



BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ
ELEKTROMETRİK COVID-19 TAYİN /TEST YÖNTEMLERİ

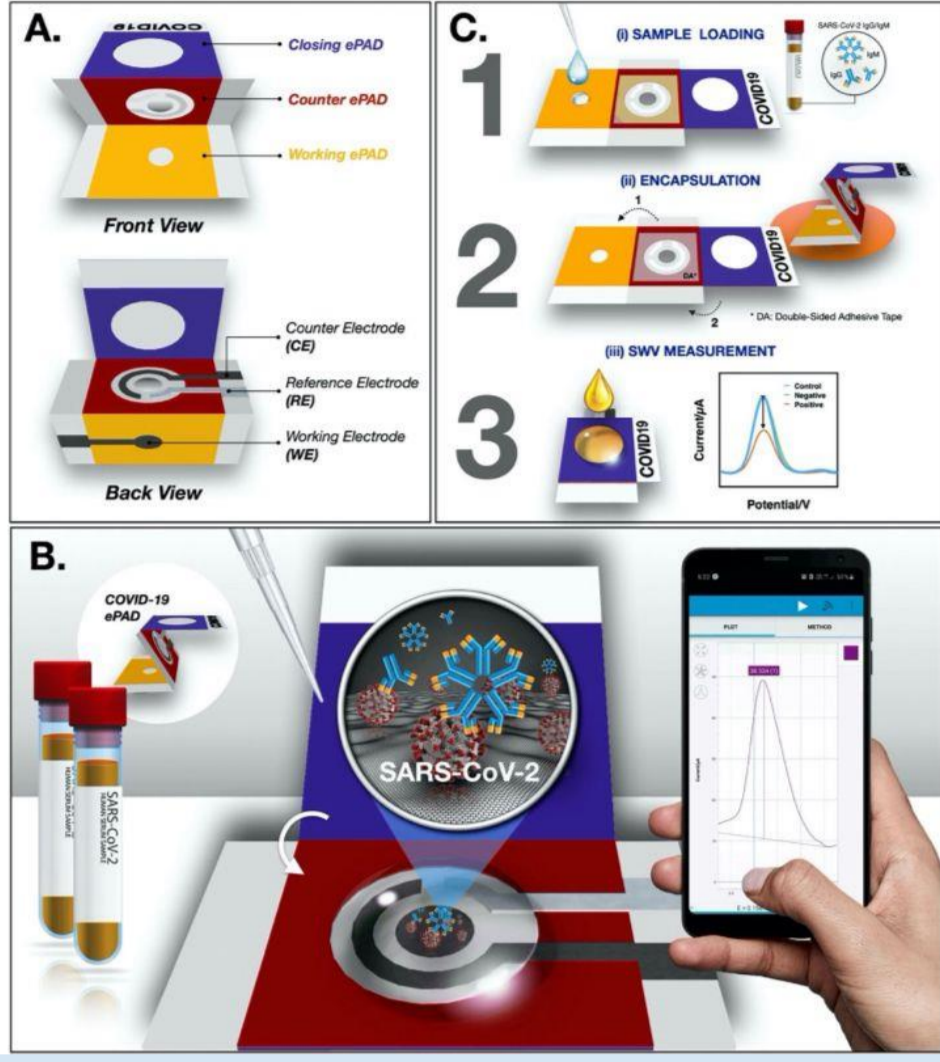
HAKTAN ERTEN

PROF. DR. NURİ NAKİBOĞLU



COVID-19 sürecinde tayine dayalı analitik kimya çalışmaları her aşamada önemli bir yer tutmuştur. Hem teşhis çalışmalarında hem de ilaç analizlerinde birçok analitik teknik kullanılmıştır. Bunlar arasında elektrokimyasal sensörler, yüksek hassasiyet, seçicilik, kısa analiz süresi, güvenilirlik, numune hazırlama kolaylığı ve organik solvent kullanımının az olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. SARS-CoV-2'de kullanılan favipiravir, molnupiravir, ribavirin vb. ilaçların tespiti için elektrokimyasal (nano)sensörler hem farmasötik hem de biyolojik numunelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Teşhis, hastalığın tedavisinde en kritik adımdır ve bu amaçla elektrokimyasal sensör araçları yaygın olarak tercih edilmektedir. Teşhis elektrokimyasal sensör araçları, biyosensör, nano biyosensör veya MIP tabanlı sensörler olabilir ve viral proteinler, viral RNA, antikorlar vb. gibi çok çeşitli analitleri kullanabilir. Literatürdeki en son çalışmaları değerlendirerek tanı ve ilaçların belirlenmesi açısından. Bu sayede en güncel çalışmalara ışık tutularak bugüne kadar olan gelişmelerin derlenmesi ve ileride yapılacak çalışmalar için araştırmacılara fikir verilmesi amaçlanmaktadır.

COVID-19 teşhisi için mevcut yaklaşımlar Günümüzde viral hastalıkların teşhisinde kullanılan yöntemlere baktığımızda, köklü yöntemlerin başında enzim bağlantılı immüno-sorbent assay (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri gelmektedir. Bu yöntemlerin erişilebilirlik ve hız açısından eksiklikleri bulunmakta olup, farklı tekniklerle teşhis alanında avantajlı seçenekler geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Özellikle COVID-19 pandemisi ile birlikte hastalığın hızlı bir şekilde teşhis edilebilmesi ve kontrol altına alınabilmesi için tanı testlerinin pratik, hızlı ve güvenilir olması daha da önem kazanmıştır. Bu amaçla testler, az miktarda viral RNA'nın hassas bir şekilde saptanmasını, çok sayıda örneği kısa bir analiz süresinde test etmek için verimli kapasiteyi ve çok düşük bir yanlış pozitif/negatif sonuç olasılığını gerektirir. COVID-19'u saptamak için, teşhis sensörleri için hedef analit olarak birkaç biyobelirteç kullanılır. En önemlileri, virüsün spike proteini veya spesifik RNA'sı ve COVID-19'a bağlı iltihaplanma durumunda ifade edilen spesifik metabolitlerdir. Antijen bazlı teşhis testleri, koronavirüsün nükleokapsid (N), spike (S), zarf (E) ve zar (M) olan yapısal proteinlerine odaklanır. Bunlar arasında S proteinini, N-terminal alanı, N-terminali S1 reseptör bağlama alanı (RBD) ve C-terminali S2 alt biriminden oluşan konakçı hücrelerde önemli rolere sahiptir.



rGO: İndirgenmiş Grafen oksit, RBD: Reseptör bağlama alanı, S1: Spike protein 1, EIS: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, FTO: Flor katkılı kalay oksit elektrot, (nCovid-19Ag: nCovid-19 spike antijeni, AuNP'ler: Altın nanoparçacık, eCovSens: Lab içi üretilmiş biyosensör cihazı, SPE: Yüzey baskılı elektrotlar, IPAD: mikroakışkan kağıt tabanlı analitik cihazlar, ZnO NWs: çinko oksit nanoteller, EDC : N-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür, NHS: N hidroksisüksinimit , BSA: Bovine serum albumin, CP/MNB: yakalama probu konjuge manyetik boncuk partikülü, SiNP'ler: Silika nanopartiküller, SPCE: Yüzey baskılı karbon elektrotlar, SCX8: p-sülfokaliks[8]aren, TB: toluidin mavisi, ORF1ab : replikaz kompleksi, DPV: Diferansiyel puls voltammetrisi S: Spike proteini, N: Nükleokapsid, SWV: Kare dalga voltammetrisi, GE: Altın elektrot, Cu₂O NC'ler: Cu₂O nanoküpler, ProtA: Stafilokokal protein A aracılığıyla düzenli bir yönelimde platform, ePAD: kağıt tabanlı analitik cihaz, GNC: grafit nanokristal.

• Voltammetri Voltammetrik yöntemler, yüksek sinyal gürültü oranı (SNR) nedeniyle en çok yönlü elektroanalitik tekniklerden biri olarak kabul edilmiştir. Bir potansiyel süpürme elektrokimyasal tekniği sınıftır. Voltammetrik yöntemler, bir elektrolitik çözeltiye batırılmış üç elektrot ile bir araya getirilen elektrolitik hücre boyunca uygulanan voltajın ve akımın ölçülmesinin kombinasyonundan oluşur. Potansiyel süpürme elektrokimyasal teknikleri ile ilgili temel ilke, elektrotlar boyunca potansiyeli değiştirerek, söz konusu kimyasal türlerin mevcut tepkilerinin ölçülmesini ve incelenmesini içerir. Akım tepkileri, elektrokatif türler ile çalışan elektrot arasındaki elektron transferi nedeniyle üretilir.

• Puls Voltammetrik Teknikler; Voltammetrideki puls teknikleri, normal voltammetrik yöntemlere kıyasla gelişmiş hassasiyetleri ve hızları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan bu teknikler, Diferansiyel Puls Voltammetrisi (DPV) ve Kare Dalga Voltammetridir.

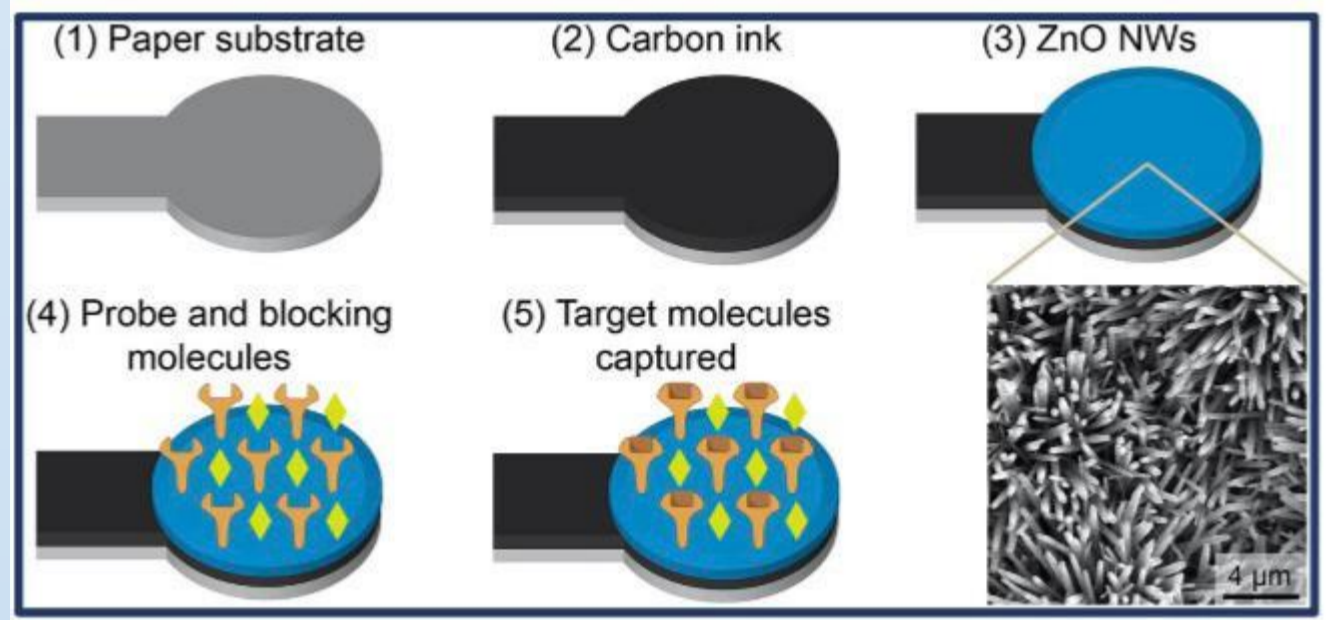
• Diferansiyel Darbe Voltammetrisi (DPV): DPV'de akım, pulsun sonunda olduğu gibi potansiyel pulsun uygulanmasından önce ölçülür. İlk ve son akım arasındaki fark kaydedilir ve potansiyele karşı grafik çizilir. DPV, nM aralığına yakın elektroaktif türlerin saptanmasını sağlar ve bu nedenle sensör tasarımında yaygın olarak kullanılır.

• Kare Dalga Voltammetrisi (SWV): Basamaklı şekilde artan bir potansiyel üzerine sabit genliğe sahip bir kare dalga yerleştirilerek uygulanan bir tekniktir. Her bir ileri yarım döngü ve her geri yarım döngü için akımlar ölçülür. Uygulanan potansiyele karşı, iki akım değeri arasındaki fark grafiğe geçirilir. Sonuç olarak, kalan kapasitif akım tamamen silindiği için SWV'deki kapasitif akımın etkisi önemli ölçüde azalır. SWV, normal puls voltammetrisi ile DPV tekniğinin bir hibriti olarak kabul edilebilir; SWV, hızları farklı olan elektron transfer reaksiyonlarını ayırt etmek için çok uygundur çünkü bu reaksiyonlar tarafından üretilen akım, kullanılan pulsun frekansına bağlıdır. Bu, açma ve kapama elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesine yardımcı olur. DNA, aptamer, RNA vb. kullanan çok sayıda elektrokimyasal sensörün SWV modunda çalıştığı bildirilmiştir.

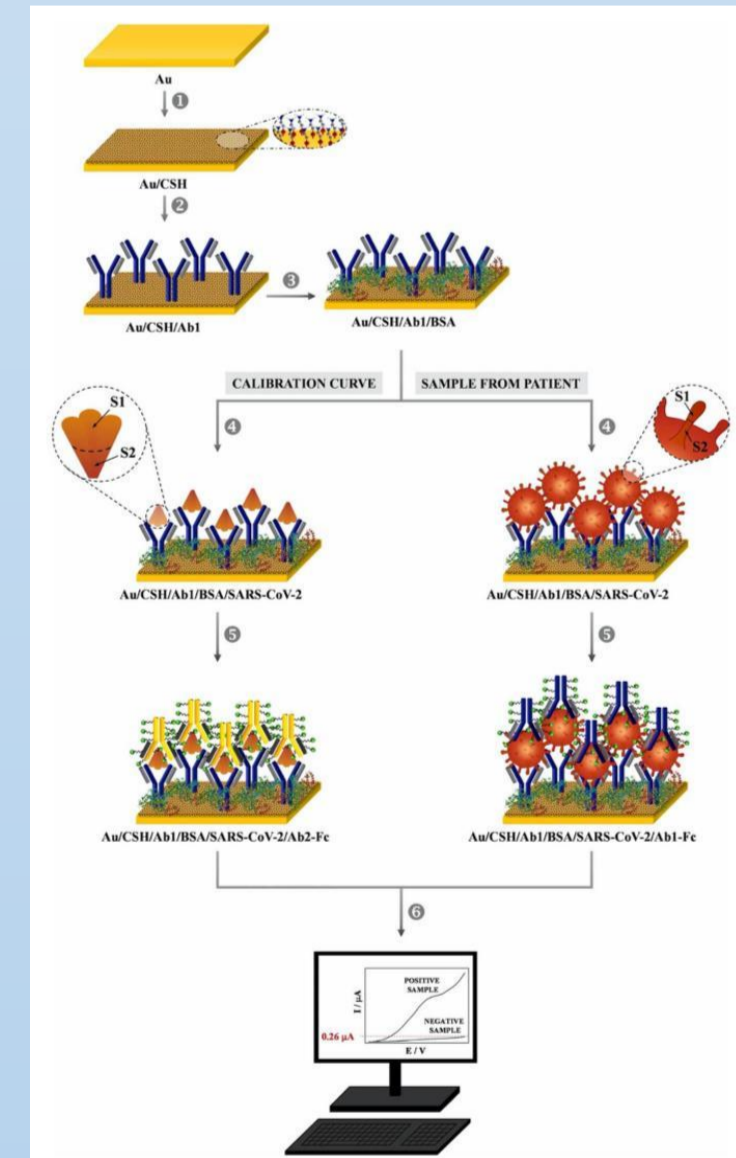
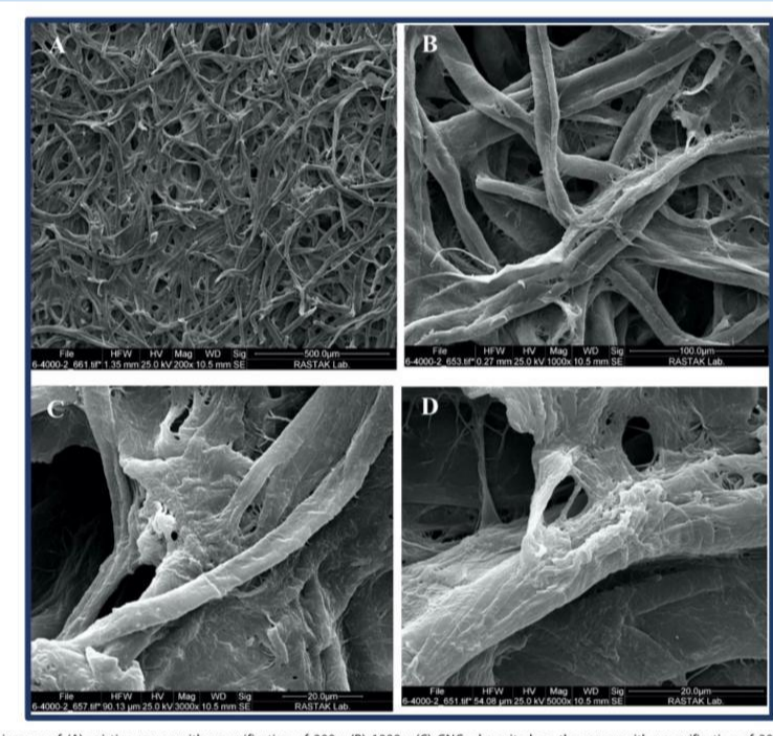
• Voltammetrik biyosensörler Biyosensör, klinik yönetimdeki etkinlikleri, özgüllükleri, hızları ve cevap verebilirlikleri gibi birçok avantajının bir sonucu olarak son yıllarda popüleritesi artan potansiyel bir teşhis aracıdır. Çeşitli tipler arasında elektrokimyasal biyosensörler, basitlikleri, özgüllükleri, hassasiyetleri ve hasta başı test verimliliği nedeniyle önemlidir. Bir biyolojik algılama sistemi artı bir elektrokimyasal dönüştürücü, elektrokimyasal biyosensörleri oluşturur. Moleküler reseptörlerin algılama yüzeyinde immobilizasyonu, adsorpsiyon, çapraz bağlama, kompleks oluşturma, kovalent bağlanma vb. ile yapılabilir. Algılama problemleri elektrot yüzeyine kovalent bağlantı (tiol aracılı, aldehit aracılı, ester aracılı veya epoksi aracılı) ve kovalent olmayan etkileşim (biyotin bazlı, DNA hibridizasyonu bazlı, elektrostatik etkileşimlere veya fiziksel yakalamaya dayalı) yoluyla bağlanabilir. Bu yöntem, azalan doğruluk ve tespit limiti ile sonuçlanabilecek çapraz bağlama reaktiflerine olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Uygun bağlama stratejisinin seçimi, biyosensör tasarımında esastır, çünkü bunların hedefe yönelik yönelimleri ve afiniteleri bunlarla büyük ölçüde değişebilir. Ayrıca, nanomalzemelerin dahil edilmesinin, tanıma probunun immobilizasyonunu ve probun hassasiyetini geliştirmek için etkili bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir.

• SARS-CoV-2 antijen tayini için voltammetrik biyosensörler SARS-CoV-2 antijeni için voltammetrik biyosensörler, virüsün N veya S proteinini hedefler.

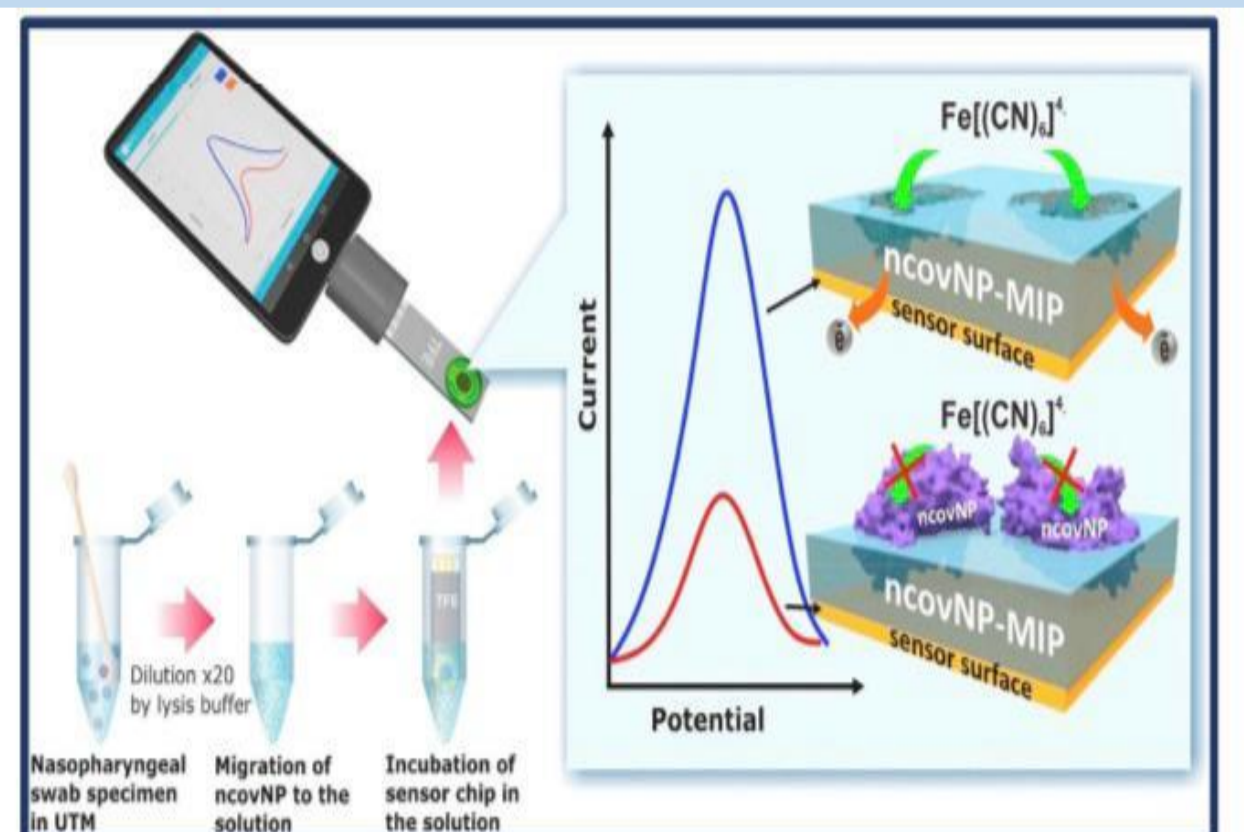
Kağıt tabanlı WE'lerin oluşturulması ve EIS biyoalgılamada kullanım için yüzey işlevselleştirme. WE'ler, EIS biyoalgılamanın çok önemli bir parçası olarak beş işlemden oluştu ve kullanıldı: (1) kağıt substrat, (2) karbon mürekkebi, (3) ZnO NW'ler, (4) prob ve bloke edici moleküller ve (5) yakalanan hedef moleküller.



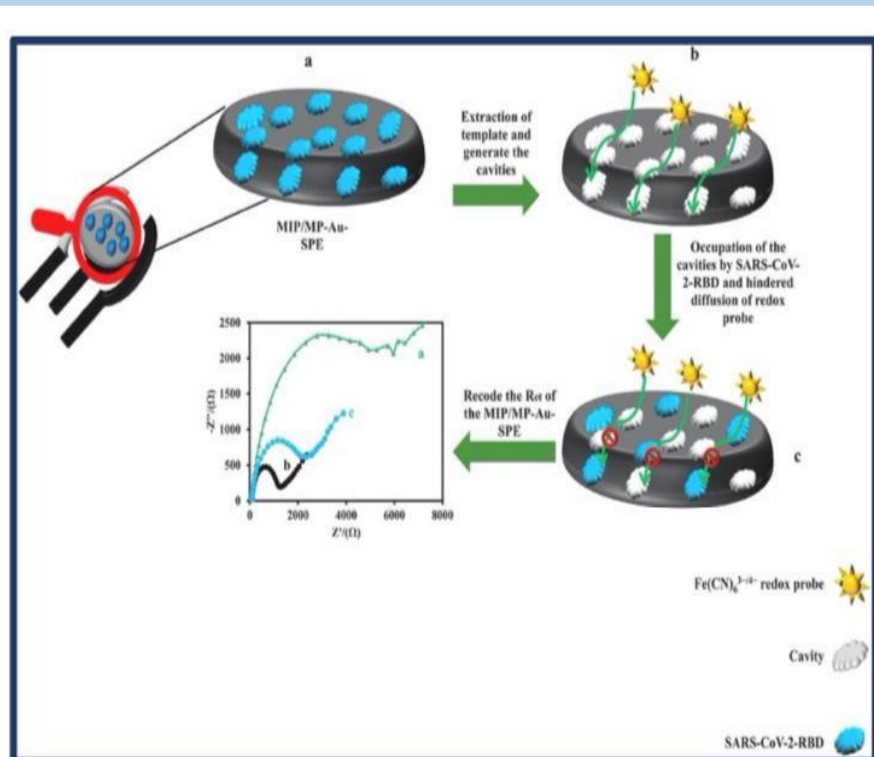
(A) bozulmamış kağıdın 200x büyütme, (B) 1000x, (C) GNC'lerin 3000x büyütme ve (D) 5000x büyütme ile kağıt üzerinde biriktirildiği SEM görüntüleri.



Nanobiosensörün SARS-CoV-2'ye tepki mekanizmasının şematik gösterimi.

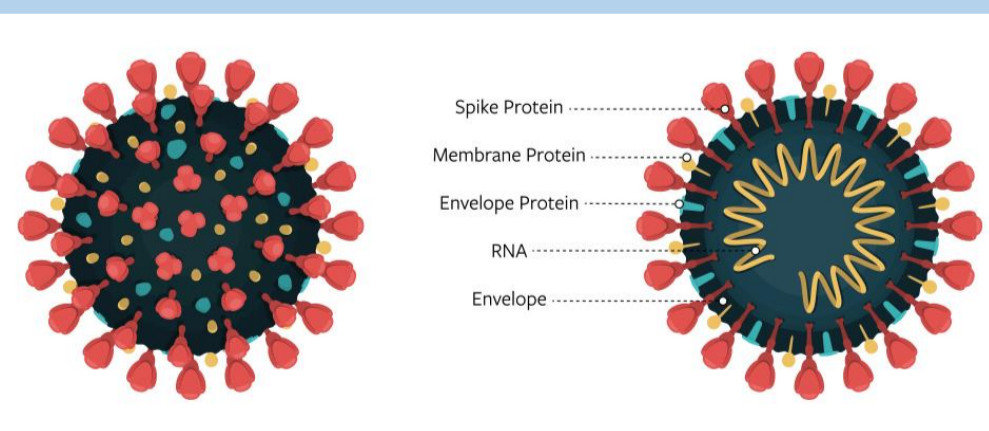


ncovNP'yi seçici olarak yeniden bağlama kapasitesi kanıtlanmış ve ncovNP-MIP'nin optimizasyon parametreleri iyileştirilmiştir. 15fM LOD değeri ve 50fM LOQ değeri ile sensör, lizis tamponunda 2,22–111fM konsantrasyon aralığında ncovNP'ye doğrusal olarak yanıt verdi. Ek olarak, ncovNP ile ncovNP arasında ayırma yapabildi. müdahale eden proteinler (S1, BSA, CD48 ve E2 HCV). Sensörün karmaşık biyolojik ortamda ncovNP'yi tespit etme kapasitesi, hasta nazofarenks sürüntülerinden alınan klinik numunelerde sensörün işlevsellik değerlendirmesinin elde edilen bulgularıyla doğrulandı. SARS-CoV-2'den tamamen farklı bir metodoloji kullanan tasarlanmış sensördür.

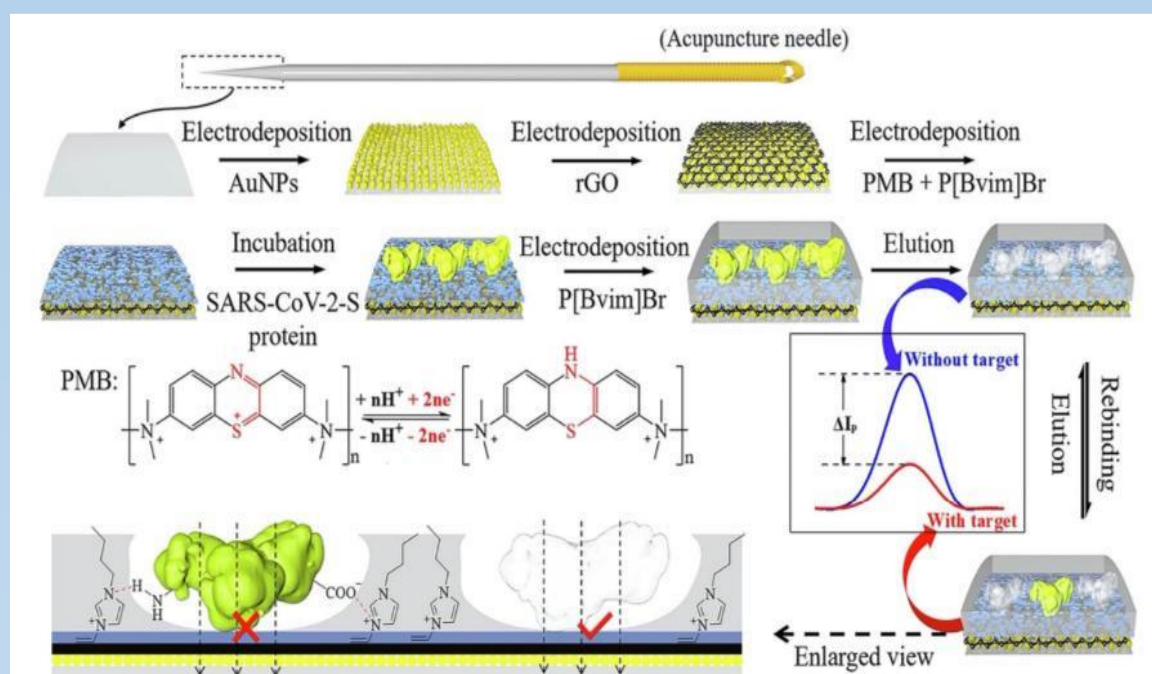


nconNP sensörlü COVID-19 teşhis yöntemi.

Şu anda kullanımda olan antijen testleri, COVID-19 için hızlı tarama için taşınabilir bir teşhis platformu olarak yararlı bir alternatif olabilir. Daha sonra araştırma, diğer koronavirüslerin (MERS-CoV ve SARS-CoV) nükleoproteinlerinin ncovNP sensör yanıtına müdahale edip etmeyeceğini belirlemeye ve hastanın tükürük örneklerini kullanarak sensör performansını doğrulamaya odaklanabilir. Bu, sık invaziv olmayan örneklemeye izin verecek ve eğitimli sağlık profesyonellerinin örnek toplama ihtiyacını azaltacaktır. Son olarak, sensörlerin kararlılığını test etmek için 12 sensör oluşturuldu. Zaman zaman, 66.6fM konsantrasyonda ncovNP eklenmiş LB ile seyreltilmiş COVID-19 negatif numuneler kullanılarak haftada bir kez test edildiler. Sonuçlar, ncovNP sensörlerinin olağanüstü uzun vadeli kararlılığa sahip olduğunu ve oluşturulan sensörlerin tepkisinin 9 haftaya kadar depolama boyunca sabit kaldığını gösteriyor.



Aşırı glikosile edilmiş proteinin 1,2-diollerini. Geliştirilen sensör, 15 dakikalık tepki süresiyle umut vaat eden bir performans sergiledi. Ayrıca hasta nazofaringeal numunelerinde ve fosfat tamponlu salin numunelerinde ncovS1'i tespit edebildi. Hızlı bir bakım noktası test platformu olarak ve COVID-19 hastalarının doğru teşhisi için, değiştirilmiş sensör, yerinde değerlendirmeye izin veren taşınabilir potansiyostatlarla da uyumludur. Ayrıca, SARS-CoV-2 virüsünün diğer varyantlarından gelen spike proteinleri arasında makul bir ayırım gösterdi. Daha fazla, araştırma gerekli olabilir.



Kaynakça

- 1-Ahmet Çetinkaya, S. İrem Kaya & Sibel A. Özkan - A Comprehensive Overview of Sensors Applications for the Diagnosis of SARS-CoV-2 and of Drugs Used in its Treatment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 10.1080/10408347.2023.2186693
- 2-Luisa De Cola, Ive Hermans, Ken Tanaka Voltammetric Sensors: A Versatile Tool in COVID-19 Diagnosis and Prognosis *ChemistrySelect* 2023, 8- 10.1002/slct.20220450