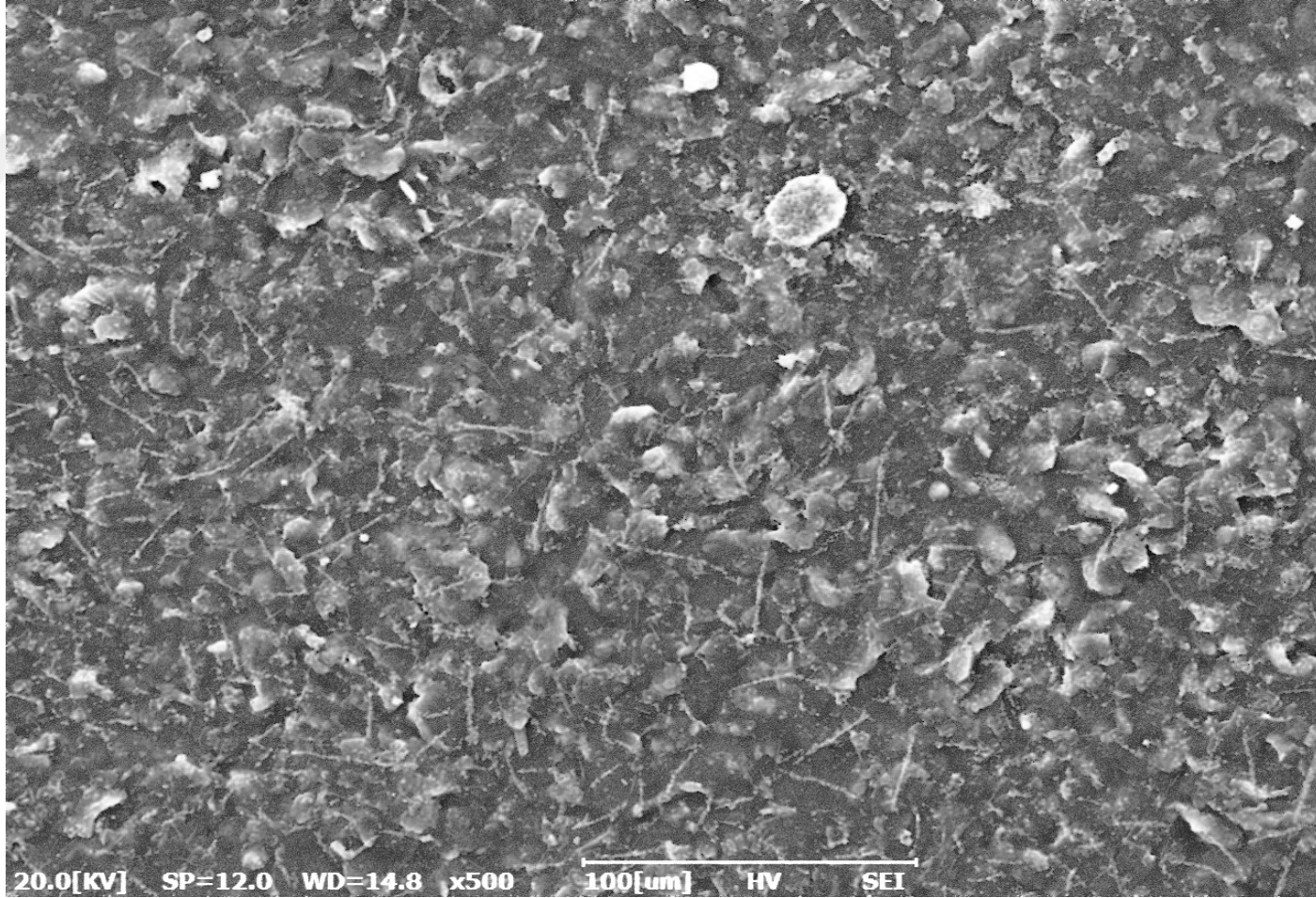
Şekil 2. COVID19 RNA biyosensör immobilizasyonlarının kapasitif olarak gösterimi



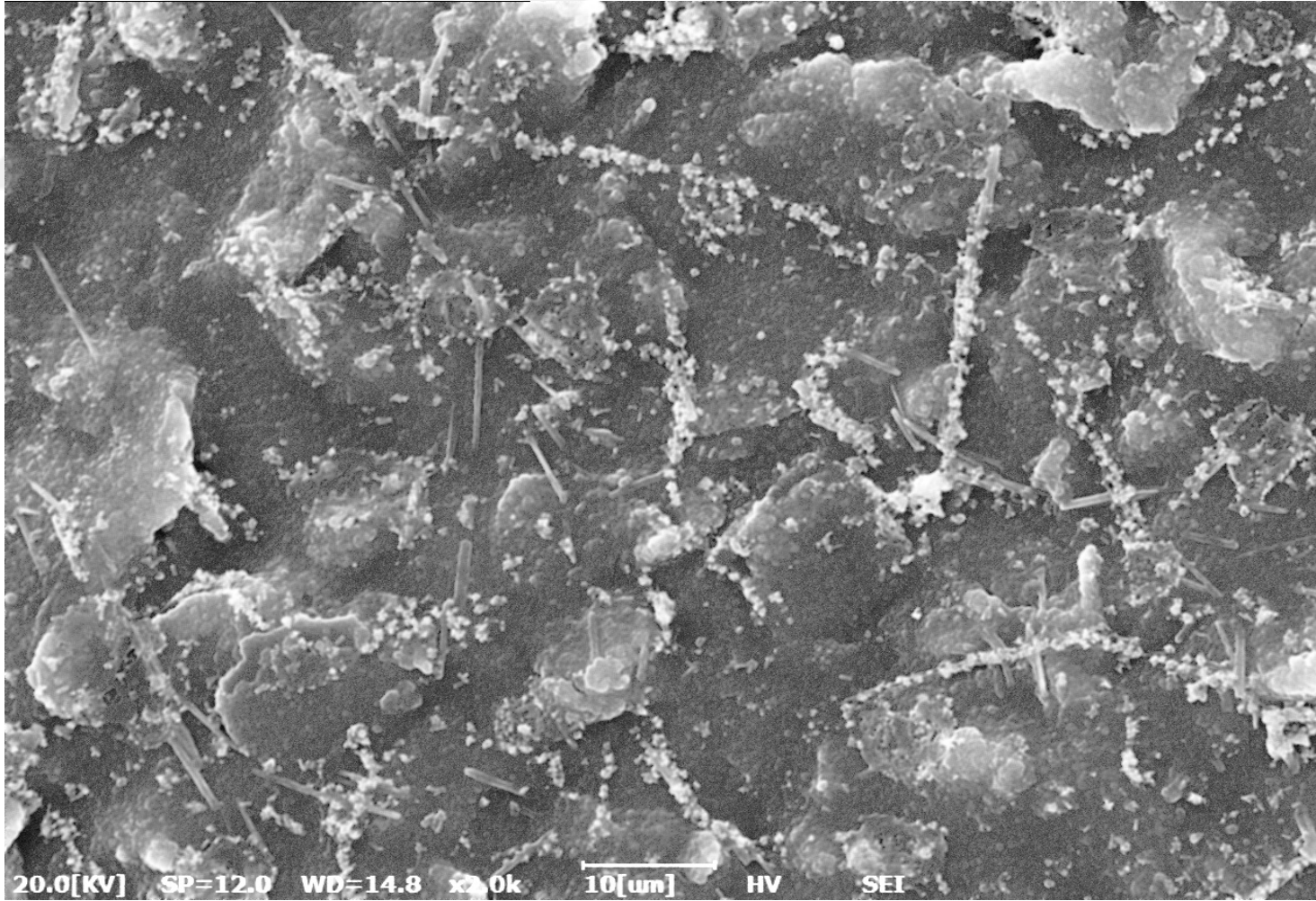
Şekil 3. Pirol ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (100um)



Şekil 4. Pirol ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (1µm)



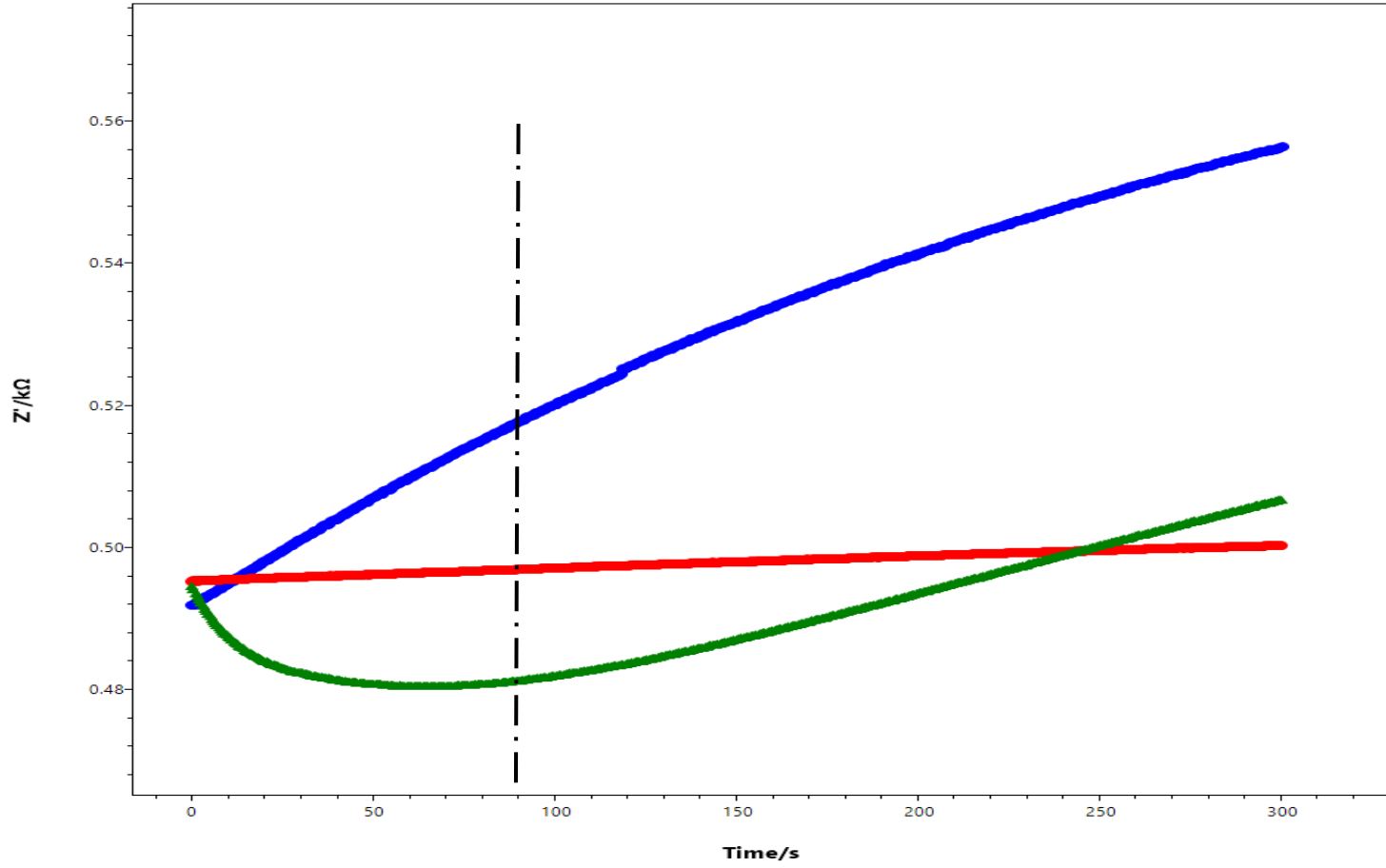
Şekil 5. Pirol, RNA ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (100um)



Şekil 6. Piro, RNA ve APBA kaplı elektrotun gösterimi (10um)

Biyosensörün immobilizasyon tabakalarının tamamlanmasının ardından 500fM düzeyinde komplementer RNA'nın kronoimpedimetrik olarak ölçülmesi gerçekleştirilmiştir. Bu ölçüm RNA içeren sıvıda 1000 Hz frekans ve 100mV potansiyel uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 7'de kronoimpedimetrik ölçüm görülmektedir. Burada kırmızı baseline, yeşil dizisi farklı olan bir RNA dizisi ve mavi ise COVID-19 RNA'sına verilen sinyaldir. Ölçüm süresi 90 saniye olarak belirlenmiştir. Bu saniyeden sonra yeşil olarak görüne kronoimpedans verisine göre COVID-19 RNA'sı dışındaki RNA'nın da yüzeye hareketi görülmektedir (Şekil 7).



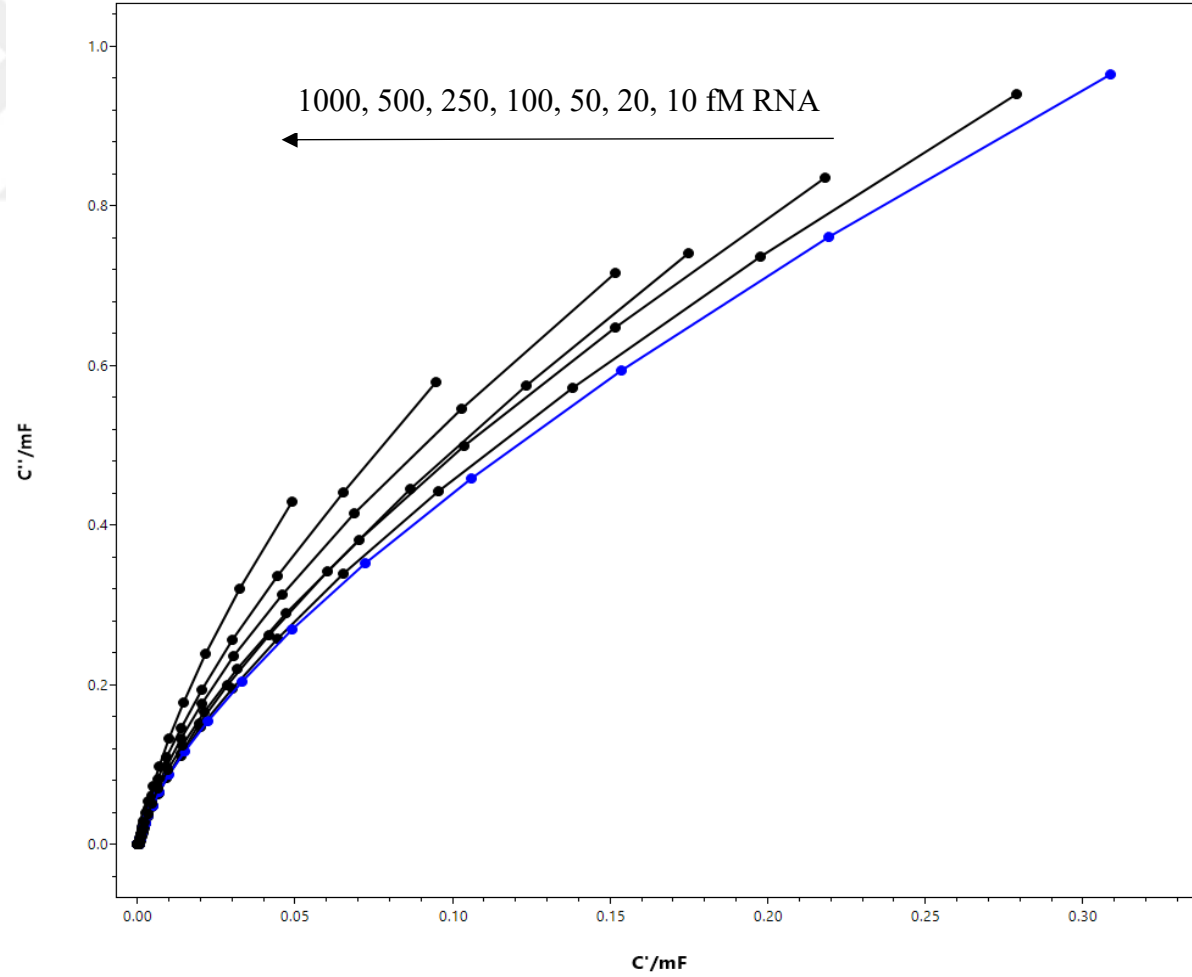


Şekil 7. RNA ölçüm zamanının kronoimpedimetrik ölçüm ile belirlenmesi

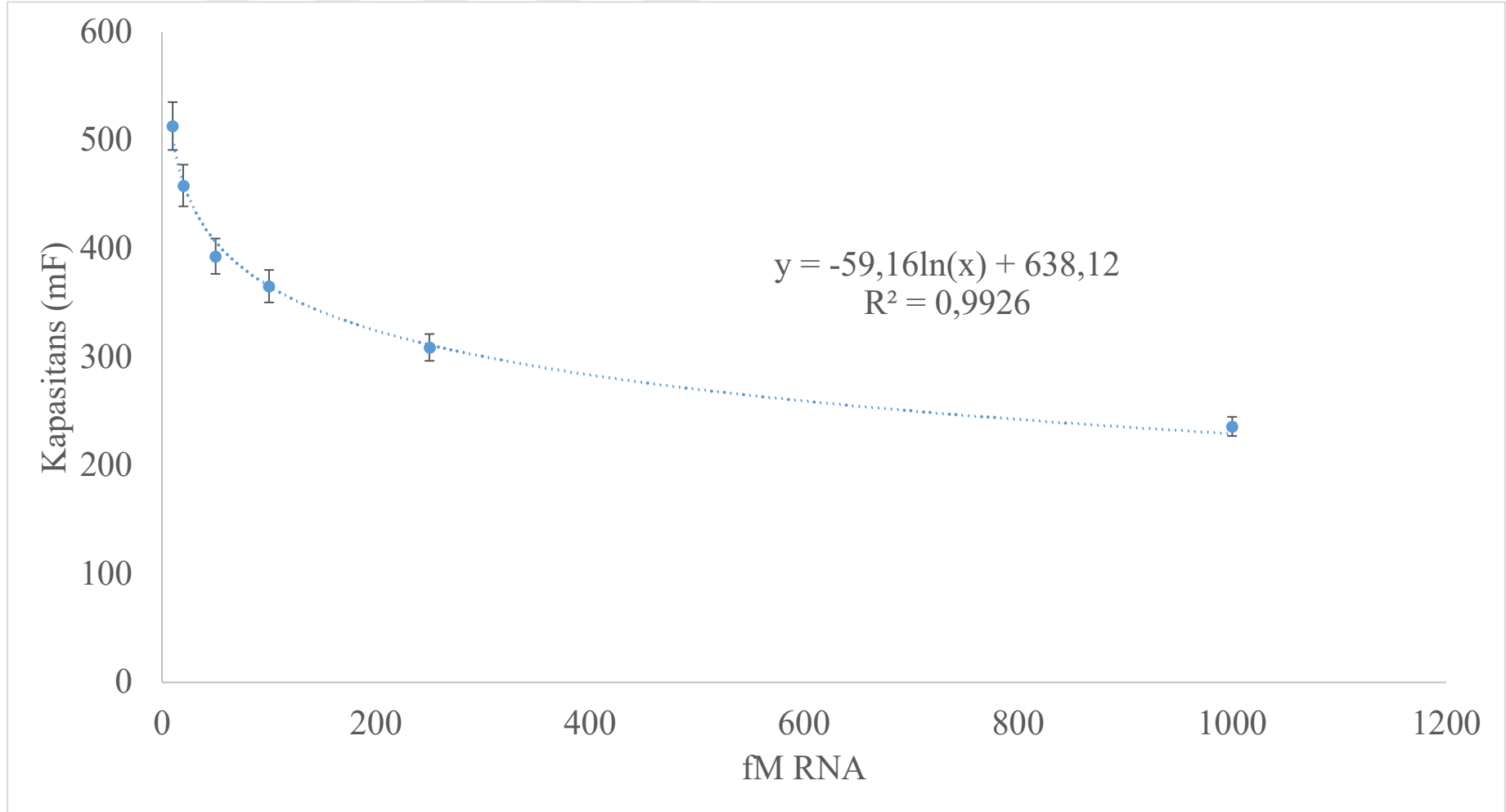
RNA ölçüm zamanının belirlenmesinden sonra RNA'nın biyosensör yüzeyinde inkübasyon süresi 90 saniye olarak belirlenmiştir. Bu süre zarfında Biyosensör yüzeyinde RNA miktarı 10-1000 fM olacak şekilde 90 saniye boyunca inkübe edilmiştir. Şekil 8'de elde edilen RNA'nın kapasitif olarak 10 ile 1000 fM derişimdeki RNA ölçümleri şekil 9'da da kalibrasyon grafiğı görölmektedir (Şekil 8 ve 9). Regresyon katsayısı (R^2) 0,9926 olarak logaritmik olarak azalışa bağılı ölçölmüştür. Bu kalibrasyon grafiğı 5 defa hazırlanmıştır. Buna göre LOD ve LOQ değıerleri hesaplanmıştır. LOD değıeri 10fM RNA ölçümünün verdiği kapasitans sinyalinin standart sapmasının 3,3 ile çarpılarak grafiğın eğimine bölünmesi ile bulunmuştur. LOQ değıeri de aynı şekilde 3,3 yerine 10 değıerinin kullanılması ile hesaplanmıştır. LOD ve LOQ değıerleri sırasıyla 3,06 fM ve 9,27 fM olarak bulunmuştur (SD: 52,08; n=5). Kalibrasyon grafiğının 5 defa hazırlanması ile regresyon katsayısı $0,9926 \pm 0,0052$ olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Biyosensör geliştirme adımlarının optimizasyonu

Optimizasyon	Parametre
Linearite	10-100 fM
LOD	3,06 fM
LOQ	9,27 fM
Regresyon Katsayısı	0,9926
Tekrar Üretilebilirlik	% 99,48



Şekil 8. COVID-19 RNA biyosensörünün standart grafiğinin kapasitif olarak gösterimi (mavi kapasitans verisi RNA biyosensörü baselinesıdır)

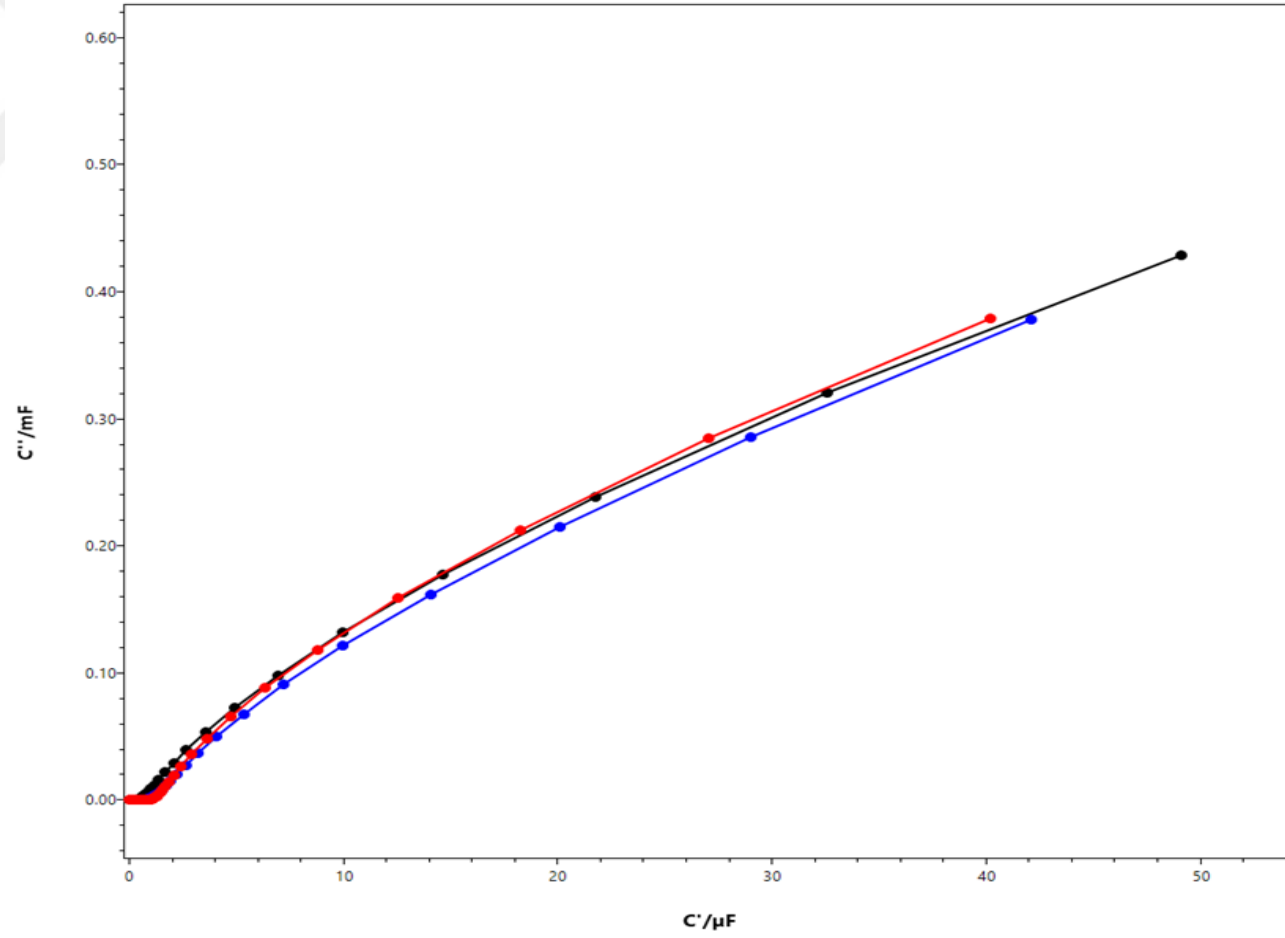


Şekil 9. COVID-19 RNA biyosensörünün standart grafiğinin gösterimi (10-1000 fM)

Optimizasyon testlerinde ticari olarak alınan serum örneklerinin içerisine de tekrarlanabilirlik ve matrix etkisi deneyleri için 10fM örnek eklenerek 2 defa ölçülmüş ve standart grafikte elde edilen kapasitans verisi ile karşılaştırılmıştır (Şekil 10). Standart grafiğinden elde edilen veril ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Standart grafik verisi siyah, diğer görünen renkler ise 10 fM RNA örneğinin sinyalleridir. Görüldüğü gibi çok yakın değerler görülmektedir ve sapma %4 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. Tekrarlanabilirlik testlerinin gösterimi

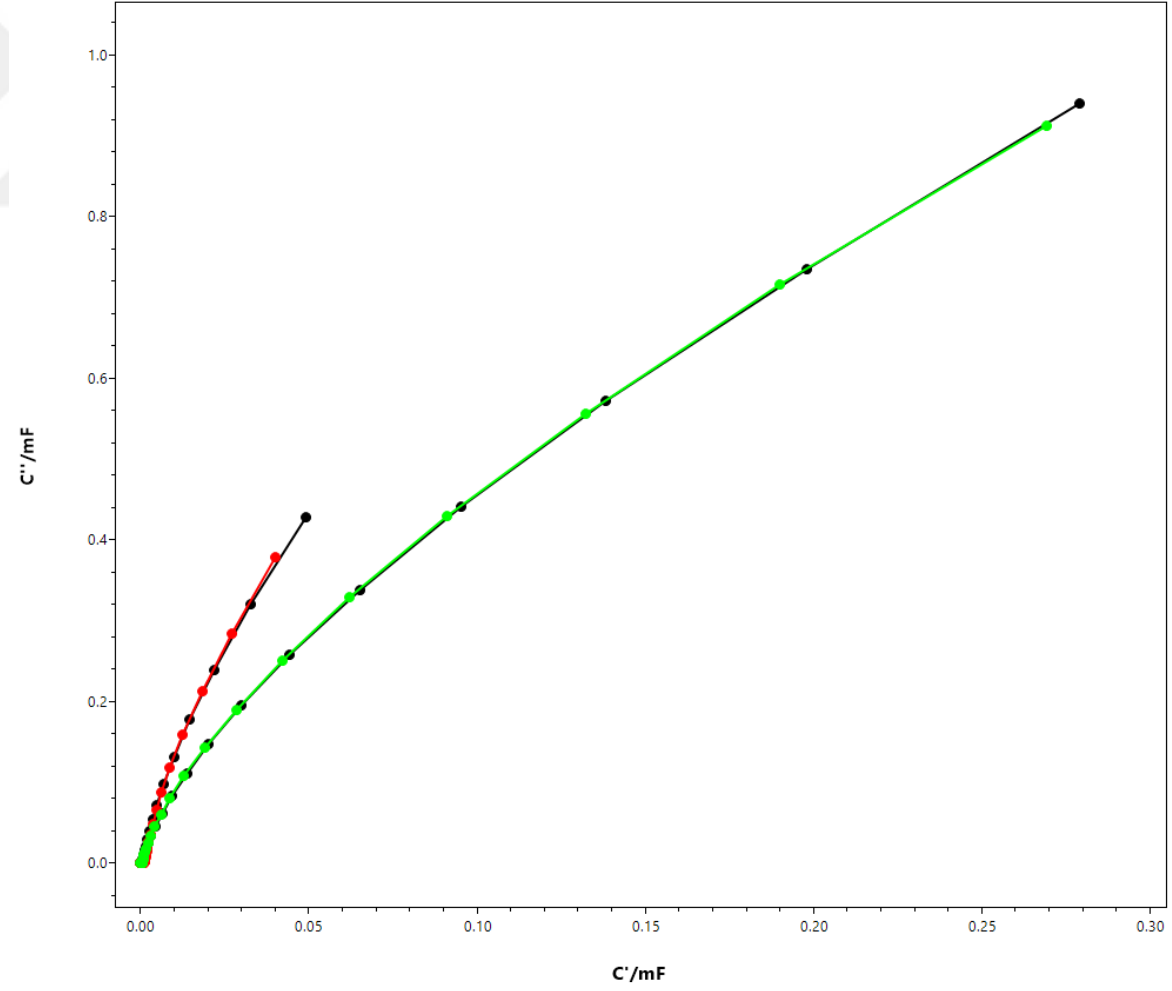
n=2	Eklenen	Bulunan	% Sapma
COVID-19 RNA	10 fM	10,4±0,3	%4



Şekil 10. COVID-19 RNA biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin kapasitans ile gösterimi

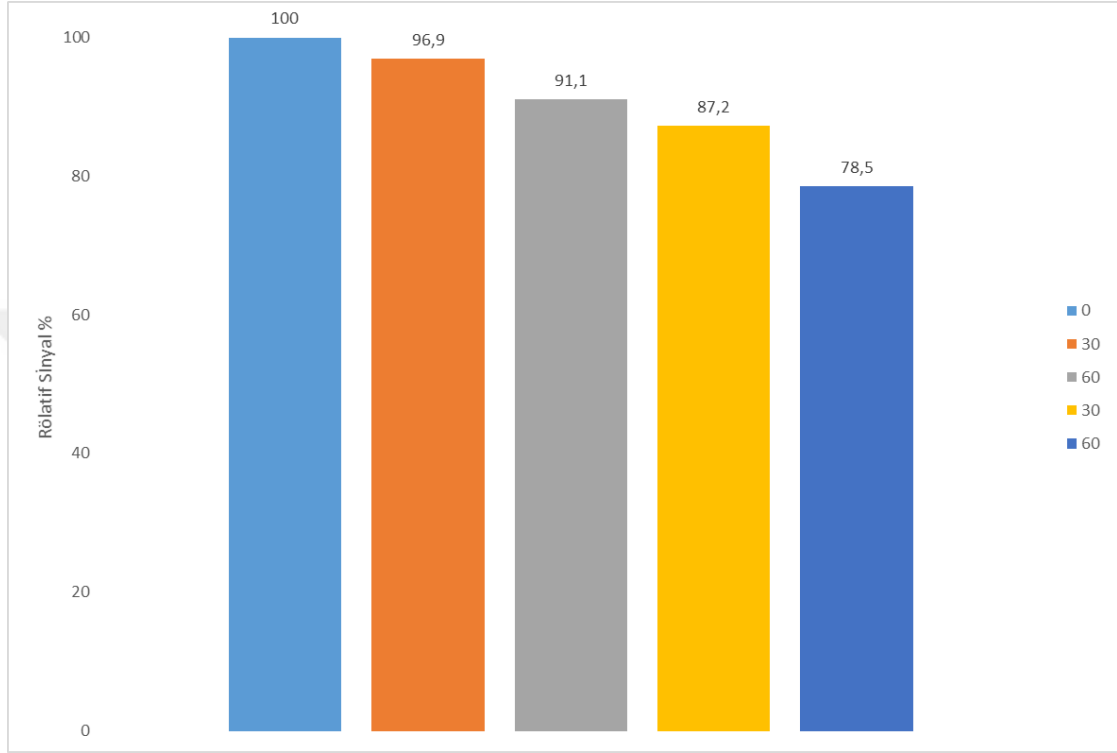
Şekil 11’de ise COVID-19 RNA biyosensörünün farklı konsantrasyonlarına karşı geri elde değerleri karşılaştırılmıştır (Şekil 11). Buna göre 1000 ve 10 fM derişimlerde yapılan eklemelerde ise ölçümler sırasında sinyalde düşüş görölmektedir. Bu da normal ölçölen değlerlerden %106,2 (Kırmızı) ile %102,1 (Yeşil) olarak fazla miktarda konsantrasyon ölçümü gerçekteşmiştir.





Şekil 11. COVID-19 RNA biyosensörünün geri elde değerlerinin karşılaştırılması

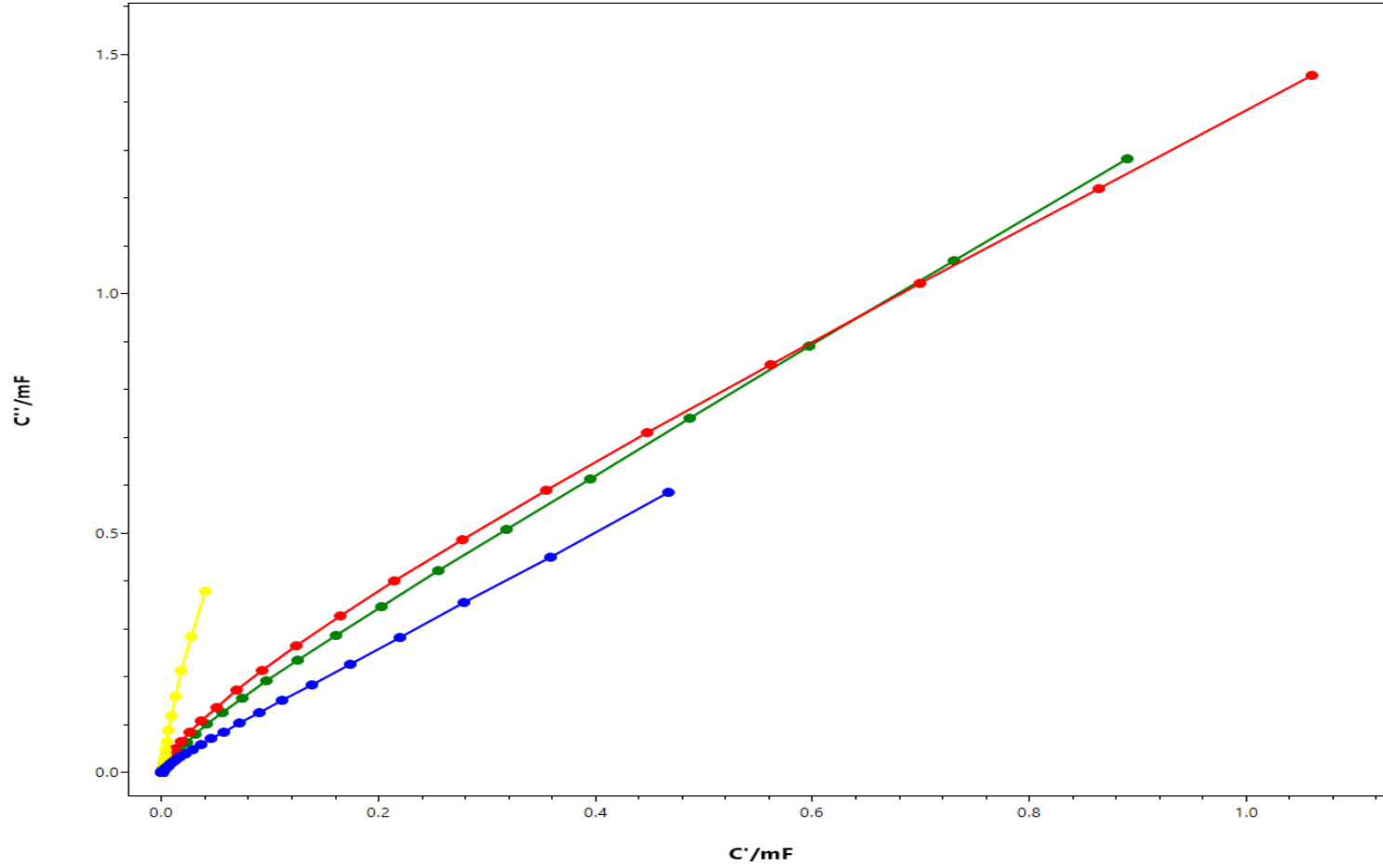
El edilen RNA biyosensörünün depo kararlılığı yani Biyosensör sisteminin saklama koşulları ele alınarak. 6 farklı Biyosensör hazırlanmıştır ve 30 ve 60 gün süre ile sırasıyla saklanmıştır. İki gruba bölünen bu biyosensörlerin ilk grubu +4 derecede diğer üç Biyosensör ise oda sıcaklığında karanlıkta 15mL falkon tüp içinde saklanarak ölçümler alınmıştır. Buna göre sinyalde azalmalar şekil 12’de verilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. Depo kararlılığının sütun grafikte gösterimi

IgM Biyosensörünün Geliştirilmesi

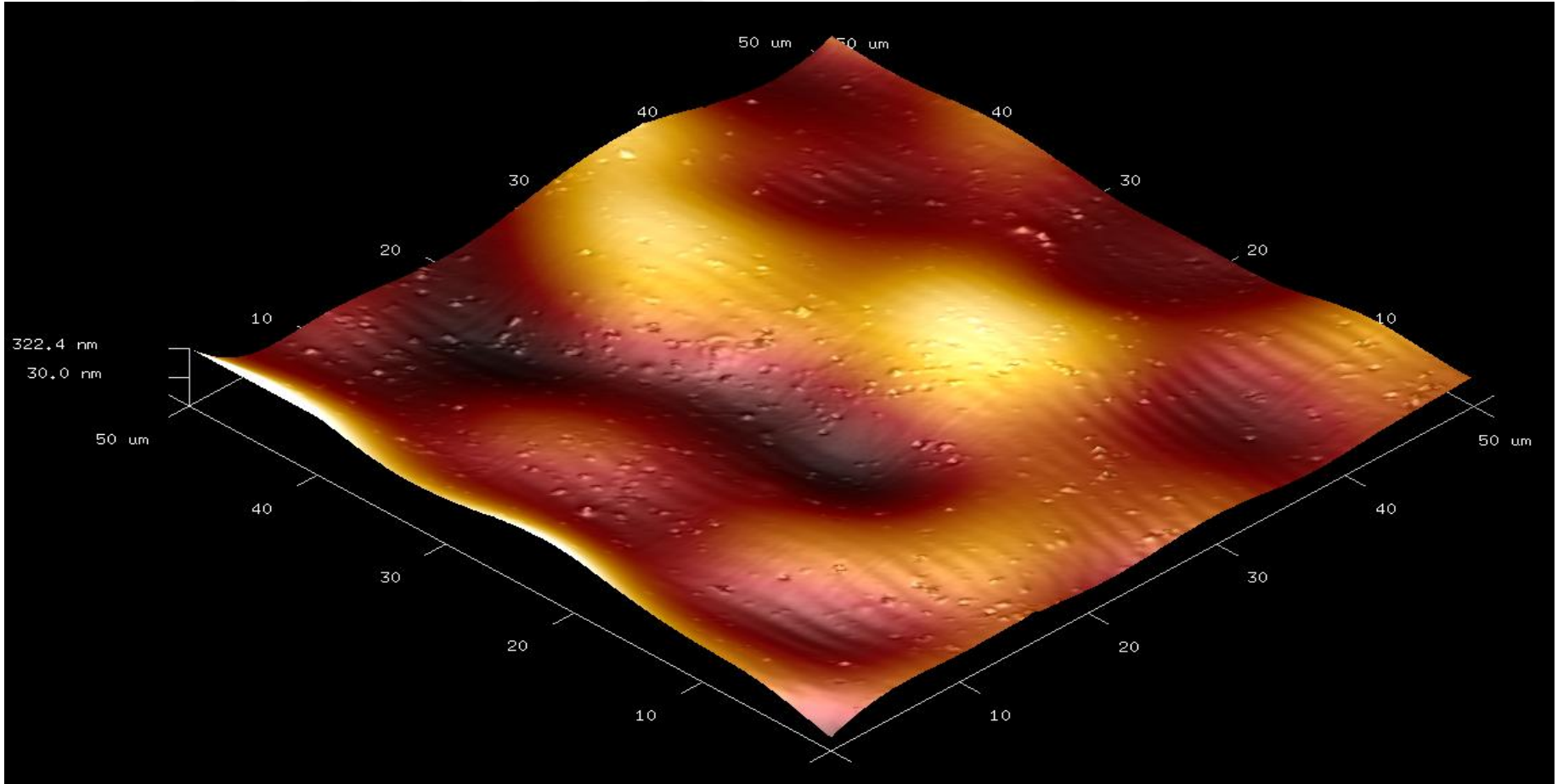
IgM biyosensörü geliştirilirken ise altın elektrot yüzeyine öncelikle pirol tabakası oluşturulmuş ve ardından da anti-IgM ile modifiye edilmiştir. Bu immobilizasyon süreci ise kapasitif olarak incelenmiştir (Şekil 13). Kapasitif olarak modifikasyonlar şekil 13'te gösterilmiştir. Buna göre, altın elektrot (AuE) mavi olarak gösterilmiştir. Kırmızı ve yeşil ise sırasıyla AuE-PPy ve AuE-PPy-PAMAM elektrot olarak görülmektedir. Son olarak sarı olarak gösterilen kapasitif ölçüm de Anti-IgM ile modifiye edilmiş AuE-PPy-PAMAM-antiIgM biyosensörünü göstermektedir. PPy ve PAMAM modifikasyonu ile kapasitif akımda artış görülmektedir. Biyomolekül immobilizasyonu ile kapasitif akım sinyalinde azalışa bağlı olarak yüzey yükleri artmıştır.



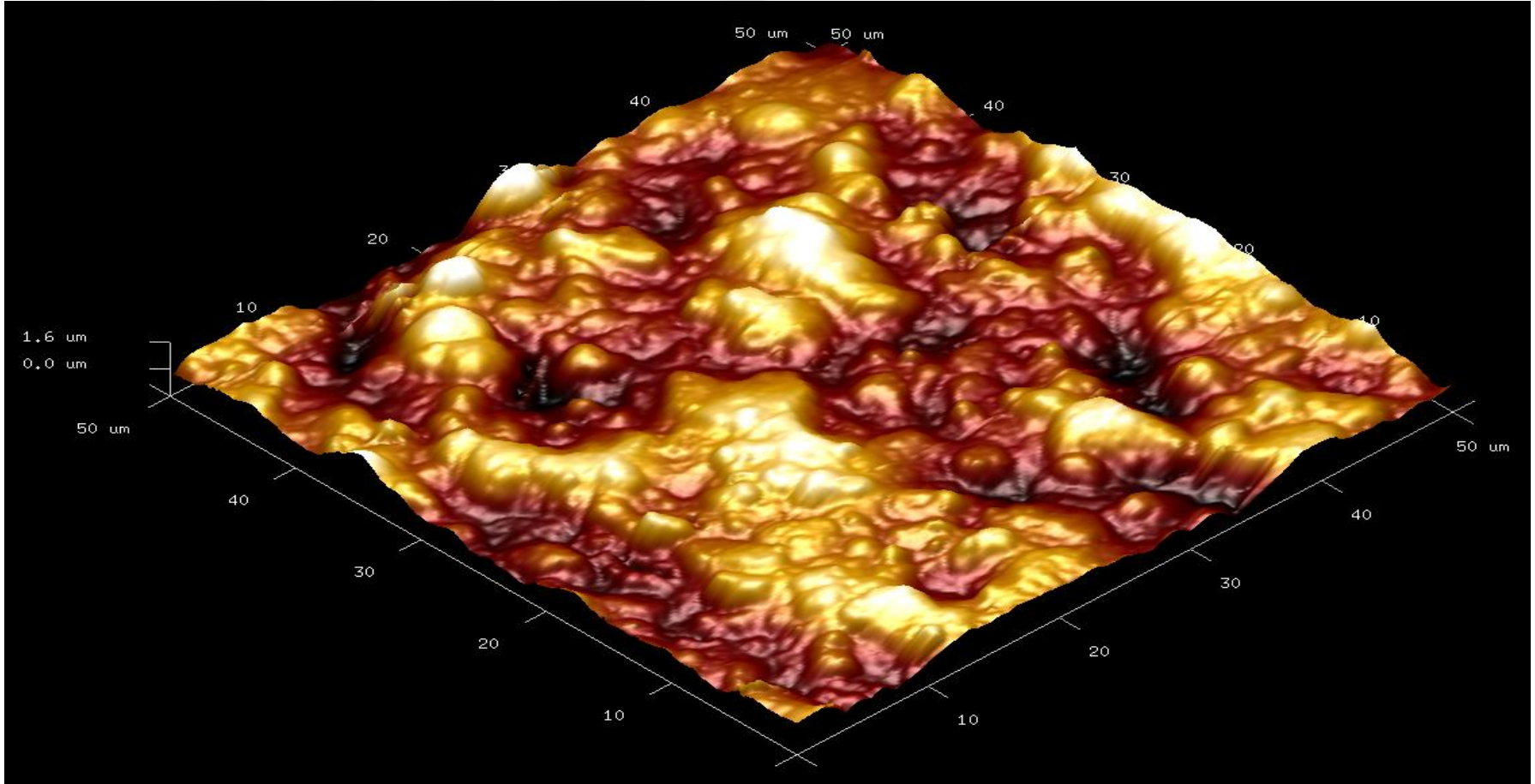
Şekil 13. Altın IgM biyosensörünün modifikasyon tabakalarının gösterimi

Elektrot yüzey immobilizasyonu ile Biyosensör modifikasyonu tamamlandıktan sonra yüzey modifikasyonunun incelenmesi için atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak yüzey modifikasyonları topografik olarak incelenmiştir. Şekil 14-17 de gösterilen AFM resimleri yüzeyin immobilizasyon ile topografik olarak değişimini göstermektedir (Şekil 14-17). Buna göre immobilizasyon ile birlikte yüzeyin topografik yapısı ile kalınlığı değişmiştir. Bu da şekil 13'teki verilerle birlikte koreledir.

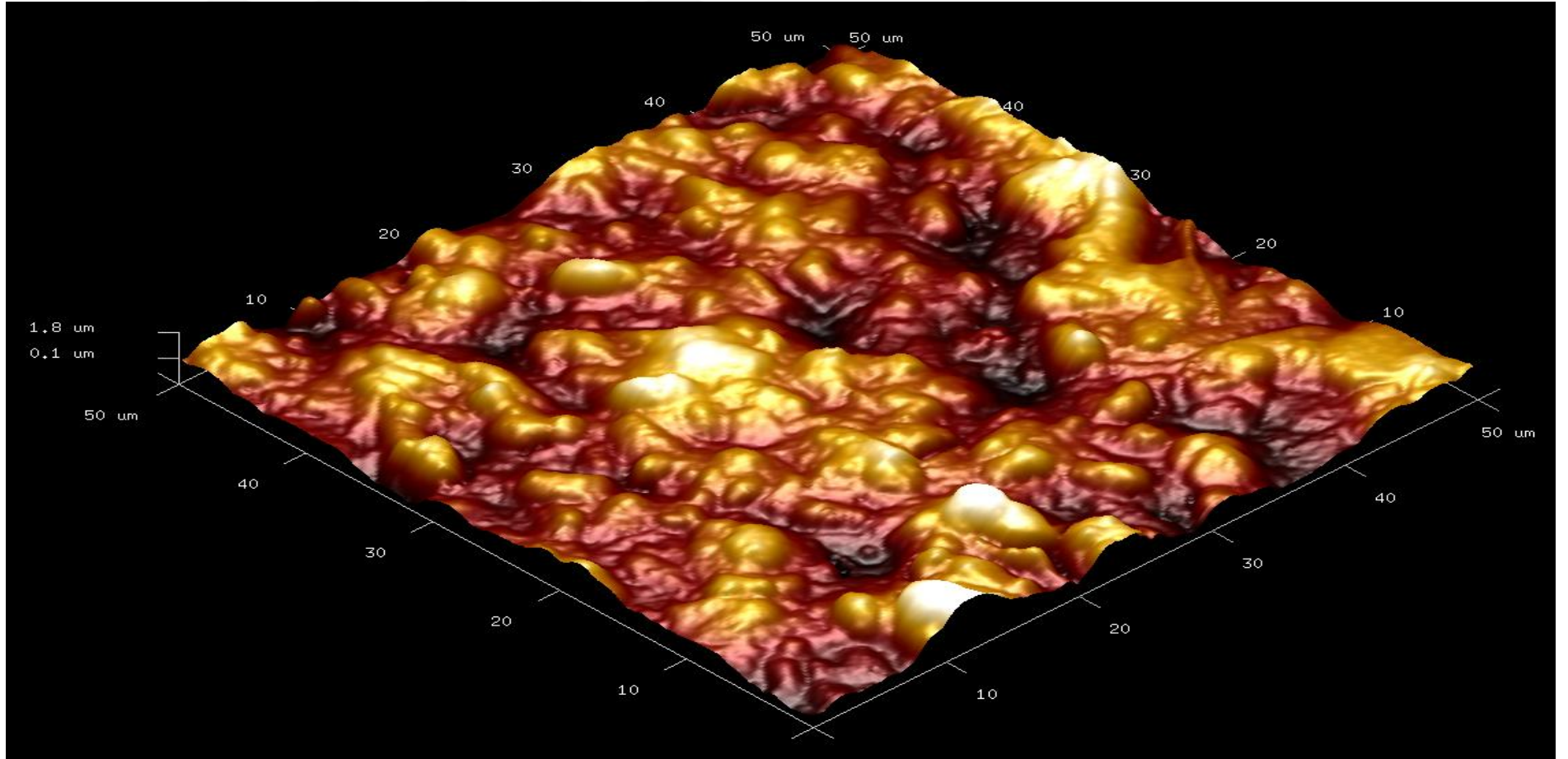




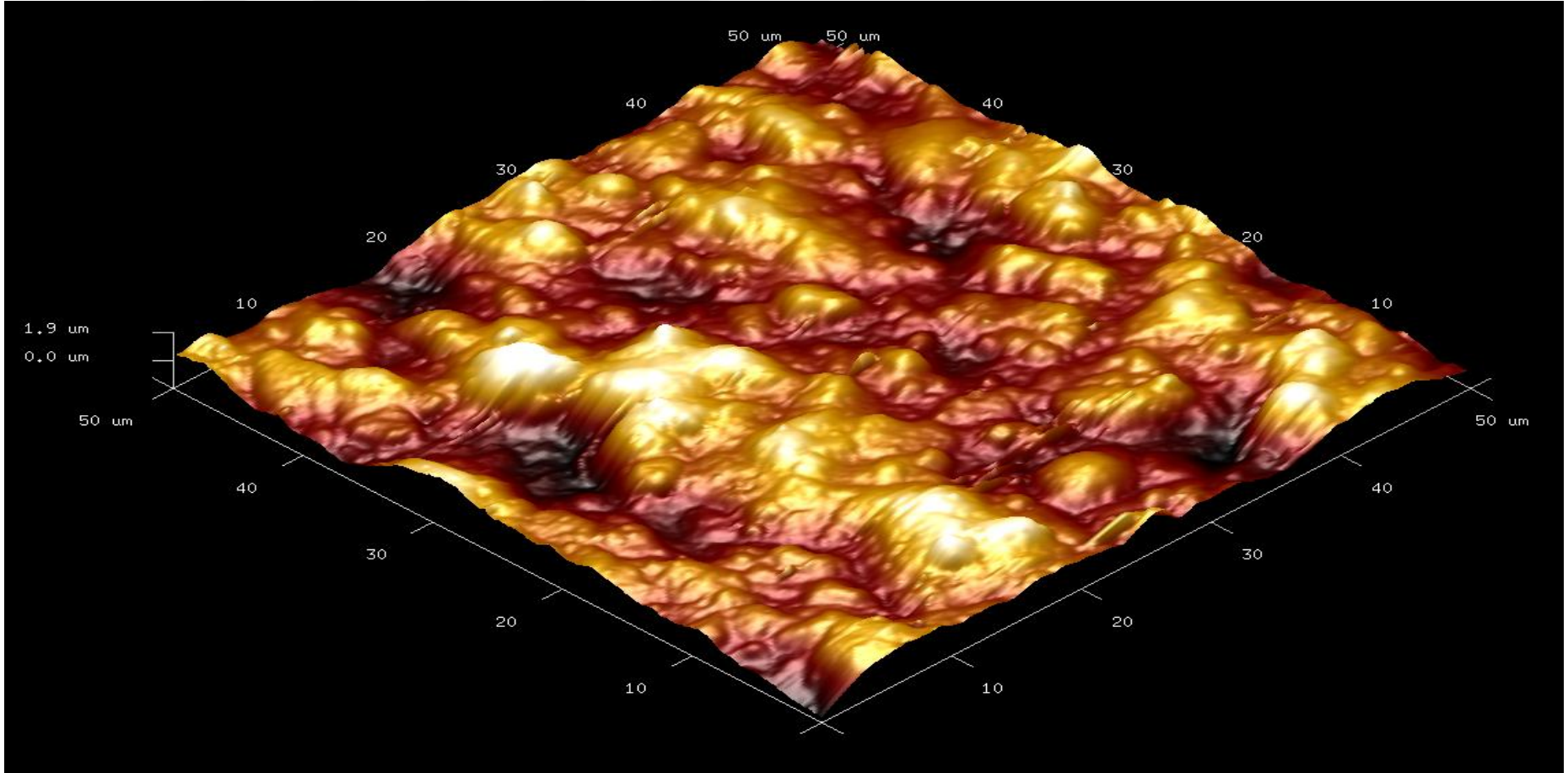
Şekil 14. Altın elektrotun AFM ile gösterimi



Şekil 15. AuE-PPy elektrotun AFM ile gösterimi



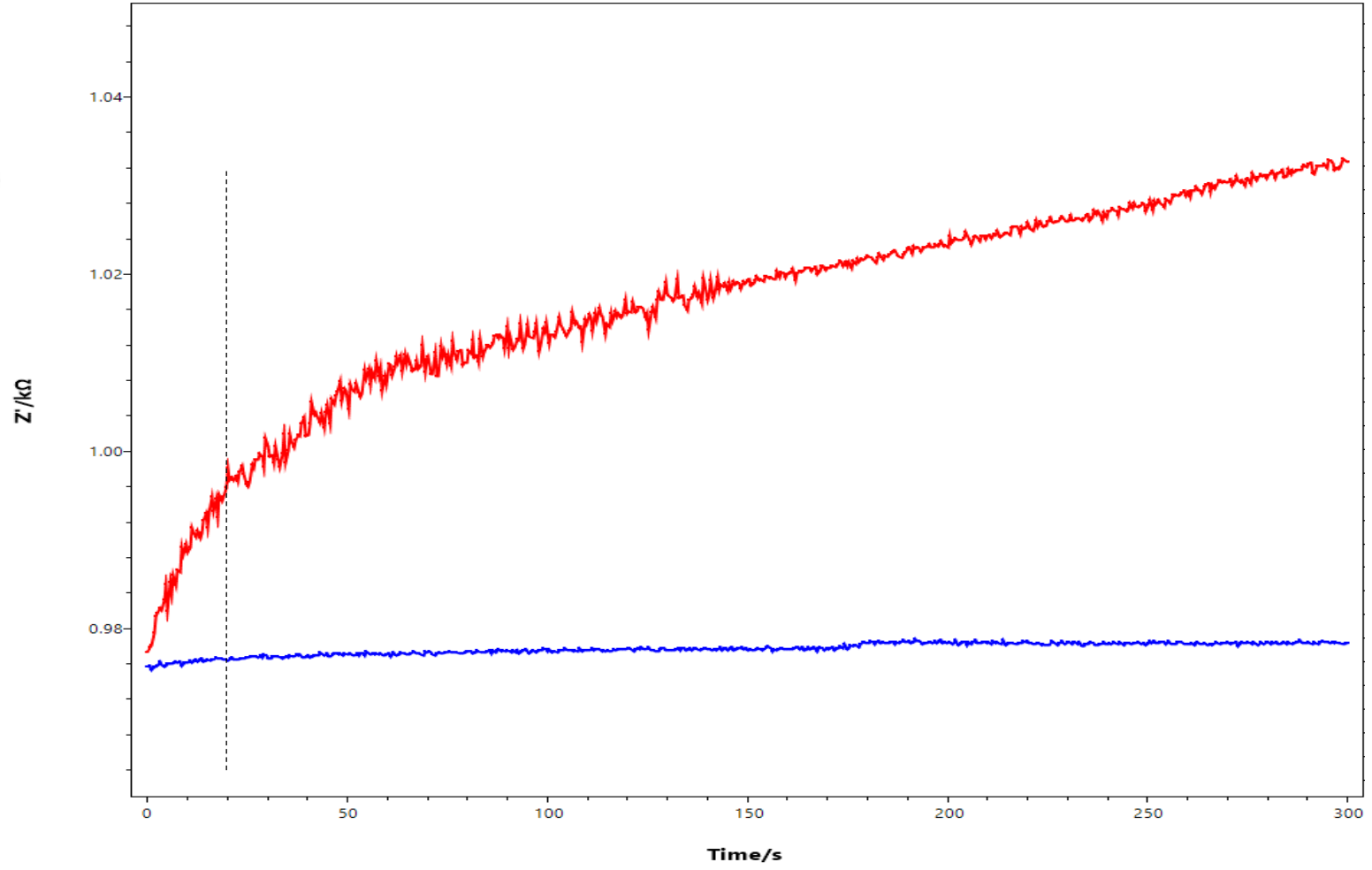
Şekil 16. AuE-PPy-PAMAM elektrotun AFM ile gösterimi



Şekil 17. IgM biyosensörünün AFM ile gösterimi

Biyosensör sisteminin immobilizasyonundan sonra, hedef molekül olan IgM'nin ölçülmesi için Biyosensör ölçüm zamanının optimizasyonu için 650 Hz frekansta 200mV akım uygulanarak kronoimpedimetrik ölçüm ile yüzeye bağlanan IgM miktarları zamana bağlı olarak ölçülmüştür (Şekil 18). Buna göre 30 saniye de lineer olarak artış görülmüş sonuç olarak ölçüm zamanı için 30 saniye seçilmiştir. Buna göre ölçüm süresi 30 saniye olarak seçilerek biyosensör inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.



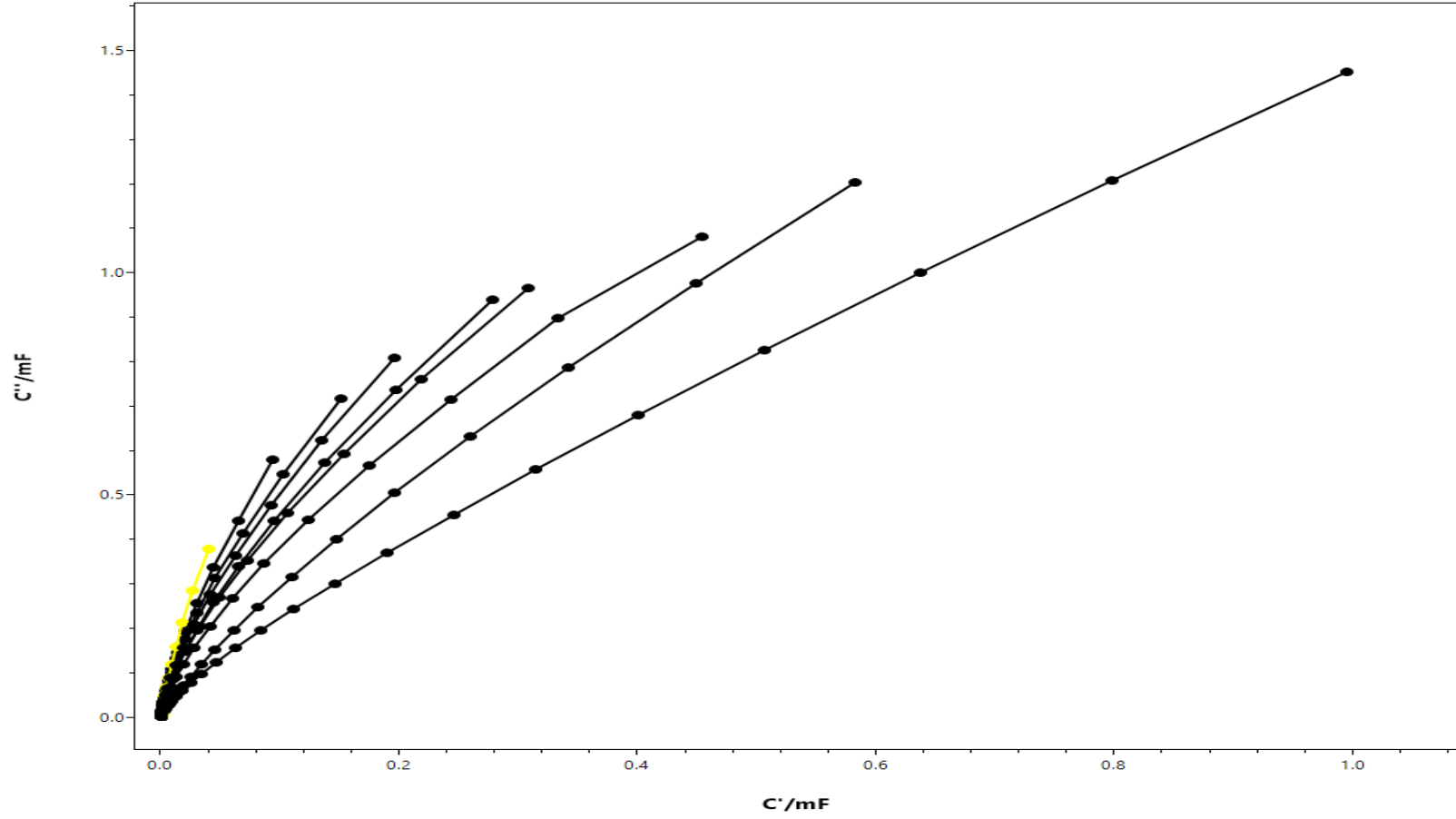


Şekil 18. IgM'nin biyosnesör yüzeyine bağlanmasının kapasitif olarak izlenmesi

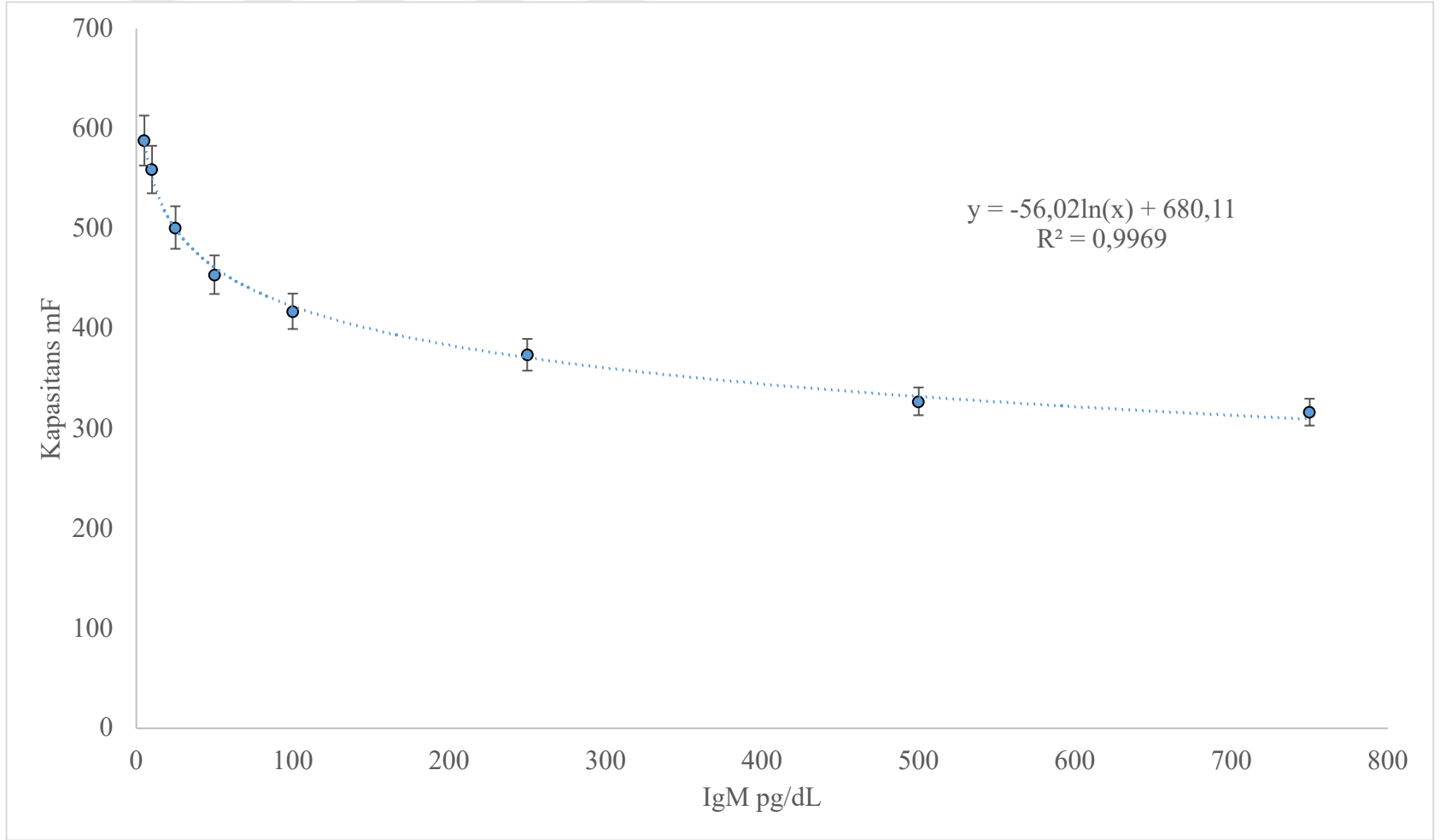
Biyosensör ölçüm süresinin belirlenmesinden sonra ise lineer ölçüm aralığı belirlenmesi için biyosensör sistemi her 30 saniyede bir 5 ile 750 pg/dL aralığında konsantrasyon ölçümlerine tabi tutulmuş ve kapasitif değerlerin buna bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 19). Grafik denklemi olarak $y = -56,02\ln(x) + 680,11$ belirlenmiş ve R^2 değeri ise 0,9969 olarak hesaplanmıştır (Şekil 20).

Tekrar üretilebilirlik testlerinin çalışılması için standart grafik 5 defa çizilmiş ve R^2 değeri $0,9969 \pm 0,0011$ olarak belirlenmiştir.

Tekrar üretilebilirlik testinden sonra LOD ve LOQ değerlerinin belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla $3,3SD/m$ ve $10SD/m$ ölçülmesi ile belirlenmiştir. Buna göre LOD ve LOQ 1,59 ve 4,81 pg/dL olarak hesaplanmıştır.



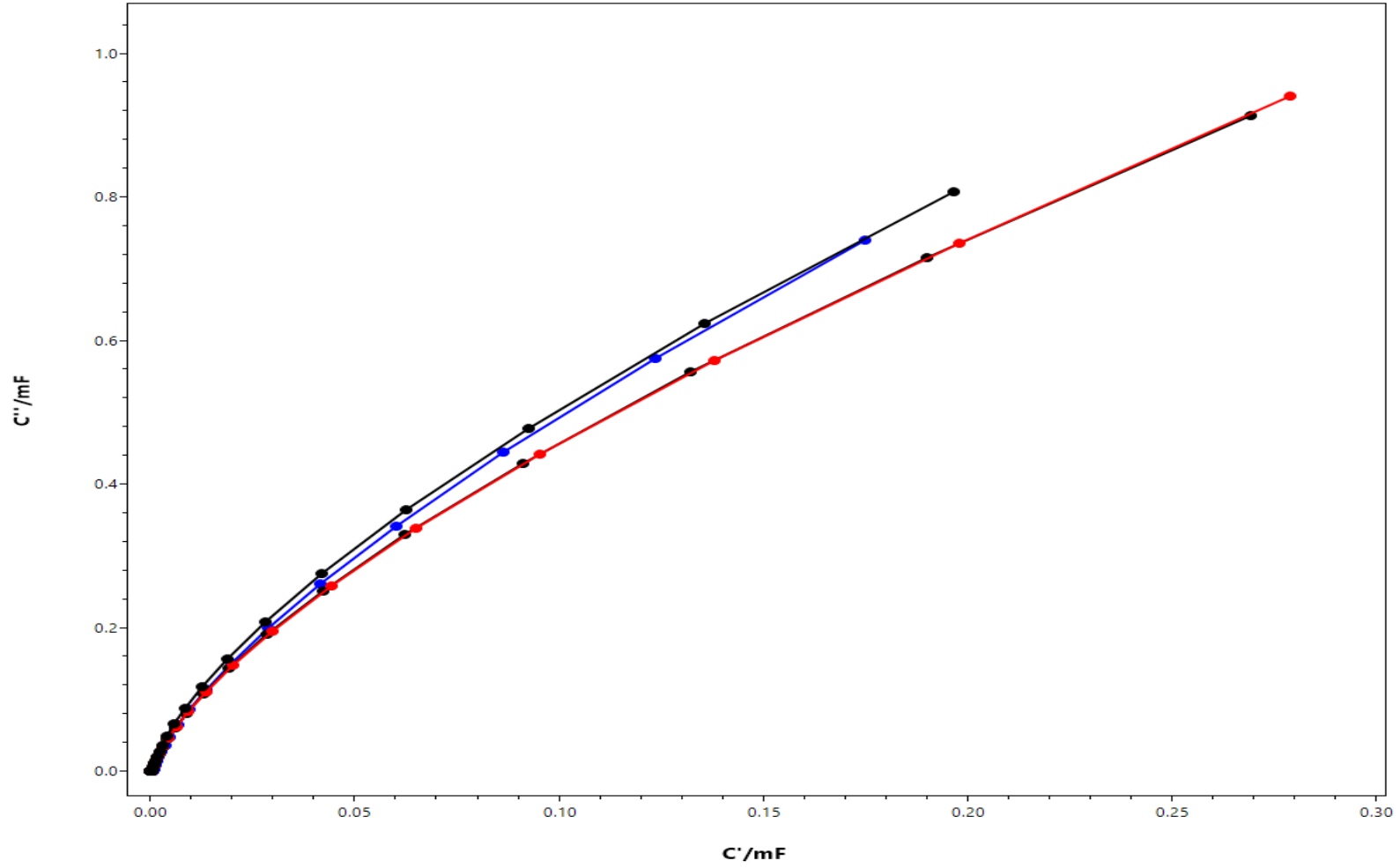
Şekil 19. IgM biyosensörünün standart grafiğinin kapasitif olarak gösterimi



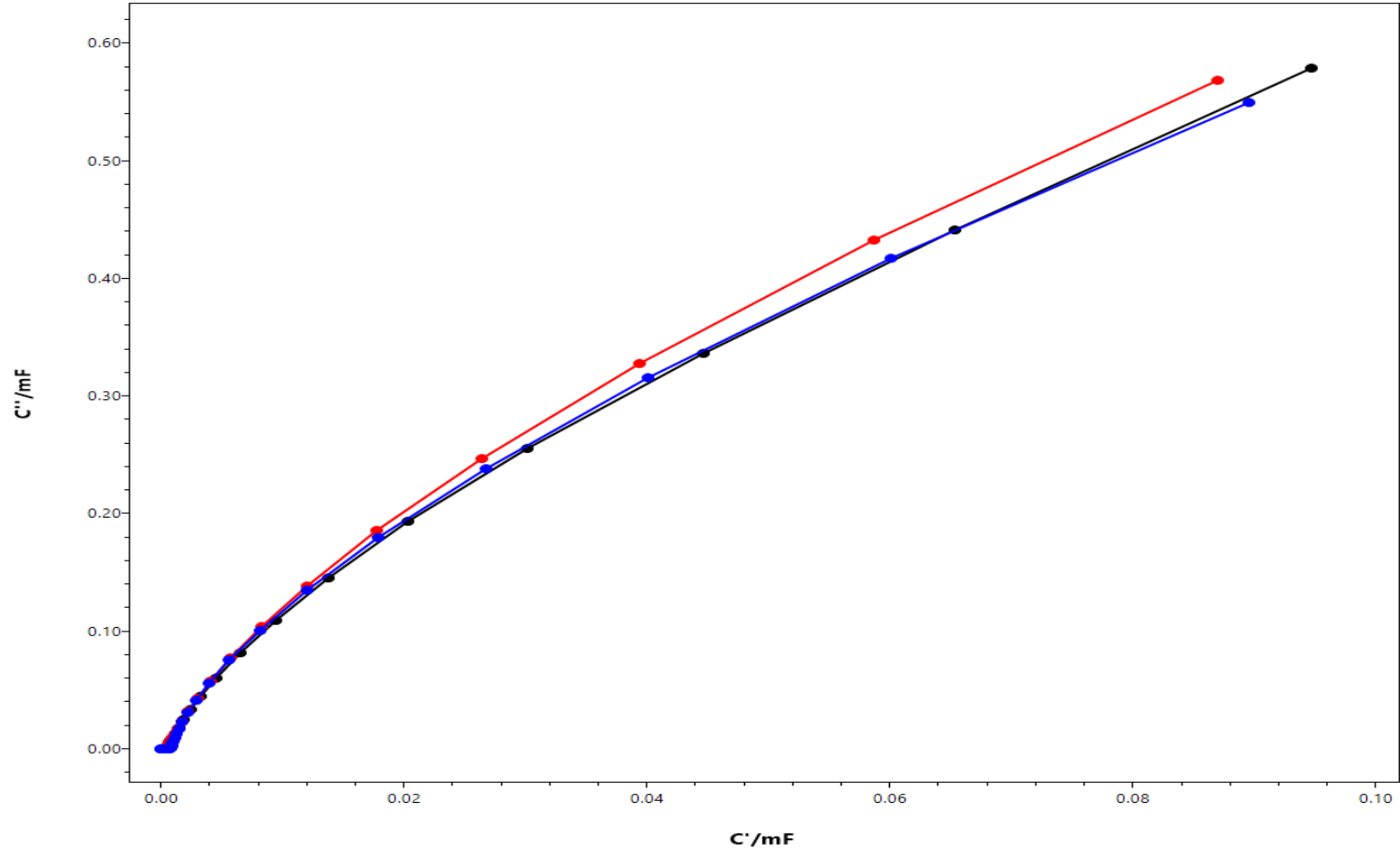
Şekil 20. IgM biyosensörünün standart grafiği

Performans testleri arasında tekrarlanabilirlik, gerçek örnek (seçicilik) denemesi testleri de yapılmıştır. Şekil 21’de 25 ve 50 pg/dL miktarlarda ölçümler seçicilik testleri olarak denenmiş, sırasıyla 28,97 ve 55,25 olarak bulunmuştur. İki testte %16 ve %10 oranında sapma görölmüştür. Şekil 22’de ise tekrarlanabilirlik görölmektedir. Buna göre 5pg/dL çözünürlükteki konsantrasyon toplamı %3,6 sapma göstermiştir.





Şekil 21. IgM biyosensörünün seçiciliğinin gösterimi



Şekil 22. IgM biyosensörünün tekrarlanabilirliğinin gösterimi

Tartışma

Bu çalışmada iki farklı Biyosensör sistemi COVID-19 hastalığının belirlenmesinde daha öncü bir çalışma olarak planlanmıştır. Genel olarak ise elektrokimyasal biyosensörlerde, özellikle afinite temelli Biyosensör sistemlerinde daha duyarlı ve ikincil bir moleküle ihtiyaç duymadan doğrudan ölçüm için de duyarlı bir metot olan kapasitif bir ölçüm metodu kullanılmıştır. Metotların içerisinde direkt RNA ölçümü ve IgM analizi yapılması amacıyla biyosensörler geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmamın amaçları arasında günümüzde kullanılan metotların eksiklikleri yatmaktadır ve metodumuzla karşılaştırmalı olarak aşağıda verilmiştir.

COVID-19 hastalığının ön teşhisinde ve teşhisinde immun sistem ile moleküler teknikler önemli yer tutmaktadır. Moleküler tanı, çağdaş tıbbın en önemli sınırlarından biridir ve temel teknolojisi nükleik asit testidir. Spesifik patojenleri tanımlama kabiliyeti nedeniyle, nükleik asit testi doğru koronavirüs teşhisi için uygundur. Şu anda, nükleik asit saptama yöntemleri, esas olarak gen dizilimi, CRISPR ve PCR veya izotermal nükleik asit amplifikasyonu gibi nükleik asit amplifikasyon testlerini içerir (Shen ve diğerleri, 2020).

PCR, gen segmentini içeren DNA'nın iki zincirini ayırarak, konumunu bir primer ile işaretleyerek ve her segmentin yanında bir kopya bir araya getirmek ve kopyaları sürekli olarak kopyalamak için bir DNA polimeraz kullanarak bir genin çok sayıda kopyasını üretmek için kullanılan enzimatik bir yöntemdir. Laboratuvar çalışması için yeterli numuneler sağlamak amacıyla çok az miktarda biyolojik materyali büyütme için yaygın olarak kullanılır. Genel olarak, koronavirüs RNA'sı, ters transkripsiyon yoluyla cDNA'ya aktarılır. Daha sonra PCR gerçekleştirilir ve ardından PCR ürününün spesifik tespit yöntemleri veya aletleri ile tespiti yapılır (Balboni, Gallina, Palladini, Prosperi ve Battilani, 2012; Uhlenhaut ve diğerleri, 2012). Fakat semptom göstermeyen COVID vakalarında yanlış pozitif teşhis koyduğundan, koronavirüsü kesin olarak tespit etme yeteneğini geliştirmek ve genom dizisi varyasyonlarının neden olduğu yanlış negatif sonuçların ortaya çıkma riskini azaltmak için araştırmacılar, koronavirüsün çok hedefli tespiti için uygun duyarlılığa sahip multipleks gerçek zamanlı RT-PCR yöntemleri geliştirilmek zorunda kalmıştır. PCR, tek bir reaksiyonun hem cDNA sentezini hem de PCR amplifikasyonunu gerçekleştirdiği ve deneysel hataları en aza indirdiği tek adımlı bir metot olsa da, bununla birlikte, şablon görevi gören RNA'nın parçalanması kolay ve hızlı olduğu için,

tek adımlı tahlil aynı numuneyi birden çok kez test etmek için uygun değildir. Kısacası RNA tayini yapması zordur. Diğer taraftan, ters transkripsiyon PCR amplifikasyonundan ayrı olarak gerçekleştiğinden, tek adımlı teste kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahip olan iki aşamalı test olabilse de bu teknik DNA kontaminasyonu riskini artırır ve daha fazla zamana ihtiyaç duyar. Sonuç olarak DNA ölçümü ile birlikte örnekten ölçüm adımları zaman alıcı ve doğruluğu düşük sonuçlar vermektedir.

Diğer bir metot ise izotermal nükleik asit amplifikasyon teknikleri olarak halen geliştirilme aşamasındadır. İlgili reaksiyon, termal döngüleyiciler gibi özel aletler olmadan sabit sıcaklıkta gerçekleştirilebilir ve PCR ile karşılaştırılabilir bir duyarlılığa sahiptir. İzotermal nükleik asit amplifikasyon teknikleri arasında rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA) ve diğerleri bulunur. LAMP, yüksek verimliliğe sahip yeni bir izotermal nükleik asit amplifikasyon yöntemidir (James ve Alwneh, 2020; Yoo ve diğerleri, 2020). Üstel amplifikasyon özelliği ve aynı anda 4 farklı primer tarafından tanımlanan 6 farklı hedef sekans nedeniyle büyük hassasiyet ve yüksek özgüllük sergileyen DNA'ların ve RNA'ların amplifikasyonu için yaygın olarak kullanılır (Notomi ve diğerleri, 2000). Bu metot ise yüksek sıcaklık gerektiren bir metottur ve ölçüm önünde en önemli handikapta bu olmaktadır.

CRISPR tabanlı testler, viral genomları PCR testlerine kıyasla daha az adımla tespit eder ve oldukça hassas ve spesifiktir ve evde yapılan testler için umut verici bir çözüm sunar. Bu teknik, virüs ve bakterilerin tespiti için yeni bir platform sağlar. Bununla birlikte, virüs konsantrasyonu 10 nM'nin altındaysa, CRISPR tabanlı testler kısa bir zaman diliminde gerçekleştirilemez (Nouri ve diğerleri, 2021). Bu nedenle, CRISPR tabanlı testlerin çoğu, duyarlılıklarını artırmak için viral RNA izolasyonundan sonra PCR, LAMP ve RPA dahil olmak üzere çeşitli amplifikasyon yöntemlerini kullanır. Bu da metodun verimliliğini düşürürken maliyetleri artırmaktadır.

Diğer taraftan nükleik asit amplifikasyonuna dayalı testler şu anda COVID-19'u teşhis etmek için altın standardı temsil etse de, başlıca bulaşma yöntemlerini tanımlamak ve enfeksiyon kümelerini lokalize etmek için sınırlı değere sahiptirler. Yani tüm genomun analiz edilmesi virüsü belirlese de hastalık teşhisi için eksik kalmaktadır. Nanoporlara dayalı üçüncü nesil dizileme teknolojisini kullanılarak

yapılan analizlerde genel olarak, gen dizilimi, vazgeçilmez ekipman ve personel eğitimi gereksinimleri olan karmaşık bir araçtır (Meredith ve diğerleri, 2020). Bu nedenle, bireylerin yerinde testlerini gerçekleştirmek için alternatif tespit yöntemlerine hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Şu anda, COVID-19 tanısı esas olarak koronavirüs RNA'sının saptanmasına dayanmaktadır. Uygun tespit yöntemlerinin seçilmesi büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, yukarıda açıklanan yöntemlerin her birinin kendine özgü avantajları ve kaçınılmaz dezavantajları vardır. PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile virüs tanımlaması için yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak analizi, ancak muhtemelen iyi kurulmuş bir laboratuvar tarafından gerçekleştirilebilecek çeşitli ekipman ve eğitimli analistler gerektirir. LAMP, genellikle yaklaşık bir saat içinde az sayıda DNA veya RNA şablonunu tespit edebilen, aşırı duyarlı bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir, ancak yüksek sıcaklık gereksinimi hala uygulanabilirliğini sınırlamaktadır. Dizilemeye gelince, yüksek maliyet kaçınılmaz olarak koronavirüslerin tespitinde daha fazla uygulamasını sınırlamaktadır.

Geliştirdiğimiz RNA biyosensörü ile doğrudan elektrot yüzeyine bağlama gerçekleştirilmiştir ve kapasitif olarak ölçülmüştür. Kapasitif biyosensörler, sensör yüzeyi ile hedef molekül arasındaki doğrudan bağlanmayı kaydederek çalışan afinite biyosensörleri grubuna aittir. Bu tip biyosensörler, elektrolit/elektrot arayüzünde dielektrik özelliklerindeki ve/veya dielektrik tabakanın kalınlığındaki değişiklikleri ölçer. Kapasitif biyosensörler şimdiye kadar proteinlerin, nükleotidlerin, ağır metallerin, sakkaritlerin, küçük organik moleküllerin ve mikrobiyal hücrelerin tespiti için başarıyla kullanılmıştır. Bu şekilde Biyosensör sistemi yukarıda açıklanan konvansiyonel sistemlere göre daha hızlı ve tekrar kullanılabilir bir ölçüm metodu sunmuştur. Karbon elektrot yüzeyine immobilize edilen prob RNA ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. Karbon elektrotun seçilmesi polimer tabaka için daha uygun ve tutunucu karboksil yüzeyler içermesi nedeniyle seçilmiştir. Karboksil yüzeyler asit hidrolizi ile elektrooksidasyon ile oluşturulmuştur. Üzerine hem kolay immobilizasyon sağlayan amin grupları bulunduran ve elektropolimerizasyonu kolay olan pirol monomerleri yüzey modifikasyonu için seçilmiştir. Bu polimerler aynı zamanda pozitif yük ihtiva ettiğinden prob RNA'nın immobilizasyonunu kolaylaştırmaktadır (Onur Uygun ve Ertuğrul Uygun, 2020). Bu işlem için potansiyel uygulanması da yüzeyi daha fazla pozitif yükleyerek probu yüzeye fosfat gruplarından

çekmektedir. Bu işlem non-kovalent olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm ve sonraki proseslerde ise yüzeyden ayrılmaların olmaması için 3-aminofenol boronik asit ile prob DNA yüzeye tutturulmuştur. Bu işlem ise boronik asit üzerindeki OH ile RNA üzerindeki şeker grupları arasında diol bağları oluşturarak stabilite sağlamıştır (Uygun, Okutucu, Hacikara ve Sağın, 2019). Bu şekilde Biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Elektrokimyasal olarak kapasitans ölçümü ile yüzeyler doğrulanmıştır. Şekilde görüldüğü gibi yüzey yükündeki toplam değişim ile kapasitansta da değişim görülmektedir. Kapasitif akım yüzey ile ölçüm alınan sıvı arasındaki ara yüzü göstermekte ve oldukça da duyarlı bir ölçüm sunmaktadır. Yük değişimleri yüzey arasındaki toplam yük ile orantılı olarak değişmektedir. Bu nedenle pozitif yük ile yüklenen yüzey ile artış görülmekte ve toplam yük değişimine göre azalış görülmektedir. RNA'nın yüzeye bağlanması ve kontrol polimeri de taramalı elektron mikroskobu resimlerinden görülmektedir. Bu şekilde baktığımızda komplementer olan RNA yüzeye bağlandıkça toplam pozitif yükü düşürmekte ve kapasitif akımda azalma görülmüştür. Biyosensör label-free bir metot olduğundan ölçüm süresi optimizasyonunda zamana bağlı yüzeyde hedef RNA'nın birikmesi ölçümü kronoimpedimetrik olarak belirlenmiştir. Şekil 7'de hem seçicilik hem de ölçüm zamanı çalışılmıştır. Görüldüğü gibi 90. Saniyeden sonra diğer tip RNA yüzeye adsorbe olmaya başlamış fakat hedef RNA yüzeye bağlanmaya başlamıştır. Ölçüm süresinin 90 saniye olarak seçildiği bu çalışmadan sonra fM düzeyinde ölçüm gerçekleştirilmiştir. Nükleik asit biyosensörleri göz önüne alındığında ise seçiciliği ve duyarlılığı oldukça yüksektir. Bunun nedeni ise genel olarak tasarımda prob RNA/DNA yani biyosensörün biyotanıma ajanı kısmını oluşturan nükleik asit 3' veya 5' ucundan yüzeye immobilize edilerek çalışılmaktadır (Baeumner, Cohen, Miksic ve Min, 2003; Chakravarthy, Anirudh, ve diğerleri, 2021; Chakravarthy, Nandakumar, ve diğerleri, 2021; Hunt ve diğerleri, 2022). Bunun en büyük handikapı ile adsorpsiyondur. Çalışmamızda herhangi bir adsorpsiyon ölçüm zamanı içerisinde görülmemektedir. Bu şekilde dikey olan Biyosensör sistemlerinde hibridizasyon üzerine kurulu olduğundan, bu ölçümlerde bir işaretçi molekül kullanılmaktadır (Tichoniuk, Ligaj ve Filipiak, 2008). Bu nedenle sistem duyarlılığı ikincil molekülün sinyaline bağlıdır. Bizim çalışmamızda ikincil bir moleküle gerek duymamaktadır. Sonuç olarak daha duyarlı, daha verimli, daha düşük maliyetli ve yeni nesil bir Biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Son zamanlarda, kan ve doku örneklerinde anti-SARS-CoV-2 antikorlarını tespit etmek için serolojik laboratuvar tanı testleri geliştirilmiştir. Bu testler, enzime bağlı immünosorbent testini (ELISA) ve immünokromatografi testini içerir. IgM seviyeleri SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonraki ilk haftada artan bir immunglobulindir. IgG ise 1 hafta sonra saptanabilir hale gelir ve uzun bir süre yüksek seviyede durmaktadır (Hou ve diğerleri, 2020). Dolayısıyla COVID-19 testinde IgM ölçümü daha verimli olmaktadır. ELISA'nın (spike protein bazlı ve nükleokapsid protein bazlı) pozitif tespit oranları, IgM için %82,2 olarak belirlendiği bazı çalışmalar vardır (W. Liu ve diğerleri, 2020). Kalitatif ve kantitatif testler tanı konmasında kullanılabilir. Bu testlere bakıldığında özellikle ELISA testi sistemde şu an için kullanılsa da sapma oranları yüksek, ölçüm süresi ve kimyasal sarf malzemesi harcaması açısından verimlilik arz etmemektedir. İmmunokromatografik testlerde ise kalitatif bir sonuç verdiğinden miktarların izlenmesi hastalığın derecesini gösterememektedir.

Bu nedenle tez çalışmasının ikinci kısmında yer alan IgM ölçümü gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında iletkenliğin güçlü olması için altın elektrotlar kullanılmıştır. Bu elektrotlar RNA tayini için kullanılan metot gibi öncelikle pirol monomeri ile kaplanmıştır. Burada amaç aktif azot yüzeyler oluşturmaktır. Bu yüzeyin üzerine bağlanan PAMAM dendrimerleri ile yüzey alanını artırmak amaçlanmıştır. Bu şekilde daha fazla anti-IgM bağlanması (daha fazla biyotanıma ajanı bağlanması) ile daha yüksek miktarda IgM ölçümü amaçlanmıştır. Biyosensör bu şekilde, tasarlanarak kapasitif olarak değerlendirilmiştir. Görüldüğü gibi pozitif yük sayısı ile orantılı olarak kapasitif akımda değişim görülmüştür. Atomik kuvvet mikroskobu resimlerinden de görüldüğü gibi yüzey topografyası, yani Biyosensör yüzeyinin değişmesi ve yüzey kalınlığının da artması ile kapasitif veriler korelasyon göstermiştir. Bu şekilde Biyosensörün tasarımı gerçekleşmiştir.

Bu da label-free bir metot olması ile birlikte, ölçüm zamanı kronoimpedimetrik olarak gerçekleştirilmiştir. Anijen-antikor etkileşiminde düşük olan K_d değeri sayesinde, bağlanma da hızlı olarak 30 saniyede ölçüm gerçekleşmiştir. Bu da hız açısından diğer metotlarda oldukça iyidir. 5 ile 750 pg/dL gibi geniş bir aralıkta duyarlı bir ölçüm sağlayan Biyosensör sistemi PAMAM modifikasyonu ile bu geniş aralığa ulaşmıştır. Pikogram düzeyinde ölçüm aralığına ulaşması da bunun bir göstergesidir. Diğer taraftan gerçek serum örneklerin içerisinde alınan ölçümlerde de

tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve duyarlılık açısından da oldukça verimli ölçümler sunmuştur.

Sonuç olarak iki Biyosensör de COVID-19 ve bundan sonraki viral hastalıkların tanısında konsept olarak kullanılabilecek yeni nesil bir ölçüm sunmuştur. RNA stabilitesini artıracak şekilde polimer ile Biyosensör yüzeyinin kaplanması ölçüm verimliliğini artırmakla birlikte dayanıklılığı da artırmıştır.



Sonuç ve Öneriler

Bugüne kadar, koronavirüs tespitini iyileştirmek için önemli çabalar sarf edilmiş ve çeşitli iyileştirilmiş veya yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Pratik uygulamalarda, mümkün olduğunca tek bir yöntemin kullanılmasının sakıncalarından kaçınmak için genellikle birkaç yöntem birleştirilir. Kısacası, yeni teknolojilerin ve yöntemlerin hızla gelişmesi ile gelecekte bilim adamlarına/klinisyenlere daha fazla seçenek sunacak daha mükemmel ve verimli tespit yöntemlerinin geliştirileceğine inanıyoruz. Aynı zamanda, yalnızca belirli amaçlara göre çeşitli saptama deneylerinin avantaj ve dezavantajlarını dengeleyerek en ekonomik ve optimal seçeneği elde edebiliriz.



Kaynaklar

- Baeumner, A. J., Cohen, R. N., Miksic, V. ve Min, J. (2003). RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. *Biosensors & bioelectronics*, 18(4), 405–413. doi:10.1016/S0956-5663(02)00162-8
- Balboni, A., Gallina, L., Palladini, A., Prosperi, S. ve Battilani, M. (2012). A Real-Time PCR Assay for Bat SARS-Like Coronavirus Detection and Its Application to Italian Greater Horseshoe Bat Faecal Sample Surveys. *The Scientific World Journal*, 2012. doi:10.1100/2012/989514
- Bournazos, S., Chow, S. K., Abboud, N., Casadeval, A. ve Ravetch, J. V. (2014). Human IgG Fc domain engineering enhances antitoxin neutralizing antibody activity. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 725–729. doi:10.1172/JCI72676
- Calfee, C. S., Gallagher, D., Abbott, J., Thompson, B. T. ve Matthay, M. A. (2012). Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: Prognostic and pathogenetic significance. *Critical Care Medicine*, 40(6), 1731–1737. doi:10.1097/CCM.0b013e3182451c87
- Chakravarthy, A., Anirudh, K., George, G., Ranganathan, S., Shettigar, N., Suchitta, U., ... Ramesh, A. (2021). Ultrasensitive RNA biosensors for SARS-CoV-2 detection in a simple color and luminescence assay. *medRxiv*, 2021.01.08.21249426. doi:10.1101/2021.01.08.21249426
- Chakravarthy, A., Nandakumar, A., George, G., Ranganathan, S., Umashankar, S., Shettigar, N., ... Ramesh, A. (2021). Engineered RNA biosensors enable ultrasensitive SARS-CoV-2 detection in a simple color and luminescence assay. *Life science alliance*, 4(12). doi:10.26508/LSA.202101213
- Hou, H., Wang, T., Zhang, B., Luo, Y., Mao, L., Wang, F., ... Sun, Z. (2020). Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical & Translational Immunology*, 9(5). doi:10.1002/CTI2.1136
- Hunt, J. P., Zhao, E. L., Free, T. J., Soltani, M., Warr, C. A., Benedict, A. B., ... Bundy, B. C. (2022). Towards detection of SARS-CoV-2 RNA in human saliva: A paper-based cell-free toehold switch biosensor with a visual bioluminescent output. *New Biotechnology*, 66, 53–60. doi:10.1016/J.NBT.2021.09.002
- Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19 | CDC. (y.y.). 16 Temmuz 2022 tarihinde <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines->

clinical-specimens.html adresinden erişildi.

- James, A. S. ve Alwneh, J. I. (2020). COVID-19 Infection Diagnosis: Potential Impact of Isothermal Amplification Technology to Reduce Community Transmission of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 10(6). doi:10.3390/DIAGNOSTICS10060399
- Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., ... Zhu, C. (2020). Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clinica Chimica Acta*, 505, 172–175. doi:10.1016/J.CCA.2020.03.009
- Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., ... Zheng, S. (2020). Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6). doi:10.1128/JCM.00461-20
- Meredith, L. W., Hamilton, W. L., Warne, B., Houldcroft, C. J., Hosmillo, M., Jahun, A. S., ... Goodfellow, I. (2020). Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 20(11), 1263. doi:10.1016/S1473-3099(20)30562-4
- Nimmerjahn, F. ve Ravetch, J. V. (2005). Immunology: Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310(5753), 1510–1512. doi:10.1126/science.1118948
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. ve Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63. doi:10.1093/NAR/28.12.E63
- Nouri, R., Tang, Z., Dong, M., Liu, T., Kshirsagar, A. ve Guan, W. (2021). CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result. *Biosensors & Bioelectronics*, 178, 113012. doi:10.1016/J.BIOS.2021.113012
- Onur Uygun, Z. ve Ertuğrul Uygun, H. D. (2020). A Novel Chronoimpedimetric Glucose Sensor in Real Blood Samples Modified by Glucose-imprinted Pyrrole-Aminophenylboronic Acid Modified Screen Printed Electrode. *Electroanalysis*, 32(2), 226–229. doi:10.1002/elan.201900537
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., ... Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 300(5624), 1394–1399.

doi:10.1126/science.1085952

Schur, P. H. (1987). IgG subclasses - a review. *Annals of Allergy*.

Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Abdullah AL-maskri, A. A., Kang, Y., Zeng, S. ve Cai, S. (2020). Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(2), 97. doi:10.1016/J.JPHA.2020.02.010

Tichoniuk, M., Ligaj, M. ve Filipiak, M. (2008). Application of DNA Hybridization Biosensor as a Screening Method for the Detection of Genetically Modified Food Components. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(4), 2118. doi:10.3390/S8042118

Uhlenhaut, C., Cohen, J. I., Pavletic, S., Illei, G., Gea-Banacloche, J. C., Abu-Asab, M., ... Krause, P. R. (2012). Use of a novel virus detection assay to identify coronavirus HKU1 in the lungs of a hematopoietic stem cell transplant recipient with fatal pneumonia. *Transplant Infectious Disease*, 14(1), 79. doi:10.1111/J.1399-3062.2011.00657.X

Uygun, Z. O., Okutucu, B., Hacikara, Ş. ve Sağın, F. (2019). Development of molecularly imprinted Acrylamide- Acrylamido phenylboronic acid copolymer microbeads for selective glycosaminoglycan separation in children urine. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(6), 738–744. doi:10.1515/tjb-2018-0413

Van Der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J. M., Wolthers, K. C., ... Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nature Medicine*, 10(4), 368–373. doi:10.1038/nm1024

Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., ... Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1061–1069. doi:10.1001/JAMA.2020.1585

Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P. ve Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. MDPI AG. doi:10.3390/v2081803

Yoo, W. S., Han, H. S., Kim, J. G., Kang, K., Jeon, H. S., Moon, J. Y. ve Park, H. (2020). Development of a tablet PC-based portable device for colorimetric determination of assays including COVID-19 and other pathogenic microorganisms. *RSC Advances*, 10(54), 32946–32952. doi:10.1039/D0RA05866A

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E. ve Fouchier,

- R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814–1820. doi:10.1056/nejmoa1211721
- Zheng, Y., Xu, H., Yang, M., Zeng, Y., Chen, H., Liu, R., ... Wang, D. (2020). Epidemiological characteristics and clinical features of 32 critical and 67 noncritical cases of COVID-19 in Chengdu. *Journal of Clinical Virology*, 127, 104366. doi:10.1016/J.JCV.2020.104366
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. doi:10.1056/nejmoa2001017



Teşekkür

Doktora eğitimim süresince her anlamda yanımda olan, bana sabırlı ve güçlü olmayı öğreten, akademik dünyada iletişimin ve bilgi aktarımının ne denli önemli olduğunu anlamamı sağlayan, bilimsel donanım ve birikimlerimin gelişmesinde bana çok kıymetli fırsatlar sunan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yasemin Akçay'a,

Doktora eğitimimin ders döneminde derslerini keyifle dinlediğim, laboratuvarında veya projelerde beraber çalışma fırsatı yakalayarak hem yeni şeyler öğrenmemde hem de farklı tecrübeler kazanmamda katkıları olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Ferhan Sağın'a, Prof. Dr. Eser Yıldırım Sözman'e, Prof.Dr. Gülinnaz Ercan, Doç. Dr. Ebru Sezer'e, Doç. Dr. Mert Özgönül'e

Doktora tezimde büyük emeği olan, kendisinden biyosensörler ve elektrokimyasal araştırmalarla ilgili birçok şey öğrendiğim, başarılarını gıptayla izlediğim ve beraber çalışmaktan keyif duyduğum sınıf arkadaşım Doç.Dr. Zihni Onur Uygun'a,

Başarılarıyla gurur duyduğum ve zorlandığım her an beni motive eden, her an yanımda olan desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Gülşah Kaçmaz Akkurt'a, Beni bugünlere getiren anneme ve doktora derecemi tamamladığımı göremeden kaybettiğim babama,

Bana hastalarımı daha çok faydalı olmamı sağlayan ve bana bilimsel bakış katarak hayata ve sağlık sorunlarına yeni bir yaklaşım ile bakmamı sağlayan Ege Üniversitesi Tıbbi Biyokimya kürsüsündeki tüm Öğretim Üyelerine,

Doktora eğitimim süresince çok güzel anılar paylaştığım başta Erhan Canbay, Çiğdem Gözde Aslan, Burak Durmaz, Tolga Abban, Burcu Denizlioğlu, Meltem Kocamanoğlu ve kürsüdeki diğer tüm arkadaşlarıma,

Bana kattıkları her şey için teşekkür ederim.

İzmir, 8.12.2022

Sinan Şaban AKKURT

Özgeçmiş

Bir yardımcı tıp yöntemi olan biorezonans tedavisini Türkiye'ye tanıtan Dr. Sinan Akkurt, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2000 yılında mezun olmuştur. İlk görev yeri olan Manisa'da dokuz yıl süreyle Aile Hekimi olarak görev yapmıştır. Bu sırada ulusal ve uluslararası alanda birçok eğitim programına katılarak tıp diplomasının yanına doğal tıbbın birçok yöntemine ilişkin sertifikaları da eklemiştir. Yurt içi ve yurt dışında pranic şifa, matriks energetics, hipnoz, kinezyoloji gibi farklı doğal tıp yaklaşımlarında eğitimler alan Dr. Sinan Akkurt, özellikle biorezonans metodu üzerinde yoğunlaşmıştır.

Avrupa'da yaklaşık 40 yıldır uygulanan biorezonans metodunu ilk olarak beklenmedik bir şekilde art arda kanser oldukları anlaşılan annesi ve kız kardeşine uygulayan Dr. Sinan Akkurt, yöntemin hastalığın tedavisine destek olabildiğine bu örneklerde tanıklık etmiştir. Biorezonans metodunun ileri eğitimini almış ve 2007 yılında muayenehanesinde bu metotla hizmet vermeye başlamıştır. Halen İzmir Bornova'daki muayenehanesinde aktif olarak hizmet vermeye devam etmektedir.

Dr. Sinan Akkurt, yöntemin daha fazla hastaya umut olması için ayrıca uluslararası konferanslarda konuşmacı olarak kendi yöntemlerini de tüm dünya hekimleri ile paylaşmaktadır. Dr. Sinan Akkurt, biorezonans ile ilgili ilk kapsamlı Türkçe kaynak olan 'Biorezonans' kitabının da yazarıdır. (2016)

Dr. Sinan Akkurt, İleri Mitokondriyal Tıp kitabının ve Kronik Enflamasyon – Moleküler Patofizyoloji, Beslenme ve Terapötik Girişimler kitabının da bölüm editörlüğünü üstlenmiştir. (2021) Öte yandan Bütüncül ve Fonksiyonel Tıp – Nütrisyonel Tedaviler – İlkeler ve Uygulamalar kitabının çeviri editörleri arasında yer almıştır. (2022)

Dr. Sinan Akkurt, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin Tıbbi Biyokimya kürsüsüne doktora adayı olarak kabul edilmiş olup halen burada doktora çalışması yapmaktadır.

Evli ve iki çocuk babası olan Dr. Sinan Akkurt, İngilizce bilmektedir.

Mesleki deneyim:

- 2007 – Halen Dr. Sinan Akkurt Muayenehanesi, Hekim
- 2000 – 2007 Alaşehir Belediyesi, Hekim

Yabancı dil:

- İngilizce, İleri seviye

Kitaplar:

- 2022 - Bütüncül ve Fonksiyonel Tıp – Nütrisyonel Tedaviler – İlkeler ve Uygulamalar, Çeviri Editörü
- 2021 - İleri Mitokondriyal Tıp, Bölüm Editörü
- 2021 - Kronik Enflamasyon – Moleküler Patofizyoloji, Beslenme ve Terapötik Girişimler, Bölüm Editörü
- 2016 - Biorezonans, Yazar

Araştırmacı olarak yer aldığı projeler:

- Parkinson modeli oluşturulmuş sıçanlarda ozon tedavisinin etkisinin biyokimyasal biyobelirteçler ile araştırılması May 2019 - May 2021

Eğitim:

- 2000 - Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi
- Regumed Regülatif Tıp Enstitüsü, Almanya, Biorezonans Uzmanlığı
- Pranik Şifa Vakfı, Hindistan, İleri Pranik Şifa ve Pranik Psikoterapi
- Regumed Regülatif Tıp Enstitüsü, Almanya, Tamamlayıcı Kanser Tedavisi
- Avrupa Hipnoz Kurumu, Hipnoz Eğitim Programı
- C. Sağlık Bakanlığı, Birinci Basamakta Psikiyatri Eğitimi
- Geo Biologia İnstitute, Almanya, Yapı Biyologluğu (İşinsal alanlar, elektrosmog ve güç alanları)
- İsviçre, Matrix-İnform Teorisi ve Pratik Çalışmalar
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Aile Hekimliği 1. Aşama Uyum Eğitimi
- Türk Tabipler Birliği, İş Yeri Hekimliği
- İzmir Biorezonans Sağlık Hizmetleri, Kinezyoloji Sertifikası
- Hindistan İçsel Şifalar Enstitüsü, İnsanın Ruhsal Özü Eğitimi
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Ozon Uygulamaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Kupa Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Mezoterapi Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Hirudoterapi Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Apiterapi Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Proloterapi Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Fitoterapi Uygulaması
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Homeopati
- Sağlık Bakanlığı, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Eğitimleri Sertifika Programı, Akupunktur

Dr. Sinan Akkurt'un Uluslararası Bicom Biorezonans Kongresi'nde yaptığı sunum başlıkları:

- 2018 – Kötü Huylu Tümörlerin Sistemik Tedavisi
- 2018 – Bicom Biorezonans İle Kanser Tedavisi Workshop Eğitimi
- 2015 – Biorezonans ile Kupa Tedavisi, Biorezonanslı Kupa Tedavisinde Etkili ve Hızlı Tedavi: Örneğin Fıtık ve Kanser
- 2014 – Akciğer Kanserlerinin Biorezonans ile Tedavisi
- 2013 – Migren ve Baş Ağrısı Hastalıklarında Biorezonansla Tedavi
- 2012 – Epilepsi Hastalıklarında Biorezonans Tedavisi
- 2011 – İlerlemiş Kanser Hastalıklarında Bicom Biorezonans ile Cesaretli Tedavi

Dr. Sinan Akkurt'un biorezonans alanında yaptığı diğer sunumlar:

- 2022-İntegratif ve Anadolu Tıbbi Kongresi, Klinikte Biorezonans Uygulamaları
- 2021-2.ci Uluslararası Katılımlı Mikrobiyom Terapileri Kongresi, Bağırsak Sağlığı ve Takviyeler
- 2021-Bütüncül GİS Sempozyumu, Gastrointestinal Sistem Hastalıklarında Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi
- 2021-11.ci Ulusal Akupunktur ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi,Biorezonansa Bilimsel bakış
- 2021-1.ci Uluslararası Katılımlı Gaps Kongresi, Bağırsak Sağlığı için Takviyeler
- 2021-Mikrobiyom Terapileri Kongresi, Biorezonans ve Mikrobiyom
- 2021-2.ci Bütüncül Tıp Kongresi, Q10
- 2020-Ulusal Akupunktur ve Tamamlayıcı Tıp Kongresi,Graves Hastalığına Bütüncül Yaklaşım
- 2020-Bütüncül Tıp Kongresi,Q10
- 2020-3.cü Enerji Tıbbi ve Frekans Terapileri E-Kongresi
- 2020- Mitokondriyal Tıp Ve kronik Enflamasyon kongresi, Q10
- 2019-GAPS Danışmanları Bilgi Paylaşım toplantısı, Q10
- 2019-2.ci Uluslararası 4.cü ulusal Tamamlayıcı Terapi ve Destekleyici Bakım Uygulamaları kongresi, Biorezonans nedir?
- 2019 -WFAS , Biorezonans Metodu ile Sigara bağımlılığı Tedavisi
- 2019-Mitokondriyal Tıp Kongresi , Q10
- 2018 – 1. Ulusal Frekans Tıbbi Kongresi, Kanser ve Biorezonans Tedavisi, İzmir
- 2018 – Magnetoterapi Kongresi, Biorezonans ve Kanser Tedavisi
- 2018 – Kanser Tanı ve Tedavisinde Bütüncül Tıp Yaklaşımları Sempozyumu, Biorezonans ve Kanser Sunumu, Bodrum, Muğla
- 2016 –Onkolojide Biorezonans Uygulamaları, 1. Uluslararası ve 3. Ulusal Tamamlayıcı Terapiler ve Destekleyici Bakım Uygulamaları Kongresi, Antalya
- 2016 – Biorezonans nedir? Uygulama alanları nelerdir? İzmir Diş Hekimleri Odası, 23. Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi

