

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΣΧΟΛΗΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ»

## ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΚΟΡΟΝΟΪΟΥ

### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΚΟΥΦΙΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Επιβλέπων: Ευάγγελος Χριστοφόρου Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΣΧΟΛΗΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ»

## ΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΚΟΡΟΝΟΪΟΥ

### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΚΟΥΦΙΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Επιβλέπων: Ευάγγελος Χριστοφόρου

Καθηγητής ΕΜΠ

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

.....

Ευάγγελος Χριστοφόρου

Κωνσταντίνα Κόλλια

Καθηγητής ΕΜΠ

Καθηγήτρια ΕΜΠ

Κωνσταντίνος Δέρβος Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα 2021

(Υπογραφή)

.....

#### ΣΚΟΥΦΙΑΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Διπλωματούχος Μεταπτυχιακού προγράμματος «Τεχνολογία και επιστήμη των υλικών» του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος – All rights reserved

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, κύριο Χριστοφόρου, για την δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο επίκαιρο και ενδιαφέρον θέμα καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Αντώνη Γεωργά, όπου η βοήθεια που μου προσέφερε τόσο εντός όσο και εκτός πλαισίου της σχολής ήταν ανεκτίμητη καθώς οι συμβουλές του έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην εκπόνηση και ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας.

Ευχαριστώ τον κύριο Angelo Ferraro για την πολύτιμη συνεργασία του και τις πολύ χρήσιμες συμβουλές του για την εργασία.

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη ενός αισθητήρα μέτρησης του κορονοϊού SARS-CoV-2. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την θεωρητική μελέτη σχετικά με την λειτουργία των βιοαισθητήρων καθώς και τους τρόπους εξάπλωσης του SARS-CoV-2.

Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η μελέτη σχετικά με την δομή των σωματιδίων SARS-CoV-2 και δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στις πρωτεΐνες S spikes που βρίσκονται στο εξωτερικό περίβλημα του SARS-CoV-2. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι το κύριο μέσο εισόδου του SARS-CoV-2 στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του υποδοχέα ACE2.

Έπειτα από την θεωρητική επεξεργασία, σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο οι κατάλληλοι πυκνωτές που χρησιμοποιούνται σε αυτόν τον αισθητήρα. Οι πυκνωτές είναι τύπου ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων, κατασκευασμένοι από χαλκό. Στους πυκνωτές αυτούς χορηγήθηκε με συγκεκριμένη διαδικασία ο υποδοχέας ACE2. Η βασική λειτουργία του αισθητήρα έγκειται στο γεγονός της αλλαγής της χωρητικότητας των πυκνωτών κατά την σύνδεση του υποδοχέα ACE2 με τις πρωτεΐνες S spikes του SARS-CoV-2. Στο πειραματικό κομμάτι πραγματοποιήθηκαν και ο μετρήσεις με πραγματικά δεδομένα. Στην συνέχεια έγιναν τα ίδια πειράματα και μέθοδοι με την χρήση χρυσών πυκνωτών αντί για χάλκινων, εκτός των πειραμάτων με πραγματικά δεδομένα.

Τέλος, παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία και διεξάγωνται συγκεκριμένα συμπεράσματα.

#### ABSTRACT

The purpose of this thesis is the development of a coronavirus sensor. The methodology followed included the theoretical study on the function of biosensors as well as the ways of spreading the Coronavirus (SARS-CoV-2).

Specifically, the study on the structure of SARS-CoV-2 particles was performed and it was given special emphasis on the S spikes proteins located in the outer shell of SARS-CoV-2. These proteins are the main means of entry of SARS-CoV-2 into the human body via the ACE2 receptor.

After the theoretical process, the appropriate capacitors, used in this sensor, were designed and developed in the laboratory. The capacitors are comb driver type, made of copper. The ACE2 receptor was administered in these capacitors by a specific procedure. The basic function of the sensor is to change the capacitance of the capacitors when the ACE2 receptor binds to the S spikes proteins of SARS-CoV-2. In the experimental part, the measurements were performed with real data. The same experiments and methods were performed using gold capacitors instead of copper, except for experiments with real data.

Finally, the results of the experiments are presented, as they were derived from the experimental process and specific conclusions were made.

#### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 SARS-CoV-2	1
1.1.1 Περιγραφή του SARS-CoV-2	1
1.1.2 Δομή SARS-CoV-2	2
1.1.3 Γλυκοπρωτεΐνη S του SARS-CoV-2	3
1.2 Υποδοχέας του SARS-CoV-2	4
1.2.1 Υποδοχείς ιών	4
1.2.2 Πεπτίδια	5
1.2.3 Ένζυμα	7
1.2.4 ACE2 (Angiotensin – converting enzyme 2)	8
1.3 Είσοδος του SARS-CoV-2 στον άνθρωπο	9
1.3.1 Αντιδράσεις αμινοξέων	9
1.3.2 Σύνδεση SARS-CoV-2 και ACE 2	10
1.4 Κύριοι τρόποι σύνδεσης SARS-CoV-2 με ACE 2 και διαφορές SARS-CoV-2	12
και SARS-COV	
1.4.1 Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης S μεταξύ των SARS-CoV και SARS-CoV-2	13
1.4.2 Ηλεκτροστατικές συνδετικές δυνάμεις μεταξύ των ιών και του υποδοχέα	14
1.5 Ανίχνευση του SARS-CoV-2	18
1.5.1 Τεστ RT PCR	18
1.5.2 Λήψη δείγματος	19
1.5.3 Μεθοδολογία RT PCR και λήψη αποτελεσμάτων	19
2 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	21
2.1 Βασικά στοιχεία αισθητήρα	21
2.2 Ταξινόμηση των αισθητήρων	21
2.3 Χημικοί-βιοχημικοί αισθητήρες	22
2.4 Βιοαισθητήρες συγγένειας (Affinity Biosensors)	23
2.5 Πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων	23
2.5.1 Περιγραφή πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων	23

2.5.2 Υπολογισμός χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων	25
2.5.3 Θεωρητικός υπολογισμός της χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων	26
ηλεκτροδίων και σύγκριση με αντίστοιχες τιμές προσομοίωσης.	
2.5.4 Καμπύλη χωρητικότητας συναρτήσει των ηλεκτροδίων	30
Β ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	32
3 ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΠΥΚΝΩΤΗ	32
3.1 Στάδια κατασκευής	32
3.1.1 Σχεδίαση του κυκλώματος	32
3.1.2 Εκτύπωση σε διαφάνεια	34
3.1.3 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία	34
3.1.4 Εμφάνιση	35
3.1.5 Αποχάλκωση	36
3.1.6 Χαρακτηριστικά των πυκνωτών	39
<b>4</b> ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΤΟΥ ACE2 ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ S	43
4.1 Τοποθέτηση του υποδοχέα ACE2 στους πυκνωτές	43
4.2 Τοποθέτηση των γλυκοπρωτεΐνων S spike στην επιφάνεια των πυκνωτών	49
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ	50
5.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χάλκινων πυκνωτών	50
5.1.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χάλκινων πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου	50
5.1.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων σε δείγματα που τοποθετήθηκε πρωτεΐνη S spikes	53
και σε δείγματα με πρωτεΐνη BSA	
5.1.3 Πειραματικά δεδομένα χάλκινων πυκνωτών σε πραγματικές συνθήκες	57
5.2 Μετρήσεις χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών	63
5.2.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου	63
6 ΕΠΙΛΟΓΟΣ	68
6.1 Σύνοψη και συμπεράσματα	68
6.2 Σφάλματα κατά τις μετρήσεις	69
6.3 Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες	70
7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

#### ПАРАРТНМА

ΕΙΚΟΝΕΣ	73
ΠΙΝΑΚΕΣ	76
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	77

# Α ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1 εισαγωγγ

#### 1.1 SARS-CoV-2.

#### 1.1.1 Περιγραφή του SARS-CoV-2.

Οι Κορονοϊοί είναι μία μεγάλη οικογένεια ιών. Πρόκειται για ιούς που έχουν εξωτερικό περίβλημα και φέρουν ως γονιδίωμα μονόκλωνο RNA. Η ονομασία τους δόθηκε για το σχήμα που έχουν που θυμίζει κορώνα (στέμμα) λόγω των εξωτερικών περιμετρικών εξογκωμάτων τους. Οι Κορονοϊοί προκαλούν συνήθως στον άνθρωπο λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού καθώς μπορούν να προκαλέσουν και πνευμονία.

Ο SARS-CoV-2 πρωτοεμφανίστηκε τον Δεκέμβρη του 2019 στην περιοχή της Γιουχάν στην Κίνα. Πρόκειται για μια ασθένεια η οποία σχετίζεται με σοβαρή αναπνευστική δυσφορία και για αυτό τον λόγο μετονομάστηκε από την διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών ως severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2). Καθώς η μετάδοση του ιού αυξήθηκε γρήγορα, ο οργανισμός υγείας ταξινόμησε το ξέσπασμα του SARS-CoV-2 ως πανδημία στις 12 Μαρτίου του 2020. Έρευνες έχουν δείξει ότι ο βασικός αριθμός αναπαραγωγής (R<sub>0</sub>) εξαρτάται από την κάθε χώρα και τις ενέργειες που λαμβάνει. Η τιμή του αριθμού αναπαραγωγής δείχνει πρακτικά τον αριθμό ανθρώπων που μπορεί να μεταδοθεί ο ιός από έναν ασθενή. Συγκεκριμένα το R<sub>0</sub> τον Ιανουάριο του 2020 ήταν περίπου 3.6 (πριν εφαρμοστεί στις χώρες καραντίνα), ενώ πλέον η τιμή είναι περίπου στο 2.2 [1]. Το σημαντικό είναι ότι οι τιμές που αναφέρθηκαν είναι μεγαλύτερες από την μονάδα, με αποτέλεσμα ο SARS-CoV-2 να εξαπλώνεται με αυξητικό ρυθμό σε όλες τις χώρες. Οι Κορονοϊοί προκαλούν ήπιες έως και μέτριες ασθένειες του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Τις προηγούμενες δεκαετίες είχαν υπάρξει δύο σοβαρές επιδημίες, ο Κορονοϊός του οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS-CoV) και ο Κορονοϊός αναπνευστικού συνδρόμου Μέσης Ανατολής (MERS-CoV). Η φυλογενετική ανάλυση αποκάλυψε ότι ο ιός SARS-CoV-2 εμφανίζει μεγάλες ομοιότητες με τον SARS-CoV παρά με τον MERS-CoV. Η ιογενής παθογένεση του SARS-CoV-2 είναι άγνωστη ακόμα, παρόλα αυτά μελέτες έχουν δείξει ότι ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί το ένζυμο ACE2 ως υποδοχέα κυτταρικής εισόδου. Το ACE2 είναι επίσης ένας πολύ γνωστός υποδοχέας κυττάρων-ξενιστών για τον SARS-CoV [2].

Τα κύρια συμπτώματα του SARS-CoV-2 είναι ο πυρετός, ο ξηρός βήχας και η κούραση. Επιπλέον πιο σπάνια συμπτώματα αποτελούν ο πονόλαιμος, η διάρροια, η επιπεφυκίτιδα, ο πονοκέφαλος καθώς και η απώλεια γεύσης ή όσφρησης. Τέλος τα σοβαρά συμπτώματα του ιού είναι η δυσκολία στην αναπνοή ή δύσπνοια, ο πόνος ή πίεση στο στήθος και η απώλεια ομιλίας ή κίνησης. Τα συμπτώματα χρειάζονται κατά μέσο όρο 5-6 μέρες για να εμφανιστούν από την στιγμή της μόλυνσης, ωστόσο μπορεί να χρειαστούν έως και 14 μέρες. Έρευνα έδειξε ότι ένα ποσοστό κοντά στο 20% των κρουσμάτων ήταν ασυμπτώματα της νόσου, είναι εξίσου ικανοί να κολλήσουν άλλους ανθρώπους, όσο και αυτοί που έχουν συμπτώματα. Σύμφωνα με μία έρευνα που διεξάχθηκε [3], το ιικό φορτίο στους ασυμπτωματικούς μειώνεται με πιο αργό ρυθμό από ό,τι στους συμπτωματικούς. Αυτοί είναι δύο από τους βασικούς λόγους της ραγδαίας εξάπλωσης του SARS-CoV-2, οι πολλές μέρες για την εμφάνιση των συμπτωμάτων καθώς και οι ασυμπτωτικοί ξενιστές.

#### 1.1.2 Δομή SARS-CoV-2

Ο SARS-CoV-2 είναι ένα μέλος της οικογένειας Coronaviridae και είδους Nidovirales. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από δύο μικρότερες οικογένειες τις Coronavirinae και Torovirinae και μέρη της οικογένειας Coronavirinae χωρίζονται σε 4 υποκατηγορίες: (α) Τον α κορονοϊό, ο οποίος περιέχει τον ανθρώπινο κορονοϊό (HCoV)-229E, (β) τον β κορονοϊό ο οποίος περιέχει τον SARS-CoV, τον SARS-CoV-2 και τον MERS-CoV, (γ) τον γ κορονοϊό ο οποίος περιέχει ιούς από φάλαινες και πουλιά και (δ) ο δ κορονοϊός που περιέχει ιούς που συναντώνται μόνο σε γουρούνια και πουλιά [4]. Συνεπώς ο

SARS-CoV-2 πρόκειται για έναν β κορονοϊό, ο οποίος έχει μια μέση διάμετρο από 60 έως 140 nm [5]. Τα σωματίδια του ιού έχουν κυρίως οβάλ σχήμα με ακίδες (SPIKES) στο εξωτερικό τους περίβλημα. Οι γενετικές πληροφορίες του κωδικοποιούνται από σχεδόν 29000 ριβουνοκλεοτίδια. Ο SARS-CoV-2 διαθέτει στο εξωτερικό του περίβλημα τις γλυκοπρωτεΐνες S με τις οποίες μπορεί να προσκολλάται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων και στην συνέχεια να μπορεί να εισέρθει σε αυτά. Εκτός από την γλυκοπρωτεΐνη S, ο SARS-CoV-2 διαθέτει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες M και E, καθώς και την νουκλεοπρωτεΐνη N, η οποία σχηματίζει ένα σύμπλοκο ιικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (vRNP) με το ιικό RNA.

#### 1.1.3 Γλυκοπρωτεΐνη S του SARS-CoV-2

Πολλοί Κορονοϊοί χρησιμοποιούν την γλυκοπρωτεΐνη S spike, την οποία διαθέτουν στο περίβλημά τους για την σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Η πρωτεΐνη S περιλαμβάνει τις υπομονάδες S1 και S2. Η υπομονάδα S1 περιέχει τον τομέα δέσμευσης υποδοχέα και είναι υπεύθυνη για την σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς ενώ η S2 είναι υπεύθυνη για την σύντηξη. Η δέσμευση της πρωτεΐνης ενεργοποιεί μια σειρά από γεγονότα τα οποία οδηγούν στην σύντηξη μεταξύ των κυτταρικών και των ιογενών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την είσοδο της πρωτεΐνης στο κύτταρο. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα ACE2, προκαλεί την διάσπαση της υπομονάδας S1 με το ACE2, οδηγώντας το S2 να περάσει σε μια σταθερή κατάσταση η οποία είναι απαραίτητη για να δημιουργηθεί η μεμβράνη σύντηξης [6]. Στην εικόνα 1.1 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός σωματιδίου SARS-CoV-2.



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση δομής σωματιδίου SARS-CoV-2 [7]

Σημαντικό ρόλο για την μεγάλη εξάπλωση του SARS-CoV-2, καθώς και της καταπολέμησης της πανδημίας έχει η κατανόηση της σύνδεσης του ιού με τον υποδοχέα ACE2. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης S του ιού καθώς και του υποδοχέα ACE2, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

#### 1.2 Υποδοχέας του SARS-CoV-2

#### 1.2.1 Υποδοχείς ιών

Ο SARS-CoV-2, όπως και κάθε ιός, ξεκινά την μόλυνσή του προσκολλώντας πάνω στον ειδικό υποδοχέα, ο οποίος βρίσκεται στην επιφάνεια ενός ευαίσθητού κυττάρου ξενιστή. Ο υποδοχέας προετοιμάζει τον τρόπο εισόδου του ιού στο κύτταρο. Κατά συνέπεια, η έκφραση του υποδοχέα σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς του ξενιστή είναι ένας σημαντικός και καθοριστικός παράγοντας της εισόδου του ιού στο κύτταρο αυτό [8].

Στην βιολογία του κυττάρου, υποδοχέας ονομάζεται μια δομή στην κυτταρική μεμβράνη ή εντός του κυττάρου, η οποία συνδέεται με έναν μολυσματικό παράγοντα (π.χ. ιός) για να αλλάξει κάποια λειτουργία του κυττάρου. Οι υποδοχείς πρόκειται για χημικές δομές, οι οποίες απαρτίζονται από πρωτεΐνες και η κύρια λειτουργία τους είναι να λαμβάνουν

και να μεταφέρουν σήματα τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε βιολογικά συστήματα. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες που διακρίνονται οι υποδοχείς ανάλογα με την δράση τους: αναμετάδοσης σήματος, ενίσχυσης ή ολοκλήρωσης.

Ο βασικός υποδοχέας για τον SARS-CoV-2 είναι το ένζυμο ACE2, το οποίο βρίσκεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στον ανθρώπινο οργανισμό και κυρίως στους πνεύμονες. Για τον λόγο αυτόν η εξάπλωση του ιού είναι τόσο μεγάλη και ένας ασθενής αυτού του ιού παρουσιάζει κυρίως αναπνευστικά συμπτώματα.

#### 1.2.2 Πεπτίδια

Τα πεπτίδια είναι μόρια τα οποία αποτελούνται από δύο ή περισσότερα αμινοξέα και η σύνδεσή τους γίνεται με πεπτιδικούς δεσμούς [8]. Τα αμινοξέα έχουν γενική δομή R – CH (NH<sub>2</sub>) COOH. Τα αμινοξέα αποτελούν ένα μονομερές, το οποίο σχηματίζει μία πεπτιδική αλυσίδα πολυμερούς με άλλα αμινοξέα. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται όταν η καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέου (-COOH) αντιδρά με την αμινομάδα (NH<sub>2</sub>) ενός άλλου αμινοξέος, σχηματίζοντας έτσι έναν ομοιοπολικό δεσμό.

Τα πεπτίδια μπορούν να δρουν βιολογικά από μόνα τους, είτε μπορούν να δρουν ως υπομονάδα για μεγαλύτερα μόρια. Τα πεπτίδια σε πολλές περιπτώσεις είναι οι υπομονάδες των πρωτεϊνών καθώς αποτελούν επίσης σημαντικά δομικά στοιχεία των ενζύμων, των κυττάρων, των ορμονών και των ιστών του σώματος.

Τα πεπτίδια παρουσιάζουν ιατρικό ενδιαφέρον, καθώς λειτουργούν ως δομικά συστατικά των κυττάρων, των ιστών, των αντιβιωτικών κ.α. Επίσης όλες οι πρωτεΐνες αποτελούνται από πεπτίδια, πράγμα που καθιστά τα πεπτίδια πολύ σημαντικά στους οργανισμούς. Οι πρωτεΐνες πρόκειται για μεγάλα πεπτίδια, όπου περιέχουν μέχρι 50 ή και περισσότερα αμινοξέα.

#### Κατηγορίες πεπτιδίων

Τα πεπτίδια μπορούν να χωριστούν σε αρκετές κατηγορίες ανάλογα με την λειτουργία τους στα εξής:

- αντιβιοτικό πεπτίδια
- Βακτηριακή πεπτίδια

- πεπτίδια εγκεφάλου
- Καρκίνος και αντικαρκινικά πεπτίδια
- Καρδιαγγειακές πεπτίδια
- πεπτίδια ενδοκρινικού
- Fungal πεπτίδια
- Γαστρεντερικές πεπτίδια
- ασπόνδυλων πεπτίδια
- πεπτίδια οπιούχων
- πεπτίδια φυτών
- νεφρική πεπτίδια
- Αναπνευστική πεπτίδια
- πεπτίδια του εμβολίου
- πεπτίδια Venom

Τέλος η ονομασία των πεπτιδίων εξαρτάται από τον αριθμό των αμινοξέων που διαθέτουν, καθώς και από την λειτουργία τους. Συνεπώς η ονομασία τους είναι η εξής:

- Monopeptide: αποτελείται από ένα αμινοξύ
- Διπεπτιδίου: αποτελείται από δύο αμινοξέα
- Τριπεπτίδιο: έχει τρία αμινοξέα
- Τετραπεπτιδίου: έχει τέσσερα αμινοξέα
- Πενταπεπτίδιο: έχει πέντε αμινοξέα
- Εξαπεπτίδιο: έχει έξι αμινοξέα
- Επταπεπτίδιο: έχει επτά αμινοξέα
- Οκταπεπτίδιο: έχει οκτώ αμινοξέα
- Εννεαπεπτίδιο: έχει εννέα αμινοξέα
- Δεκαπεπτίδιο: έχει δέκα αμινοξέα
- Ολιγοπεπτίδιο: αποτελείται από μεταξύ δύο και είκοσι αμινοξέα

- Πολυπεπτίδιο: γραμμική αλυσίδα πολλών αμινοξέα συνδεδεμένα με αμίδιο ή πεπτιδικών δεσμών
- Πρωτεΐνη: είτε αποτελείται από περισσότερα από 50 αμινοξέα ή πολλαπλά πολυπεπτίδια
- Λιποπεπτιδίου: αποτελείται από ένα πεπτίδιο συνδεδεμένο με ένα λιπίδιο
- Το νευροπεπτίδιο: οποιοδήποτε πεπτίδιο που δραστηριοποιούνται στον νευρικό ιστό
- Πεπτιδενεργές παράγοντα: χημικό το οποίο ρυθμίζει τη λειτουργία των πεπτιδίων
- Πρωτεόζης: πεπτίδια που παράγονται με την υδρόλυση των πρωτεϊνών

#### **1.2.3 Ένζυμα**

Τα ένζυμα είναι ουσίες οι οποίες λειτουργούν ως καταλύτες για μια βιολογική αντίδραση. Η λειτουργία τους δεν επηρεάζει την σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης και δεν επιφέρει οποιαδήποτε χημική αλλαγή, η οποία κατά τα άλλα θα ήταν δυσμενής. Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες και δρουν μόνο για να μειώσουν την ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης, κάνοντας έτσι την αντίδραση πολύ γρηγορότερη. Η επιτάχυνση της αντίδρασης συνήθως γίνεται με ρυθμούς εκατομμυρίων φορών γρηγορότερα χάρη στα ένζυμα. Τα ένζυμα της γλυκοσιδάσης, τα οποία υδρολύουν πολυσαγχαρίτες, αυξάνουν την αντίδραση με έναν παράγοντα της τάξης του 10<sup>17</sup>, κάνοντας έτσι την αντίδραση να επιτευχθεί από εκατομμύρια χρόνια σε μόλις μερικά κλάσματα του δευτερολέπτου [8].

Τα ένζυμα κατατάσσονται σε 6 κατηγορίες αναλόγως του είδους της αντίδρασης που καταλύουν:

- 1. Οι Oxidoreductases καταλύουν τις οξειδώσεις,
- Οι transferases καταλύουν την μεταφορά μιας ομάδας από ένα υπόστρωμα σε ένα άλλο,
- Οι hydrolases καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης εστέρων, αμιδίων και συναφή υποστρωμάτων,

- Οι lyases καταλύουν την αποβολή ή την προσθήκη ενός μικρού μορίου όπως είναι του νερού (H<sub>2</sub>O) από ή προς ένα υπόστρωμα,
- 5. Οι isomerases καταλύουν τον ισομερισμό,
- 6. Οι ligases καταλύουν την σύνδεση δύο μορίων.

Η συστηματική ονομασία ενός ενζύμου έχει δύο μέρη, που τελειώνουν με -ase. Το πρώτο μέρος προσδιορίζει το υπόστρωμα του ενζύμου και το δεύτερο μέρος προσδιορίζει την κατηγορία του.

#### **1.2.4** ACE 2 (Angiotensin – converting enzyme 2)

Το ACE 2 είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια πολλών κυττάρων και είναι υπεύθυνο για την δημιουργία μικρών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα το ACE 2 είναι προσκολλημένο στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων που βρίσκονται στους πνεύμονες, τις αρτηρίες, την καρδιά, τα νεφρά και τα έντερα. Στους πνεύμονες το ACE 2 είναι άφθονο και βρίσκεται στα πνευμοκύτταρα τύπου 2. Τα πνευμονοκύτταρα τύπου 2 πρόκειται για έναν σημαντικό τύπο κυττάρου που υπάρχει στους θαλάμους του πνεύμονα, στα οποία απορροφάτε οξυγόνο και απελευθερώνεται διοξείδιο του άνθρακα [9].

Το ACE 2 πρόκειται για ένα ζωτικό στοιχείο που είναι κρίσιμο για την ρύθμιση διαφόρων διαδικασιών σε έναν οργανισμό, όπως η αρτηριακή πίεση, η επούλωση τραυμάτων, καθώς και για την φλεγμονή. Επίσης το ACE 2 βοηθά στην διαμόρφωση πολλών δραστηριοτήτων μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται αγγειοτενσίνη 2. Η αγγειοτεσνίνη 2 δρα ως ορμόνη που προκαλεί σύσπαση των λείων μυικών ινών των αγγείων, με αποτέλεσμα αύξηση της αρτηριακής πίεσης Ακόμα το ACE2 αυξάνει την βλάβη στις επενδύσεις των αιμοφόρων αγγείων και τους διάφορους τραυματισμούς των ιστών. Το ACE 2 πρακτικά μετατρέπει την αγγειοτενσίνη 2 σε άλλα μόρια με σκοπό να αντισταθμίσει τις επιδράσεις της πρωτεΐνης αυτής.

Το ACE 2 υπάρχει σε όλους τους ανθρώπους αλλά η ποσότητα ποικίλει μεταξύ ατόμων και σε διαφορετικούς ιστούς στα κύτταρα. Στοιχεία και μελέτες έχουν δείξει ότι το ACE 2 είναι υψηλότερο σε ασθενείς με υπέρταση, διαβήτη και στεφανιαία νόσο. Η έλλειψη του ACE 2 σχετίζεται με σοβαρό τραυματισμό ιστού στην καρδία, στους πνεύμονες καθώς και σε άλλους τύπους ιστών. Καθώς το ACE2 είναι ο κύριος υποδοχέας για τον ιό, τα κύρια συμπτώματα που προκαλούνται σε έναν ξενιστή είναι στα όργανα που περιέχουν το ACE2 σε αφθονία, που είναι οι πνεύμονες και η καρδιά. Στην εικόνα 1.2 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση ενός κυττάρου το οποίο διαθέτει εξωτερικά και περιμετρικά του τα ένζυμα ACE2 [10].



Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση του υποδοχέα ΑCE2 σε ένα κύτταρο [10]

#### 1.3 Είσοδος του SARS-CoV-2 στον άνθρωπο

#### 1.3.1 Αντιδράσεις αμινοξέων

Για να γίνει κατανοητό το πώς γίνεται η αντίδραση του SARS-CoV-2 και ACE2 θα πρέπει πρώτα να γίνει αναφορά στην αντίδραση πρωτεΐνης με πρωτεΐνη. Για να μελετηθεί η αντίδραση μεταξύ πρωτεϊνών θα πρέπει να εξεταστούν οι αντιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων. Τα αμινοξέα μπορούν να αντιδράσουν με πολλούς τρόπους. Οι αντιδράσεις αυτές έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επίδραση τους ως προς την δομή των πρωτεϊνών [11].

Τα αμινοξέα μπορούν να συνδεθούν με αντίδραση συμπύκνωσης, κατά την οποία ένα υδροξείδιο (OH) χάνεται από την καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος μαζί με ένα υδρογόνο από την αμινομάδα του δεύτερου, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.3. Με τον τρόπο αυτόν σχηματίζεται ένα μόριο νερού και έτσι τα δύο αμινοξέα ενώνονται μέσω ενός αμίδιου, δημιουργώντας έναν πεπτιδικό δεσμό. Όταν τα μεμονωμένα αμινοξέα συνδυάζονται για να

δημιουργήσουν πρωτεΐνες, οι καρβοξυλικές ομάδες και οι αμινομάδες τους δεν δρουν ως οξέα ή ως βάσεις, καθώς έχουν αντιδράσει για να σχηματίσουν τον πεπτιδικό δεσμό. Συνεπώς μια πρωτεΐνη συμπεριφέρεται σαν βάση ή σαν οξέο αναλόγως από τα συνολικά χαρακτηριστικά ιονισμού των μεμονωμένων ομάδων R των συστατικών αμινοξέων.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση αντίδρασης αμινοζέων [11].

Τα αμινοξέα που ενώνονται με μια σειρά πεπτιδικών δεσμών αποτελούν ένα πεπτίδιο. Μετά την ενσωμάτωση τους σε ένα πεπτίδιο, τα μεμονωμένα αμινοξέα αναφέρονται ως υπολείμματα αμινοξέων. Ένα μόριο πρωτεΐνης είναι μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία αποτελείται από πολλά υπολείμματα αμινοξέων, με κάθε υπόλειμμα να είναι ενωμένο στο επόμενο με έναν πεπτιδικό δεσμό. Τα μήκη για τις διάφορες πρωτεΐνες κυμαίνονται από μερικές δεκάδες έως χιλιάδες αμινοξέα και κάθε πρωτεΐνη περιέχει διαφορετικές σχετικές αναλογίες των 20 τυπικών αμινοξέων. Συνεπώς οι πρωτεΐνες αντιδρούν με άλλες πρωτεΐνες ανάλογα με τις αντιδράσεις που θα προκύψουν από τα αμινοξέα που τις αποτελούν.

#### 1.3.2 Σύνδεση SARS-CoV-2 και ACE 2

Μελέτες έχουν δείξει ότι το ACE2 είναι ο βασικός υποδοχέας για τους ιούς SARS-COV. Συγκεκριμένα ο SARS-COV-2 μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα τα οποία έχουν ACE2 και όχι σε κύτταρα που δεν διαθέτουν αυτό το ένζυμο. Η σύνδεση αυτών των ιών γίνεται με την βοήθεια της γλυκοπρωτεΐνης S την οποία διαθέτουν στο εξωτερικό τους περίβλημα. Έρευνες που θα αναφερθούν παρακάτω έχουν δείξει ότι η σύνδεση του SARS-COV-2 με το ACE2 είναι περίπου 10 με 20 φορές μεγαλύτερη από την σύνδεση του με τον SARS-COV. Ορισμένες διαμεμβρανικές πρωτεϊνάσες, όπως είναι η TMPRSS2 και η ADAM17 συμμετέχουν επίσης σε αυτή την διαδικασία όπως φαίνεται στην εικόνα 1.2 [12]. Τα σωματίδια SARS-CoV-2 μπορούν να χρησιμοποιήσουν το TMPRSS2 για την εκκίνηση των πρωτεϊνών σε κυτταρικές σειρές. Τα μολυσμένα κύτταρα και τα φλεγμονώδη κύτταρα που διεγείρονται από ιικά αντιγόνα, μπορούν να παράγουν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες για την ενεργοποίηση ανοσολογικών αντιδράσεων και φλεγμονωδών αποκρίσεων για την καταπολέμηση των ιών. Ο συνδυασμός της μεμβράνης του ιού και του κυττάρου που έχει προσβληθεί ενεργοποιείται μετά την δέσμευση, καθώς το RNA του ιού απελευθερώνεται στο κυτόπλασμα, δημιουργώντας έτσι μόλυνση.

Το ACE2 εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα ανθρώπινα όργανα. Στο αναπνευστικό σύστημα το ACE2 εκφράζεται κυρίως σε κυψελικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου ΙΙ, αλλά εκφράζεται ασθενώς στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων στον στοματικό και ρινικό βλεννογόνο και στον ρινοφάρυγγα, υποδεικνύοντας πως οι πνεύμονες είναι ο πρωταρχικός στόχος του SARS-CoV-2.



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του ιού και των υποδοχέων ACE2, TMPRSS2 και ADAM17 [13]

1.4 Κύριοι τρόποι σύνδεσης SARS-CoV-2 με ACE 2 και διαφορές SARS-CoV-2 και SARS-COV

Παρόλο που η πρωτεΐνη S του SARS-COV και του SARS-COV-2 έχουν πολύ παρόμοια δομή, η σύνδεση της πρωτεΐνης S του SARS-COV-2 με τον υποδοχέα ACE2 είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με του SARS-COV. Αυτός ίσως είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο ο SARS-COV-2 εξαπλώνεται γρηγορότερα σε σχέση με τον SARS-COV. Σε αυτή την περίπτωση, εξηγώντας τις διαφορές μεταξύ των SARS-COV και SARS-COV-2 θα γίνει κατανοητό πόσο γρήγορα εξαπλώνεται ο ιός καθώς και πως επηρεάζει την υγεία του ανθρώπου.

Στην έρευνα Spike Proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Utilize Different Mechanisms to Bind With Human ACE2 [14] έγινε η μελέτη των ηλεκτροστατικών χαρακτηριστικών της σύνδεσης της πρωτεΐνης S των SARS-CoV και SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα AC2 με την χρήση του προγράμματος DelPhi. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε καθώς το πρόγραμμα αυτό επίλυσε την εξίσωση Poisson – Boltzmann (1.1):

$$\nabla \bullet \left[\epsilon\left(r\right)\nabla\phi\left(r\right)\right] = -4\pi\rho\left(r\right) + \epsilon\left(r\right)\kappa^{2}\left(r\right)\sinh\left(\frac{\phi(r)}{k_{B}T}\right) \qquad (1.1)$$

Όπου  $\varphi(\mathbf{r})$  είναι το ηλεκτρικό πεδίο,

ε(r) η διηλεκτρική συνάρτηση,

 $\rho(r)$ η πυκνότητα φορτίου η οποία εξαρτάται από την ατομική δομή,

κ η παράμετρος Debye-Huckel,

k<sub>B</sub> η σταθερά του Boltzmann,

Τ η θερμοκρασία.

Κατά την διαδικασία επίλυσης της εξίσωσης Poisson Boltzmann οι διηλεκτρικές σταθερές ορίστηκαν ως 2.0 για τις πρωτεΐνες και 80.0 για το νερό αντίστοιχα. Το ποσοστό πλήρωσης πρωτεΐνης ορίστηκε σε 70.0. Η ακτίνα ανιχνευτή για τη δημιουργία μοριακής επιφάνειας ήταν 1.4 Å. Η συγκέντρωση αλατιού ορίστηκε ως 0.15 M. Η οριακή συνθήκη για την εξίσωση Poisson Boltzmann ορίστηκε ως διπολική οριακή συνθήκη. Τέλος κατά τους υπολογισμούς του DelPhi, η ανάλυση ορίστηκε ως 1 πλέγμα ανά Å.

Μέσω της εξίσωσης (1.1) κατάφεραν να γίνουν υπολογισμοί για τα ηλεκτρικά πεδία που δημιουργούνται από τον SARS-CoV και SARS-CoV-2 καθώς και τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ιών και του υποδοχέα ACE2.

#### 1.4.1 Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης S μεταξύ των SARS-CoV και SARS-CoV-2

Στην εικόνα 1.5 παρουσιάζονται οι βασικές διαφορές μεταξύ του SARS-CoV και SARS-CoV-2 ως προς την σύνδεσή τους με το ACE2. Οι θέσεις των διαφορών αυτών έχουν χαρτογραφηθεί στην εικόνα 1.5 με την χρήση 4 χρωμάτων, σε μία μονή αλυσίδα της πρωτεΐνης S. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο αρνητικά, το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο θετικά, το κίτρινο αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από πολικά σε υδροφοβικά και το κυανό αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από πολικά σε υδροφοβικά και το κυανό αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από υδροφοβικά σε πολικά. Παρατηρείται ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις κατανέμονται στην επιφάνεια της S πρωτεΐνης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη της περιοχής δέσμευσης υποδοχέα RBD (receptor-binding domain) τοποθετείται κοντά στην διεπαφή με τον υποδοχέα ACE2. Αυτή η παρατήρηση αποκαλύπτει ότι ο μηχανισμός σύνδεση του SARS-CoV-2 με το ACE2.



Εικόνα 1.5: Δομή της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 και του υποδοχέα ACE2. (A) Η δομή της S πρωτεΐνης σε σύνδεση με το ACE2. Το ACE2 παρουσιάζεται με το γκρι χρώμα. Τα τρία μονομερή της πρωτεΐνης S παρουσιάζονται με το κίτρινο, το πορτοκαλί και το πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις του SARS-CoV και του SARS-CoV-2 παρουσιάζονται με τα 4 χρώματα. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο αρνητικά, το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο αρνητικά, το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο θετικά, το κίτρινο αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από πολικά σε υδροφοβικά και το κυανό αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από υδροφοβικά σε πολικά. (B) Δομή ενός μονού μονομερούς πρωτεΐνης S. To RBD φαίνεται στον κόκκινο κύκλο κατά την ένωσή του με το ACE2. Η πράσινη κυκλική περιοχή επισημαίνει την ένωση μεταξύ της RBD και της υπόλοιπης πρωτεΐνης S [14]

#### 1.4.2 Ηλεκτροστατικές συνδετικές δυνάμεις μεταξύ των ιών και του υποδοχέα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σύνδεση του SARS-CoV-2 και του SARS-CoV με τον υποδοχέα ACE2 διαφέρουν. Αυτό οφείλεται κυρίως στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των πρωτεϊνών S των ιών και του υποδοχέα ACE2 [14]. Οι διαφορές παρουσιάζονται στην εικόνα 1.6. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.6 η επιφάνεια της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 είναι πιο θετικά φορτισμένη σε σχέση με την επιφάνεια της πρωτεΐνης S του SARS-CoV. Επίσης η επιφάνεια του υποδοχέα ACE2 είναι στο μεγαλύτερο μέρος της

αρνητικά φορτισμένη με αποτέλεσμα να έλκεται με μεγαλύτερη ευκολία από την πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2. Αυτός πρέπει να είναι ο βασικός λόγος για τον οποίο ο SARS-CoV-2 είναι πιο μεταδοτικός από τον SARS-CoV, διότι υπάρχει μεγαλύτερη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ACE2.



Εικόνα 1.6: (A) Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης S, RBD του SARS-CoV, (B) Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης S, RBD του SARS-CoV-2, (C) ηλεκτροστατική διαφορά ανάμεσα στις πρωτεΐνες S, RBD του SARS-CoV κ SARS-CoV-2, (D) ηλεκτροστατική επιφάνεια του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2 [14].

Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από τον SARS-CoV-2 είναι παρεμφερή με του SARS-CoV και αρκετά ισχυρό ώστε οι πρωτεΐνες S των δύο ιών να έλκονται με μεγάλη ευκολία από τον υποδοχέα ACE2. Οι ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στους ιούς και τον υποδοχέα υπολογίστηκαν με προσομοίωση για διάφορες αποστάσεις στην δημοσίευση Utilize Different Mechanisms to Bind With Human ACE2 [14] και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 1.7. Στην εικόνα 1.7 αναπαρίσταται οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV καθώς και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV 2 σε συγκεκριμένες αποστάσεις. Στο (A) μέρος πρόκειται για τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Ομοίως το μέρος (B) δείχνει τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Ομοίως το μέρος (B) δείχνει τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Στην συνέχεια το μέρος (C) και (D) αναπαριστά τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 αντίστοιχα, που αναπτύσσονται με τον υποδοχέα ACE2 που υπάρχει στους ανθρώπους, όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι 5 Å. Τέλος το μέρος (E) και (F) απεικονίζουν μία μεγέθυνση του (C) και (D).



Εικόνα 1.7: Ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV καθώς και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV 2 σε συγκεκριμένες αποστάσεις. (Α) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια

συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. (B) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων.(C) και (D) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 αντίστοιχα, που αναπτύσσονται με τον υποδοχέα ACE2 που υπάρχει στους ανθρώπους, όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι 5 Å. (E) και (F) απεικονίζουν μία μεγέθυνση του (C) και (D) [14].

Στην εικόνα 1.7 το μέγεθος των βελών δεν αντιπροσωπεύει το μέτρο των δυνάμεων, αλλά μόνο την διεύθυνσή τους. Από το (A) και (B) μέρος της εικόνας 1.7, φαίνεται ότι η συνολική συνδετική δύναμη είναι ελκτική και στους δύο ιούς. Από το μέρος (C) και (D) φαίνεται ότι τα υπολείμματα της RBD σε απόσταση 5Å έχουν αρκετά διαφορετική διανομή από τον SARS-CoV στον SARS-CoV-2. Αυτή η διαφορά μπορεί να δικαιολογηθεί από τα μέρη (E) και (F). Τα διαφορετικά υπολείμματα από τις γέφυρες άλατος που υπάρχουν μεταξύ των δύο ιών φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τις διαφορετικές ελκτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται.

Τα μεγέθη των δυνάμεων παρουσιάζονται στην εικόνα 1.8. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8 τα μεγέθη των δυνάμεων και των δύο ιών μειώνονται όσο η απόσταση αυξάνεται από τα 5 στα 40 Å. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ιών και του υποδοχέα ACE2 είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσεως, όπου το μέτρο της δύναμης είναι αντιστρόφως ανάλογο του τετραγώνου της απόστασης, σύμφωνα με τον νόμο του Coulomb.



17

Εικόνα 1.8: οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της RBDs της S πρωτεΐνης και τον υποδοχέα ACE2 σε διάφορες αποστάσεις από 5 έως 40 Å. (A) συνολική ηλεκτροστατική δύναμη μεταξύ του SARS-COV και του ACE2. (B) συνολική ηλεκτροστατική δύναμη μεταξύ του SARS-COV-2 και του ACE2 [14].

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1.8 (A) οι δυνάμεις που αναπτύσσονται στην περίπτωση του SARS-CoV είναι πιο ισχυρές από τις δυνάμεις στην περίπτωση του SARS-CoV-2. Αν και οι δυνάμεις είναι πιο ασθενείς στην περίπτωση του SARS-CoV-2, η σύνδεση των πρωτεϊνών S γίνονται με μεγαλύτερη ευκολία σε σχέση με τον SARS-CoV. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι με την μικρότερη δύναμη που αναπτύσσεται τα υπολείμματα RBD μπορούν να κινηθούν με μεγαλύτερη ευλυγισία με αποτέλεσμα να μπορούν να συνδεθούν ευκολότερα με το ACE2.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν, τα σωματίδια του SARS-CoV-2 έχουν μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια. Για αυτόν τον λόγο τα σωματίδια αυτά έλκονται με μεγάλη ευκολία από τα ρούχα των ανθρώπων, τα οποία είναι συνήθως φορτισμένα με αρνητικό φορτίο. Με τον τρόπο αυτόν ο ιός στην συνέχεια από τα ρούχα περνάει στο αναπνευστικό σύστημα και μολύνει τον ανθρώπινο οργανισμό.

#### 1.5 Ανίχνευση του SARS-CoV-2

Οι ιοί οι οποίο σχετίζονται με την αναπνευστική οδό, όπως ο SARS-CoV-2, συνήθως διαγιγνώσκονται μέσω άμεσης ανίχνευσης ιικών συστατικών σε αναπνευστικά δείγματα. Οι δύο πιο διαδεδομένοι τρόποι για την ανίχνευση τέτοιων ιών είναι οι δοκιμές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και οι δοκιμές με βάση το αντιγόνο.

#### **1.5.1 Τεστ RT PCR**

Όταν η πανδημία COVID-19 ξέσπασε, τα πρώτα τεστ ανίχνευσης του ιού που αναπτύχθηκαν ήταν τα RT – PCR (reverse-transcriptase PCR). Τα τεστ αυτά έγιναν ο κύριος τρόπος ανίχνευσης του ιού. Πρόκειται για τεστ τα οποία ανιχνεύουν ιογενή RNA [15]. Τα αποτελέσματα είναι για τον προσδιορισμό του RNA του SARS-CoV-2. Το RNA του SARS-CoV-2 είναι γενικά ανιχνεύσιμο στα αναπνευστικά δείγματα κατά την διάρκεια της οξείας φάσης της μόλυνσης. Τα θετικά αποτελέσματα είναι ενδεικτικά για την παρουσία του RNA του SARS-CoV-2. Για να υπάρχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση του ιού είναι απαραίτητο να έχει γίνει η σωστή κλινική συσχέτιση με το ιστορικό του ασθενούς. Παρόλα αυτά τα θετικά αποτελέσματα μερικές φορές μπορεί να είναι από βακτηριακή λοίμωξη ή μόλυνση από άλλους ιούς.

Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν την μόλυνση του ιού και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως μοναδική βάση για αποφάσεις διαχείρισης ασθενών. Τα αρνητικά αποτελέσματα θα πρέπει να συνδυάζονται με κλινικές παρατηρήσεις, με το ιστορικό του ασθενούς και με επιδημιολογικές πληροφορίες.

Η δοκιμή με το τεστ COVID-19 RT-PCR προορίζεται για χρήση από εκπαιδευμένο κλινικό εργαστήριο με προσωπικό που να έχει εκπαιδευτεί κατάλληλα, ειδικά στις τεχνικές PCR σε πραγματικό χρόνο.

#### 1.5.2 Λήψη δείγματος

Το δείγμα για το τεστ RT PCR λαμβάνεται από τον ρινοφάρυγγα ή από βρογχικές εκκρίσεις. Επίσης μπορεί να ληφθεί από τον στοματοφάρυγγα με ειδικό στειλεό [16]. Στην συνέχεια το δείγμα συσκευάζεται και τοποθετείται σε ειδικό κυτίο μεταφοράς. Τα δείγματα που λαμβάνονται από βρογχικές εκκρίσεις είναι δείγματα κατώτερου αναπνευστικού συστήματος και συνήθως έχουν μεγαλύτερη διαγνωστική αξία από δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος όπως είναι τα δείγματα που προέρχονται από στον στοματοφάρρυγκα και από το ρινοφάρυγγα.

#### 1.5.3 Μεθοδολογία RT PCR και λήψη αποτελεσμάτων

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων στο εργαστήριο, γίνεται η προσπάθεια της απομόνωσης του ιικού RNA του ιού. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή για την ενίσχυση 2 διαφορετικών στόχων του ιικού γονιδώματος του SARS-CoV-2. Η εξέταση διαρκεί περίπου 3 με 4 ώρες.

Η μέθοδος RT-PCR υπερτερεί σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεθόδους, καθώς είναι ικανή να ανιχνεύσει τον ιό στα πολύ αρχικά στάδια της λοίμωξης. Το μειονέκτημά της είναι ότι δεν μπορεί να τον ανιχνεύσει 100% στην φάση της επώασης. Αν το αποτέλεσμα της μέτρησης είναι αρνητικό αυτό σημαίνει ότι ο ιός δεν είναι στο δείγμα. Υπάρχει και η πιθανότητα τα αποτελέσματα να είναι αρνητικά στους ασυμπτωματικούς φορείς οι οποίοι βρίσκονται στην φάση της επώασης. Επιπλέον πολύ σημαντικό είναι κατά την λήψη των επιχρισμάτων να έχει συλλεχθεί αρκετό υλικό. Προτιμάται για τον λόγο αυτόν να συλλέγεται ρινοφαρυγγικό επίχρισμα διότι υπερτερεί σε σχέση με του στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος. Αυτό συμβαίνει καθώς η ποσότητα του συλλέγεται είναι κατά κανόνα περισσότερη, όταν πρόκειται για δείγματα που προέρχονται από τον ρινοφάρυγγα, και δεν επηρεάζεται εύκολα από τον λήπτη ή τον ασθενή.

# 2 ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

#### 2.1 Βασικά στοιχεία αισθητήρα

Ο αισθητήρας πρόκειται για μία συσκευή, η οποία μετατρέπει ένα μακροσκοπικό μέγεθος, όπως το φως, η θερμοκρασία κ.λ.π, σε ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος και έπειτα το ηλεκτρικό σήμα αυτό μετατρέπεται σε κάποιο τυποποιημένο σήμα με ορισμένα χαρακτηριστικά [17]. Το τμήμα που μετατρέπει το μακροσκοπικό μέγεθος σε ηλεκτρικά μετρήσιμο σήμα ονομάζεται Μετατροπέας, ενώ το τμήμα που μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα Του μετατροπέας και το κύκλωμα οδήγησης αποτελούν τον αισθητήρα.

Ο μετατροπέας είναι το βασικότερο τμήμα ενός αισθητήρα, καθώς από αυτόν καθορίζονται τα χαρακτηριστικά του. Ο μετατροπέας κατασκευάζεται με τέτοιον τρόπο ώστε να είναι δυνατόν οι μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους να επιφέρουν μεταβολή σε ένα ηλεκτρικά μετρήσιμο μέγεθος. Ο μετατροπέας από μόνος του δεν αποτελεί μια ιδιαίτερα αξιόπιστη λύση σαν αισθητήρας καθώς συνήθως τα ηλεκτρικά σήματα που δίνει είναι πολύ μικρής έντασης. Για τον λόγο αυτόν ένας αισθητήρας αποτελείται συνήθως και από έναν μεταλλάκτη, ώστε να υπάρχει ένα πιο σταθερό σήμα. Το υποκύκλωμα σταθεροποίησης είναι μέρος του κυκλώματος οδήγησης του αισθητήρα.

#### 2.2 Ταξινόμηση των αισθητήρων

Οι αισθητήρες κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες βάση την λειτουργία τους που επιτελούν (για παράδειγμα ένας αισθητήρας μέτρησης της θερμοκρασίας κ.α.) ή την φυσική αρχή στην οποία στηρίζεται η λειτουργία τους (για παράδειγμα η μαγνητική αντίσταση κ.α.). Οι βασικότερες κατηγορίες αισθητήρων ταξινομούνται, βάση την κύρια μορφή ενέργειας που μεταφέρει το σήμα τους, στους παρακάτω τύπους:

• Μηχανικοί

- Ηλεκτρικοί
- Μαγνητικοί
- Θερμικοί
- Ακτινοβολίας
- Χημικοί

Ο αισθητήρας που θα ασχοληθούμε στην παρούσα εργασία πρόκειται για έναν βιοχημικό αισθητήρα.

#### 2.3 Χημικοί-βιοχημικοί αισθητήρες

Οι χημικοί ή βιοχημικοί αισθητήρες πρόκειται για συσκευές οι οποίες μετατρέπουν μία χημική ή βιολογική ποσότητα σε ηλεκτρικό σήμα. Η δομή ενός τέτοιου αισθητήρα αποτελείται από μία θέση επιλεκτικής αναγνώρισης μια ατομικής, μοριακής ή ιοντικής ουσίας συνδυαζόμενη με έναν τύπο μετατροπέα. Ο αισθητήρας αυτός έχει ως στόχο την αναγνώριση και την ανάλυση μιας ουσίας, η οποία βρίσκεται σε αέρια ή σε υγρή μορφή, καθώς πιθανόν να είναι σε συνδυασμό με πολλές άλλες ουσίες. Ο μετατροπέας στους χημικούς αισθητήρες μεταφράζει την παρουσία της επιλεγμένης αναλυόμενης ουσίας σε ένα ανιχνεύσιμο φυσικό σήμα, το οποίο στην συνέχεια μπορεί να συλλεχθεί και να ερμηνευθεί. Η δομή τους συνήθως περιλαμβάνει την απευθείας αλληλεπίδραση τμήματος της αναλυόμενης ουσίας με κάποιο πραγματικό συστατικό του ίδιου του μετατροπέα.

Οι χημικοί αισθητήρες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- Μάζας
- Θερμικοί
- Οπτικοί
- Ηλεκτροχημικοί
- Συγγένειας

#### 2.4 Βιοαισθητήρες συγγένειας (Affinity Biosensors)

Ο αισθητήρας που θα μελετηθεί στην παρούσα εργασία πρόκειται για έναν βιοχημικό αισθητήρα. Συγκεκριμένα ο αισθητήρας ανήκει στην κατηγορία των βιοαισθητήρων συγγένειας ή αλλιώς affinity biosensors. Πρόκειται για αισθητήρες οι οποίοι αποτελούνται από βιοειδικούς συνδέτες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, νουκλεϊκά οξέα και αντισώματα [18]. Επίσης σε αυτούς τους αισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστατικά κυτταρικής μεμβράνης, κυτταρικά οργανίδια καθώς και ακέραια κύτταρα. Σε αντίθεση με τους βιοαισθητήρες, οι οποίοι για τον προσδιορισμό του αναστολέα βασίζονται στην ικανότητα των ανασταλτικών ουσιών να δεσμεύονται στο συστατικό του υποδοχέα και να επιβραδύνουν την μετατροπή του υποστρώματος, οι affinity biosensors συνδιάζουν την αρχή της συγγένειας με τις αντιδράσεις ενζυματικής ενίσχυσης. Σε αυτή την περίπτωση γίνεται η αξιολόγηση της δέσμευσης και όχι της χημικής αντίδρασης του αναλυτή. Πρόκειται για αισθητήρες μικρής δαπάνης και με την χρήση προσδεμάτων χαμηλού μοριακού βάρους αποφεύγεται η χρήση οποιουδήποτε ραδιενεργού υλικού που θα χρειαζόταν σε άλλους αισθητήρες [19].

Ο αισθητήρας της παρούσας εργασίας θα είναι επίσης ένας αισθητήρας μέτρησης χωρητικότητας. Οι αισθητήρες αυτής της κατηγορίας συνδέουν την μέτρηση του ρεύματος διά μέσου ενός ηλεκτροδίου εργασίας και ενός αντισαθμιστικού ηλεκτροδίου ως μια συνάρτηση της συγκέντρωσης προς ανάλυση σε ένα ηλεκτροχημικό κελί. Το ηλεκτρόδιο εργασίας που χρησιμοποιείται είναι συνήθως από χρυσό ή πλατίνα.

#### 2.5 Πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων

#### 2.5.1 Περιγραφή πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων

Οι πυκνωτές με δομή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων έχουν μελετηθεί σε βάθος από την δεκαετία του '70. Πρόκειται για πυκνωτές οι οποίοι αποτελούνται, πέρα από τις δύο παράλληλες πλάκες, από ένα πλήθος κτενιών τα οποία αλληλεπικαλύπτονται, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1. Έχουν μεγάλη χρήση σε εφαρμογές που περιλαμβάνουν ολοκληρωμένα κυκλώματα μικροκυμάτων, διατάξεις ακουστικών κυμάτων και διηλεκτρικές μελέτες λεπτών υμενίων. Επίσης τα τελευταία χρόνια έχουν μεγάλη χρήση και στους χημικούς αισθητήρες. Οι διαστάσεις των πυκνωτών αυτού του είδους συνήθως αναφέρονται σε μίκρο ή νάνο κλίμακα.

Κατά την εφαρμογή μιας τάσης μεταξύ των στατικών και των κινούμενων κτενιών, αναπτύσσονται ελκτικές δυνάμεις οι οποίες προκαλούν την έλξη μεταξύ τους. Τα κτένια διατάσσονται έτσι ώστε να μην ακουμπάνε ποτέ μεταξύ τους, καθώς τότε δεν θα υπήρχε διαφορά δυναμικού. Η δύναμη που αναπτύσσεται είναι ανάλογη με την μεταβολή της χωρητικότητας μεταξύ των δύο κτενών και αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των κτενών, το κενό μεταξύ των δοντιών καθώς και με την αύξηση της τάσης [20].





Οι δομές των πυκνωτών αυτών προτιμώνται στους χημικούς αισθητήρες λόγω της επίπεδης διαμόρφωσης των ηλεκτροδίων, καθώς τα ηλεκτρόδια δεν εμποδίζουν την διάχυση των αναλυτών. Με τον τρόπο αυτόν πραγματοποιείται η γρήγορη απόκριση της διάταξης. Οι αισθητήρες που χρησιμοποιούν αυτούς τους πυκνωτές συνήθως κατασκευάζονται σε αδρανές υπόστρωμα, πάνω στο οποίο σχηματίζονται τα δύο ηλεκτρόδια σχήματος κτενιών. Στην συνέχεια τα ηλεκτρόδια καλύπτονται από πάνω με ένα ευαίσθητο στρώμα, το οποίο είναι συνήθως πολυμερές.

#### 2.5.2 Υπολογισμός χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων

Σημαντικό για την κατασκευή ενός αισθητήρα, ο οποίος διαθέτει έναν τέτοιο πυκνωτή είναι ο υπολογισμός των χαρακτηριστικών του πυκνωτή. Η χωρητικότητα του συγκεκριμένου πυκνωτή είναι ένα πολύπλοκο μέγεθος και είναι το άθροισμα δύο υποχωρητικοτήτων, της χωρητικότητας που δημιουργείται ενδιάμεσα από τα ηλεκτρόδια C (Normal Capacitance Between Beams) και από την χωρητικότητα που δημιουργείται από το άκρο του κάθε ηλεκτροδίου με την τοίχωμα C<sub>f</sub> (Fringe Capacitance). Στην εικόνα 2.2 φαίνεται η δημιουργία και η συνεισφορά της κάθε χωρητικότητας στο σύστημα:



Εικόνα 2.2: Αναπαράσταση πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων κατά την εφαρμογή τάσης στα άκρα του [20]

Συνεπώς η χωρητικότητα ενός τέτοιου πυκνωτή δίνεται από την σχέση:

$$\mathbf{C}_{\text{tot}} = \mathbf{C} + \mathbf{C}_f \quad (2.1)$$

Όπου η χωρητικότητα C θα δίνεται από την βασική σχέση χωρητικότητας ενός πυκνωτή:

$$C = \frac{\varepsilon A}{d} = \varepsilon_r \varepsilon_0 L_0 t / x_0 \quad (2.2)$$

Όπου ε<sub>0</sub> η διηλεκτρική σταθερά του αέρα

εr η σχετική διηλεκτρική σταθερά του υλικού ενδιάμεσα στο ηλεκτρόδια

t το πάχος των ηλεκτροδίων
x<sub>0</sub> η απόσταση των δοντιών μεταξύ τους

L<sub>0</sub> το βάθος των επικαλυπτόμενων δοντιών

Η χωρητικότητα C<sub>f</sub> ονομάζεται fringe capacitance και η συμβολή της είναι σημαντική και δεν μπορεί να αγνοηθεί. Ωστόσο η χωρητικότητα αυτή είναι εξαιρετικά μη γραμμική και αλλάζει με διαφορετικές αρχικές και οριακές συνθήκες. Για παράδειγμα εξαρτάται από το μήκος κάθε ηλεκτροδίου, καθώς και από το μήκος της επικαλυπτόμενης περιοχής L<sub>0</sub>, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.3. Όσο μεγαλώνει η απόσταση μεταξύ του ηλεκτροδίου από την άκρη, τόσο μειώνεται η χωρητικότητα C<sub>f</sub>, διότι η χωρητικότητα ενός πυκνωτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της απόστασης των δύο πλακών.



Εικόνα 2.3: Αναπαράσταση ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται στο εσωτερικό ενός πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων [20].

# 2.5.3 Θεωρητικός υπολογισμός της χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων και σύγκριση με αντίστοιχες τιμές προσομοίωσης.

Στην παρούσα εργασία θα πραγματοποιηθεί ο θεωρητικός υπολογισμός της χωρητικότητας του πυκνωτή και θα συγκριθεί με τις αντίστοιχες τιμές της προσομοίωσης. Συγκεκριμένα θα ληφθούν υπόψη οι τιμές της προσομοίωσης της δημοσίευσης Study of Capacitance in Electrostatic Comb-Drive Actuators B G Sheeparamatti, Prashant D. Hanasi, Vanita Aibbigeri, Naveen Meti [21]. Στην δημοσίευση πραγματοποιήθηκε η προσομοίωση ενός πυκνωτή αλληλεπικαλυπτόμενων ηλεκτροδίων με τα χαρακτηριστικά όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4:



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων που έγινε η προσομοίωση [21].

Από την εικόνα 2.4 λαμβάνονται τα εξής χαρακτηριστικά:

Μήκος ηλεκτροδίου	$1 = 100 \ \mu m$ ,
Μήκος αλληλεπικαλυπτόμενων ηλεκτροδίων	$l_0=90 \mu m$
Διάκενο ηλεκτροδίων	$d=5\mu m$
Πλάτος ηλεκτροδίων	$w = 5 \mu m$

Επίσης το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στην προσομοίωση αυτή είναι το πυρίτιο και τα χαρακτηριστικά του δίνονται από τον πίνακα 1:

Ιδιότητες	Πυρίτιο
Σταθερά του Young	170e9[Pa]
Αναλογία Poisson	0.28
Πυκνότητα	2329[kg/m <sup>3</sup> ]
Συντελεστής θερμικής διαστολής	2.6e-6[K <sup>-1</sup> ]

Θερμική αγωγιμότητα	130[W/(m*K)]
Διηλεκτρική σταθερά	11,7

Πίνακας 1: χαρακτηριστικά του υλικού που χρησιμοποιήθηκε κατά την προσομοίωση για τον πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων [21].

Στο σχήμα 2.5 παρουσιάζεται ο πυκνωτής που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση με 10 και με 20 ηλεκτρόδια αντίστοιχα, ενώ στο σχήμα 2.6 φαίνεται ο πυκνωτής για 100 ηλεκτρόδια:



Εικόνα 2.5: Στο αριστερό μέρος φαίνεται ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 10 ηλεκτρόδια, ενώ στο δεξί μέρος ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 20 ηλεκτρόδια [21].



Εικόνα 2.6: Στο αριστερό μέρος φαίνεται ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 100 ηλεκτρόδια [21].

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της προσομοίωσης και των θεωρητικών τιμών τους από την δημοσίευση. Τα αποτελέσματα έχουν χρησιμοποιήσει για διηλεκτρικό στο εσωτερικό του πυκνωτή τον αέρα.

Αριθμός ηλεκτροδίων	Τιμή προσομοίωσης (σε	Θεωρητική τιμή (σε Farad)
	Farad)	
5	1.5488*10 <sup>-13</sup>	1.50935*10 <sup>-13</sup>
10	3.1042*10 <sup>-13</sup>	3.0173*10 <sup>-13</sup>
20	8.8236*10 <sup>-13</sup>	6.0356*10 <sup>-13</sup>
30	1.2428*10 <sup>-12</sup>	0.905*10 <sup>-12</sup>
50	2.0640*10 <sup>-12</sup>	1.50895*10 <sup>-12</sup>
70	2.8873*10 <sup>-12</sup>	2.1125*10 <sup>-12</sup>
100	4.1181*10 <sup>-12</sup>	3.0173*10 <sup>-12</sup>
120	4.9364*10 <sup>-12</sup>	3.62136*10 <sup>-12</sup>
150	6.1674*10 <sup>-12</sup>	4.52645*10 <sup>-12</sup>

Πίνακας 2: Αποτελέσματα προσομοίωσης και των θεωρητικών υπολογισμών της χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων για τις διάφορες τιμές ηλεκτροδίων [21]

Για τον υπολογισμό των θεωρητικών τιμών του πίνακα 2 χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση (2.3):

$$C = N\varepsilon_0\varepsilon_r l_0 \frac{t}{d} + C_f \qquad (2.3)$$

Όπου Νο αριθμός των ηλεκτροδίων,

εο η διηλεκτρική σταθερά του κενού,

εr η σχετική διηλεκτρική σταθερά του υλικού,

 $l_0$  το μήκος των ηλεκτροδίων που καλύπτονται μεταξύ τους,

t το πάχος των ηλεκτροδίων,

d το διάκενο των ηλεκτροδίων.

### 2.5.4 Καμπύλη χωρητικότητας συναρτήσει των ηλεκτροδίων

Όπως έγινε κατανοητό, με την αύξηση των ηλεκτροδίων στους πυκνωτές ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων πραγματοποιείται η αύξηση της χωρητικότητάς του. Στην συνέχεια ακολουθεί το διάγραμμα 2.1, στο οποίο φαίνεται η αύξηση της χωρητικότητας του πυκνωτή συναρτήσει των ηλεκτροδίων. Το διάγραμμα 2.1 αναπαριστά την χωρητικότητα του πυκνωτή συναρτήσει των ηλεκτροδίων για τις τιμές της προσομοίωσης που λήφθηκαν υπόψη από τον πίνακα 2 για αριθμό ηλεκτροδίων από 5 έως 150.



Διάγραμμα 2.1: Χωρητικότητα πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων συναρτήσει του αριθμού των ηλεκτροδίων από 5 έως 150, σύμφωνα με τις τιμές προσομοίωσης του πίνακα 2. [21]

Από το διάγραμμα 2.1 συμπεραίνεται ότι η χωρητικότητα του ενός πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων και ο αριθμός των ηλεκτροδίων είναι ανάλογα ποσά. Στο διάγραμμα 2.2 παρουσιάζεται η καμπύλη που προκύπτει από τους θεωρητικούς υπολογισμούς της χωρητικότητας του πυκνωτή συναρτήσει του αριθμού των ηλεκτροδίων. Οι τιμές παρουσιάζονται στον πίνακα 2 και αφορούν την χωρητικότητα για αριθμό

ηλεκτροδίων από 5 έως 150. Στο διάγραμμα 2.2 αναπαρίσταται επίσης και η καμπύλη της προσομοίωσης για τον ίδιο αριθμό ηλεκτροδίων.



Διάγραμμα 2.2: Με το κόκκινο χρώμα αναπαρίσταται η χωρητικότητα πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων συναρτήσει του αριθμού των ηλεκτροδίων των θεωρητικών υπολογισμών ενώ με μαύρο χρώμα των προσομοιώσεων για αριθμό ηλεκτροδίων από 5 έως 150, σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 2 [21].

# **Β** ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

# 3 ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΠΥΚΝΩΤΗ

# 3.1 Στάδια κατασκευής

Ο αισθητήρας που θα κατασκευαστεί στην παρούσα εργασία, όπως ήδη αναφέρθηκε θα περιέχει έναν πυκνωτή ενδοεπικαλυπτόμενων ηλεκτροδίων. Συγκεκριμένα πρόκειται για βιοχημικούς αισθητήρες της κατηγορίας affinity biosensors. Συνεπώς για τα απαραίτητα πειράματα κατασκευάστηκαν αρκετοί πυκνωτές ενδοεπικαλυπτόμενων ηλεκτροδίων με διάφορα χαρακτηριστικά που θα αναλυθούν στην συνέχεια. Αναλόγως τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τον κάθε πυκνωτή, έγινε και μια εκτίμηση για τα χαρακτηριστικά που έδιναν καλύτερα πειραματικά αποτελέσματα. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την ανάπτυξη αυτών των πυκνωτών είναι τα εξής:

#### 3.1.1 Σχεδίαση του κυκλώματος

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η σχεδίαση του κυκλώματος. Για την σχεδίαση αυτή χρησιμοποιείται ειδικό λογισμικό, π.χ. το Autodesk Eagle. Προτιμώνται συνήθεις τύποι υποδοχών για την είσοδο και έξοδο του σήματος, όπως για παράδειγμα τύπος BNC, καθώς και για την τροφοδοσία. Οι πυκνωτές που κατασκευάστηκαν είχαν διαστάσεις 2 επί 1 εκατοστά, οι οποίοι διαθέτουν 10 ηλεκτρόδια (5 από κάθε πλευρά). Η σχεδίαση του κυκλώματος φαίνεται στην εικόνα 3.1.



Εικόνα 3.1: Σχεδίαση πυκνωτή δέκα ηλεκτροδίων και διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά

Αρχικά σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν πυκνωτές μεγαλύτερων διαστάσεων. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν πυκνωτές διαστάσεων 5 επί 5 και 4 επί 4 εκατοστά, οι οποίοι διέθεταν περισσότερα ηλεκτρόδια. Η σχεδίαση των πυκνωτών μεγαλύτερων διαστάσεων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2. Οι πυκνωτές όμως αυτοί ήταν δύσκολοι στην χρήση τους, με αποτέλεσμα να προτιμηθούν οι πυκνωτές μικρών διαστάσεων (2 επί 1 εκατοστά) διότι είχαν καλύτερη συμπεριφορά και ήταν περισσότερο ελέγξιμοι.



Εικόνα 3.2: Σχεδίαση πυκνωτών μεγαλύτερων διαστάσεων.

# 3.1.2 Εκτύπωση σε διαφάνεια

Σε δεύτερο στάδιο έρχεται η εκτύπωση σε διαφάνεια. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται η εκτύπωση του σχεδιασμένου κυκλώματος που έχει προηγηθεί πάνω σε ειδική διαφάνεια, η οποία στην συνέχεια τοποθετείται σε φωτοευαίσθητη πλάκα.

# 3.1.3 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία

Σε τρίτο στάδιο έρχεται η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στην εικόνα 3.3 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση μιας φωτοευαίσθητης πλακέτας.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση μια φωτοευαίσθητης πλακέτας. Στο πάνω μέρος βρίσκεται η διαφάνεια με το εκτυπωμένο σχέδιο του ηλεκτρικού κυκλώματος

Στο πάνω μέρος με το μαύρο χρώμα είναι τοποθετημένη η διαφάνεια με το ηλεκτρικό κύκλωμα. Η διαφάνεια αυτή επιτρέπει ή αποτρέπει τη διέλευση της υπεριώδους ακτινοβολίας ανά σημείο. Στην συνέχεια ακολουθεί με το μωβ χρώμα το φωτοευαίσθητο υπόστρωμα, όπου προστατεύει τον χαλκό κατά το στάδιο της αποχάλκωσης. Τρίτο με το καφέ χρώμα έρχεται ο χαλκός. Στο μέρος αυτό δημιουργούνται οι αγώγιμοι δρόμοι της πλακέτας. Τέλος με το πορτοκαλί χρώμα βρίσκεται το υπόστρωμα (FR-4) το οποίο αποτελεί τον μονωτή μεταξύ των αγώγιμων δρόμων.

Η φωτοευαίσθητη πλακέτα προστατεύεται με προστατευτικό αυτοκόλλητο σε σκοτεινό χώρο. Για να χρησιμοποιηθεί, αφαιρείται το προστατευτικό αυτοκόλλητο και τοποθετείται πάνω στην πλακέτα το εκτυπωμένο κύκλωμα. Η πλακέτα στην συνέχεια μαζί με το εκτυπωμένο κύκλωμα τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας και εκτίθεται για περίπου 5 λεπτά. Με τον τρόπο αυτόν οι περιοχές του φωτοευαίσθητου στρώματος που δεν καλύπτονται από τις μαύρες περιοχές της μάσκας, εκτίθενται στην υπεριώδη ακτινοβολία, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση της φωτοευαίσθητης πλακέτας κατά την έκθεση της στην υπεριώδη ακτινοβολία.

# 3.1.4 Εμφάνιση

Στο τέταρτο στάδιο ακολουθεί η εμφάνιση. Για να εμφανιστεί το σχεδιάγραμμα του εκτυπωμένου κυκλώματος, η πλακέτα (χωρίς την μάσκα) τοποθετείται σε διάλυμα NaOH (καυστική σόδα – developer). Ο χρόνος που τοποθετείται η πλακέτα στην καυστική σόδα διαφέρει ανάλογα την περιεκτικότητά της και αυτή η διαφορά κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα έως και 20 λεπτά. Η φωτοευαίσθητη πλακέτα χωρίζεται σε δύο μέρη, στις περιοχές του φωτοευαίσθητου στρώματος που επηρεάστηκαν από την υπεριώδη ακτινοβολία και απομακρύνονται από την πλακέτα (πλακέτα positive photoresist) και στις περιοχές που παραμένουν στην πλακέτα (πλακέτα negative photoresist). Με τον τρόπο αυτόν πραγματοποιείται η εμφάνιση του σχεδίου της μάσκας όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση φωτοευαίσθτης πλακέτας μετά την έκθεση της σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στις περιοχές όπου υπήρχε το εκτυπωμένο ηλεκτρικό κύκλωμα έχει σχηματιστεί το σχέδιο αυτό στην φωτοευαίσθητη πλακέτα, ενώ το υπόλοιπο μέρος έχει αφαιρεθεί λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας.

### 3.1.5 Αποχάλκωση

Στο επόμενο βήμα έρχεται η αποχάκλωση. Αφού η πλακέτα αφαιρεθεί από την καυστική σόδα, καθαρίζεται με νερό και τοποθετείται σε διάλυμα FeCl<sub>3</sub> (τριχλωριούχου σιδήρου). Το διάλυμα αυτό είναι ισχυρό διαβρωτικό με αποτέλεσμα να διαλύει τον χαλκό. Συνεπώς οι περιοχές του χαλκού που βρίσκονται κάτω από το φωτοευαίσθητο στρώμα προστατεύονται, ενώ οι υπόλοιπες απομακρύνονται. Ο χρόνος που απαιτείται στο βήμα αυτό εξαρτάται από την περιπλοκότητα του σχεδίου, την θερμοκρασία του περιβάλλοντος καθώς και την κατάσταση του διαλύματος και κυμαίνεται περίπου από 30 λεπτά έως και αρκετές

ώρες. Στην παρούσα εργασία για να επιταχυνθεί η διαδικασία αποχάλκωσης χρησιμοποιήθηκε ειδικός αναδευτήρας Orbital Shaker PSU – 10i Grand - bio, ο οποίος ήταν ενεργοποιημένος σε συχνότητα 80 rpm (rounds per minute), ο οποίος φαίνεται στην εικόνα 3.6. Στην εικόνα 3.6 φαίνεται ο αναδευτήρας στον οποίο είναι τοποθετημένο το διάλυμα τριχλωριούχου σιδήρου μαζί με τις φωτοευαίσθητες πλακέτες.



Εικόνα 3.6: Αναπαράσταση του αναδευτήρα Orbital Shaker PSU – 10i Grand – bio. Στον αναδευτήρα είναι τοποθετημένο το διάλυμα του τριχλωριούχου σιδήρου το οποίο περιέχει μέσα τις φωτοευαίσθητες πλακέτες

Μετά την εμφάνιση ολόκληρου του σχεδίου η πλακέτα καθαρίζεται αρχικά με ακετόνη, ώστε να απομακρυνθεί ο τριχλωριούχος σίδηρος καθώς και τα υπολείμματα

χαλκού και στην συνέχεια με λίγο νερό. Στην εικόνα 3.7 φαίνεται το τελικό αποτέλεσμα της φωτοευαίσθητης πλακέτας μετά την αποχάλκωση.



Εικόνα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση της φωτοευαίσθητης πλακέτας μετά την αποχάλκωση.

Με τον τρόπο αυτόν πραγματοποιείται η κατασκευή των πυκνωτών που θα χρησιμοποιηθούν στην παρούσα εργασία. Στην εικόνα 3.8 παρουσιάζεται ένας πυκνωτής μεγαλύτερων διαστάσεων 5 επί 5 εκατοστών, από τους οποίους είχαν παρασκευαστεί στην αρχή.



Εικόνα 3.8: Αναπαράσταση πυκνωτή μεγαλύτερων διαστάσεων (5 επί 5 εκατοστά) που παρασκευάστηκε.

# 3.1.6 Χαρακτηριστικά των πυκνωτών

Οι πυκνωτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Αποτελούνται από 10 ηλεκτρόδια, 5 από την κάθε μεριά.
- Τα ηλεκτρόδια έχουν μήκος 1.9 εκατοστά και πλάτος 0.5 χιλιοστά.
- Τα ηλεκτρόδια είναι κατασκευασμένα από χαλκό.
- Το πλάτος του πυκνωτή είναι 1 εκατοστό, συνεπώς οι διαστάσεις του είναι 2 επί 1 εκατοστά.
- Το διάκενο των ηλεκτροδίων είναι 0.5 χιλιοστά.

Ένας από τους πυκνωτές που παρασκευάστηκε φαίνεται στην εικόνα 3.9.



# Εικόνα 3.9: Αναπαράσταση πυκνωτή διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά.

Για να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις της χωρητικότητας ήταν αναγκαίο να συγκοληθούν καλώδια στα δύο άκρα του πυκνωτή και αυτό επιτεύχθηκε με κολλητήρι. Στην εικόνα 3.10 φαίνονται οι πυκνωτές μετά την προσθήκη καλωδίων στα άκρα τους.



Εικόνα 3.10: Αναπαράσταση πυκνωτή διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά μετά την προσθήκη καλωδίων με την χρήση κολλητηριού.

Στην συνέχεια μετρήθηκαν οι χωρητικότητες των πυκνωτών που κατασκευάστηκαν με την χρήση του μηχανήματος LCR Meter 380193 EXTECH INSTRUMENTS, το οποίο φαίνεται στην εικόνα 3.11. Η συχνότητα μέτρησης της χωρητικότητας των πυκνωτών με την χρήση αυτής της συσκευής ήταν 1kHz.



Εικόνα 3.11: Αναπαράσταση του μηχανήματος μέτρησης χωρητικότητας LCR Meter 380193 EXTECH INSTRUMENTS που χρησιμοποιήθηκε.

Μετρήθηκαν ενδεικτικά οι χωρητικότητες 5 πυκνωτών μετά την παρασκευή τους, έχοντας στο διάκενο τους αέρα. Οι τιμές καταγράφονται στον πίνακα 3.1:

Πυκνωτής	Χωρητικότητα σε pF
1	5
2	5.9
3	6
4	5

5	4

Πίνακας 3: Οι χωρητικότητες 5 χάλκινων πυκνωτών μικρών διαστάσεων (2 επί 1 εκατοστά), έχοντας στο διάκενο τους αέρα.

Στην εικόνα 3.12 φαίνεται η μέτρηση της χωρητικότητας του πρώτου πυκνωτή, όταν στο διάκενο των ηλεκτροδίων υπήρχε αέρας.



Εικόνα 3.12: Αναπαράσταση μέτρησης του πρώτου πυκνωτή, έχοντας στο διάκενο του αέρα.

# **4** ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΤΟΥ ΑCE2 ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ S

Στο παρόν κεφάλαιο θα γίνει αναφορά στις διαδικασίες και στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για να μπορέσει να εισαχθεί με επιτυχία ο υποδοχέας ACE2 και οι πρωτεΐνες S spikes στην επιφάνεια των πυκνωτών.

# 4.1 Τοποθέτηση του υποδοχέα ΑCE2 στους πυκνωτές

Για να τοποθετηθεί ο υποδοχέας ACE2 στους πυκνωτές αρχικά τοποθετήθηκε στους πυκνωτές ειδική ταινία διπλής όψης πάχους περίπου 2 χιλιοστών. Στην μέση της ταινίας ανοίχτηκε μικρή οπή διαμέτρου περίπου 6 χιλιοστών, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.1. Στόχος της οπής αυτής ήταν να κατασκευαστεί ένα πηγάδι το οποίο θα απομόνωνε την επιφάνεια στην οποία θα γινόντουσαν τα απαραίτητα πειράματα και μετρήσεις.



Εικόνα 4.1: Αναπαράσταση πυκνωτή με την προσθήκη ταινίας στην επιφάνειά τους. Στην μέση υπάρχει κυκλική οπή με σκοπό την δημιουργία πηγαδιού.

Αρχικά στο πηγάδι τοποθετήθηκε Κυστεΐνη (Cystein). Η κυστεΐνη πρόκειται για αμινοξύ με συντακτικό τύπο HO<sub>2</sub>CCH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>SH. Η κυστεΐνη διαθέτει μια πλευρική αλυσίδα η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία της χαρακτηριστικής ομάδας του σουλφυδρυλίου. Με την σειρά του το σουλφυδρύλιο της κυστεΐνης είναι πολύ δραστικό και συμμετέχει σε πολλές ενζυμικές αντιδράσεις [22]. Η κυστεΐνη είναι απαραίτητη να προστεθεί στην επιφάνεια του πυκνωτή για να μπορέσει να επιτραπεί η προσθήκη του ACE2 πάνω στον χαλκό. Στην εικόνα 4.2 φαίνεται ο πρώτος πυκνωτής, στον οποίο έχει τοποθετηθεί στο ειδικό πηγάδι η κυστεΐνη.



Εικόνα 4.2: Αναπαράσταση του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την τοποθέτηση της Κυστεΐνης στο εσωτερικό του πηγαδιού.

Η κυστεΐνη, όπως και όλα τα υπόλοιπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, τοποθετήθηκε με ειδικό σταγονόμετρο σε ποσότητα 40 μL (40 μικρό λίτρων). Το σταγονόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Eppendorf Research plus, με την χρήση ειδικών πιπέτων, τα οποία φαίνονται στην εικόνα 4.3.



Εικόνα 4.3: Σταγονόμετρο Eppendorf Research plus που χρησιμοποιήθηκε.

Στην συνέχεια αφήνεται η Κυστεΐνη να στεγνώσει μέσα στα πηγάδια των πυκνωτών για περίπου μία ώρα. Το μεγαλύτερο μέρος της προσροφήθηκε από τον πυκνωτή ενώ το υπόλοιπο αφαιρείται με PBS (Phosphate-buffered saline). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε για το κάθε ξέπλυμα 30 μL από PBS, το οποίο αφαιρούνταν με προσροφητικό χαρτί. Στην

εικόνα 4.4 φαίνεται ο πρώτος πυκνωτής μετά την αφαίρεση της κυστεΐνης κατά την μέτρηση της χωρητικότητάς του. Η τιμή της χωρητικότητας του πυκνωτή 1 μετά την προσθήκη της κυστεΐνης είναι  $C_1 = 673.4$  nF. Όπως ήταν αναμενόμενο υπήρξε μεγάλη αύξηση της χωρητικότητας διότι καλύφθηκε η εσωτερική επιφάνεια του πυκνωτή, με αποτέλεσμα να αλλάξει η διηλεκτρική σταθερά στο εσωτερικό του.



Εικόνα 4.4: Μέτρηση της χωρητικότητας του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την προσθήκη της Κυστεΐνης στο εσωτερικό του πηγαδιού.

Το ACE2 διατηρείται σε κατάψυξη στους -20°C. Για να ξεκολλήσει από τα τοιχώματα, ήταν απαραίτητη η χρήση φυγοκεντριτή, ο οποίος λειτουργούσε σε συχνότητα

10000rpm για λίγα δευτερόλεπτα. Ο φυγοκεντριτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο φυγοκεντριτής OHAUS και παρουσιάζεται στην εικόνα 4.5.





Για να τοποθετηθεί το ACE2 κατασκευάστηκε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε 5 μL ACE2, 5 μL EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) και 10 μL MES (2-(Nmorpholino)ethanesulfonic acid). Το EDC και το MES είναι απαραίτητα για να γίνει η χημική αντίδραση και να τοποθετηθεί το ACE2 στην επιφάνεια του χαλκού. Συγκεκριμένα το EDC και το MES ενεργοποιούν το καρβοξυλικό άκρο (-COOH) του ACE2. Με το που ενεργοποιηθεί το καβοξυλικό άκρο του ACE2 γίνεται η αντίδραση με την αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>) της κυστεΐνης σχηματίζοντας έναν ομοιοπολικό πεπτικό δεσμό. Με αυτόν τον τρόπο το ACE2 καταφέρνει να προσδεθεί στον πυκνωτή. Συνεπώς το διάλυμα που δημιουργήθηκε είχε όγκο 20 μL και είναι η κατάλληλη ποσότητα που τοποθετούταν στον κάθε πυκνωτή. Η διαδικασία της τοποθέτησης του ACE2 έπρεπε να γίνει με γρήγορους ρυθμούς για να αποφευχθεί η δημιουργία δεσμών μεταξύ των ενζύμων ACE2.

Μετά την τοποθέτηση του διαλύματος με το ACE2 πραγματοποιήθηκε συνεχής παρακολούθηση για να μην στεγνώσει η επιφάνεια του πυκνωτή. Κατά την διάρκεια της παρακολούθησης, όταν η επιφάνεια ενός πυκνωτή άρχισε να στεγνώνει επανατοποθετήθηκε MES. Το διάλυμα που περιείχε το ACE2 αφέθηκε στην επιφάνεια για περίπου μιάμιση ώρα. Μετά τον απαραίτητο χρόνο που χρειάστηκε για να στεγνώσει η επιφάνεια των πυκνωτών έγινε η καταμέτρηση της χωρητικότητας τους. Στην εικόνα 4.6 φαίνεται η καταμέτρηση της χωρητικότητας του διαλύματος το οποίο περιείχε τον υποδοχέα ACE2.



Εικόνα 4.6: Μέτρηση της χωρητικότητας του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την προσθήκη του διαλύματος που περιείχε τον υποδοχέα ACE2 στο εσωτερικό του πηγαδιού.

Για να γίνει εκτίμηση για το αν συνδέθηκε ο υποδοχέας ACE2 στην επιφάνεια του πυκνωτή έγιναν μετρήσεις της χωρητικότητας κάθε πυκνωτή μετά την προσθήκη του. Από τις μετρήσεις που λήφθηκαν συμπεραίνεται ότι πιθανότητα το ACE2 ήταν συνδεδεμένο στον χαλκό, αλλά ήταν αδύνατο να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια. Εκτιμήθηκε ότι από τα 100 ng ACE2 που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση, περίπου τα 20 έως 50 ng μπόρεσαν να συνδεθούν ομοιοπολικά στον χαλκό.

# 4.2 Τοποθέτηση των γλυκοπρωτεϊνών S Spike στην επιφάνεια των πυκνωτών

Πριν τοποθετηθούν οι γλυκοπρωτεΐνες S Spikes στην επιφάνεια των πυκνωτών, ξεπλένονται οι πυκνωτές με PBS, 4 φορές ο καθένας, ώστε να απομακρυνθούν τα σωματίδια του ACE2 που δεν έχουν προσκολλήσει στην επιφάνεια. Οι γλυκοπρωτεΐνες S συντηρούνται και αυτές σε κατάψυξη στους -20 °C για αυτό για να ξεκολλήσουν από τα τοιχώματα του δοχείου φυγοκεντρήθηκαν από τον φυγοκεντριτή OHAUS με συχνότητα 10000 rpm. Στην συνέχεια στον κάθε πυκνωτή τοποθετήθηκε ένα διάλυμα που κατασκευάστηκε το οποίο περιείχε 15 μL PBS και 5 μL Spike Protein.

# 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν οι μετρήσεις και οι διαδικασίες που ακολούθησαν καθώς και τα αντίστοιχα αποτελέσματα κάθε μέτρησης. Το πρώτο μέρος του κεφαλαίου έχει την αναλυτική πειραματική διαδικασία και μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τους χάλκινους πυκνωτές, ενώ στο δεύτερο μέρος υπάρχει η πειραματική διαδικασία και οι μετρήσεις χωρητικοτήτων για χρυσούς πυκνωτές.

### 5.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χάλκινων πυκνωτών

### 5.1.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χάλκινων πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου

Στο κομμάτι των πειραματικών, εργαστηριακών μετρήσεων ακολούθησαν δύο κατηγορίες πειραμάτων. Το πρώτο πείραμα είχε σκοπό την καταμέτρηση της χωρητικότητας του πυκνωτή σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τα πρώτα λεπτά μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes στην επιφάνειά του. Συγκεκριμένα μετά την τοποθέτηση του διαλύματος που περιείχε τις πρωτεΐνες S spikes πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της χωρητικότητας για 3 λεπτά. Αρχικά οι τιμές της χωρητικότητας αυξάνονταν επειδή η ταινία που έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του πηγαδιού δεν είναι τέλεια μονωμένη και υπάρχει διάχυση του υγρού. Με την διάχυση αυτή πραγματοποιείται αύξηση της διηλεκτρικής σταθεράς καθώς καλύπτεται μεγαλύτερο μέρος της εσωτερικής επιφάνειας του πυκνωτή με το διαλύματος. Έπειτα από μικρό χρονικό διάστημα η διάχυση σταματάει με αποτέλεσμα να αρχίζει η μείωση της χωρητικότητας. Μέχρι να αρχίσει να δημιουργούνται κάποιοι δεσμοί των πρωτεϊνών S spike με τον υποδοχέα ACE2.

Στον πίνακα 4 έγινε η καταγραφή των τιμών της χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου μετά την προσθήκη του διαλύματος που περιείχε τις πρωτεΐνες S spikes για τον πρώτο πυκνωτή. Οι τιμές της χωρητικότητας καταγράφονται ανά 5 δευτερόλεπτα για τα πρώτα 80 δευτερόλεπτα από την στιγμή που η χωρητικότητα ξεκίνησε να μειώνεται κάτω από την αρχική τιμή που είχε, έχοντας στο εσωτερικό του πυκνωτή μόνο το ACE2:

Χωρητικότητα C (nF)	χρόνος t (s)
1380	0
1364,7	5
1349,3	10
1343,9	15
1330,7	20
1317,1	25
1312,9	30
1300,1	35
1287,3	40
1275,1	45
1269,8	50
1257,8	55
1246,2	60
1233,4	65
1236	70
1222,7	75
1204	80

Πίνακας 4: Τιμές χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 80 δευτερόλεπτα μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes. Οι μετρήσεις έγιναν για 80 δευτερόλεπτα μετά την στιγμή που η χωρητικότητα έφτασε στην αρχική τιμή που είχε όσο στο εσωτερικό του πυκνωτή υπήρχε το ACE2

Σύμφωνα με τον πίνακα 4 δημιουργήθηκε το διάγραμμα 3.1, το οποίο απεικονίζει την καμπύλη της χωρητικότητας συναρτήσει με τον χρόνο, όταν στον πυκνωτή έχει προστεθεί η πρωτεΐνη S spike.



Διάγραμμα 5.1: Χωρητικότητα συναρτήσει του χρόνου μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes. Οι τιμές λήφθηκαν από τον πίνακα 4

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα υπήρξε μείωση της χωρητικότητας του πυκνωτή κατά την διάρκεια του χρόνου. Η μείωση της χωρητικότητας πραγματοποιήθηκε σχεδόν γραμμικά. Η κλίση της ευθείας θα είναι ανάλογη με την ποσότητα των πρωτεϊνών S spikes που καταφέρνουν να συνδεθούν με τους υποδοχείς ACE2 που βρίσκονται στην επιφάνεια του πυκνωτή.

Σύμφωνα με την εξίσωση 2.3 σελίδα 29, όταν στον πυκνωτή αυξάνεται η διηλεκτρική σταθερά στο εσωτερικό του επάγεται και η αύξηση της χωρητικότητας. Στην πραγματικότητα θα έπρεπε η χωρητικότητα του πυκνωτή μετά την τοποθέτηση του διαλύματος το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες S spikes va αυξάνεται διότι η διηλεκτρική σταθερά των S Spikes proteins είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από την διηλεκτρική σταθερά του υποδοχέα ACE2 [23]. Όμως από την εξίσωση 2.3 παρατηρείται ότι αυξάνοντας την απόσταση των ηλεκτροδίων του πυκνωτή η χωρητικότητα μειώνεται. Με την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S πραγματοποιούνται ολοένα και περισσότεροι δεσμοί με τους υποδοχείς

ACE2. Όταν ένα μόριο πρωτεΐνης δεσμεύεται από τον υποδοχέα, μετατοπίζονται τα αντίθετα φορτισμένα ιόντα που βρίσκονται κοντά στα ηλεκτρόδια του πυκνωτή, με αποτέλεσμα να υπάρχει μείωση της χωρητικότητας [19]. Όσο περισσότεροι δεσμοί πραγματοποιούνται μεταξύ των πρωτεϊνών S spikes και των υποδεχέων ACE2, τόσο περισσότερο επιτυγχάνεται η μετατόπιση των αντίθετων φορτισμένων ιόντων και συνεπώς τόσο μειώνεται η χωρητικότητα. Αυτό το φαινόμενο δικαιολογεί την μείωση της χωρητικότητας κατά το πέρασμα του χρόνου, διότι με την διάχυση του διαλύματος το οποίο περιέχει πρωτεΐνες S spikes, πραγματοποιούνται περισσότεροι δεσμοί με τους υποδοχείς ACE2.

# 5.1.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων σε δείγματα που τοποθετήθηκε πρωτεΐνη S spikes και σε δείγματα με πρωτεΐνη BSA

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν και άλλες μετρήσεις, καθώς επίσης έγινε και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με μία άλλη πρωτεΐνη αντί των πρωτεϊνών S spikes. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η BSA protein ή αλλιώς Bovine serum albumin. Η πρωτεΐνη BSA προέρχεται από τις αγελάδες και πρέπει να φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2 έως 8 °C. Είναι σφαιρική πρωτεΐνη και συχνά χρησιμοποιείται ως στάνταρ πρωτεΐνη σύγκρισης σε εργαστηριακά πειράματα. Έχει πολύ μεγάλη χρήση λόγω της έλλειψης επίδρασης σε διαφορετικές βιοχημικές αντιδράσεις καθώς δεν επηρεάζει άλλα ένζυμα που δεν τα χρειάζονται για την σταθεροποίηση της αντίδρασης [24]. Με το πείραμα αυτό θα πρέπει να ελεγχθεί η αξιοπιστία των αισθητήρων, δηλαδή αν οι αισθητήρες αυτοί μπορούν να μετρήσουν κάποια άλλη πρωτεΐνη αντί της πρωτεΐνης S spikes.

Οι πυκνωτές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό ήταν 12. Στους 10 από αυτούς πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις που έγιναν με την εξής σειρά:

- 1. Έχοντας αέρα στο εσωτερικό τους
- 2. Έχοντας εισάγει την κυστεΐνη στην επιφάνειά τους
- 3. Έχοντας εισάγει το διάλυμα που περιείχε το ACE2
- 4. Δέκα λεπτά μετά την εισαγωγή του διαλύματος που περιείχε τις πρωτεΐνες S spikes
- 5. Μετά από την πρώτη πλύση με PBS

- 6. Μετά την δεύτερη πλύση με PBS
- 7. Μετά την τρίτη πλύση με PBS.

Στους υπόλοιπους δύο πυκνωτές πραγματοποιήθηκαν οι ίδιες μετρήσεις με την διαφορά ότι δεν χορηγήθηκαν οι πρωτεΐνες S spikes όπως πριν. Στον έναν πυκνωτή μετά την τοποθέτηση του ACE2 χορηγήθηκε η πρωτεΐνη BSA, ενώ στον δεύτερο χορηγήθηκε ένα διάλυμα που περιείχε το μισό την πρωτεΐνη BSA και το άλλο μισό την πρωτεΐνη S spikes. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των 10 πυκνωτών που δεν χορηγήθηκε η πρωτεΐνη BSA, παρουσιάζονται στον πίνακα 5, ενώ τα αποτελέσματα των μετρήσεων των 2 πυκνωτών που χορηγήθηκε η πρωτεΐνη BSA φαίνονται στον πίνακα 6.

		C10 (nF)	C9 (nF)	C8(nF)	C7(nF)	C1(nF)	C2(nF)	C6(nF)	C3(nF)	C4(nF)	C5(nF)
Air		0,064	0,27	0,106	0,11	0,091	0,13		0,076	0,11	0,2
Cysteine		702	667	194	79	822	965	250	835	906,5	343
ACE2		1065	1069	180	74	123	1262	472	1201	1231	577
SPIKE											
before											
washing		961	622	145	32	820	1100	415	1062	705	516
after	1										
wash		1010	846			831,5	1148	431	1083	720	526
after	2										
washes		1047	880			817	1159	442	1129	739	543
after	3										
washes		1067	903	172	69	852	1174	458	1158	800	551

Πίνακας 5: Τιμές των χωρητικοτήτων των 10 πυκνωτών που τοποθετήθηκε στην επιφάνεια τους πρωτεΐνη S spikes.

	(Spike_half concentration+BSA)	BSA
Air	0,062	0,067
Cysteine	968	879
ACE2	1330	1100
After 10 minutes	1096	1090

SPIKE after 1 wash	1130	1090
SPIKE after 2 washes	1152	1095

Πίνακας 6: Τιμές των χωρητικοτήτων των 2 πυκνωτών στους οποίος στον πρώτο τοποθετήθηκε διάλυμα με μισή ποσότητα πρωτεΐνης S spikes και η υπόλοιπη με πρωτεΐνη BSA και ο δεύτερος όπου τοποθετήθηκε μόνο πρωτεΐνη BSA.

Σύμφωνα με τον πίνακα 5 δημιουργήθηκε το διάγραμμα 5.2 το οποίο απεικονίζει την χωρητικότητα 5 πυκνωτών κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Από το διάγραμμα 5.2 φαίνεται πως σε όλους τους πυκνωτές, ιδιαίτερα στους πυκνωτές C<sub>2</sub> και C<sub>4</sub>, οι χωρητικότητες τους μειώνονται πολύ μετά από την χορήγηση των πρωτεϊνών S spikes, όπως ήταν αναμενόμενο.





Στον πίνακα 6 πραγματοποιήθηκαν λιγότερες μετρήσεις. Αυτό συμβαίνει διότι στην περίπτωση του πυκνωτή που χορηγήθηκε μόνο η πρωτεΐνη BSA δεν παρουσιάστηκε σχεδόν καθόλου διαφορά στην χωρητικότητα πριν και μετά την χορήγησή της. Η τιμή της χωρητικότητας με το ACE2 στην επιφάνεια ήταν 1100nF ενώ με την εισαγωγή του BSA ήταν 1090 nF. Συνεπώς δεν χρειάστηκε να γίνουν άλλες μετρήσεις στον πυκνωτή αυτόν. Στην άλλη περίπτωση, στον πυκνωτή που χορηγήθηκε και η πρωτεΐνη BSA και η S spikes, παρατηρήθηκε μείωση της χωρητικότητας μετά την εισαγωγή τους. Συγκεκριμένα η χωρητικότητα του πυκνωτή με το ACE2 στην επιφάνειά του ήταν 1330nF και μετά την εισαγωγή των πρωτεϊνών έπεσε στα 1096nF. Σύμφωνα με τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη BSA δεν επηρεάζει καθόλου τις μετρήσεις. Οι μετρήσεις επηρεάζονται μονάχα από τις συνδέσεις των πρωτεϊνών S Spikes με τους υποδοχείς ACE2.

Στο διάγραμμα 5.3 φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση των χωρητικοτήτων των 3 πυκνωτών, ενός που περιείχε την πρωτεΐνη S spikes, ενός που περιείχε το διάλυμα που είχε το μισό την πρωτεΐνη BSA και το άλλο μισό την πρωτεΐνη S spikes και ενός που περιείχε μόνο την πρωτεΐνη BSA.



Wash

Διάγραμμα 5.3: Τιμή της χωρητικότητας για 2 πυκνωτές που τοποθετήθηκε η πρωτεΐνη BSA κατά την διάρκεια των πειραμάτων έχοντας στο διάκενο α) αέρα, β) κυστεΐνη, γ) ACE2, δ) S spikes, ε) μετά από πρώτη πλύση PBS, στ) μετά από δεύτερη πλύση PBS, ζ) μετά από Τρίτη πλύση PBS. Με το γκρι χρώμα είναι η καμπύλη του πυκνωτή που τοποθετήθηκε μόνο πρωτεΐνη BSA, ενώ με το κίτρινο χρώμα η καμπύλη του πυκνωτή που τοποθετήθηκε και BSA και S spikes. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται και η πορτοκαλί καμπύλη ενός πυκνωτή που τοποθετήθηκε πρωτεΐνη S spikes.

Στο διάγραμμα αυτό γίνεται εύκολα η παρατήρηση που αναφέρθηκε προηγουμένως. Παρατηρείται δηλαδή ότι ο πυκνωτής που περιείχε μόνο την πρωτεΐνη BSA (μωβ καμπύλη) δεν άλλαξε σχεδόν καθόλου ως προς την χωρητικότητά του μετά την χορήγησή του. Επίσης μετά από τις πλύσεις που πραγματοποιήθηκαν η τελική χωρητικότητα αυτού του πυκνωτή έφτασε σχεδόν στην αρχική τιμή που είχε η χωρητικότητά του, όσο είχε και με τον υποδοχέα ACE2.

Στις άλλες δυο καμπύλες (πορτοκαλί και κίτρινες), επειδή τα διαλύματα που τοποθετήθηκαν περιείχαν τις πρωτεΐνες S spikes, παρατηρείται η μεγάλη μείωση της χωρητικότητας μετά από 10 λεπτά από την τοποθέτηση τους. Επίσης παρατηρείται ότι μετά από τις τρεις πλύσεις η χωρητικότητα των πυκνωτών δεν ανεβαίνει ιδιαίτερα πολύ. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες S spikes έχουν δημιουργήσει δεσμούς με τους υποδοχείς ACE2 και δεν διαχωρίζονται από την επιφάνεια του πυκνωτή με το πέρας των πλύσεων. Προφανώς ο πυκνωτής που περιείχε μόνο την πρωτεΐνη S spikes παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση της χωρητικότητάς του και η τιμή μετά τις 3 πλυσίματα δεν άλλαξε πολύ.

#### 5.1.3 Πειραματικά δεδομένα χάλκινων πυκνωτών σε πραγματικές συνθήκες

Το τρίτο κομμάτι των πειραμάτων περιλάμβανε την δοκιμή του αισθητήρα με τους χάλκινους πυκνωτές με πραγματικά δεδομένα. Κατασκευάστηκαν οι πυκνωτές ακριβώς με την ίδια διαδικασία που ακολουθήθηκε στο κεφάλαιο 3 και 4. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 28 ανθρώπους, από τους οποίους λήφθηκαν τα δείγματα από την μύτη τους. Από το κάθε βαμβακοφόρο στυλεό, που χρησιμοποιήθηκαν για να ληφθούν τα απαραίτητα δείγματα, 40 μL δείγματος τοποθετήθηκαν στην οπή που είχε δημιουργηθεί στην ταινία πάνω στην επιφάνεια κάθε πυκνωτή. Μετά την τοποθέτηση του δείγματος πραγματοποιήθηκε η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο για τα επόμενα 3 με 4 λεπτά.

Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε κατάσταση τυφλού-τυφλού, δηλαδή:

- Τα δείγματα που λήφθηκαν δοκιμάστηκαν πρώτα στο εργαστήριο με την μορφή μέτρησης χωρητικότητας,
- Στην συνέχεια, υποβλήθηκαν σε δοκιμές RT PCR.

Ο συνολικός αριθμός των θετικών δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν από το RT PCR ήταν 8 και τα αρνητικά 20. Οι μετρήσεις της χωρητικότητας που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο έδειξε μικρές αλλαγές στην χωρητικότητα των δειγμάτων που βγήκαν αρνητικά. Συγκεκριμένα υπήρξε μια μικρή μείωση της τάξης του 5-8%. Στα δείγματα που βγήκαν θετικά υπήρξαν μεγαλύτερες μειώσεις της χωρητικότητας, οι οποίες ήταν περίπου της τάξης 12-22%.

Αναμενόταν οι πραγματικές δοκιμές να μην είναι ιδανικές και να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα, λόγω της ανάμιξης πρωτεϊνών, βακτηρίων και λοιπών από το δείγμα. Παρόλα αυτά στις μετρήσεις της χωρητικότητας υπήρξαν μόνο δύο αποτελέσματα που δεν συμβάδιζαν με τα αποτελέσματα του RT PCR. Μία από τις μετρήσεις που είχε μικρή αλλαγή στην χωρητικότητα και καταχωρήθηκε ως αρνητικό δείγμα, αποκαλύφθηκε από τις μετρήσεις RT PCR πως ήταν θετικό και μία από τις μετρήσεις που παρουσίασαν μεγάλη μείωση και καταχωρήθηκε ως θετική, εν τέλει προέκυψε πως ήταν αρνητικό δείγμα.

Παρατηρήθηκε ότι για τα 20 αρνητικά αποτελέσματα οι χωρητικότητες τους στην διάρκεια των πρώτων λεπτών ήταν είτε σταθερές είτε παρουσίαζαν μικρές αυξομειώσεις. Γενικότερα όλες οι μετρήσεις είχαν καθοδική πορεία, με το εύρος των αλλαγών να κυμαίνεται περίπου από το 5-8%. Στον πίνακα 7 και 8 παρουσιάζονται οι τιμές της χωρητικότητας των πυκνωτών για 6 από τα αρνητικά δείγματα που συλλέχθηκαν, τα οποία παρουσίασαν την μεγαλύτερη αλλαγή χωρητικότητας.

Δειγμα	1 (-)	1 (-)	2 (-)	2 (-)	3 (-)	3 (-)
1s	3.035	100%	1107	100,00%	2646	100,00%
5s	3027	100%	1105,7	99,88%	2634	99,55%

10s	3019	99%	1103,8	99,71%	2622	99,09%
15s	3010	99%	1101,1	99,47%	2596	98,11%
20s	2994	99%	1098,2	99,21%	2571	97,17%
25s	2980	98%	1094,7	98,89%	2552	96,45%
30s	2967	98%	1090,8	98,54%	2542	96,07%
40s	2942	97%	1086,7	98,17%	2527	95,50%
50s	2919	96%	1082,6	97,80%	2519	95,20%
60s	2896	95%	1078,7	97,44%	2512	94,94%
70s	2873	95%	1074,9	97,10%	2504	94,63%
80s	2851	94%	1071,6	96,80%	2496	94,33%
90s	2841	94%	1068,1	96,49%	2488	94,03%
100s	2832	93%	1065,5	96,25%	2483	93,84%
110s	2814	93%	1063	96,03%	2479	93,69%
120s	2802	92%	1060,6	95,81%	2477	93,61%
150s	2789	92%	1048,6	94,72%	2471	93,39%

Πίνακας 7: Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 1(-), 2(-) και 3(-) που βρέθηκαν αρνητικά αποτελέσματα

Δειγμα	4 (-)	4 (-)	5 (-)	5 (-)	6 (-)	6 (-)
1s	1917,2	100,00%	1793,9	100,00%	1792,5	100,00%
5s	1892,8	98,73%	1791,4	99,86%	1781,9	99,41%
10s	1876,3	97,87%	1775,7	98,99%	1774,9	99,02%
15s	1865,9	97,32%	1767,2	98,51%	1765,3	98,48%
20s	1832,9	95,60%	1759,5	98,08%	1761,4	98,26%
25s	1826	95,24%	1747	97,39%	1757,8	98,06%
30s	1800,2	93,90%	1742,4	97,13%	1754	97,85%
40s	1782,9	92,99%	1738	96,88%	1748,1	97,52%
50s	1751,6	91,36%	1733,2	96,62%	1742,1	97,19%
60s	1741,4	90,83%	1721,8	95,98%	1737,6	96,94%
70s	1725,9	90,02%	1712,3	95,45%	1733,8	96,73%
80s	1708,3	89,10%	1701,8	94,87%	1730,7	96,55%
90s	1694,7	88,39%	1698,1	94,66%	1728,5	96,43%

100s	1683,2	87,79%	1694,6	94,46%	1722,1	96,07%
110s	1672,1	87,22%	1689,6	94,19%	1719,7	95,94%
120s	1662,7	86,73%	1685,7	93,97%	1712,6	95,54%
150s	1638,5	85,46%	1674,9	93,37%	1707,9	95,28%

Πίνακας 8: Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 4(-), 5(-) και 6(-) που βρέθηκαν αρνητικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα του πυκνωτή 4(-) είναι τα λανθασμένα θετικά.

Στην διάγραμμα 5.1 απεικονίζεται η εξάρτηση της χωρητικότητας με τον χρόνο για τα 6 ενδεικτικά δείγματα, τα οποία παρουσίασαν την μεγαλύτερη αλλαγή χωρητικότητας που αναγράφονται στους πίνακες 7 και 8. Στα δείγματα αυτά συμπεριλαμβάνεται και το λανθασμένο θετικό αποτέλεσμα, το οποίο απεικονίζεται με την καμπύλη του κίτρινου χρώματος με τον αριθμό 4 (-).



Διάγραμμα 5.4: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 150 δευτερόλεπτα. Στο διάγραμμα αυτό βρίσκονται οι 6 πυκνωτές οι οποίοι είχαν αρνητικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου και του λανθασμένου θετικού αποτελέσματος με την κίτρινη καμπύλη 4(-).

Οι καμπύλες του διαγράμματος 5.1, εκτός της λανθασμένης, φαίνεται ότι για τα πρώτα δυόμιση λεπτά δεν πέφτουν κάτω από το 90%.

Για τα 8 δείγματα που βγήκαν θετικά παρατηρήθηκε ότι η χωρητικότητα μετά από μια μικρή αρχική αύξηση, μειώνεται συνεχώς και γρήγορα. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χωρητικότητας τεσσάρων από τα 8 θετικά δείγματα συναρτήσει του χρόνου.

Δειγμα	1 (+)	1 (+)	2 (+)	2 (+)	3 (+)	3 (+)	4 (+)	4 (+)
1s	752,2	100,00%	1863,1	100,00%	1671,2	100,00%	1677,4	100,00%
5s	749,6	99,65%	1856,3	99,64%	1670,7	99,97%	1676,1	99,92%
10s	744,5	98,98%	1820,6	97,72%	1670	99,93%	1672,9	99,73%
15s	736,2	97,87%	1808,1	97,05%	1668,6	99,84%	1668	99,44%
20s	723,2	96,14%	1775,2	95,28%	1667,1	99,75%	1662	99,08%
25s	713,8	94,89%	1764,2	94,69%	1665,4	99,65%	1655,7	98,71%
30s	706,1	93,87%	1732	92,96%	1663,3	99,53%	1647,8	98,24%
40s	694,3	92,30%	1697,4	91,11%	1658,7	99,25%	1633,3	97,37%
50s	685,9	91,19%	1663,4	89,28%	1654,9	99,02%	1614,5	96,25%
60s	679,2	90,30%	1651,1	88,62%	1650,9	98,79%	1598,6	95,30%
70s	674,5	89,67%	1622,3	87,08%	1647	98,55%	1583,6	94,41%
80s	669,9	89,06%	1594,1	85,56%	1642,4	98,28%	1568,5	93,51%
90s	666,3	88,58%	1561,9	83,83%	1638,9	98,07%	1556	92,76%
100s	662,2	88,04%	1552	83,30%	1635,4	97,86%	1543,5	92,02%
110s	658,9	87,60%	1527	81,96%	1631,2	97,61%	1533,1	91,40%
120s	655,6	87,16%	1502,9	80,67%	1626,7	97,34%	1521,4	90,70%
150s	648,1	86,16%	1463,5	78,55%	1613,7	96,56%	1494,3	89,08%

Πίνακας 9: Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 1(+), 2(+). 3(+) και 4(+) που βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα, Στον πίνακα αυτόν βρίσκεται και το λανθασμένο αρνητικό αποτέλεσμα 3(+).

Στην διάγραμμα 5.2 απεικονίζεται η εξάρτηση της χωρητικότητας με τον χρόνο για τα 4 ενδεικτικά θετικά δείγματα που φαίνονται στον πίνακα 9. Στα δείγματα αυτά συμπεριλαμβάνεται και το λανθασμένο αρνητικό, το οποίο απεικονίζεται με την μωβ καμπύλη και έχει τον αριθμό 3 (+).


Διάγραμμα 5.5: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 150 δευτερόλεπτα. Στο διάγραμμα αυτό βρίσκονται οι 4 πυκνωτές οι οποίοι είχαν θετικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου και του λανθασμένου αρνητικού αποτελέσματος με την μωβ καμπύλη 3(+).

Στο διάγραμμα 5.2 φαίνεται η μεγάλη μείωση της χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου. Με εξαίρεση την καμπύλη του λανθασμένου αποτελέσματος, οι άλλες τρεις φαίνονται να μειώνονται γρήγορα και να φτάνουν σε τιμές μείωσης από 12-22%.

Όλες οι μετρήσεις της χωρητικότητας καταγράφονταν σε βίντεο για να μην χάνεται καμία τιμή. Οι τιμές αυτές παρουσίαζαν μικρές ταλαντώσεις, έχοντας πάντα καθοδική πορεία. Οι ταλαντώσεις και οι διακυμάνσεις θα μπορούσαν να οφείλονται στην εξάτμιση του δείγματος από την επιφάνεια του αισθητήρα (τα πειράματα διεξήχθησαν μέσα σε έναν ειδικό απορροφητήρα με ισχυρή ροή αέρα για την αποφυγή διαφυγής του ιού καθώς και για την ασφάλεια των χειριστών), καθώς και σε συστηματικά σφάλματα του οργάνου μέτρησης.

### 5.2 Μετρήσεις χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών

Όπως αναφέρθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, ο αισθητήρας που κατασκευάστηκε περιείχε χάλκινο πυκνωτή αλληλοεπικαλυπτόμενων ηλετροδίων. Οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τους πυκνωτές αυτούς παρουσίαζαν μερικά σφάλματα, τα οποία οφείλονταν στις φυσικές ιδιότητες του χαλκού. Τα σφάλματα των αποτελεσμάτων αναγράφονται στο κεφάλαιο 6.2. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και με αισθητήρες, οι οποίοι περιείχαν πυκνωτές που ήταν από χρυσό. Ο κύριος λόγος που επιλέχτηκε ο χρυσός ήταν επειδή ο χρυσός πρόκειται για ένα ευγενή μέταλλο το οποίο δεν οξειδώνεται, συνεπώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν οι αισθητήρες για περισσότερο από μια μέτρηση.

Για να πραγματοποιηθούν μετρήσεις με τους χρυσούς πυκνωτές, ακολούθησε η διαδικασία εναπόθεσης του υποδοχέα ACE2, η οποία έχει αναγραφεί αναλυτικά στην ενότητα 4.1. Οι χρυσοί πυκνωτές ήταν μικρότεροι από τους χάλκινους καθώς επίσης ήταν και τυποποιημένοι. Είχαν όλοι τις ίδιες διαστάσεις, οι οποίες ήταν:

- Μήκος ηλεκτροδίου 6 mm
- Πλάτος ηλεκτροδίου 200 μm
- Πλάτος διάκενου 200 μm
- Αριθμός ηλεκτροδίων 16, δηλαδή 8 από κάθε πλευρά.

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιούνταν οι μετρήσεις της χωρητικότητας των πυκνωτών. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν οι χωρητικότητες δύο πυκνωτών C1 και C2, όταν είχαν στην επιφάνεια τους κυστεΐνη και τον υποδοχέα ACE2.

#### 5.2.1 Μετρήσεις χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου

Μετά την εναπόθεση των υποδοχέων ACE2, τοποθετήθηκαν και οι πρωτεΐνες S spikes, με την ίδια διαδικασία που αναγράφεται στην ενότητα 4.2. Ακολούθησαν οι μετρήσεις της χωρητικότητας των πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου για τους δύο πυκνωτές C<sub>1</sub> και C<sub>2</sub>. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι τιμές της χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου, για τα πρώτα 3 λεπτά των μετρήσεων.

SPIKE	C1	C1	C2	C2
1s	4.650	100,000%	4.979	100,000%
5s	4.630	99,570%	4.970	99,819%
10s	4.623	99,419%	4.961	99,638%
15s	4.617	99,290%	4.949	99,397%
20s	4.608	99,097%	4.929	98,996%
25s	4.597	98,860%	4.914	98,695%
30s	4.583	98,559%	4.900	98,413%
40s	4.562	98,108%	4.878	97,971%
50s	4.542	97,677%	4.866	97,730%
60s	4.526	97,333%	4.839	97,188%
70s	4.511	97,011%	4.826	96,927%
80s	4.499	96,753%	4.811	96,626%
90s	4.487	96,495%	4.799	96,385%
100s	4.477	96,280%	4.790	96,204%
110s	4.465	96,022%	4.779	95,983%
120s	4.456	95,828%	4.769	95,782%
150s	4.431	95,290%	4.743	95,260%
180s	4.406	94,753%	4.720	94,798%

Πίνακας 10: Τιμές χωρητικότητας κατά την διάρκεια των 3 πρώτων λεπτών μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes για τους χρυσούς πυκνωτές.

Σύμφωνα με τον πίνακα 10 κατασκευάστηκε το διάγραμμα 5.5, το οποίο απεικονίζει το ποσοστό μείωσης της χωρητικότητας των πυκνωτών συναρτήσει του χρόνου για τα 3 λεπτά μετά την τοποθέτηση της πρωτεΐνης S spikes.



Διάγραμμα 5.6: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα 3 πρώτα λεπτά μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes στην επιφάνεια των χρυσών πυκνωτών.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 5.5, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα στις δύο καμπύλες. Αυτό συμβαίνει διότι σε αντίθεση με τους χάλκινους πυκνωτές, οι χρυσοί είναι τυποποιημένοι και παρασκευασμένοι σε βιομηχανικό περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να συμπεριφέρονται σχεδόν το ίδιο στις διάφορες μετρήσεις που έγιναν.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα που είχαν οι χρυσοί πυκνωτές ήταν οι μικρές διαστάσεις τους. Λόγω του μικρού μεγέθους δεν χρειάστηκε η ειδική ταινία που είχε χρησιμοποιηθεί στους χάλκινους πυκνωτές, καθώς οι μικρές ποσότητες υγρών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετές για να καλύψουν όλη την επιφάνεια τους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αποφευχθεί η διάχυση των υγρών και συνεπώς οι χωρητικότητές των πυκνωτών να μην παρουσιάζουν έντονες αυξομειώσεις.

Έπειτα οι πυκνωτές αφέθηκαν για 8 λεπτά, όπου έγινε άλλη μία μέτρηση της χωρητικότητάς τους. Πραγματοποιήθηκε και μια τελευταία μέτρηση για τις χωρητικότητές

τους, έπειτα από το πλύσιμο των αισθητήρων με PBS. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

	C1(µF)	C2(µF)
Cysteine	4.650	3.940
ACE2	5.180	4.900
SPIKE (μετά από 8 λεπτά)	3.900	3.800
Washed	4.340	4.070

Πίνακας 11: Τιμές χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών καθώς άλλαζε το υλικό που υπήρχε στο εσωτερικό τους διάκενο.

Σύμφωνα με τον πίνακα 11 κατασκευάστηκε το διάγραμμα 5.6 το οποίο απεικονίζει τις χωρητικότητες των πυκνωτών C<sub>1</sub> και C<sub>2</sub>, κατά το πέρας των πειραμάτων.





Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, υπάρχει πολύ μικρή διαφορά ανάμεσα στις χωρητικότητες που μετρήθηκαν για τους δύο πυκνωτές. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός πως οι πυκνωτές ήταν τυποποιημένοι.



### 6.1 Σύνοψη και συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο κεφάλαιο 4 φαίνεται ότι τόσο στους χάλκινους όσο και στους χρυσούς πυκνωτές, το ένζυμο ACE2 το οποίο είναι ο κύριος υποδοχέας για τις πρωτεΐνες S spikes του SARS-CoV-2, τοποθετείται στην επιφάνεια τους με επιτυχία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αισθητήρες μπορούν να ανιχνεύουν με μεγάλη επιτυχία τις πρωτεΐνες S spikes, κατά τις εργαστηριακές δοκιμές. Επιπλέον τα πειράματα που περιγράφονται στο κεφάλαιο 5, αποδεικνύεται πως οι χάλκινοι πυκνωτές μπορούν να λειτουργήσουν ως αισθητήρες μέτρησης του SARS-CoV-2, ακόμη και σε νοσοκομειακό περιβάλλον. Συγκεκριμένα οι χάλκινοι πυκνωτές είχαν ποσοστό επιτυχίας το οποίο έφτανε στο 92% (26 στα 28 δείγματα), κατά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με πραγματικά δεδομένα, καθώς ανίχνευσαν σωστά ότι 19 από τα 20 δείγματα ήταν αρνητικά και 7 από τα 8 δείγματα πως ήταν θετικά.

Οι χρυσοί πυκνωτές έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα στα εργαστηριακά πειράματα κατά τις μετρήσεις ανίχνευσης των πρωτεϊνών S spikes. Χρειάζονται όμως να γίνουν και οι απαραίτητες δοκιμές και μετρήσεις με πραγματικά δεδομένα για να βγει ένα ολοκληρωμένο συμπέρασμα.

Συμπερασματικά, οι μέθοδοι εναπόθεσης του υποδοχέα ACE2 που περιεγράφηκαν στο κεφάλαιο 4, καθώς και ο τρόπος των μετρήσεων της χωρητικότητας των πυκνωτών έδωσαν σωστά αποτελέσματα, κυρίως για τους χάλκινους πυκνωτές. Τέλος να σημειωθεί ότι οι αισθητήρες αυτοί μπορούν να ανιχνεύουν τις πρωτεΐνες S spikes σε λιγότερο από τα πρώτα 10 λεπτά μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην επιφάνειά τους, κάνοντάς τους έναν γρήγορο τρόπο ανίχνευσης του ιού.

### 6.2 Σφάλματα κατά τις μετρήσεις

Όπως έχει παρατηρηθεί οι μετρήσεις που λαμβάνονται είναι πολύ μικρής χωρητικότητας της τάξης των nF έως μF. Στο πρώτο κομμάτι των πειραμάτων, όπως έχει αναφερθεί, όλα τα ηλεκτρονικά που χρησιμοποιούνται στον πυκνωτή είναι από χαλκό. Ο χαλκός όμως οξειδώνεται εύκολα μετά την αρχική τοποθέτηση της κυστεΐνης και του υποδοχέα ACE2 στην επιφάνεια του πυκνωτή. Για τον λόγο αυτόν είναι δύσκολο να ξαναγίνουν μετρήσεις στους ίδιους πυκνωτές γιατί τα αποτελέσματα θα επηρεάζονται από τον οξειδωμένο χαλκό και δεν θα είναι αντικειμενικά. Επίσης ένα ακόμα πρόβλημα είναι ότι η επιφάνεια των πυκνωτών είναι καλυμμένη με ειδική ταινία στην οποία στο κέντρο της έχει ανοιχθεί μικρή οπή. Στην οπή αυτή πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα που αναφέρθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Το πρόβλημα που δημιουργείται είναι ότι η οπή δεν είναι τέλεια μονωμένη. Συνεπώς το υγρό που τοποθετείται μπορεί να διεισδύσει και στον υπόλοιπο πυκνωτή, αυξάνοντας του έτσι την χωρητικότητά του. Αυτό δημιουργεί λανθασμένα αποτελέσματα, διότι οι πρωτεΐνες Spikel μειώνουν την χωρητικότητα. Τέλος ένα ακόμα πρόβλημα που δημιουργείται είναι ότι οι πυκνωτές από χαλκό δεν είναι τυποποιημένοι, με αποτέλεσμα να δίνουν ο κάθε ένας από αυτούς διαφορετικά αποτελέσματα και να μην μπορεί να δημιουργηθεί ένα ακριβής μοντέλο που να περιγράψει τα αποτελέσματα που λαμβάνονταν.

Οι πυκνωτές από χρυσό δεν παρουσίασαν τα παραπάνω προβλήματα, διότι ο χρυσός δεν οξειδώνεται, ήταν αρκετά μικρών διαστάσεων ώστε να μην χρειάζονται να καλυφθεί η επιφάνειά τους με την ειδική ταινία και ήταν τυποποιημένοι με αποτέλεσμα να δίνουν όλοι τους παρόμοια αποτελέσματα.

## 6.3 Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες

Εκκινώντας από τα παραπάνω αποτελέσματα επόμενες εργασίες πάνω στο αντικείμενο μπορούν:

- Να επιχειρήσουν την κατασκευή χάλκινων πυκνωτών μικρότερων διαστάσεων, για να μπορεί να αποφευχθεί η χρήση της ειδικής ταινίας και της οπής. Με τον τρόπο αυτόν δεν θα υπήρχε διάχυση των υγρών και τα αποτελέσματα θα ήταν πιο ακριβή.
- Η τυποποιημένη παρασκευή χάλκινων πυκνωτών θα έδινε συγκεκριμένα αποτελέσματα. Με τον τρόπο αυτόν θα μπορούσαν να δημιουργηθούν μαθηματικά μοντέλα για τον προσδιορισμό της ποσότητας των σωματιδίων SARS-CoV-2 στα δείγματα.
- Περισσότερες δοκιμές με τους χρυσούς πυκνωτές. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο
  6.2 οι χάλκινοι πυκνωτές παρουσιάζουν αρκετά σφάλματα λόγω της φύσης του χαλκού. Συνεπώς ο χρυσός είναι το κατάλληλο υλικό που μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα και την αξιοπιστία αυτών των αισθητήρων. Θα χρειαστούν αρκετές εργαστηριακές μελέτες, τόσο για τον τρόπο σύνδεσής των ενζύμων ACE2 στην επιφάνειά τους, όσο και για τον τρόπο σύνδεσης των δειγμάτων που περιέχουν τα σωματίδια SARS-CoV-2.

# 7 βιβλιογραφια

- B. Zhang and H. Zhouid, "Study on SARS-CoV-2 transmission and the effects of control measures in China," 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0242649. (σελ. 1)
- [2] B. Pfefferbaum and C. S. North, "Mental Health and the Covid-19 Pandemic," N. *Engl. J. Med.*, vol. 383, no. 6, pp. 510–512, Aug. 2020, doi: 10.1056/nejmp2008017. (σελ. 2)
- Q. X. Long *et al.*, "Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 8, pp. 1200–1204, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0965-6. (σελ.2)
- [4] H. Harapan *et al.*, "Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review," *Journal of Infection and Public Health*, vol. 13, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 667–673, May 01, 2020, doi: 10.1016/j.jiph.2020.03.019. (σελ. 3)
- [5] A. C. Walls, Y. J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, and D. Veesler, "Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein," *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 281-292.e6, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. (σελ..3)
- [6] 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, May 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5. (σελ. 3)
- [7] "Schematic representation of coronavirus structure showing M (membrane)... | Download Scientific Diagram." https://www.researchgate.net/figure/Schematicrepresentation-of-coronavirus-structure-showing-M-membrane-protein-S-Spike\_fig6\_342129073 (accessed Jan. 31, 2021). (σελ. 4)
- [8] R. S. Glass, *Fundamentals of organic chemistry*, vol. 60, no. 10. 1983. (σελ. 4, 5, 7)
- [9] J. Shang *et al.*, "Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2," *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 221–224, May 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2179-y. (σελ. 8)
- [10] M. Dong *et al.*, "ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 131. Elsevier Masson SAS, p. 110678, Nov. 01, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110678. (σελ. 9)
- [11] "Amino acid Amino acid reactions | Britannica." https://www.britannica.com/science/amino-acid/Amino-acid-reactions (accessed

Feb. 01, 2021). (σελ. 9, 10)

- [12] A. Heurich, H. Hofmann-Winkler, S. Gierer, T. Liepold, O. Jahn, and S. Pohlmann, "TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein," J. Virol., vol. 88, no. 2, pp. 1293–1307, Jan. 2014, doi: 10.1128/jvi.02202-13. (σελ. 11)
- [13] "COVID-19." http://www.cogershop.com/sars-cov-2-covid-19.htm?page=1 (accessed Jan. 31, 2021). (σελ. 12)
- [14] Y. Xie *et al.*, "Spike Proteins of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Utilize Different Mechanisms to Bind With Human ACE2," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 7, Dec. 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.591873. (σελ 12, 14, 17)
- [15] "LabCorp COVID-19 RT-PCR test EUA Summary." (σελ. 18)
- [16] "Με ποιον τρόπο διενεργείται το τεστ για τον νέο κορωνοϊό SARS-Cov-2 στο ΥΓΕΙΑ; | Νοσοκομείο ΥΓΕΙΑ." https://www.hygeia.gr/me-poion-tropo-dienergeitaito-test-gia-ton-neo-koronoio-sars-cov-2-sto-ygeia/ (accessed Feb. 08, 2021). (σελ. 19)
- [17] "ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ." (σελ. 21)
- [18] "Affinity Biosensors," *Tech. Instrum. Anal. Chem.*, vol. 11, no. 100, pp. 253–290, Jan. 1992, doi: 10.1016/S0167-9244(08)70036-2. (σελ. 23)
- [19] G. Ertürk and B. Mattiasson, "Capacitive biosensors and molecularly imprinted electrodes," *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 2, pp. 1–21, 2017, doi: 10.3390/s17020390. (σελ. 23, 53)
- [20] "Lecture 5: Electrostatic Sensors and Actuators PDF Free Download." https://docplayer.net/78874026-Lecture-5-electrostatic-sensors-and-actuators.html (accessed Jan. 31, 2021). (σελ. 24, 25)
- [21] B. G. Sheeparamatti, P. D. Hanasi, V. Aibbigeri, and N. Meti, "Study of Capacitance in Electrostatic Comb-Drive Actuators." (σελ. 27, 30)
- [22] N. M. Kredich, "Biosynthesis of Cysteine," *EcoSal Plus*, vol. 3, no. 1, Sep. 2008, doi: 10.1128/ecosalplus.3.6.1.11. (σελ. 44)
- [23] J. Wyman and T. L. McMeekin, "The Dielectric Constant of Solutions of Amino Acids and Peptides," J. Am. Chem. Soc., vol. 55, no. 3, pp. 908–914, 1933, doi: 10.1021/ja01330a006. (σελ. 52)
- [24] "Why Is Bovine Serum the Preferred Standard for Protein Assays?" https://info.gbiosciences.com/blog/why-is-bovine-serum-the-preferred-standard-forprotein-assays (accessed Feb. 05, 2021). (σελ. 53)

## ПАРАРТНМА

## Εικόνες

Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση δομής σωματιδίου SARS-CoV-2 [7] (σελ.4)

Εικόνα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση υποδοχέα ΑCE2 [10] (σελ. 9)

Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση αντίδρασης αμινοξέων [11] (σελ. 10)

Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του ιού και των υποδοχέων ACE2, TMPRSS2 και ADAM17 [13] (σελ.11)

Εικόνα 1.5: Δομή της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 και του υποδοχέα ACE2. (Α) Η δομή της S πρωτεΐνης σε σύνδεση με το ACE2. Το ACE2 παρουσιάζεται με το γκρι χρώμα. Τα τρία μονομερή της πρωτεΐνης S παρουσιάζονται με το κίτρινο, το πορτοκαλί και το πράσινο χρώμα αντίστοιχα. Οι μεταλλάζεις του SARS-CoV και του SARS-CoV-2 παρουσιάζονται με τα 4 χρώματα. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο αρνητικά, το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο αρνητικά, το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται για να είναι πιο θετικά, το κίτρινο αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από πολικά σε υδροφοβικά και το κυανό αντιπροσωπεύει υπολείμματα που μεταλλάσσονται από υδροφοβικά σε πολικά. (Β) Δομή ενός μονού μονομερούς πρωτεΐνης S. To RBD φαίνεται στον κόκκινο κύκλο κατά την ένωσή του με το ACE2. Η πράσινη κυκλική περιοχή επισημαίνει την ένωση μεταξύ της RBD και της υπόλοιπης πρωτεΐνης S [14] (σελ. 14)

Εικόνα 1.6: (A) Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης S, RBD του SARS-CoV, (B) Ηλεκτροστατική επιφάνεια της πρωτεΐνης S, RBD του SARS-CoV-2, (C) ηλεκτροστατική διαφορά ανάμεσα στις πρωτεΐνες S, RBD του SARS-CoV κ SARS-CoV-2, (D) ηλεκτροστατική επιφάνεια του ανθρώπινου υποδοχέα ACE2 [14] (σελ. 15)

**Εικόνα 1.7:** Ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV καθώς και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV 2 σε συγκεκριμένες αποστάσεις. (A) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. (B) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 σε απόσταση από 5 έως 40 Å με βήμα 2 Å. Τα μπλε βελάκια συμβολίζουν την διεύθυνση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. (C) και (D) ηλεκτροστατικές δυνάμεις της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV και της RBD της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 αντίστοιχα, που αναπτύσσονται με τον υποδοχέα ACE2 που υπάρχει στους ανθρώπους, όταν η μεταξύ τους απόσταση είναι 5 Å. (E) και (F) απεικονίζουν μία μεγέθυνση του (C) και (D) [14] (σελ. 16) Εικόνα 1.8: οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ της RBDs της S πρωτεΐνης και τον υποδοχέα ACE2 σε διάφορες αποστάσεις από 5 έως 40 Å. (A) συνολική ηλεκτροστατική δύναμη μεταξύ του SARS-COV και του ACE2. (B) συνολική ηλεκτροστατική δύναμη μεταξύ του SARS-COV-2 και του ACE2 [14] (σελ. 17)

Εικόνα 2.1: Αναπαράσταση πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων [20] (σελ. 24)

**Εικόνα 2.2:** Αναπαράσταση πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων κατά την εφαρμογή τάσης στα άκρα του [20] (σελ. 25)

Εικόνα 2.3: Αναπαράσταση ηλεκτρικού πεδίου που δημιουργείται στο εσωτερικό ενός πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων [20] (σελ. 26)

**Εικόνα 2.4:** Σχηματική αναπαράσταση πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων που έγινε η προσομοίωση [21] (σελ. 27)

Εικόνα 2.5: Στο αριστερό μέρος φαίνεται ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 10 ηλεκτρόδια, ενώ στο δεζί μέρος ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 20 ηλεκτρόδια [21] (σελ. 28)

Εικόνα 2.6: Στο αριστερό μέρος φαίνεται ο πυκνωτής ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων με 100 ηλεκτρόδια [21] (σελ. 28)

Εικόνα 3.1: Σχεδίαση πυκνωτή δέκα ηλεκτροδίων και διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά (σελ. 33)

Εικόνα 3.2: Σχεδίαση πυκνωτών μεγαλύτερων διαστάσεων. (σελ. 33)

Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση μια φωτοευαίσθητης πλακέτας. Στο πάνω μέρος βρίσκεται η διαφάνεια με το εκτυπωμένο σχέδιο του ηλεκτρικού κυκλώματος (σελ. 34)

Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση της φωτοευαίσθητης πλακέτας κατά την έκθεση της στην υπεριώδη ακτινοβολία. (σελ. 35)

Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση φωτοευαίσθτης πλακέτας μετά την έκθεση της σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στις περιοχές όπου υπήρχε το εκτυπωμένο ηλεκτρικό κύκλωμα έχει σχηματιστεί το σχέδιο αυτό στην φωτοευαίσθητη πλακέτα, ενώ το υπόλοιπο μέρος έχει αφαιρεθεί λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας. (σελ. 36)

Εικόνα 3.6: Αναπαράσταση του αναδευτήρα Orbital Shaker PSU – 10i Grand – bio. Στον αναδευτήρα είναι τοποθετημένο το διάλυμα του τριχλωριούχου σιδήρου το οποίο περιέχει μέσα τις φωτοευαίσθητες πλακέτες (σελ. 37)

Εικόνα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση της φωτοευαίσθητης πλακέτας μετά την αποχάλκωση. (σελ. 38)

**Εικόνα 3.8:** Αναπαράσταση πυκνωτή μεγαλύτερων διαστάσεων (5 επί 5 εκατοστά) που παρασκευάστηκε. (σελ. 38)

Εικόνα 3.9: Αναπαράσταση πυκνωτή διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά. (σελ. 39)

Εικόνα 3.10: Αναπαράσταση πυκνωτή διαστάσεων 2 επί 1 εκατοστά μετά την προσθήκη καλωδίων με την χρήση κολλητηριού. (σελ. 40)

**Εικόνα 3.11:** Αναπαράσταση του μηχανήματος μέτρησης χωρητικότητας LCR Meter 380193 EXTECH INSTRUMENTS που χρησιμοποιήθηκε. (σελ. 41)

Εικόνα 3.12: Αναπαράσταση μέτρησης του πρώτου πυκνωτή, έχοντας στο διάκενο του αέρα. (σελ. 42)

**Εικόνα 4.1:** Αναπαράσταση πυκνωτή με την προσθήκη ταινίας στην επιφάνειά τους. Στην μέση υπάρχει κυκλική οπή με σκοπό την δημιουργία πηγαδιού. (σελ. 43)

Εικόνα 4.2: Αναπαράσταση του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την τοποθέτηση της Κυστεΐνης στο εσωτερικό του πηγαδιού. (σελ. 44)

Εικόνα 4.3: Σταγονόμετρο Eppendorf Research plus που χρησιμοποιήθηκε. (σελ. 45)

**Εικόνα 4.4:** Μέτρηση της χωρητικότητας του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την προσθήκη της Κυστεΐνης στο εσωτερικό του πηγαδιού. (σελ. 46)

Εικόνα 4.5: Φυγοκεντριτής OHAUS. (σελ. 47)

**Εικόνα 4.6:** Μέτρηση της χωρητικότητας του πρώτου πυκνωτή έπειτα από την προσθήκη του διαλύματος που περιείχε τον υποδοχέα ACE2 στο εσωτερικό του πηγαδιού. (σελ. 48)

## Πίνακες

Πίνακας 1: χαρακτηριστικά του υλικού που χρησιμοποιήθηκε κατά την προσομοίωση για τον πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων [21]. (σελ. 27)

Πίνακας 2: Αποτελέσματα προσομοίωσης και των θεωρητικών υπολογισμών της χωρητικότητας πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων για τις διάφορες τιμές ηλεκτροδίων [21] (σελ. 29)

Πίνακας 3: Οι χωρητικότητες 5 χάλκινων πυκνωτών μικρών διαστάσεων (2 επί 1 εκατοστά), έχοντας στο διάκενο τους αέρα. (σελ. 41)

Πίνακας 4: Τιμές χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 80 δευτερόλεπτα μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes. Οι μετρήσεις έγιναν για 80 δευτερόλεπτα μετά την στιγμή που η χωρητικότητα έφτασε στην αρχική τιμή που είχε όσο στο εσωτερικό του πυκνωτή υπήρχε το ACE2. (σελ. 51)

Πίνακας 5: Τιμές των χωρητικοτήτων των 10 πυκνωτών που τοποθετήθηκε στην επιφάνεια τους πρωτεΐνη S spikes. (σελ. 54)

Πίνακας 6: Τιμές των χωρητικοτήτων των 2 πυκνωτών στους οποίος στον πρώτο τοποθετήθηκε διάλυμα με μισή ποσότητα πρωτεΐνης S spikes και η υπόλοιπη με πρωτεΐνη BSA και ο δεύτερος όπου τοποθετήθηκε μόνο πρωτεΐνη BSA. (σελ. 54)

Πίνακας 7: Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 1(-), 2(-) και 3(-) που βρέθηκαν αρνητικά αποτελέσματα. (σελ. 58)

Πίνακας 8: Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 4(-), 5(-) και 6(-) που βρέθηκαν αρνητικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα του πυκνωτή 4(-) είναι τα λανθασμένα θετικά. (σελ. 59)

**Πίνακας 9:** Τιμές χωρητικότητας για τους πυκνωτές 1(+), 2(+). 3(+) και 4(+) που βρέθηκαν θετικά αποτελέσματα, Στον πίνακα αυτόν βρίσκεται και το λανθασμένο αρνητικό αποτέλεσμα 3(+). (σελ. 61)

Πίνακας 10: Τιμές χωρητικότητας κατά την διάρκεια των 3 πρώτων λεπτών μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes για τους χρυσούς πυκνωτές. (σελ. 64)

Πίνακας 11: Τιμές χωρητικότητας των χρυσών πυκνωτών καθώς άλλαζε το υλικό που υπήρχε στο εσωτερικό τους διάκενο. (σελ. 66)

## Διαγράμματα

Διάγραμμα 2.1: Χωρητικότητα πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων συναρτήσει του αριθμού των ηλεκτροδίων από 5 έως 150, σύμφωνα με τις τιμές προσομοίωσης του πίνακα 2. [21] (σελ. 30)

Διάγραμμα 2.2: Με το κόκκινο χρώμα αναπαρίσταται η χωρητικότητα πυκνωτή ενδοδιαπλεκόμενων ηλεκτροδίων συναρτήσει του αριθμού των ηλεκτροδίων των θεωρητικών υπολογισμών ενώ με μαύρο χρώμα των προσομοιώσεων για αριθμό ηλεκτροδίων από 5 έως 150, σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα 2 [21]. (σελ. 31)

Διάγραμμα 5.1: Χωρητικότητα συναρτήσει του χρόνου μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes. Οι τιμές λήφθηκαν από τον πίνακα 4. (σελ. 52)

Διάγραμμα 5.2: Τιμή της χωρητικότητας για 5 πυκνωτές που τοποθετήθηκαν οι πρωτεΐνες S spikes κατά την διάρκεια των πειραμάτων έχοντας στο διάκενο α) αέρα, β) κυστεΐνη, γ) ACE2, δ) S spikes, ε) μετά από πρώτη πλύση PBS, στ) μετά από δεύτερη πλύση PBS, ζ) μετά από Τρίτη πλύση PBS. (σελ. 55)

Διάγραμμα 5.3: Τιμή της χωρητικότητας για 2 πυκνωτές που τοποθετήθηκε η πρωτεΐνη BSA κατά την διάρκεια των πειραμάτων έχοντας στο διάκενο α) αέρα, β) κυστεΐνη, γ) ACE2, δ) S spikes, ε) μετά από πρώτη πλύση PBS, στ) μετά από δεύτερη πλύση PBS, ζ) μετά από Τρίτη πλύση PBS. Με το γκρι χρώμα είναι η καμπύλη του πυκνωτή που τοποθετήθηκε μόνο πρωτεΐνη BSA, ενώ με το κίτρινο χρώμα η καμπύλη του πυκνωτή που τοποθετήθηκε και BSA και S spikes. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται και η πορτοκαλί καμπύλη ενός πυκνωτή που τοποθετήθηκε πρωτεΐνη S spikes. (σελ. 56)

Διάγραμμα 5.4: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 150 δευτερόλεπτα. Στο διάγραμμα αυτό βρίσκονται οι 6 πυκνωτές οι οποίοι είχαν αρνητικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου και του λανθασμένου θετικού αποτελέσματος με την κίτρινη καμπύλη 4(-). (σελ. 60)

Διάγραμμα 5.5: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα πρώτα 150 δευτερόλεπτα. Στο διάγραμμα αυτό βρίσκονται οι 4 πυκνωτές οι οποίοι είχαν θετικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου και του λανθασμένου αρνητικού αποτελέσματος με την μωβ καμπύλη 3(+). (σελ. 62)

Διάγραμμα 5.6: Ποσοστό μείωσης χωρητικότητας συναρτήσει του χρόνου για τα 3 πρώτα λεπτά μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνών S spikes στην επιφάνεια των χρυσών πυκνωτών. (σελ. 65)

Διάγραμμα 5.7: Χωρητικότητα χρυσών πυκνωτών καθώς άλλαζε το υλικό που περιείχε στο εσωτερικό τους διάκενο. (σελ. 66)