



**ASETİLKOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI, ALZHEIMER
TEDAVİSİ İÇİN YENİ ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN
SENTEZİ, SPEKTROFOTOMETRİK VE ELEKTROKİMYASAL
YÖNTEMLERLE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Elif AYNACI

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mart 2015

Elif AYNACI tarafından hazırlanan “ASETİLKOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI, ALZHEIMER TEDAVİSİ İÇİN YENİ ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN SENTEZİ, SPEKTROFOTOMETRİK VE ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye : Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif AYNACI

27.03.2015

ASETİLKOLİN BİYOSENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI, ALZHEIMER TEDAVİSİ İÇİN YENİ
ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN SENTEZİ, SPEKTROFOTOMETRİK VE
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNHİBİSYON ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ
(Doktora Tezi)

Elif AYNACI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2015

ÖZET

Bu tez çalışması üç bölümden oluşmaktadır; birinci bölümde, polipirol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) filme asetilkolinesteraz (AChE) ve kolin oksidaz (ChO) enzimlerinin immobilize edilmesiyle yeni bir asetilkolin (ACh) biyosensörü başarıyla hazırlandı. AChE ve ChO enzimleri PPy-PVS filme glutaraldehit ve sığır serum albumin (SSA) kullanılarak çapraz bağlama ile immobilize edildi. ACh tayini enzimatik olarak açığa çıkan H_2O_2 'in +0,3 V'da yükseltgenmesi ile yapıldı. pH ve sıcaklık etkisi araştırıldı ve optimum parametreler sırası ile 9,0 ve 65 °C olarak bulundu. $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M ($R^2=0,994$) ve $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ($R^2=0,994$) aralıklarında iki doğrusal çalışma bölgesi gözlemlendi. Biyosensörün tayin sınırı $5,0 \times 10^{-9}$ M ve cevap süresi 200 s'dir. Enzim elektrodun ayrıca tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı çalışıldı. Tekrar kullanılabilirlik sonuçları biyosensörün 18 ölçüm sonunda başlangıç aktivitesinin % 83,1'ini koruduğunu gösterdi ve bağlı standart sapması % 4,4 olarak bulundu. Hazırlanan ACh biyosensörünün +4 °C'de ve 0,1 M pH 9,0 glisin tamponu içerisinde 35 gün sonunda başlangıç aktivitesinin % 31'ini muhafaza ettiği gözlemlendi. Tezin ikinci bölümünde, takrinin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) farklı aldehytler (salisilaldehit ve türevleri) ile meydana getirdiği yeni Schiff bazı türevleri (serisi) sentezlendi. Takrin Alzheimer hastalığı tedavisinde ilaç olarak kullanılmış bir ilaçtır ve tersinir bir AChE inhibitörüdür. Sentezlenen bileşiklerin yapıları elementel analiz, TGA, FT-IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spektroskopisi ile karakterize edildi. Tezin üçüncü bölümünde, sentezlenen bileşiklerin AChE aktivitesi hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal olarak araştırıldı. Spektrofotometrik Ellman yöntemi kullanılarak yapılan deneyler sonucunda inhibitörlerin IC_{50} , K_i , K_m , V_{max} değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi. Tüm bileşiklerin tersinir AChE inhibitör özelliğine sahip olduğu görüldü. Spektrofotometrik çalışmalar sonucunda sentezlenen bileşiklerin takrinden daha iyi AChE inhibisyon özelliği gösterdiği sonucuna ulaşıldı. Bileşiklerin IC_{50} değerleri birinci bölümde hazırlanan ACh biyosensörü ile elektrokimyasal olarak da tayin edildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Biyosensör, asetilkolin, asetilkolinesteraz, kolin oksidaz, inhibisyon
Sayfa Adedi : 144
Danışman : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

PREPARATION OF ACETYLCHOLINE BIOSENSOR, SYNTHESIS OF NOVEL
ACETYLCHOLINE INHIBITORS FOR ALZHEIMER TREATMENT, INVESTIGATION OF
INHIBITION PROPERTIES WITH SPECTROPHOTOMETRIC AND ELECTROCHEMICAL
METHODS

(Ph. D. Thesis)

Elif AYNACI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

March 2015

ABSTRACT

This study consists of three parts. In the first part, a novel amperometric acetylcholine (ACh) biosensor with immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase (AChE-ChO) on polypyrrole-polyvinylsulphonate (PPy-PVS) film has been successfully prepared. AChE and ChO enzymes were immobilized on PPy-PVS film by cross-linking with glutaraldehyde and bovine serum albumine (BSA). Determination of ACh was carried out by oxidation of enzymatically produced H_2O_2 at +0.3 V. The effects of pH and temperature were investigated and optimum parameters were found to be 9.0 and 65 °C, respectively. Two linear parts in the region between 1.0×10^{-8} - 1.0×10^{-7} M ($R^2=0.994$) and 1.0×10^{-7} - 1.0×10^{-6} M ($R^2=0.994$) were observed. The detection limit of the biosensor was 5.0×10^{-9} M and response time of the biosensor was 200 s. Storage stability and reproducibility of the enzyme electrode were also studied. Reproducibility results showed that 83.1% of the response current was retained after 18 activity assays and relative standard deviation was found out as 4.4%. It was observed that the prepared ACh biosensor retained 31% of its initial activity after 35 days storage in 0.1 M pH 9.0 glycine buffer solution at 4 °C. In the second part of the study, new Schiff base derivatives of tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine) were synthesized with different aldehydes (salicylaldehyde and its derivatives). Tacrine has been used as a drug for the treatment of Alzheimer's disease and is a reversible AChE inhibitor. Compounds were characterized by elemental analysis, TGA, FT-IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR spectroscopy. In the third part of the study, AChE activity of the synthesized compounds were investigated both spectrophotometrically and electrochemically. Inhibitors' IC_{50} , K_i , K_m , V_{max} values were calculated by the spectrophotometric Ellman method as a result of the experiments and inhibition types were determined. It was seen that all compounds had the property of a reversible AChE inhibitor. As a result of spectrophotometric studies, it was concluded that synthesized compounds showed a greater property of AChE inhibition than tacrine. Compounds' IC_{50} values were also determined electrochemically by an ACh biosensor which was prepared in the first part of the study and results were then compared.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Biosensor, acetylcholine, acetylcholinesterase, choline oxidase, inhibition

Page Number : 144

Supervisor : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez dönemi boyunca destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen, Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a ve Prof. Dr. Nurşen SARI'ya teşekkürlerimi sunarım. Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e, Doç. Dr. Servet ÇETE'ye ve Doç. Dr. Halit ARSLAN'a bu süre içerisindeki her türlü katkıları ve yardımları için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Dr. Özlem ÇOLAK'a, Arş. Gör. Dr. Soner DÖNMEZ'e, Arş. Gör. Dr. Demet UZUN'a ve çalışma arkadaşlarım Şule ŞİMŞEK, Ayşe Tuğçe TUNÇ ve Kübra ÜNAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına mali destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: 05/2012-59) teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan en büyük destekçilerim çok kıymetli babam Mehmet AYNACI, annem Firdevs AYNACI ve ablam Nilgün AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Biyosensörler	3
2.1.1. Biyosensörlerin yapısı	4
2.1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	5
2.1.3. Biyosensörlerin kullanım alanları	6
2.2. Enzimler ve Enzim Bazlı Biyosensörler	8
2.2.1. Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri	9
2.2.2. Optik esaslı enzim sensörleri.....	10
2.2.3. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri.....	10
2.2.4. Piezoelektrik esaslı ezim sensörleri	11
2.3. Yapay Enzim Temelli Sensörler.....	11
2.3.1. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) temelli sensörler	12
2.3.2. Kompozit polimerik yapı temelli sensörler	12
2.3.3. Peptit temelli sensörler	12

	Sayfa
2.4. Enzim İnhibisyonu Temelli Biyosensörler	12
2.4.1. Tersinir inhibisyon türleri.....	13
2.5. Biyosensörlerde Biyobileşen immobilizasyonu	17
2.6. İletken polimerler ve polipirol (PPy).....	18
2.7. Asetilkolin Metabolizması	20
2.7.1. Asetilkolin (ACh).....	20
2.7.2. ACh Sentezi.....	21
2.7.3. ACh depolanması ve salgılanması.....	22
2.7.4. ACh Yıkımı	23
2.8. Kolinesterazlar ve AChE	23
2.9. Kolin Oksidaz (ChO).....	27
2.10. Alzheimer Hastalığı ve Kolinerjik Hipotez.....	27
2.10.1. Alzheimer hastalığında AChE inhibitörlerinin klinik uygulamaları	28
2.11. Kaynak Araştırması	30
2.11.1. Biyosensör çalışmalarına ait kaynak araştırmaları	30
2.11.2. Takrin ve türevlerine ait kaynak araştırmaları.....	35
3. DENEYSEL KISIM	41
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler.....	42
3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	44
3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı	44
3.3.2. Hücre ve elektrotlar	44
3.3.3. Element analizi cihazı.....	45
3.3.4. Erime noktası tayini cihazı.....	45

Sayfa

3.3.5. Ultraviyole-görünür bölge (UV-GB) spektrofotometresi	45
3.3.6. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrofotometresi	45
3.3.7. ¹ H-Nükleer magnetik rezonans (¹ H-NMR) spektrofotometresi	45
3.3.8. ¹³ C-Nükleer magnetik rezonans (¹³ C-NMR) spektrofotometresi	45
3.3.9. Taramalı elektron mikroskobu	46
3.3.10. Termal gravimetrik analiz (TGA) cihazı	46
3.3.11. pH metre	46
3.3.12. Su banyosu	46
3.3.13. Mikro pipet	46
3.3.14. Argon gazı	46
3.3.15. Saf Su	46
3.4. ACh Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi	47
3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Platin elektroda PPy-PVS kaplanması	47
3.4.2. Pt/PPy-PVS elektrodun sabit akıma getirilmesi	47
3.4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	47
3.4.4. PPy-PVS filmin çevrim sayısının seçicilik üzerine etkisinin incelenmesi	48
3.4.5. AChE ve ChO enzim miktarının belirlenmesi	48
3.4.6. Enzim immobilizasyon yönteminin belirlenmesi	48
3.4.7. Çapraz bağlama yöntemine gluteraldehit miktarının etkisi	49
3.4.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi	50
3.4.9. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi	51
3.4.10. Sentetik kan çözeltisinde ACh tayini	52
3.5. İnhibitör Sentezleri	52

	Sayfa
3.5.1. Genel yöntem	52
3.6. İnhibitörlerin AChE Aktivitesinin Araştırılması.....	56
3.6.1. Spektrofotometrik olarak AChE aktivitesinin araştırılması.....	56
3.6.2. Elektrokimyasal olarak AChE aktivitesinin araştırılması.....	57
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
4.1. ACh Biyosensörünün Hazırlanması	61
4.1.1. Platin elektroda PPy-PVS kaplanması	61
4.1.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi	62
4.1.3. PPy-PVS filmin çevrim sayısının seçicilik üzerine etkisinin incelenmesi	63
4.1.4. AChE ve ChO enzim miktarının belirlenmesi.....	64
4.1.5. Enzim immobilizasyon yönteminin belirlenmesi.....	65
4.1.6. Çapraz bağlama yöntemine glutraldehit miktarının etkisi	67
4.1.7. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi	68
4.1.8. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi	76
4.1.9. Sentetik kan çözeltisinde ACh tayini.....	77
4.2. İnhibitör Sentezleri.....	77
4.2.1. Erime noktası ve elementel analiz sonuçları	77
4.2.2. Isıl analiz.....	78
4.2.3. FT-IR spektrumları.....	79
4.2.4. ¹ H-NMR spektrumları	84
4.2.5. ¹³ C-NMR spektrumları.....	88
4.3. İnhibitörlerin AChE Aktivitesinin Araştırılması.....	92
4.3.1. Spektrofotometrik olarak AChE aktivitesinin araştırılması	92
4.3.2. Elektrokimyasal olarak AChE aktivitesinin araştırılması.....	104

	Sayfa
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR.....	115
EKLER.....	127
EK-1. TGA eğrileri	128
EK-2. FT-IR spektrumları	132
EK-3. ¹ H-NMR spektrumları	136
EK-4. ¹³ C-NMR spektrumları	140
ÖZGEÇMİŞ	144

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.2. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları.....	7
Çizelge 2.3. Enzim bazlı sensörlerin sınıflandırılması.....	9
Çizelge 2.4. Çeşitli enzim immobilizasyon türleri.....	18
Çizelge 3.1. Deneysel kısımda kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar	41
Çizelge 4.1. Farklı pH koşulları altında ACh biyosensörüne ait $K_m(göz)$, $I_{maks}(göz)$ ve $I_{maks}(göz)/K_m(göz)$ değerleri.....	70
Çizelge 4.2. Schiff bazlarının element analizi sonuçları ve fiziksel özellikleri.....	78
Çizelge 4.3. Schiff bazlarının ısı analiz sonuçları.....	79
Çizelge 4.4. Schiff bazlarının belirgin IR frekansları (cm^{-1}) ve elektronik spektrum verileri (nm)	81
Çizelge 4.5. Schiff bazlarının ^1H -NMR spektrumları.....	85
Çizelge 4.6. Schiff bazlarının ^{13}C -NMR spektrumları	89
Çizelge 4.7. İnhibitörlerin spektrofotometrik AChE inhibisyon çalışmaları sonuçları	103
Çizelge 4.8. İnhibitörlerin elektrokimyasal ve spektrofotometrik yöntem ile hesaplanan IC_{50} değerleri	107
Çizelge 5.1. Çalışma sonuçları ile literatürün karşılaştırılması	112

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi	4
Şekil 2.2. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.....	5
Şekil 2.3. Yarışmalı inhibisyon (E: enzim, S: substrat, ES: enzim-substrat ara kompleksi, EI: enzim-inhibitör kompleksi, Ü: ürün)	13
Şekil 2.4. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği.....	14
Şekil 2.5. Yarışmasız inhibisyon (EIS: enzim-inhibitör-substrat kompleksi)	14
Şekil 2.6. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği.....	15
Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon.....	15
Şekil 2.8. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği	16
Şekil 2.9. Karışık inhibisyon	16
Şekil 2.10. Karışık tip inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafikleri.....	17
Şekil 2.11. Polipirrol (PPy).....	18
Şekil 2.12. Pirrolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması.....	20
Şekil 2.13. Asetilkolin (ACh)	21
Şekil 2.14. ChAT'ın katalizlediği reaksiyon	21
Şekil 2.15. ACh metabolizması	22
Şekil 2.16. AChE'nin katalizlediği reaksiyon	23
Şekil 2.17. AChE'nin üç boyutlu yapısı.....	24
Şekil 2.18. AChE'nin aktif merkezi.....	25
Şekil 2.19. ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması	26
Şekil 2.20. ChO'nin katalizlediği reaksiyon.....	27
Şekil 2.21. ChO'nin üç boyutlu yapısı.....	27

Şekil	Sayfa
Şekil 2.22. Fizostigmin.....	29
Şekil 2.23. Takrin.....	29
Şekil 2.24. Donepezil	29
Şekil 2.25. Rivastigmin	30
Şekil 2.26. İyonik-kovalent hibrit yöntemi ile hazırlanan pHEMA membran	30
Şekil 2.27. Hazırlama sensörün şematik gösterimi, (a) Pt tel, (b) cam, (c) teflon kapak, (d) PVA membran.....	32
Şekil 2.28. Avidin ve biyotin kullanılarak, çoklu enzim tabakalarının elektrot yüzeyi üzerinde hazırlanması	32
Şekil 2.29. (a) Triklorfon, (b) karbofuran (c) eserin	34
Şekil 2.30. Takrinin protonlanmış yapısı	36
Şekil 2.31. 7 metilen grubu içeren takrin dimeri	37
Şekil 2.32. Takrin-ferulik asit hibriti	37
Şekil 2.33. Takrin-8-hidroksikinolin hibriti	38
Şekil 2.34. Takrin-huperzin A hibriti	38
Şekil 2.35. Takrin-E2020 hibriti	39
Şekil 3.1. T5F3MetS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	53
Şekil 3.2. T3Cl5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	53
Şekil 3.3. T5MetS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	54
Şekil 3.4. T5BrS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	54
Şekil 3.5. T5ClS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	55
Şekil 3.6. T5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	55
Şekil 3.7. T5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi	56
Şekil 3.8. Ellman metodunun prensibi	56
Şekil 4.1. ACh tayini reaksiyonları	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. ACh tayininin reaksiyon şeması	59
Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS elektrodun H ₂ O ₂ 'ye duyarlılığı üzerine potansiyelin etkisi	63
Şekil 4.4. Çevrim sayısının ÜA ve AA'nın cevap akımına karşı etkisi (pH 9,0 glisin tamponu, +0,3 V).....	64
Şekil 4.5. AChE ve ChO miktarının biyosensör cevap akımı üzerine etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V) (■) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,024 ünite/mL ChO (1:1) (▲) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,048 ünite/mL ChO (1:2) (◆) 0,048 ünite/mL AChE ve 0,024 ünite/mL ChO (2:1) (✖) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,072 ünite/mL ChO (1:3) (✖) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,096 ünite/mL ChO (1:4)	65
Şekil 4.6. Hapsetme(◆) ve çapraz bağlama (■) immobilizasyon yöntemi ile elde edilen enzim elektrotlara ait ACh derişimi-akım farkı grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V)	66
Şekil 4.7. Hapsetme(◆) ve çapraz bağlama (■) immobilizasyon yöntemi ile elde edilen enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V)	67
Şekil 4.8. Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan gluteraldehit miktarının etkisinin incelendiği derişim-akım farkı grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V) (■) %0,23 gluteraldehit, (◆) %0,11 gluteraldehit, (▲) %0,38 gluteraldehit	68
Şekil 4.9. Biyosensörün ACh'e duyarlılığına pH'nın etkisi (◆) 0,1 M fosfat tamponu (▲) 0,1 M glisin tamponu (■) 0,1 M borat tamponu (25 °C, 1,0x10 ⁻³ M ACh, +0,3V)	70
Şekil 4.10. Biyosensörün ACh'e duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 1,0x10 ⁻³ M ACh, +0,3V)	71
Şekil 4.11. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı ACh derişiminin etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)	72
Şekil 4.12. ACh biyosensörü için kalibrasyon grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)	73
Şekil 4.13. ACh biyosensörü için kalibrasyon grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)	73
Şekil 4.14. Biyosensörün amperometrik cevabına ACh derişiminin etkisi (Lineweaver-Burk grafiği, 0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V).....	74

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)	75
Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrü (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)	76
Şekil 4.17. (a) Takrin (b) Takrinin protonlanmış yapısı (c) Schiff bazı formunda sentezlenen inhibitörlerin yapısı.....	80
Şekil 4.18. Takrinin IC ₅₀ grafiği.....	92
Şekil 4.19. T5F3MetS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği.....	92
Şekil 4.20. T3Cl5FS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği	93
Şekil 4.21. T5MetS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği.....	93
Şekil 4.22. T5BrS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği	94
Şekil 4.23. T5ClS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği	94
Şekil 4.24. T5FS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği.....	95
Şekil 4.25. TS inhibitörünün IC ₅₀ grafiği	95
Şekil 4.26. TS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [TS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [TS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[TS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	96
Şekil 4.27. T5FS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5FS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [T5FS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[T5FS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	96
Şekil 4.28. T5BrS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5BrS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [T5BrS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[T5BrS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	97
Şekil 4.29. T5MetS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5MetS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [T5MetS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[T5MetS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	97
Şekil 4.30. T3Cl5FS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T3Cl5FS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [T3Cl5FS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[T3Cl5FS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	98
Şekil 4.31. T5F3MetS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5F3MetS]= 1,0x10 ⁻⁸ M ▲ [T5F3MetS]= 5,0x10 ⁻⁸ M, ■[T5F3MetS]= 1,0x10 ⁻⁷ M)	98

Şekil	Sayfa
Şekil 4.32. T5ClS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5ClS]= $1,0 \times 10^{-8}$ M ▲ [T5ClS]= $5,0 \times 10^{-8}$ M, ■ [T5ClS]= $1,0 \times 10^{-7}$ M)	99
Şekil 4.33. TS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [TS]= 1×10^{-8} M, ▲ [TS]= 5×10^{-8} M, ■ [TS]= 1×10^{-7} M)	99
Şekil 4.34. T5FS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5FS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5FS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5FS]= 1×10^{-7} M).....	100
Şekil 4.35. T5BrS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5BrS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5BrS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5BrS]= 1×10^{-7} M)	100
Şekil 4.36. T5MetS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5MetS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5MetS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5MetS]= 1×10^{-7} M).....	101
Şekil 4.37. T3Cl5FS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T3Cl5FS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T3Cl5FS]= 5×10^{-8} M, ■ [T3Cl5FS]= 1×10^{-7} M)	101
Şekil 4.38. T5F3MetS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5F3MetS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5F3MetS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5F3MetS]= 1×10^{-7} M).....	102
Şekil 4.39. T5ClS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5ClS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5ClS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5ClS]= 1×10^{-7} M)	102
Şekil 4.40. T5F3MetS inhibitörünün IC_{50} grafiği	104
Şekil 4.41. T3Cl5S inhibitörünün IC_{50} grafiği	104
Şekil 4.42. T5MetS inhibitörünün IC_{50} grafiği	105
Şekil 4.43. T5BrS inhibitörünün IC_{50} grafiği	105
Şekil 4.44. T5ClS inhibitörünün IC_{50} grafiği	106
Şekil 4.45. T5FS inhibitörünün IC_{50} grafiği	106
Şekil 4.46. TS inhibitörünün IC_{50} grafiği	107

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Elektrokimyasal deneylerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi.....	44
Resim 4.1. PPy-PVS filmin dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramı.....	61
Resim 4.2. PPy-PVS filmin taramalı elektron mikroskobu resmi.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Derece Celcius
g	Gram
mg	Miligram
M	Molar derişim
mM	Milimolar derişim
mL	Mililitre
mV	Milivolt
s	Saniye
μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar derişim
V	Hız
Δi	Akım farkı
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklamalar
AA	Askorbik asit
ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolin esteraz
ADP	Adenozin di fosfat
ALT	Alanin transaminaz
ATCh	Asetil tiyokolin
ATP	Adenozin trifosfat
BChE	Bütiril kolin esteraz
Ch	Kolin

Kısaltmalar**Açıklamalar****ChAT**

Kolin asetiltransferaz

ChO

Kolin oksidaz

DNA

Deoksiribonükleik asit

DTNB

5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)

E

Enzim

EC

Enzim Kodu

EI

Enzim-inhibitör kompleksi

EIS

Enzim-inhibitör-substrat kompleksi

ENFET

Enzim alan etkili transistör ü

ES

Enzim-substrat ara kompleksi

FAD

Flavin adenin dinükleotit

FDA

Food and Drug Administration

FT-IR

Fourier transform infrared

GOD

Glukoz Oksidaz

I

İnhibitör

IC₅₀

Enzim aktivitesinin % 50' sini inhibe etmesi için gerekli inhibitör derişimi

ISFET

İyon duyarlı olan etkin transistörler

K_i

İnhibisyon sabiti

K_m

Michealis-Menten sabiti

MIP

Moleküler baskılanmış polimer

MOSFET

Metal oksit yarı iletken etkili transistörler

PAS

Periferik bölge

PPy

Polipirol

PVS

Polivinilsülfonat

RNA

Ribonükleik asit

S

Substrat

SSA

Sığır serum albumin

TGA

Termal gravimetrik analiz

Ü

Ürün

ÜA

Ürik asit

V_{max}

Maksimum hız

Kısaltmalar **^{13}C -NMR** **^1H -NMR****Açıklamalar** ^{13}C -Nükleer magnetik rezonans ^1H -Nükleer magnetik rezonans

1. GİRİŞ

Biyosensörler, fiziksel bir dönüştürücü yüzeyine yerleştirilmiş, analite karşı hassasiyeti ve seçiciliği artıran biyoreseptörden oluşan analitik cihazlardır [1]. Daha ucuz, hızlı ve kolay kullanıma sahip ve gerçek zamanlı olarak çok küçük miktardaki örneklerde bile kalitatif veya kantitatif bilgi sağlayabilmesinden dolayı biyosensörler tıbbi analizlerden çevresel analizlere, proses izlenmesinden ilaç analizlerine ve savunma faaliyetlerine kadar oldukça geniş bir alanda kullanım imkanı bulmaktadır [1,2].

Bu zamana kadar değişik formlarda pek çok enzim sensörü geliştirilmiştir. [1,3-5]. Bunlar arasında kolin (Ch), asetilkolin (ACh), sinir ajanları, pestisitler ve bakteriyel toksinlerin teşhisi için kullanılan kolinesteraz temelli biyosensörler dikkat çekmektedir [1,6].

ACh, Ch ve asetik asitin esteri olup, tanımlanan ilk nörotransmitterdir [7]. Bu ester, sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine sinir impulsu taşımakla görevlidir [8,9]. ACh beyin hücrelerinde depolanır ve uyarı sonrası sinaptik boşluğa salınır [7]. ACh'nin tayini klinik açıdan çok önemlidir, çünkü ACh beyinde öğrenme ve hafıza ile yakından ilişkilidir [10]. Ayrıca ACh seviyesi Alzheimer ve demans gibi nöral hastalıklarla da ilişkilidir [11]. Kolinerjik hipoteze göre, Alzheimer, ACh sentezinin azalması ile açığa çıkmaktadır [12,13]. Bu yüzden ACh tayininde hızlı, güvenilir ve seçici bir biyosensör tasarlamak klinik açıdan yararlı olacaktır. ACh tayini analitik amaçlarla da yapılmaktadır. Kolinesteraz temelli biyosensörler çevresel analizlerde, toprak ve gıda analizlerinde toksisiteyi izlemek için kullanılan başarılı ve hassas bir yöntemdir [1]. Organofosfat ve karbamat gibi pestisitler kolinesterazları inhibe etmektedir. Bu inhibisyon sonucu enzimde meydana gelen aktivite azalmasının izlenmesi ACh biyosensörleri ile yapılabilmektedir [14]. Bu zamana kadar farklı yapılarda pek çok kolinesteraz inhibisyonu temelli biyosensör geliştirilmiştir [15-17].

Kolinesteraz inhibitörleri günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan yaygın ilaçlardır [18]. Kolinesteraz inhibitörleri, AChE'ı inhibe ederek ACh'nin hidroliz reaksiyonunu durdurur ve ACh seviyesini artırır. Alzheimer'lı hastalarda seyreden düşük ACh seviyesi bu şekilde yükseltilmiş olur ve sinirler arasındaki geçişler kuvvetlenir. [19]. Alzheimer hastalığı tedavisinin klinik uygulamasında FDA (Food and Drug Administration)'dan onay alan ilk AChE inhibitörü takrin (9-amino-

1,2,3,4-tetrahidroakridin) dir [20]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar takrinden daha etkili inhibisyona sahip türevlerini geliştirmeye yöneliktir [21-24]. Bu çalışmada takrinden daha iyi inhibisyon özelliklerine sahip inhibitörlerin sentezlenmesi ve AChE aktivitelerinin yeni bir amperometrik ACh biyosensörü ile elektrokimyasal olarak tayin edilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez 3 bölümden oluşmaktadır; birinci bölümde, asetilkolinesteraz (AChE) ve kolin oksidaz (ChO) enzimleri iletken polimerler olan polipirrol-polivinilsülfonat (PPy-PVS) filme immobilize edilerek yeni bir ACh biyosensörü hazırlandı ve hazırlanan biyosensörün performansını etkileyen parametreler (enzim oranlarının belirlenmesi, enzim immobilizasyon yönteminin belirlenmesi, gluteraldehit miktarının belirlenmesi v.b) ve en iyi çalışma koşulları (pH, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik, raf ömrü, substrat derişiminin etkisi v.b) araştırıldı. İkinci bölümde, Alzheimer hastalığı tedavisinde ilaç olarak kullanılmış ve bir AChE inhibitörü olan takrinin farklı aldehitlerle meydana getirdiği yeni Schiff bazı türevleri sentezlendi. Bileşiklerin yapıları elementel analiz, TGA, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spektroskopisi ile aydınlatıldı. Üçüncü bölümde, sentezlenen bileşiklerin AChE aktivitesi hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal olarak araştırıldı. Spektrofotometrik Ellman yöntemi kullanılarak yapılan deneyler sonucunda inhibitörlerin IC₅₀, K_i, K_m, V_{max} değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi. Tüm bileşiklerin tersinir AChE inhibitör özelliğine sahip olduğu görüldü. Spektrofotometrik çalışmalar sonucunda sentezlenen bileşiklerin takrinden daha iyi AChE inhibisyon özelliği gösterdiği sonucuna ulaşıldı. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri birinci bölümde hazırlanan ACh biyosensörü ile elektrokimyasal olarak da tayin edildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

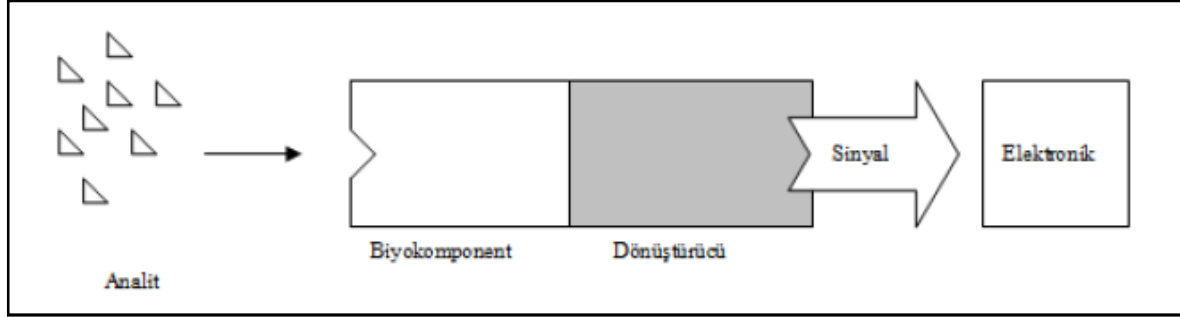
Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri hemen algılayıp hayatlarını sürdürebilmek için bu değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin temelini oluşturmuştur [25]. İlk biyosensör fikri doğadaki canlıların izlenip, gözlenmesinden sonra ortaya atılmıştır. Örneğin, bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100000 kat daha fazladır, yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal algırlar, kelebekler eşlerinin yaydığı birkaç molekülü bile hissederler, algiler ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdırlar [25]. 20. yüzyılın başlarında (1911) İngiltere ve ABD’de kömür ocaklarında grizu patlamasına önlem olarak kanarya kuşlarının kullanılması ilk biyosensör uygulaması olarak kabul edilebilir. İnsanlara oranla kanaryalar, karbondioksit ve metana daha duyarlı olup erken rahatsızlık semptomları verirler [25].

Canlılarda bu uyarıları algılamayı sağlayan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleşimi biyosensörleri meydana getirmiştir [25]. Biyosensörler günümüze kadar çok hızlı gelişim göstermiştir, bu sebeple International Union of Pure and Applied Chemistry tarafından oluşturulan Biyosensörleri Sınıflandırma Adlandırma Komisyonu’nun 1996 yılında hazırlayıp yayınladığı biyosensör tanımı biyo-mikrochiplerin gelişimi ile 2000 yılında geçirliliğini yitirmiştir [25]. Biyosensörler, daha küçük, daha doğru ve daha ucuz aletlere eğilim yönünde gelişim göstermekte olup, biochip formundaki uygulamaları gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır [25].

Biyosensörler; izole enzimler, immünosistemler, dokular, organeller veya hücreler, yapay enzimler tarafından yönlendirilen biyokimyasal reaksiyonları kullanarak oluşan elektriksel, termal veya optik sinyaller yardımı ile kimyasal/biyokimyasal maddeler ve biyomateriyallerin kalitatif ve kantitatif tayinini yapabilen aygıtlardır (Şekil 2.1) [25].

Kronolojik olarak bakıldığında, biyosensörlerin tarihi 50’li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesi ile başlar [25,26]. 1962 yılında Clarkve Lyons, glukoz oksidaz (GOD)

enzimini O₂ elektrodu ile birleştirerek kandaki glukoz düzeyinin ölçülmesini başardılar [25,26]. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek özgülüğünü (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş bir uygulama olanağı bulmuştur [25,26].



Şekil 2.1. Bir biyosensörün şematik gösterimi [27]

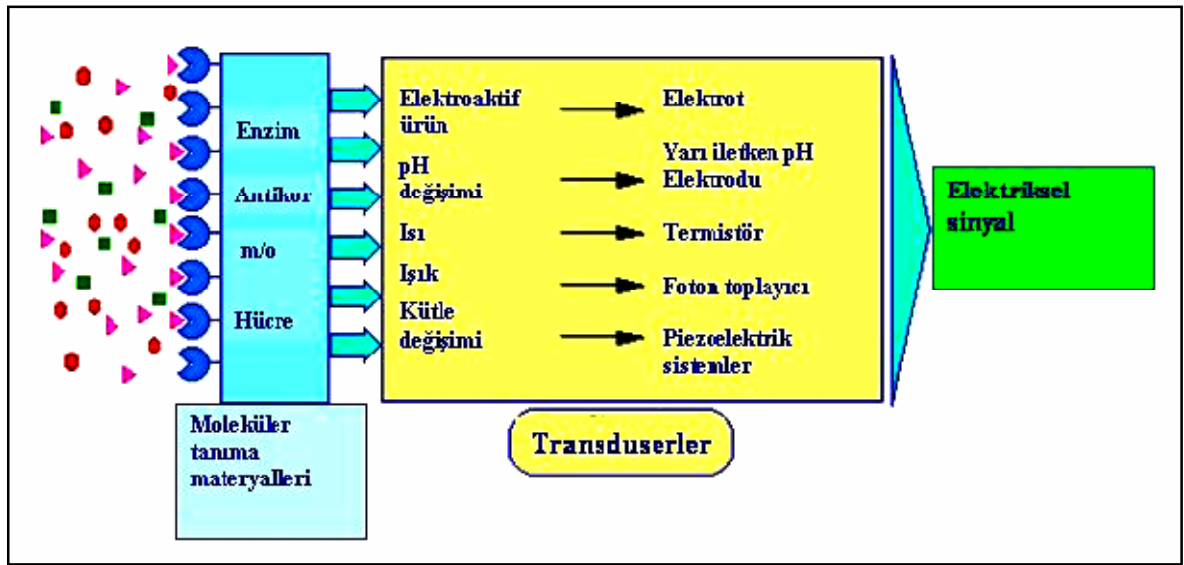
2.1.1. Biyosensörlerin yapısı

Bir biyosensör üç temel bileşenden ibarettir. Bunlar biyobileşen (biyoreseptör/biyokomponent/biyojan), dönüştürücü (transduser/çevirici) ve elektronik ağıttır (Şekil 2.2) [26]. Biyobileşenler, biyoafinite ve biyokatalitik olmak üzere iki sınıfta toplanabilir. Biyoafinite ajanları, analitler ile kompleks oluşturarak analitin moleküler tanımlanmasında kullanılırlar, biyoafinite ajanlarına örnek olarak antikor, hormon, glikoproteinler ve DNA verilebilir. Meydana gelen kompleks oluşumu tabaka kalınlığı, kırılma indisi ve elektriksel yük gibi fizikokimyasal parametrelerin değişimine neden olur ve bu değişimler optik sensörler, potansiyometrik elektrotlar veya transistörler tarafından saptanır [25,26]. Biyokatalitik ajanlar ise analitin moleküler yapısında değişime sebep olurlar, değişim sonucu ortamda artan veya azalan madde miktarı tespit edilerek değerlendirilir. Biyokatalitik ajanlara örnek olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitki veya hayvansal doku parçaları, organeller verilebilir [25,26].

Biyosensörlerin ikinci bileşeni dönüştürücülerdir. Dönüştürücü, biyobileşenin incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine çeviren biyosensör parçalarıdır [26]. Dönüştürücü biyokimyasal reaksiyona göre seçilir. Elektrotlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef; maddedir. Örneğin, O₂ elektrodunda çözülmüş O₂, pH elektrodunda H⁺ iyonu gibi. Optik sensörlerde

hedef; ışık, piezoelektrik sensörlerde ise kristalin salınım rezonansının kütle yüklenimi sebebi ile değişmesidir. Bunların dışında ayrıca transistörler ve termistörlerde dönüştürücü olarak kullanılmaktadır [25].

Biyosensörün üçüncü kısmı ise doğrudan biyobileşen tabakasına bağlı elektronik aygıttır. Bu kısımda biyokatalizör ile tayin edilecek maddenin teması sonucu ortaya çıkan biyokimyasal sinyal uygun bir mekanizmayla kantitatif olarak elektrik sinyaline dönüştürülür [28].



Şekil 2.2. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi [29]

2.1.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyobileşen veya dönüştürücüye göre değişik adlar altında toplanabilirler (Çizelge 2.1). Biyobileşen olarak enzimler, mikroorganizmalar, hücreler, organaller, dokular, virüsler, immüno ajanlar, nükleik asitler (DNA, RNA), proteinler, karbohidratlar ve sentetik enzimler kullanılabilir. Dönüştürücülere göre sınıflandırmada hergün yeni olasıklar çıkmakta çeşitlilik sürekli artmaktadır [25].

Çizelge 2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması [25]

<u>Biyobileşene göre</u>	<u>Dönüştürücüye göre</u>	
Enzim	Optik	• Spektroskopik • İnternal reflektans • Elipsometrik • SPR (Yüzey Plazmon Rezonans)
Hücre		
Mikroorganizma		
Doku	Elektrokimyasal	• Potansiyometrik • Amperometrik • Voltametrik • İmpedimetrik • Konduktometrik
Organel		
Virüs		
Nükleik asit		
İmmuno ajanlar		
Reseptörler	Akustik	• Piezoelektrik • Yüzey dalga sensörleri • Manyetik akustik rezonatör v.b.
Biyomimik materyal	Termal	
	Micro-cantilever temelli	

2.1.3. Biyosensörlerin kullanım alanları

Biyosensörlerin kullanım alanları incelendiğinde tıbbi analizlerden çevresel analizlere, proses izlenmesinden ilaç analizlerine ve savunma faaliyetlerine kadar pek çok alanda uygulama bulunduğu görülmektedir. Biyosensörlerin en çok kullanıldığı uygulama alanları aşağıda verilmiştir [25].

- Gıda analizleri
- Mekanistik çalışmalar
- İlaç geliştirme
- Kriminal analizler
- Medikal tanı, klinik analizler
- Çevre analizleri
- Kalite kontrolü
- Endüstriyel proses kontrolü
- Biyolojik silah ajanlarının tesbiti
- İlaç üretimi

Bugüne kadar 180’den fazla farklı madde için biyosensör hazırlanmış olup, bunlardan ancak 25 kadarı ticari olarak üretilmiştir [25]. Biyosensörler için kuşkusuz en iyi kullanım alanı biyomedikal sektördür ve bu alanda uygulama olanağı bulan ilk biyosensör enzim sensörleridir. Ticari olarak ilk üretilen biyosensör, şeker hastalığı teşhisi için kan ve idrarda glukoz tayinini mümkün kılan GOD elektrodudur. Bunu renal fonksiyon testleri için geliştirilen üre ve kreatinin elektrotları ile kas gücünü ölçmeye yönelik laktat elektrodu izlemiştir [25]. Ayrıca gıdalardaki yabancı maddeler (pestisitler, toksitler vb.) yanında aroma ve tazelik gibi kompleks parametreler içinde biyosensörler hazırlanmaktadır. Antijen-antikor reaksiyonu (immuno sensörler) veya DNA hibridizasyonu vasıtası (DNA sensörleri) ile mikroorganizmaların doğrudan tayini yapılabilmektedir [25]. Birçok kimyasal savaş maddesinde organofosfor bileşikleri bulunur ve bunlarda kolinesteraz temelli enzim sensörleri ile belirlenebilir [1].

Son yıllarda enzim elektrotları analizörler ile birleştirilip yoğun bakım ünitelerinde kullanılmıştır. Ayrıca insan vücuduna yerleştirilebilen biyosensörler ameliyat sırasında biyolojik sıvıların vücut dışına alınmadan ve tüketilmeden analiz imkanı verirler. Ameliyat esnasında kesintisiz bilgi sağlaması açısından bu uygulama oldukça önemlidir. İleri zamanlarda kullanma imkanı bulabilecek bir diğer biyosensör uygulaması ise kısa ömürlü süper oksit, nitrik oksit ve düşük konsantrasyonlu nörotransmitter, hormon gibi maddelerin in vivo tayinidir [25].

Aşağıda verilen çizelgede (Çizelge 2.2) biyosensör grupları ve bunların analiz alanları görülmektedir. Sensör çeşitleri içerisinde en çok uygulama alanı bulan enzim sensörleridir [25].

Çizelge 2.2. Biyosensör grupları ve kapsadıkları analiz alanları [25]

Biyosensör grubu	Analiz alanı
Enzim Sensörleri	Küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler (metabolitler, ilaçlar, gıdalar, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler)
Immunsensörler	Viruslar, patojenler, ksenobiyotikler
Mikrobiyal Sensörler	Enzim sensörlerinin kapsadığı alanlar, BOD, toksisite, mutajenite
DNA Sensörleri	Viruslar, patojen mikroorganizmalar

2.2. Enzimler ve Enzim Bazlı Biyosensörler

En genel anlamda bakıldığında bir biyosensör biyobileşen, dönüştürücü ve ölçüm sisteminden ibarettir. Enzim sensörlerini diğer biyosensörlerden ayıran tek fark biyoaktif tabakada biyobileşen olarak enzimlerin yer almasıdır [6,7].

Enzimler, biyolojik yapılardaki reaksiyonların ılımlı şartlarda gerçekleşmesine imkan sağlayan ve bu reaksiyonları düzenleyen genel olarak protein yapılı spesifik biyokatalizörlerdir [30,31]. Enzimler, uygun şartların sağlanması durumunda doğal ortamlarının dışında besin, kimya, biyoteknoloji, kağıt ve tekstil endüstrisi gibi pek çok farklı alanda kullanılabilmektedirler [32].

Genel anlamda enzimler protein veya proteid yapısındaki biyomoleküllerdir. Ancak son 30 yılda bazı RNA moleküllerinin (ribozimler) ve antikorların (abizimler) da katalitik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir [25]. Enzimlerde protein yapıyı oluşturan amino asitlerin dizilişi, sayısı ve sırası belirli bir düzen içindedir. Bu düzen enzimin substrata seçiciliğini (özgüllüğünü) sağlar [33]. Enzimlerin bir kısmı sadece protein yapıdan oluşurken bazıları ise protein yapıdan farklı bir takım maddeler de ihtiva eder. Bu maddeler “koenzim” ya da “kofaktör” adını alır. Kofaktör bir metal iyonu olabildiği gibi (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} v.b.), koenzim ise organik bir madde (NAD^+ , FAD, TPP, CoA v.b.) olabilir [34]. Koenzim ya da kofaktör enzime kovalent bağlıysa “prostetik grup” adını alır. [33,35]. Enzimlere etki eden maddelere “substrat” denir. Enzim üzerinde substratların bağlanıp bir kimyasal reaksiyona girdiği yere “aktif bölge” denir. Substrat ve eğer varsa koenzim, aktif bölgeye hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya kovalent bağlar ile bağlanır [33,36].

Enzim sensörlerinin sınıflandırılması en yaygın şekilde, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sinyalin belirlenme ilkesine göre yapılmaktadır (Çizelge 2.3) [33,37].

Çizelge 2.3. Enzim bazlı sensörlerin sınıflandırılması [33,37]

1. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Sensorleri
a. Amperometrik esaslı enzim sensörleri
Birinci nesil amperometrik enzim elektrotları
İkinci nesil amperometrik enzim elektrotları
Üçüncü nesil amperometrik enzim elektrotları
b. Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri
Proton duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Amonyum duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Karbon dioksit duyar potansiyometrik enzim elektrotları
Diğer iyon duyar potansiyometrik enzim elektrotları
c. Yarı iletkenleri esas alan enzim sensörler,
Enzim alan etki transistörleri (ENFET)
2. Optik esaslı enzim sensorleri;
Absorpsiyon esaslı optik enzim sensörleri.
Fluoresans esaslı optik enzim sensörleri
Biyoluminesans esaslı optik enzim sensörleri.
3. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri
4. Piezoelektrik esaslı enzim sensörleri

2.2.1. Elektrokimyasal esaslı enzim sensörleri

Amperometrik esaslı enzim sensörleri

Amperometri en genel anlamıyla belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Sistem; çalışma, referans ve yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrottan oluşur. Çalışma elektrodu immobilize biyoaktif tabaka içermektedir. Söz konusu akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektro aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Kalibrasyondan sonra, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır [37,38].

Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik

oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır [37-39].

Potansiyometrik esaslı enzim sensörleri

Potansiyometri en genel anlamda çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlar. Elde edilen sinyal Nerst Kanunu uyarınca derişimin logaritması ile orantılıdır. Potansiyometrik enzim elektrotlarında kullanılan temel sensörler pH ya da tek değerlikli iyonlara duyar cam elektrotlar, anyon ya da katyonlara duyar iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyar elektrotlardır. [37,39].

Yarı iletken esaslı enzim sensörleri

Temel sensör olarak metal oksit yarı iletken alan etkili transistörleri (MOSFET) ya da iyon duyar alan etkin transistörleri (ISFET) esas alan bu tür enzim sensörleri, enzim ile alan etkin transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etkili transistörü (ENFET) olarak adlandırılır [6,9].

2.2.2. Optik esaslı enzim sensörleri

Optik enzim sensörleri iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle enzim immobilize edilerek hazırlanan ölçüm cihazlarıdır. Enzimatik reaksiyon sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü temel alır. Sinyal ışık yansımaları, saçılması ya da yayımı sonucu meydana geldiği için, optik lifin üzerine enzim immobilizasyonu ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri absorpsiyon, flouresans, biyoluminesans gibi ilkeler çerçevesinde işlev görürler [37,39].

2.2.3. Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri

Kalorimetrik esaslı enzim sensörleri; termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpik enzim sensörleri gibi değişik isimlerle tanımlanırlar. Çalışma ilkeleri bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişimini belirlemektir. Genel olarak ekzotermik enzimatik reaksiyonlardan yararlanılır. Enzimatik reaksiyon sonucu

meydana gelen sıcaklık değişimi ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır ve oldukça küçük sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir [37,39].

2.2.4. Piezoelektrik esash enzim sensörleri

Piezoelektrik sensörler genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki değişimi belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütlesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör seçimliliği kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Bir piezoelektrik sensörün yzerinde enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen piezoelektrik enzim sensörlerinde, enzim moleküllerine substratların bağlanması dolay meydana gelen kütle değişimlerinin, piezoelektrik kuartz diskin vibrasyonunda sebep oldukları farklanmadan yararlanılarak madde miktarına ulaşılır [37,39].

2.3. Yapay Enzim Temelli Sensörler

Doğal enzimler evre şartlarından etkilenip denatüre olabildikleri için, enzim gibi davranabilen ama dış koşullara daha dayanıklı sentetik polimerik yapılar, yani sentetik enzimler günümüzde tasarlanmaktadır [25].

Yapay enzim temelli biyosensörler iki mekanizmaya göre çalışır; birincisi substrat gibi davranan analitin tayin edilebilir bir ürüne dönüşümü ve bu ürünün izlenmesi veya tayin edilebilir bir kosubstratın (rneğin, oksijen) tüketiminin izlenmesi şeklinededir. İkincisi ise; analitin yapay enzimin substratı dönüşüme uğratması reaksiyonunu inhibe etmesi sonucu substratı tayin edebilir formdan tayin edilemez forma veya tam tersine dönüşmesine dayanır. Tüm durumlarda reaksiyon hızı analit konsantrasyonuna bağlıdır ama reaksiyon koşulları ve enzim konsantrasyonu değişmez [25].

Yapay enzim temelli biyosensörler kendi arasında çeşitlilik göstermektedir. Aşağıda eşitleri sunulmuştur.

2.3.1. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) temelli sensörler

Tasarlanarak sentezlenen MIP'ler enzim takliti yapabilmekte ve aktivite gösterebilmektedirler. Örneğin; dehidrojenaz takliti yapan bir MIP yardımı ile fruktozil valin elektrokimyasal olarak tayin edilebilmektedir. Fruktozil valin diyabet kontrolü için önemli bir indikatör olan HbA1c için model bir bileşiktir [25].

2.3.2. Kompozit polimerik yapı temelli sensörler

Birbirini tamamlayan kimyasal fonksiyonlara sahip polimerlerin düzenlenmesi ile ilginç özellikleri olan üç boyutlu yapılar oluşabilmektedir. Örneğin; katyonik bir polimer olan polihistidin ile anyonik bir polimer olan polistiren sülfonatın Cu(II) iyonları ile oluşturduğu kompozit yapı fosfodiesteraz aktivitesi gösterebilmektedir. Bu kompozitin biyobileşen olarak kullanıldığı sensörler ile ATP ve ADP tayini yapılabilmektedir. Bu sensör gıdaların mikrobiyal kirliliğe uğrayıp uğramadığının kontrolünde oldukça önemlidir [25].

2.3.3. Peptit temelli sensörler

Protein yapısındaki enzimler, protein molekülünün üç boyutlu yapısını oluşturmak üzere katlanması sonucu katalitik aktivite yeteneği kazanır. Daha az sayıda aminoasite sahip, amaca uygun zincir dizisi ve uzunluğuna sahip peptitlerin enzim takliti yapabilmeleri mümkündür [25].

2.4. Enzim İnhibisyonu Temelli Biyosensörler

Enzimatik biyosensörler ile analit tayini iki farklı yaklaşıma dayanır; birincisi, enzim analiti metabolize ediyorsa analit, oluşan ürün üzerinden tayin edilir. İkicisi; analit enzimi inhibe ediyorsa, analit konsantrasyonu ile ürün oluşumu ters orantılı olarak değişir. İşte bu ikinci durumda biyosensör “enzim inhibisyonun dayalı biyosensör” olarak adlandırılır [25].

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de “inhibitör” denilir. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde

başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve pestisit ve insektisit gibi zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterirler. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemli bir araç fonksiyonu görmüştür [34].

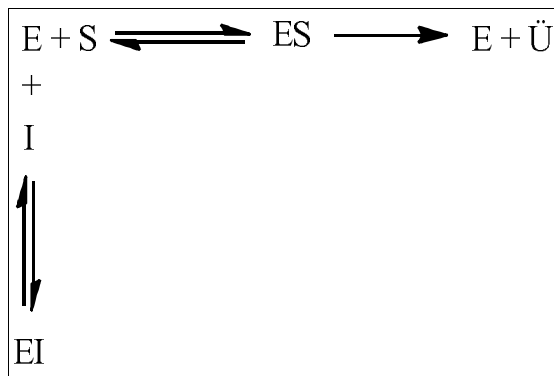
Enzim inhibisyonu biyosensörleri; organofosfor pestisitlerinin, insektisit türevlerinin tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır [25].

İnhibitörler tersinir ve tersinmez olarak iki sınıfa ayrılırlar. Tersinmez inhibitörler, enzimin aktif merkezine kovalent bağlanırlar ve enzimin konformasyonunu değiştirerek katalitik aktiviteyi tamamen yok edebilirler. Örneğin; sinir gazı zehiri ve bazı insektisitler. Tersinir inhibitörlerde enzim ve inhibitör arasında bir denge kurulur. Enzim-inhibitör (EI) kompleksinin K_i sabiti aynı zamanda “inhibitör sabitidir” ve enzimin inhibitöre ilgisini ifade eder [25].

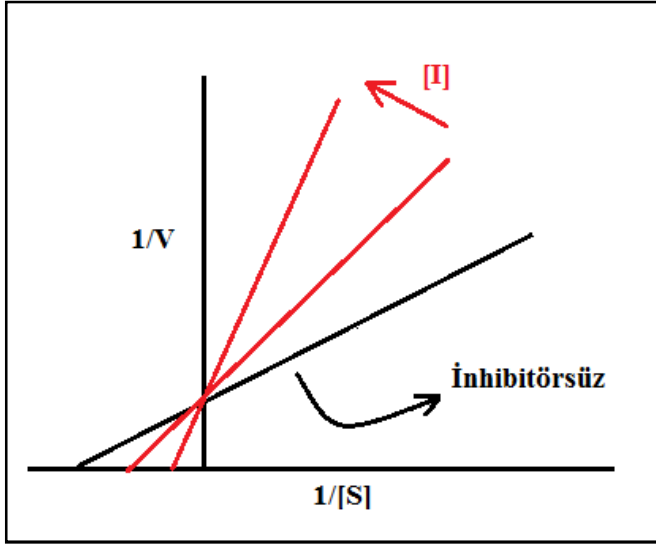
2.4.1. Tersinir inhibisyon türleri

Yarışmalı (competitive) inhibisyon

İnhibitör (I) ve substrat (S), enzimin (E) aktif merkezine bağlanmak için yarışır (Şekil 2.3). İnhibitör bağlanması substrat bağlanmasını engeller böylece enzimin aktivitesi azalır [25]. Lineweaver-Burke grafiğinde V_{max} (maksimum hız) aynı kalırken; K_m (Michealis-Menten sabiti) artar (Şekil 2.4).



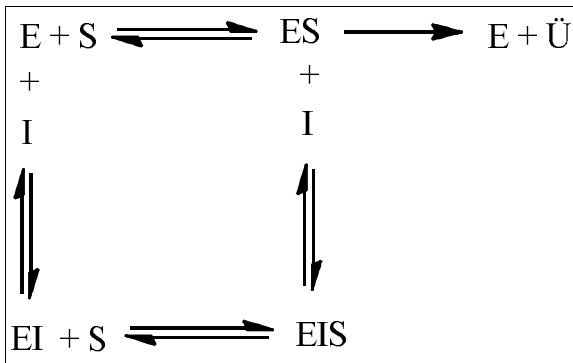
Şekil 2.3. Yarışmalı inhibisyon (ES: enzim-substrat ara kompleksi, EI: enzim-inhibitör kompleksi, Ü: ürün)



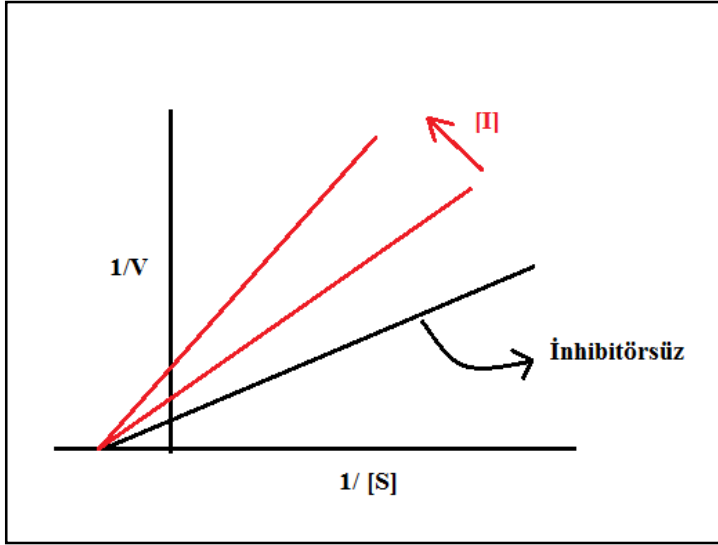
Şekil 2.4. Yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği [34]

Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon

İnhibitör ve substrat farklı merkezlere bağlanırlar (Şekil 2.5). İnhibitör bağlanması enzim konformasyonunu etkiler ve substrat bağlanmasını engeller. Yarışmasız inhibisyonda inhibitör hem serbest enzime hem de enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır ancak bağlanma aktif merkez üzerinden değildir [25]. Lineweaver-Burke grafiğinde $V_{\max}$ azalırken; K_m aynı kalır (Şekil 2.6).



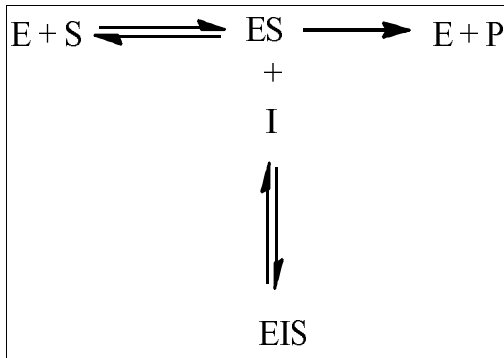
Şekil 2.5. Yarışmasız inhibisyon (EIS: enzim-inhibitör-substrat kompleksi)



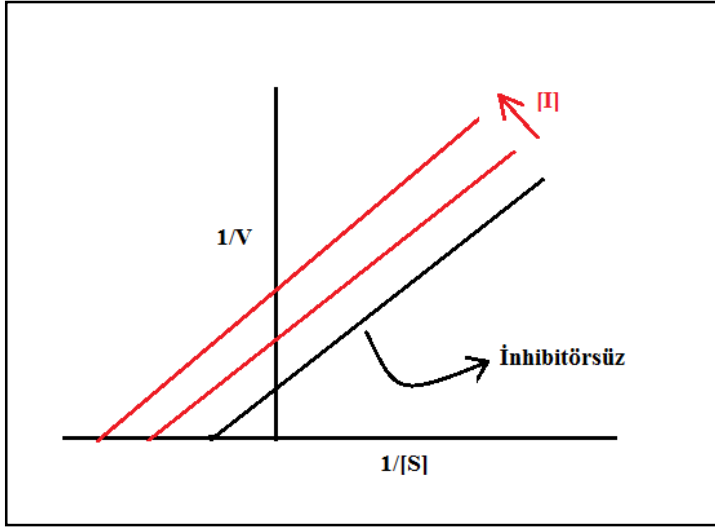
Şekil 2.6. Yarışmasız bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği [34]

Yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon

Bu inhibisyon türünde inhibitörün serbest enzime karşı hiçbir ilgisi yoktur (Şekil 2.7). Ancak ES ara kompleksine bağlanarak ürün oluşumunu azaltır. Lineweaver-Burke grafiğinde $V_{\max}$ ve K_m aynı oranda azalır (Şekil 2.8) [25].



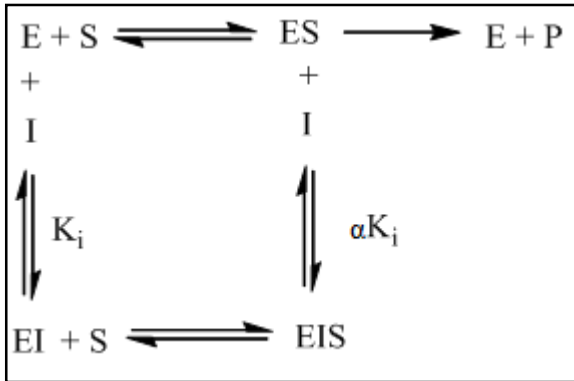
Şekil 2.7. Yarı yarışmalı inhibisyon



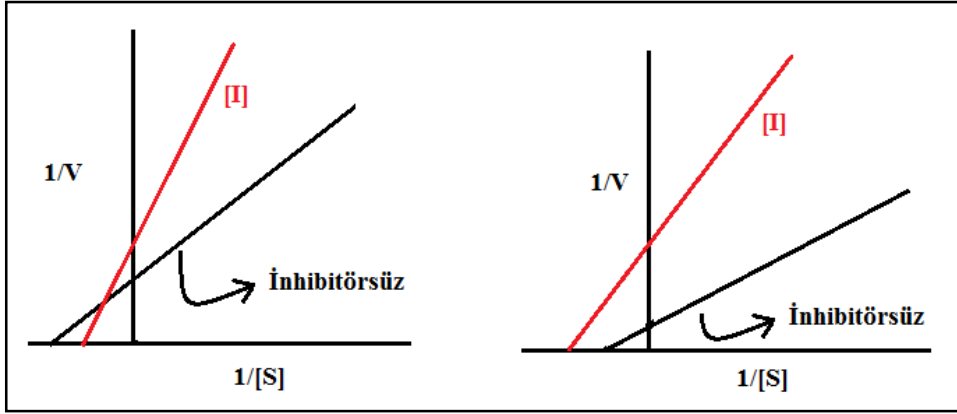
Şekil 2.8. Yarı yarışmalı bir inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafiği [34]

Karışık (mix) inhibisyon

Karışık inhibisyonda inhibitör yarışmasız inhibisyonda olduğu gibi hem serbest enzime hem de ES kompleksine bağlanır, ancak bu bağlanmalar farklı afinitededir (Şekil 2.9 ve 2.10) [25].



Şekil 2.9. Karışık inhibisyon



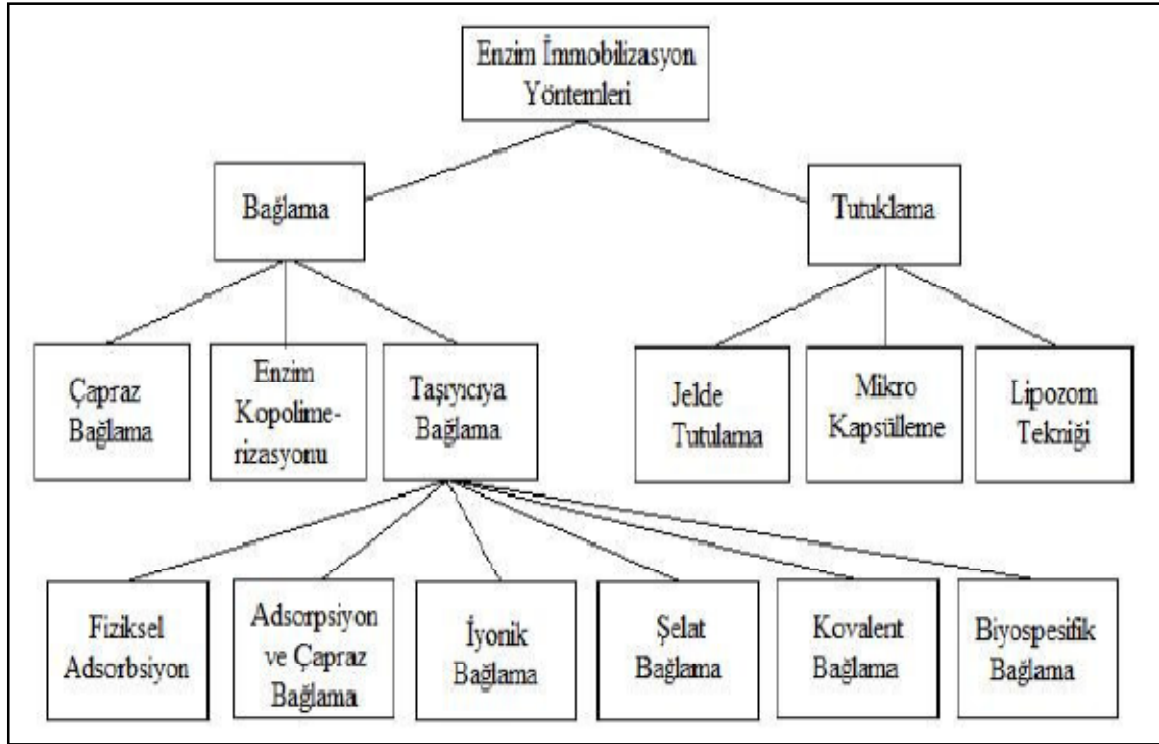
Şekil 2.10. Karışık tip inhibitörün varlığında ve yokluğunda enzimatik reaksiyon hızının Lineweaver-Burke grafikleri [25]

2.5. Biyosensörlerde Biyobileşen İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon kelime anlamı olarak, *tutuklanmış, hareketi sınırlandırılmış, çözünmez hale getirilmiş* demektir. Daha kapsamlı olarak immobilizasyon, enzimlerin ya da mikroorganizmaların fiziksel ve/veya kimyasal yöntemlerle katalitik aktifliğini koruyarak, tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla organik veya inorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır [31,40].

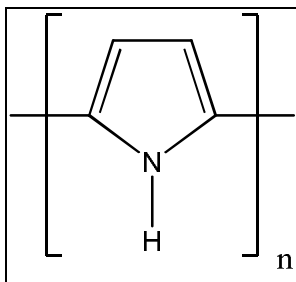
Biyosensör sisteminde en sık kullanılan biyobileşen enzimlerdir. Enzim immobilizasyonu bir enzim biyosensörünün tasarımı esnasındaki en önemli basamaklardan birisidir. Çünkü biyosensörün kararlılığı, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için enzim ve destek materyal arasında güçlü etkileşimlerin olması gerekir [1]. Biyosensör çalışmalarında enzim immobilizasyonu için farklı metotlar kullanılır (Çizelge 2.4). Her bir metodun kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Örneğin; çapraz bağlama uygulanması kolay bir yöntemdir, ancak çapraz bağlanma enzimin aktif bölgesinde meydana gelirse enzim aktivitesinde azalmaya neden olabilir. Bu sebeple çapraz bağlama gibi bir yöntem kullanılacak ise mutlaka çapraz bağlayıcı reaktifin miktarı iyi ayarlanmalıdır [41,42].

Çizelge 2.4. Çeşitli enzim immobilizasyon türleri [38]



2.6. İletken Polimerler ve Polipirol (PPy)

İletken polimer kavramı kendi örgüsü içerisindeki elektronlarla (elektronik) yeterli düzeyde elektriksel iletkenliği sağlayan polimerler için kullanılır. Başlıca iletken polimerler; polianilin, polipirol (Şekil 2.11), poliasetilendir [43].



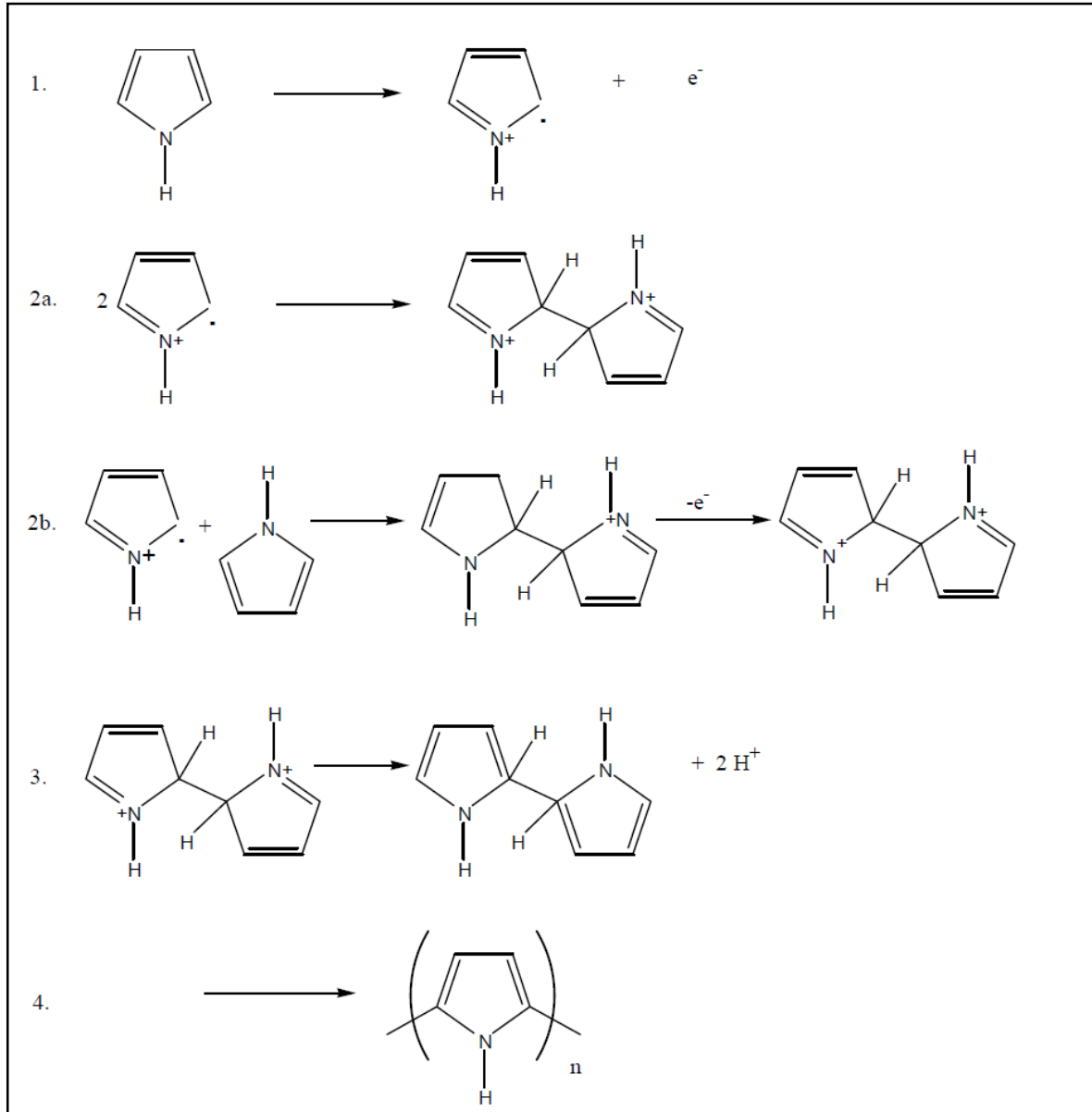
Şekil 2.11. Polipirol (PPy)

PPy kimyasal yoldan elde edilebildiği gibi pirolün elektrokimyasal polimerizasyonu ile de elde edilebilir. Elektrokimyasal reaksiyon sulu veya susuz çözeltilerde ve oksijensiz ortamlarda anodik yükseltgenme ile başlar ve devam eder. Şekil 2.12’de görüldüğü gibi

radikal katyonlar dimerleşip tekrar yükseltgenme veya başka monomere katılıp sonra yükseltgenmektedir. Oluşan dikatyon iki protonkaybedip nötürleştikten sonra yükseltgenme ile başlayan basamağa tekrar dönmekteve bu mekanizma polimerleşme duruncaya kadar tekrarlanmaktadır [33,44].

Levha ya da tambur şeklindeki elektrotlar kullanılarak PPy filmler sentezlenebilir. Derişimi 1,0 M pirol ve 0,1 M destek elektrolit (örneğin; tetrabütil amonyum tetraflorborat, sodyum perklorat, sodyum klorür v.b.) (destek elektrolit anyonu dopant olarak görev yapar) uygun potansiyelde Pt levha elektrot üzerinde elektroliz edilir. İletken karakterinden dolayı elektrot yüzeyinde oluşan PPy film pirolin ileri polimerizasyonunu engellemez. Elektroliz zamanı değiştirilerek film kalınlığını kontrol etmek mümkündür. Ya da dönüşümlü voltametri tekniği kullanılıyorsa çevrim sayısı değiştirilerek istenilen kalınlıkta PPy film elde edilebilir [43].

PPy'ün diğer iletken polimerlere göre sulu ve susuz ortamda sentezlenebilmesi gibi bir üstünlüğü de vardır. Pirolün sulu ortamdaki polimerleşmesi ile pirolün yükseltgenmesi 0,65 V ile başlar ve yükseltgenme pik potansiyelleri 0,8-1,2 arasında görülmektedir. Susuz ortamda ise 1,0-1,5 V arasında görülür [43].



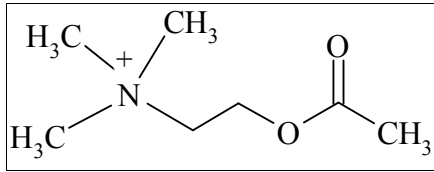
Şekil 2.12. Prolün elektrokimyasal yükseltgenme ile polimerleşme mekanizması [33,44]

2.7. Asetilkolin Metabolizması

2.7.1. Asetilkolin (ACh)

Bir alkaloid (bitki, hayvan ya da mantar tarafından doğal olarak üretilen amin yapısındaki kimyasal bileşik) olan ACh, tanımlanan ilk nörotransmitterdir (Şekil 2.13). Merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal iletilci (transmitter) olmasının yanı sıra birçok organizmanın (insanlar dahil) parasempatik sinir sisteminde (istemsiz duysal ve motor sistemi) yer alır [45]. Parasempatik sinir sistemi, kolinerjik sistem olarak da bilinir.

Formülü $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ olan ACh, asetik asit ile Ch'nin esteridir. İlk kez 1914 yılında İngiliz bilimadamı Henry Hallet Dale tarafından tanımlanmış, 1921 yılında ise Avustralyalı bilim adamı Otto Loewi tarafından, kurbağa kalpleri üzerinde yaptığı deneyler sonucu bir nörotransmitter olarak doğrulanmıştır. Kolinerjik sistemin nörotransmitter olan ACh üzerine kurulu olduğu keşfi 1936 yılında Loewi'ye Nobel ödülü kazandırmıştır [45].



Şekil 2.13. Asetilkolin (ACh)

ACh büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Bu ester, sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine sinir impulsu taşımakla görevli olmasının yanı sıra, sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevlidir [8,9,46]. Ayrıca ACh, çizgili kas (iskelet kası) liflerindeki ACh reseptörlerine bağlanarak, lifin kasılmasına neden olur. Parasempatik sinir sistemindedir yer alan ACh, bu sistemin uyarılmasıyla beraber gerçekleşen kalp atışının yavaşlaması, tükürük salgısının artması gibi etkilerin gerçekleşmesine neden olur [45].

2.7.2. ACh sentezi

ACh'nin sentezi, yıkımı ve depolanması bütün kolinerjik nöronlarda benzerdir. ACh; kolinerjik nöronların gövdesinde asetilkoenzim A (Asetil-KoA)'dan gelen asetil ve Ch'in, kolin asetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi ile oluşur (Şekil 2.14) [47].



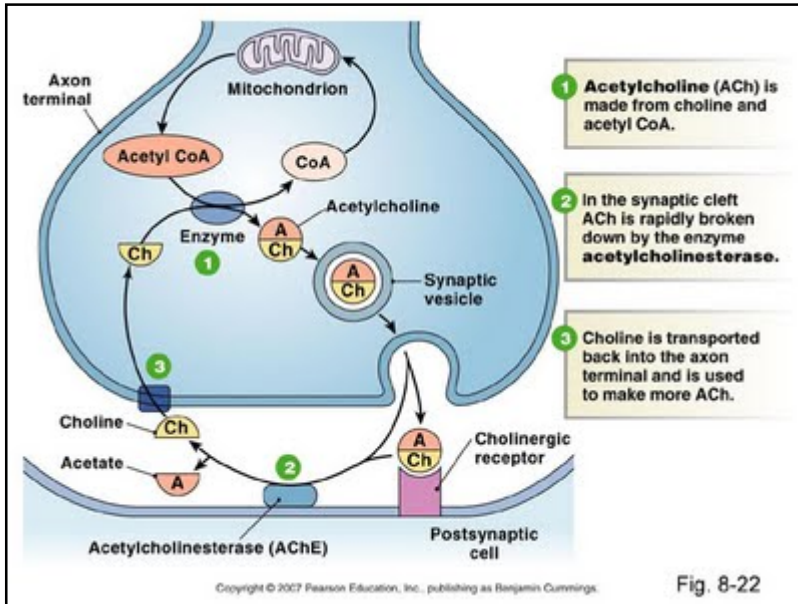
Şekil. 2.14. ChAT'ın katalizlediği reaksiyon

Asetil-KoA glikoliz ürünüdür ve reaksiyonda kullanılan asetil-KoA'nın büyük çoğunluğu, mitokondri iç membranında, glikoliz sırasında, pürivat dehidrojenaz enzimi tarafından

oluşturularak ChAT'ın bulunduğu sitoplazmaya taşınır [9]. Ch'in ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden ACh sentezinde kullanılan Ch'dir [47]. Bazı nöronlarda, Ch'in de novo sentezi yapılmakla birlikte, merkezi sinir sisteminde, ACh sentezinde kullanılan Ch'in üçte biri diğer kaynaklardan sağlanır [51].

2.7.3. ACh depolanması ve salgılanması

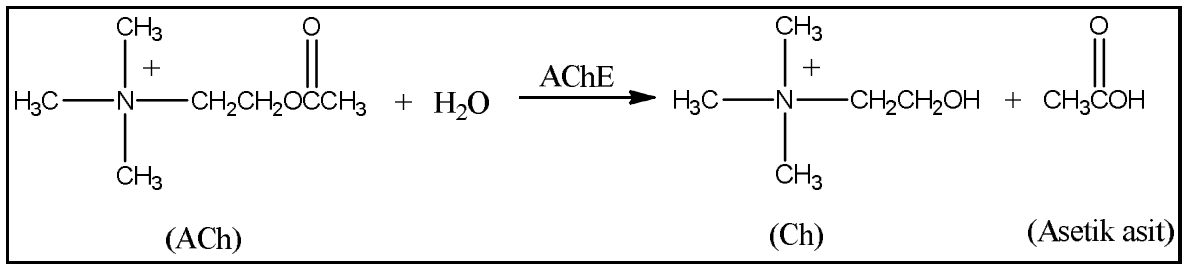
Beyinden gelen elektrik akımı sinirler boyunca iletilir. Sinirler belli bölgelerde birbirleriyle karşılaşırlar. Bu karşılaşma bölgesine “sinaps” adı verilir [48]. ACh'in sinapstaki varlığı, ChAT ve AChE enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller, nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik aralığa döker. Sinaptik aralığa salınan ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, bunlar da yine AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan Ch yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Şekil 2.15) [47].



Şekil 2.15. ACh metabolizması [49]

2.7.4. ACh yıkımı

Dış çevre ile lifin iç kısmı arasında ACh derişimi farklılıklarının oluşması neticesi sodyum iyonu geçisiyle bir elektrik akımı meydana gelir. Bu olayın sonunda ACh, AChE enzimi tarafından hidrolize uğrayarak inaktif hale getirilir. Hidroliz sonunda Ch ve asetik asit olmak üzere iki tane inaktif kısım meydana gelir (Şekil 2.16). Bir süre sonra inaktif formlar tekrar eski haline döner ve sonraki impulsu geçirmeye hazır hale gelirler. Enzimin bu etkisi sinir iletiminin esasını oluşturur [9].



Şekil 2.16. AChE'nin katalizlediği reaksiyon

2.8. Kolinesterazlar ve AChE

Kolinesterazlar; ACh, bütirilkolin ve asetiltiyokolin (ATCh) gibi çeşitli kolin türlerinin ayrışma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir [50,51]. Plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunan kolinesterazlar, kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahiptir [47]. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılmışlardır; bir tanesi seçici olarak ACh'i hidroliz eden asetilkolinesteraz (AChE; E.C 3.1.1.7), diğeri ise ACh ve diğer kolin esterlerini hidroliz edebilen bütirilkolinesteraz (BChE; E.C 3.1.1.8) dır [47,52]. AChE, gerçek kolinesteraz olarak bilinirken, BChE spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak da bilinir [47,53]. Kolinesterazlar aynı zamanda hücre yenilenmesi, farklılaşması, farklı etkenler sonucunda oluşan strese yanıt ve amiloid (beyin v.b. dokularda sentezlenen ancak düzensiz plaklar şeklinde birikmesi sonucu birçok ciddi rahatsızlığa sebep olabilen bir protein) oluşumunda da rol oynamaktadırlar [47].

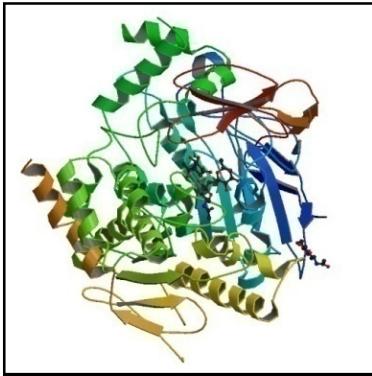
AChE; beyin ve eritrositlerde yüksek derişimde bulunurken, BuChE; serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur. [47,52]. AChE'nin temel fonksiyonu

kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır fakat ACh ve diğer Ch esterlerini hidroliz eden BuChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir [47,54].

AChE enzimi başlıca beyin, sinir hücreleri, kas ve eritrositlerde bulunur [8,9]. Hayvan aleminde de oldukça yaygın bir enzimdir. En bol AChE kaynaklarından birisi elektrik balığının (*Torpedo vulgaris*) elektrik organıdır. Bu enzim ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılmıştır [9,55]. Bir adet AChE molekülü dakikada $4,0 \times 10^5$ adet ACh molekülünü hidroliz eder, bundan dolayı en etkin hidrolitik enzimlerden bir tanesidir [50,51].

AChE, diğer esterazlardan ACh'i hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle AChE olarak adlandırılır [9,55]. Son yıllarda spesifik AChE, eritrositte bulunan AChE'den farklı olarak serumda da bulunmuştur. Serum ve eritrosit AChE'nin optimum pH'sı yaklaşık 7,2'dir. Serum AChE aktivitesinin ölçümü klinik açıdan önemlidir, çünkü hepatit, habis tümörlü hastalar, astım ve akciğer tüberkülozu gibi hastalıklarda bu enzimin normal değerinin değişmektedir [9].

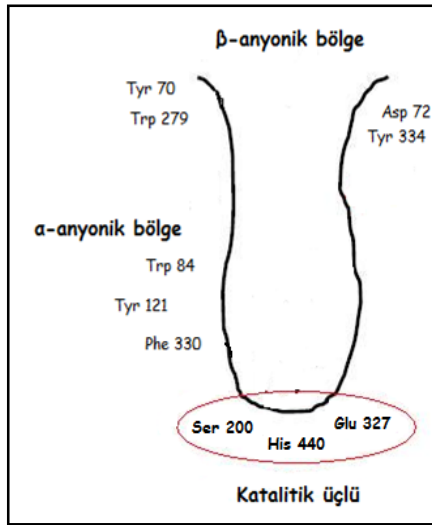
AChE'nin yapısı 1990'dan beri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Şekil 2.17). AChE üzerine kaydedilmiş ilk deneyler bulunabilirliğinden dolayı elektrikli yılan balığı (*Torpedo californica*) üzerine olmuştur [58]. İnsan rekombinant AChE'lerin ticarileşmesine kadar bu informal bir model olarak benimsenmiştir. [58].



Şekil 2.17. AChE'nin üç boyutlu yapısı [56]

AChE, aktif bölge ve katalitik mekanizma açısından başka bir enzimde bulunmayan özelliklere sahiptir. Elektrikli yılan balığı (*Torpedo Californica*) AChE'nin aktif merkezi

20 angstrom derinliğinde uzun ve dar bir oluk yapıdadır (Şekil 2.18). ‘Periferik Bölge’ ve ‘Aktif Bölge’ olmak üzere iki bağlanma bölgesi içermektedir. Periferik Bölge (PAS, periferik anyonik bölge ya da β -anyonik bölge) aktif bölge çukurunun ağız kısmındadır [57]. Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 ve Tyr 334 aminoasitleri en önemli kalıntılarıdır. Bu bölge hem katalitik etkinliğin düzenlenmesine, hem de AChE’ ın pek çok inhibitör ile etkileşimine aracılık eder, birçok toksin ve ilaçlar için bir hedeftir, ayrıca Alzheimer hastalığında da muhtemel bir öneme sahiptir [5].

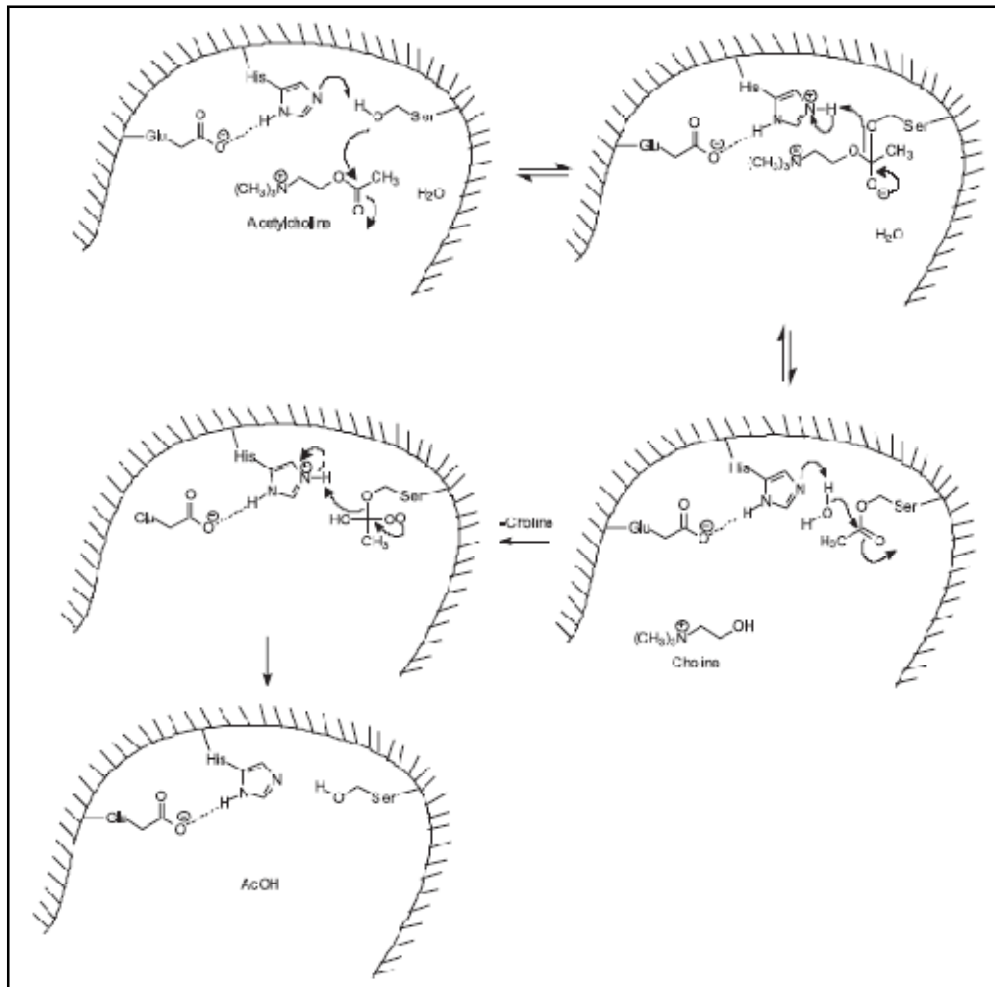


Şekil 2.18. Yılan balığı AChE’ın aktif merkezi

Aktif bölge üç alt bağlanma bölgesini ihtiva eder; esteratik, α -anyonik ve aromatik bölge. α -anyonik bölge fare AChE’ında Trp 86, Tyr 337 ve Phe 338 aminoasitlerinden, yılan balığında ise Trp 84, Tyr 121 ve Phe 330 aminoasitlerinden oluşmuştur. Bu bölge ACh kuaterner amonyum atomu ile etkileşime girer ve doğru yönlendirmeden sorumludur. Aromatik aminoasitlerden oluşan ve aromatikbölge (geçit, boğaz) olarak adlandırılan oyuğun içinden geçerek aktif bölgeye ulaşılması ACh için yüksek seçicilik sağlar [58]. Substratın (ACh) nüfuz etmesine ACh kuaterner amonyum atomu ve fenilalanin, triptofan, tirozin aromatik merkezlerinin π elektronları arasındaki katyon- π etkileşimleri izin verir [58-60]. Özellikle Trp 84 amonyum grubuna çok yakındır (3,7 angstrom). Esteratik bölge, katalitik üçlü (triad) (Ser 200, His 440ve Glu 327) olarak da bilinir. Katalitik üçlüde bulunan serin ve histidin, ACh’in (substratın) açıl grubuna geçici olarak bağlanır [62].

AChE, tetramer (G4) yapıdadır fakat suda çözünebilen bir molekül olarak gizlenmiş dimer (G2) şeklinde de oluşabilirler [58]. Ayrıca G1 izoformu olduğu da bilinmektedir. Alzheimer hastalarının beyinlerinin belirli bölgelerinde G4 formunun kaybı nedeni ile G4/G1 oranının azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [47,63,64].

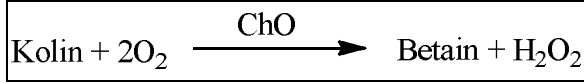
ACh'nin enzimatik hidrolizi katalitik üçlü bölgesindeki aminoasit kalıntılarının temelinde gerçekleşir ve nükleofilik katılmalar ile asit-baz reaksiyonlarından ibarettir. Mevcut deneysel verilerle desteklenen önerilen mekanizma, açıl-enzim ara ürününün meydana geldiği iki nükleofilik atak ve iki proton transferinden ibarettir. His 440, Ser 200'den bir proton çıkarmasıyla oluşan Ser-O⁻ nükleofili ACh'e saldırır, tetrehedral bir katılma ara ürünü oluşur. Protonlanmış His-440, Glu-327 tarafından kararlı hale getirilir. Geçiş halindeki oluşan yükler tarafından sağlanan kararlılık, AChE'a katalitik güç yaratır [62,65-69]. Bu mekanizma Şekil 2.19'da görülmektedir.



Şekil 2.19. ACh'nin AChE tarafından hidroliz mekanizması [62]

2.9. Kolin Oksidaz (ChO)

Kolin oksidaz (ChO), Ch'in betain ve hidrojen preoksite dönüşüm reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (Şekil 2.20). Bu enzim oksidoredüktaz sınıfına dahildir. Organik bir kofaktör olan FAD, enzime kovalent olarak bağlıdır (Şekil 2.21) [70].



Şekil 2.20. ChO'nun katalizlediği reaksiyon

Şekil 2.20'deki reaksiyon, iki yarı tepkime olarak gerçekleşir [71,72]. İlk yarı tepkime, Ch'in hidroksil protonunun yakalanmasıyla gerçekleşir ve sonucunda alkoksit ara ürünü oluşur. Bu tepkimeyi alkoksitin α -karbonundan flavinin N(5) atomuna hibrit iyonu transferi takip eder ve sonuçta Ch, betaine dönüşür ve böylelikle flavin yükseltgenmiş olur [71,73]. Daha sonra betain, enzimin aktif bölgesinde hidratlanır ve gem-diol Ch oluşumu sağlanır [71,74,75]. İkinci yarı tepkimede ise gem-diol kolin, glisin betaine dönüşür. Bu yarı tepkimelerde yükseltgenmiş olan flavin, oksijene iki elektron transfer eder [71,76].



Şekil 2.21. ChO'nun üç boyutlu yapısı

2.10. Alzheimer Hastalığı ve Kolinergik Hipotez

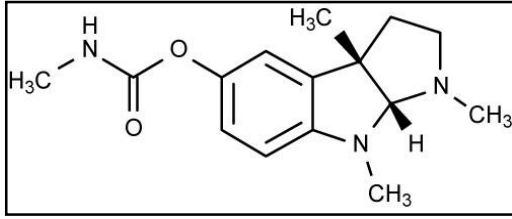
Alzheimer, beynin bazı bölgelerindeki hücrelerin bilinmeyen nedenlerle yavaş yavaş kaybolması sonucu hafıza, konuşma, yön bulma, problem çözme, insanları tanıma gibi günlük yaşamda gerçekleştirilen pratiklerin zayıfladığı ve davranış bozukluklarının

görülebildiği bir ileri yaş beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığında beyin hücrelerinde meydana gelen kaybolmanın nedeni henüz bilinmemekle beraber, hastalığın ortaya çıkmasında genetik faktörler, anormal proteinler (amiloidler) veya otoimmün reaksiyonlar gibi pek çok farklı etkenin neden olabileceği düşünülmektedir [77]. Bu nedenlerden bir tanesi ise “kolinerjik hipotez” olarak tanımlanan kolinerjik sistemdeki değişimlerdir.

Kolinerjik hipotezi şöyle açıklamak mümkündür; beyindeki sinir hücreleri arasında mesaj geçişini sağlayan bir nörotransmitter olan ACh normal bir beyinde sabit seviyededir [47]. Yapılan bir takım araştırmalar, Alzheimer hastalığı olan çoğu kişinin beyinlerinin, azalmış ACh miktarlarına sahip olduğunu göstermiş ve bu kimyasal maddenin kaybının, hafızanın kötüleşmesiyle sonuçlandığı görülmüştür. Alzheimer hastalarının beyinlerinde yapılan çalışmalarda ayrıca ChAT aktivitesinin azalması sonucu ACh sentezinin de azaldığına ulaşılmıştır. Alzheimer hastalığı olan kişilerin beyinlerindeki ACh eksikliğini düzeltmenin yollarını bulmak için yapılan araştırmaların çoğu, kişileri, ACh miktarının artırılmasına doğru yöneltmiştir. Alzheimerlı hastalarda kolinerjik fonksiyonun artırılmasına yönelik çalışmalardan bir tanesi de ACh yıkımının oranını azaltmak için kolinesteraz inhibitörü olan ilaçların (antikolinesterazlar) geliştirilmesi olmuştur [77,78]. Kolinesteraz inhibitörleri, AChE’ı tersinir veya tersinmez olarak inhibe ederek ACh’nin hidroliz reaksiyonunu durdurur ve ACh seviyesini artırır. Alzheimerlı hastalarda seyreden düşük ACh seviyesi bu şekilde yükseltilmiş olur. Diğer taraftan, Alzheimerlı hastaların beyinlerinde gözlenen amiloid plaklar etrafındaki AChE aktivitesinin artmış olarak bulunması da tedavide bu grup ilaçların kullanım stratejisini desteklemiştir [78]. Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde AChE inhibitörleri, belirli bir başarı oranının elde edildiği en etkili ilaç gruplarının başında gelmektedir.

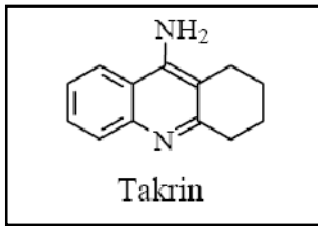
2.10.1. Alzheimer hastalığında AChE inhibitörlerinin klinik uygulamaları

Alzheimer hastalığında, AChE inhibitörlerinin klinik uygulamasına 1980’lerin başında ilk olarak tersinir bir kolinesteraz inhibitörü olan fizostigmin (eserin) kullanılmasıyla başlanmıştır (Şekil 2.22). Fizostigmin, Alzheimer tedavisinde kullanıldığında, bellek ve davranışta istatistiksel olarak anlamlı iyileşme sağlamış, ancak bu bulgular tekrarlanamamış ve hastaların klinik iyileşmesinde bir gelişim gözlenememiştir [79-81].



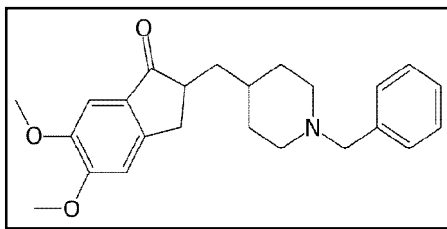
Şekil 2.22. Fizostigmin [79]

1980'lerin ortalarında, Alzheimer hastalığının kolinesteraz inhibitörleriyle uzun süreli tedavisinde geliştirilen başka bir ilaç olan takrin klinik uygulama alanı bulmuştur (Şekil 2.23). Bu bileşik tersinir bir AChE inhibitörüdür ve Alzheimer tedavisinde kullanılmak üzere 1996'da FDA'dan (Food and Drug Administration) onay alan ilk ilaç olmuştur. [79,83,84].



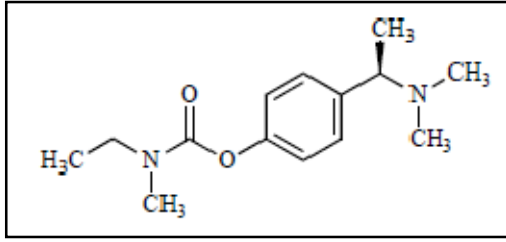
Şekil 2.23 Takrin [77]

Donepezil, 1997'de başarıyla tedavi alanına giren tersinir bir diğer AChE inhibitörüdür (Şekil 2.24). Donepezil klinik uygulamada, hafif ve orta şiddette Alzheimer'ın tedavisinde, giderek takrinin yerini almıştır [79,85,86].



Şekil 2.24. Donepezil

Son yıllarda geliştirilen bir diğer ilaç rivastigmindir. Rivastigmin hidrogen tartarat, geri dönüşümsüz bir AChE inhibitörüdür (Şekil 2.25). Bu ilaç 1997'de İsviçre'de kullanıma girmiştir. FDA tarafından Mayıs 1999'da onaylanmıştır [79,87,88].



Şekil 2.25. Rivastigmin [79]

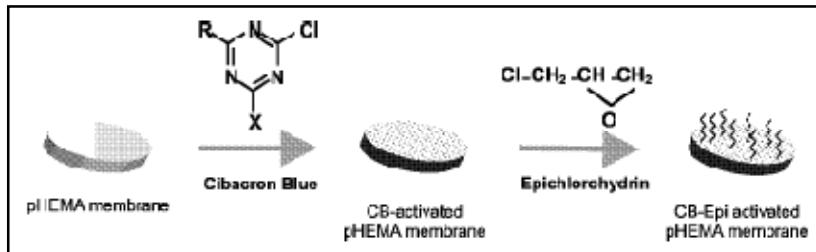
Alzheimer hastalığı tedavisi amacıyla ticari olarak satılan ve değişik başarı oranlarına sahip çok farklı kolinesteraz inhibitörleri mevcuttur. Yukarıda bunlardan en çok kullanılanları örnek olarak verilmiştir. Her geçen gün ise farklı AChE inhibitörlerin sentez çalışmaları yapılmaktadır.

2.11. Kaynak Araştırması

2.11.1. Biyosensör çalışmalarına ait kaynak araştırmaları

Aşağıda ACh biyosensörlerine ait literatür araştırmalarına örnekler verilmiştir.

Kök ve arkadaşları, biyosensör yapımında kullanılmak amacıyla AChE ve ChO enzimlerini poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) membranına ko-immobilize etmişlerdir. Enzim immobilizasyonunda hapsedme ve yüzeye bağlama yöntemleri ayrı ayrı kullanmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Yüzeye bağlama yönteminde hem epiklorhidrin (Epi) ile kovalent bağlama hem de Cibacron Blue F36A aracılığı ile iyonik bağlama yapılmıştır. Bu yönteme ise iyonik-kovalent hibrit immobilizasyon yöntemi (CB-Epi) denmiştir (Şekil 2.26) [89].

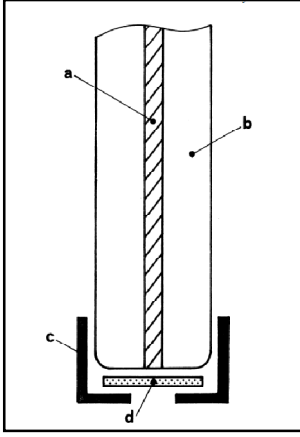


Şekil 2.26. İyonik-kovalent hibrit yöntemi ile hazırlanan pHEMA membran [89]

Araştırmacılar, serbest ve immobilize enzim sistemleri için K_m ve V_{max} değerlerini karşılaştırarak enzim aktivitesi üzerine immobilizasyon etkilerini araştırmışlardır. Yüzeye bağlama yöntemi kullanılarak immobilize edilen bi-enziminin K_m değerindeki artış (1,08 katı) ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur ama hapsetme yönteminde 2,12 katı artış bulunmuştur. Immobilize enzimin performansı tampon tipi, pH ve sıcaklık koşullarına bağlı olarak incelenmiş ve en iyi enzim aktivitesinin pH 9'da gerçekleştiği bulunmuştur. Bu çalışma sonucu fotopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanan pHEMA'nın ACh biyosensörü yapımında kullanılabilecek iyi bir immobilizasyon destek mayeryali olabileceğine ulaşılmıştır. CB-Epi aktifleştirmesi ile yapılan enzim immobilizasyonundan, hapsetme yöntemine göre daha kolay ve daha ılımlı sonuçlar elde edilmiştir [89].

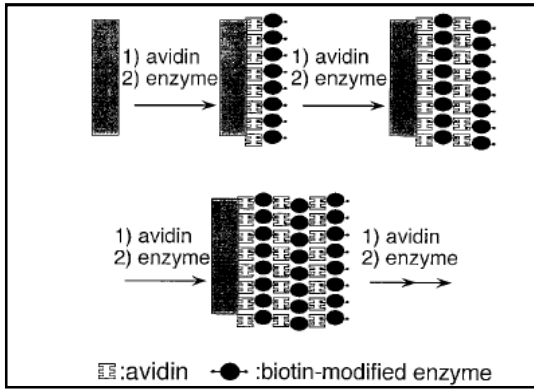
Yang ve arkadaşları, ACh ve Ch tayin etmek amacıyla amperometrik biyosensörler hazırlamışlardır. Bu amaçla öncelikle N-asetanilini Pt elektrot üzerinde elektropolimerize etmişler, sonrasında modifiye Pt elektrot üzerine sığır serum albümin (SSA) ve ChO'ı ZnO sol-jel içine Ch biyosensörü elde etmek amacıyla immobilize etmişler; AChE, ChO ve SSA'yı ACh/Ch biyosensörü elde etmek amacıyla immobilize etmişlerdir. ACh ve Ch'in amperometrik tayini doymuş kalomel elektroda karşı +0,6 V potansiyel uygulanarak yapılmıştır. Hazırlanan ACh/Ch sensörü ile ACh tayin aralığı $1,0 \times 10^{-6}$ - $1,5 \times 10^{-3}$ M ve Ch için $1,6 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-7}$ M bulunmuştur ACh tayin limiti $6,0 \times 10^{-7}$ M; Ch tayin limiti $5,0 \times 10^{-7}$ olarak bulunmuştur. [90].

Doretti ve arkadaşları, ACh tayin etmek amacıyla bienzimatik sensör hazırlamışlardır. Sensör, dondurma-çözdürme prosesi ile hazırlanmış poli(vinil alkol) membran içerisine AChE ve poli(etilen glikol) modifiyeli ChO'nun fiziksel ko-immobilizasyonu ile elde edilmiştir (Şekil 2.27). Sensör, enzim modifiyeli polimer Pt elektrot üzerinde enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan hidrojen peroksitin elektrokimyasal tayinine dayanır. Bu sensörün analitiksel karakterizasyonları olarak Ch ve ACh'in kalibrasyon eğrileri, pH, sıcaklık etkisi ve kararlılığı belirlenmiştir. Optimum pH 8,0; optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuş ve ACh kalibrasyon grafiği 5,0-100,0 mM aralığında lineer olarak elde edilmiştir [91].



Şekil 2.27. Hazırlanan sensörün şematik gösterimi, (a) Pt tel, (b) cam, (c) teflon kapak, (d) poli(vinil alkol) membran [91]

Chen ve arkadaşları, ACh biyosensörü için avidin-biotin temelli çok tabakalı bir membran hazırlamışlardır. Bu membran avidin ve biotin arasındaki güçlü affiniteye dayanılarak hazırlanmış, avidin ve monomoleküler enzim tabakaları birikimi değiştirilerek karakterize edilmiştir. Araştırmacılar bu amaçla AChE ve ChO enzimlerini biotin kalıntıları ile etiketlemişler, monomoleküler enzim ve avidin tabakalarından oluşan çoklu tabaka membranı oluşturmuşlardır (Şekil 2.28) [92].



Şekil 2.28. Avidin ve biyotin kullanarak, çoklu enzim tabakalarının elektrot yüzeyi üzerinde hazırlanması [92]

AChE/ChO bienzim çoklu tabaka modifiye elektrodu, ACh hidroliz reaksiyonunu ve bu reaksiyonda açığa çıkan Ch'in oksidasyon reaksiyonunu katalizler. Sensörün amperometrik tepkisi hidrojen peroksidin oksidasyon akımı şeklindedir. Bu sebeple ACh sensörünün performansı elektrot yüzeyi üzerinde immobilize edilmiş kolinesteraz ve ChO enzim tabakasının bağlı katalitik aktivite değerine bağlıdır. Avidin-biotin sistemi ile AChE ve

ChO'nın tabaka tabaka birikimi sonucu ACh sensörlerindeki AChE/ChO oranını optimize etmek mümkündür. Bu çalışmada biyosensörün maksimum performansının gözlemlendiği oran 10 ChO tabakası: 2 AChE tabakası olarak bulunmuştur [92].

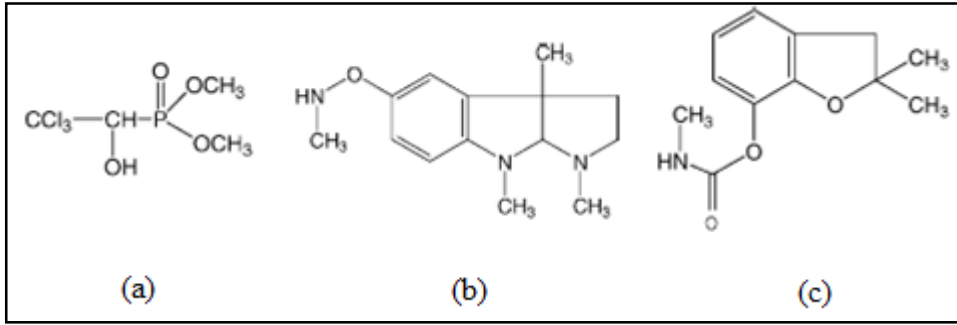
Kök ve arkadaşları, anti-kolinesteraz bileşikler olan aldikarb (AS), karbofuran (CF), karbaril (CL) ve bunların karışımlarını tayin etmek amacıyla bir AChE-ChO biyosensörü tasarlamışlardır. Bunun için AChE ve ChO enzimlerini epiklorhidrin ve boyar madde olan Cibacron Blue F3G-A ile aktive edilmiş pHEMA içine immobilize etmişlerdir. İkili enzim aktivite ölçümleri oksijen elektrodu ile yapmışlar ve substrat olarak ACh kullanmışlardır. CL ve CF'nin 1,0-50,0 ppb arasında farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi farklı inkübasyon süreleri boyunca (5,15 ve 30 dakika) test edilmiştir. İkili pestisit karışımlarının toplam anti-kolinesteraz aktiviteleri pestisitlerin toplam tekli aktivitelerinden daha düşük bulunmuştur. Minimum tayin limitlerini CF için 0,4 ppb; AS için 11,7 ppb ve CL için 1,9 ppb olarak bulunmuştur [93].

Ciucuve arkadaşları, organofosfat bileşiklerini tayin eden yüksek hassasiyette bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde araştırmacılar, yüzeyine AChE ve ChO immobilize edilmiş diyaliz membranını ferroftalosiyanın modifiyeli karbon pasta elektrodu ile birleştirmişlerdir. Kolinesteraz, pestisit varlığında yarışmasız olarak inhibe olmuştur. Analizlerde substrat olarak ACh kullanılmıştır, ölçümler üçlü elektrot sistemi ile alınmıştır. Ferroftalosiyanın modifiyeli karbon pasta elektrot çalışma elektrodu olarak, Ag/AgCl (3 M NaCl) referans elektrot olarak ve platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Enzimatik tabakada reaksiyon sonucu oluşan Ch, ChO tarafından okside olmuş ve açığa çıkan H_2O_2 , Ag/AgCl'e karşı 0,35 V da elektrokimyasal olarak tayin edilmiştir. Pestisit derişimi ile orantılı olan ACh inhibisyonu, H_2O_2 oluşum hızındaki azalma olarak ölçülmüştür. H_2O_2 oluşum hızı azaldığı için biyosensörün katodik akımında da azalma meydana gelmiştir. Pestisit ilavesi artıkça substrat kararlı hal akımı azalmıştır. Bundan yararlanarak $1,0 \times 10^{-10}$ M'a kadar paraoksonu ve karbofurani tayin edebilmişlerdir [15].

Gyurcsányi ve arkadaşları, triklorfon analizlerinde kullanılmak amacıyla hızlı cevap verme özelliğine sahip bir potansiyometrik ACh sensörü tasarlamışlardır. Sensörün hazırlanmasında pH antimon elektrot kullanılmıştır. Antimon disk pH elektrodu, cam elektrotların aksine immobilizasyon için kolay yenilenebilir yüzeye sahiptir, düşük elektriksel kararlılığı vardır ve farklı şekil ve boyutlarla hazırlanabildiği için araştırmacılar

tarafından tercih edilmiştir. Enzim immobilizasyonu için 3 farklı yöntem kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılarak en iyi yöntem seçilmiştir. Bu yöntemlerden en iyisinin AChE ve SSA'nın antimon disk üzerine GA aracılığıyla çapraz bağlama yapıldığı yöntem olmuştur [94].

Snejdarkova ve arkadaşları, pestisit tayini yapmak için modifiye altın elektrot temelli potansiyometrik ve amperometrik enzim sensörleri üretmiş ve bunları karşılaştırmışlardır. Amperometrik sensörde poli(amido amin) dendrimere AChE ve ChO immobilize edilmiştir. Potansiyometrik biyosensörde ise aynı enzimler polianiline immobilize edilmiştir. Çalışmada triklorfon, karbofuran ve eserin inhibitörleri kullanılmıştır. Bunlardan triklorfon organofosfat, diğerleri karbamat türü pestisitlerdir (Şekil 2.29). Tayin limitleri triklorfon için 0,003 ve 200,0 nmol/L, karbofuran için 0,04 ve 6,0 nmol/L, eserin için ise 0,1 ve 700,0 nmol/L olarak sırasıyla amperometrik ve potansiyometrik sensörlerden elde edilmiştir. Dendrimer tabakalı amperometrik AChE sensöründen daha düşük tayin limitleri elde edilmiştir [95].



Şekil 2.29. (a) Triklorfon, (b) karbofuran (c) eserin [95]

Shimomura ve arkadaşları, AChE ve ChO'ı hibrit mezofor silika membranlara immobilize ederek bir ACh biyosensörü hazırlamışlardır. Biyosensörün ölçüm temeli enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2 'in +0,6 V'da amperometrik yükseltgenme akımının ölçümüne dayanır. Hazırlanan biyosensörün ACh tayin aralığı 6,0-800 μM ve cevap süresi 3 dakika olarak bulunmuştur. 80 gün sonunda başlangıç aktivitesinin yaklaşık %80'ini koruduğu gözlenmiştir. Biyosensörün optimum pH'sı 8,0-9,0 olarak bulunmuştur [96].

Şen ve arkadaşları, AChE ve ChO enzimlerinin Pt elektrot yüzeyindeki polivinilferrosenyum perklorat matrisi içerisinde immobilize edilmesiyle, sulu çözeltide ACh'e duyarlı yeni bir enzim elektrot hazırlamışlardır. Enzimler polimerik yapıda elektrostatik olarak tutuklanmıştır. Enzim elektrodun amperometrik cevabı +0,7 V'da enzimatik olarak üretilen H_2O_2 'in elektrooksidasyonu ile ölçülmüştür. Cevap süresi 30-50 saniye ve lineer çalışma aralığının üst sınırı 1,2mM ACh olarak bulunmuştur. İmmobilize enzim sistemi için Michealis-Menten sabiti $K_{m(göz)}$ ve aktivasyon enerjisi sırasıyla 1,74 mM ve 14,92 kJ/mol olarak bulunmuştur. Biyosensörün optimum pH'sı 7,4; optimum sıcaklığı 55 °C olarak bulunmuştur [97].

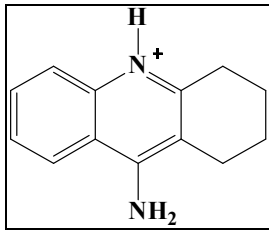
Kanik ve arkadaşları, grafit elektrot yüzeyine poli(4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-yl)benzamin) iletken polimerini kullanarak pestisit tayini için bir ACh biyosensörü hazırlamışlardır. AChE ve ChO enzimleri iletken polimer üzerine kovalent bağlama tekniği ile immobilize edilmiştir. ACh biyosensörünün karakterizasyonu optimum pH, doğrusal tayin aralığı ve raf ömrü araştırılarak yapılmıştır. Doğrusal tayin aralığı 0,12-10,0 mM ve raf ömrü 4 hafta olarak bulunmuştur. Hazırlanan bu biyosensör ile çeşme suyunda paraokson-etil tayini yapılmıştır [98].

Hou ve arkadaşları, sol-jel tekniğini kullanarak altın nanopartikül ve çok duvarlı karbon nanotüp ve AChE-ChO enzimlerinden oluşan yeni bir amperometrik ACh biyosensörü geliştirmişlerdir. Hazırlanan biyosensörün doğrusal tayin aralığı 0,005-0,4 mM ve amperometrik cevap süresi 15 saniye olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar kalibrasyon grafiğinin çok geniş bir aralığa sahip olmadığını ancak, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında kendi çalışmalarının tayin aralığının iyi olduğunu belirtmişlerdir. Hazırlanan biyosensör ile askorbik asit, ürik asit, serotonin, dopamin ve asetaminofenin girişim etkileri incelenmiş ve bu türlerin amperometrik cevap akımına fark edilebilir bir etkisinin olmadığını tespit edilmiştir [99].

2.11.2. Takrin ve türevlerine ait kaynak araştırmaları

AChE inhibitörlerinden biri olan takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) 1996'da FDA'dan onay alan ilk Alzheimer ilacıdır (Şekil 2.20). Takrin, akridin yapısında, seçici olmayan, tersinir bir AChE inhibitörüdür. Aynı zamanda, BChE ve monoamin oksidazı da inhibe etmektedir [57,100].

Takrinin X-ray kristal yapısının araştırılması sonucunda molekülün enzime bağlanmasında 4-aminokinolin kısmının sorumlu olduğu anlaşılmıştır [57,101]. Enzimin alt bağlanma bölgelerinden biri olan katalitik üçlü bölgesindeki His 440'ın karbonil oksijeni ile takrinin protonlanmış azotu (Şekil 2.30) arasında hidrojen bağının meydana geldiği bilinmektedir. Takrinin protonlanmış azotu ile Trp84 ve Phe 330 aromatik aminoasitleri arasında katyon- π etkileşimlerinin olduğu, ayrıca α -anyonik bölgedeki Trp 84'ün indol halkası ve Phe 330'un fenil halkası ile takrinin iki aromatik halkası arasındaki π - π etkileşimlerinin olduğu da bilinmektedir [57,102,103].



Şekil 2.30. Takrinin protonlanmış yapısı [103]

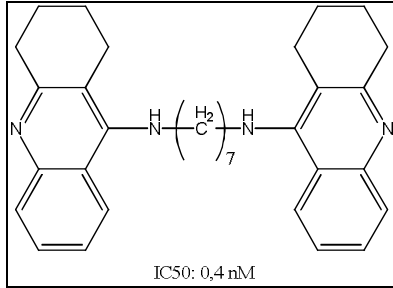
Son zamanlarda yapılan çalışmalar takrinden çok daha etkili türevlerini hazırlamaya yöneliktir. Aşağıda sunulan literatür araştırmalarında, türevlendirilen takrin hibritlerinin, genel olarak takrinden daha güçlü inhibisyon özelliği gösterdiği görülmüştür.

Bivalan takrin türevleri

Bivalan ligandlar, AChE'nin hem aktif hem de periferik bölgesiyle etkileşime giren moleküllerdir [57]. Bivalan bileşiklerin pek çoğunun ana bileşiklerinden daha etkili olduğu bulunmuştur. Bivalan takrin inhibitörlerinin sentezi, değişken uzunluklardaki oligometilen bağlayıcılarıyla iki lateral (yanal) takrin molekülünün bağlanması ile gerçekleşir. Böylece bir takrin molekülü aktif bölge ile etkileşirken ikincisi periferik bölge ile etkileşime girer [57].

Pang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada farklı sayıda karbon içeren oligometilen bağlayıcılarıyla takrin molekülleri bağlanmıştır. Bu dimerler takrine oranla 10000 kat daha seçici ve 1000 kat daha etkilidir. Bu dimerlerden, takrin molekülleri arasında 7 metilen grubu içeren bileşik en etkilisidir (IC_{50} :0,4 nM; IC_{50} :enzim aktivitesinin % 50' sini inhibe etmesi için gerekli inhibitör derişimi, Şekil 2.31). Yani en uygun zincir uzunluğu 7 metilen

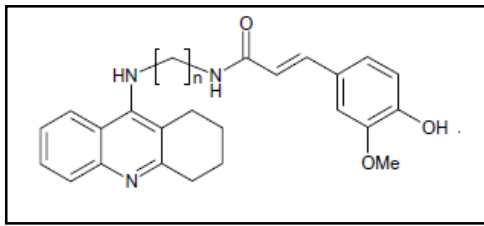
grubu ile elde edilmiştir. Daha uzun dimerler de (8-10 metilen grubu içeren) takrin monomerinden daha etkili bulunmuş, ancak içlerinde en iyisi 7 metilen içeren dimer olmuştur [104].



Şekil 2.31. 7 metilen grubu içeren takrin dimeri [104]

Takrin Hibritleri

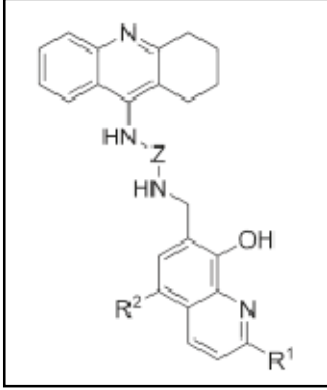
Takrinin farklı yapıdaki bileşiklere bağlanarak hibritleri sentezlenmiş ve inhibisyon etkisi incelenmiştir. Buna bir örnek, takrin ve ferulik asit moleküllerinin alkilen diamin tipi bir uzatıcı kol ile birleşmesi sonucu oluşturulan bileşiklerdir. (Şekil 2.32). Bu bileşiklerden n=5 olan içlerinde en iyi AChE inhibisyonu göstermiştir (IC₅₀: 4,4 nM), takrinden yaklaşık 10 kat daha etkili bulunmuştur, ayrıca inhibisyon türü tersinir yarışmasız inhibisyon olarak belirlenmiştir. Sentezi yapılan tüm bileşiklerin takrinden daha etkili olduğu görülmüştür [105].



Şekil 2.32. Takrin-ferulik asit hibriti [105]

Fernández-Bachiller ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada takrin-8-hidroksikinolin hibritleri (Şekil 2.33) sentezlenmiş ve bu bileşiklerin potansiyel bir Alzheimer ilacı olabileceği belirtilmiştir. Sentezlenen bu takrin hibritlerinin insan AChE ve BChE'nin nanomolar ve subnanomolar seviyelerinde inhibe edebildikleri görülmüştür. Şekil 2.33'e göre R¹: -CH₃ R²: -H ve Z: -(CH₂)₆- olan hibrit içlerinde en iyi AChE inhibisyonu göstermiştir (IC₅₀: 0,5 nM) ve takrinden 700 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu

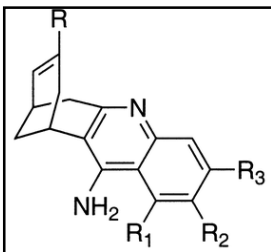
takrin hibritlerinin Alzheimer hastalığında bir başka etken olan A β peptit plaklarının birikimini inhibe ettiği de gözlenmiştir [106].



Şekil 2.33. Takrin-8-hidroksikinolin hibriti [106]

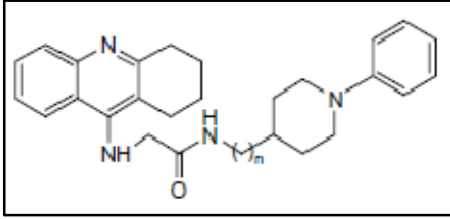
Bu bilim adamlarının yaptığı bir başka çalışmada ise takrin-melatonin hibritleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu hibrit moleküllerinin moleküler modelleme çalışmalarından hem katalitik bölge ile hem de periferik bölge elde etkileşime girdikleri görülmüştür. Ayrıca insan AChE'ni takrinden daha iyi inhibe ettiği, A β peptit plaklarının birikimini inhibe ettiği ve antioksidan özellik gösterdiği gözlenmiştir [107].

Camps ve arkadaşları, takrin-huperzin A hibrit moleküllerini sentezlemiş ve AChE inhibisyonları test etmişlerdir. Sentezlenen tüm hibritler flor, klor ve metil süstituentlerini içermektedir (Şekil2.34). Monosüstitüe hibritlerin aktiviteleri 3-klor>3-flor>3-metil>3-hidrojen şeklindenir. Bu hidritlerin L-enantiyomerlerinin D-enantiyomerlerinden daha aktif olduğu görülmüştür. En çok aktivite gösteren hibrit molekülleri ise 9 pozisyonunda -etil ve -metil grubu içerenler olduğu belirtilmiştir [108].



Şekil 2.34. Takrin-huperzin A hibriti [108]

Shao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise takrin-E2020 hibrit molekülleri sentezlenmiştir (Şekil 2.35). $n=2$ olan hibrit molekülünün (IC_{50} : 6,0 nM) takrinden 37 kat daha etkili, 31 kat daha seçici olduğu belirtilmiştir. Bu hibrit molekülünün moleküler modelleme çalışması sonucunda takrin halkasının katalitik bölgeye ve fenil grubun periferik bölgeye bağlandığı hipotezini öne sürmüşlerdir [109].



Şekil 2.35. Takrin-E2020 hibriti [109]

Hibrit takrin molekülleri bu yukarıda sayılan örneklerle sınırlı değildir. Çok farklı maddelerle türevleri oluşturulmuş ve farklı inhibitör aktivitesine sahip takrin türevi örnekleri literatürde mevcuttur [110].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tezin deneysel kısmında kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel kısımda kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar

Kimyasal Madde	Temin Edilen Üretici Firma
Pirol (C_4H_5N)	Fluka
Sodyum polivinilsülfonat	Aldrich
Asetilkolin klorür ($C_7H_{16}O_2NCl$)	Sigma
Asetiltiyokolin iyodür ($C_7H_{16}OSNI$)	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Monosodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Glisin ($C_2H_5NO_2$)	Sigma
Sodyum hidroksit ($NaOH$)	Fluka
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck
Sodyum perklorat ($NaClO_4$)	Sigma-Aldrich
Gluteraldehit ($C_5H_8O_2$)	Aldrich
Sığır serum albumin	Merck
Ürik asit ($C_5H_4N_4O_3$)	Sigma
L-Askorbik asit ($C_6H_8O_6$)	Sigma
L-Glukoz ($C_6H_{12}O_6$)	Fluka
Parasetamol (Asetaminofen, $C_8H_9O_2N$)	Fluka
L-Sistein ($C_3H_7O_2N$)	Aldrich
L-Sistin ($C_6H_{12}O_4N_2S_2$)	Sigma
Takrin ($C_{13}H_{14}N_2 \cdot HCl \cdot xH_2O$) (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin hidroklorür hidrat)	Aldrich
Salisilaldehit ($C_7H_6O_2$)	Aldrich
5-bromsalisilaldehit ($C_7H_5O_2Br$)	Aldrich
5-kloralisilaldehit ($C_7H_5O_2Cl$)	Aldrich
5-florsalisilaldehit ($C_7H_5O_2F$)	Aldrich
5-flor-3-metilsalisilaldehit ($C_8H_7O_2F$)	Aldrich
3-klor-5-flor-salisilaldehit ($C_7H_4O_2FCl$)	Aldrich
2-hidroksi-5-metilbenzaldehit ($C_8H_8O_2$)	Aldrich
5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO, $(CH_3)_2SO$)	Sigma-Aldrich
Metil alkol (CH_3OH)	Sigma-Aldrich
Etil alkol (CH_3CH_2OH)	Sigma-Aldrich
Etil asetat ($CH_3COOCH_2CH_3$)	Sigma-Aldrich

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu: Monosodyum dihidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat uygun miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ile ayarlandı. Tampon çözelti +4 °C'de buzdolabında saklandı.

Glisin tamponu: Glisin ve NaOH uygun miktarlarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ayarlandı. Tampon çözelti +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Borat tamponu: Borik asit uygun miktarda tartılarak saf suda çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ayarlandı. Tampon çözelti +4 °C' de buzdolabında saklandı.

Enzim çözeltileri: Aktivitesi 50,0 ünite olan asetilkolinesteraz (insan eritrositlerinden saflaştırılmış) toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi ve her biri 1'er mL lik çözeltiler halinde deney tüplerine alındı (5,0 ünite/mL). Aktivitesi 50,0 ünite olan kolin oksidaz toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi ve her biri 1'er mL lik çözeltiler halinde deney tüplerine alındı (5,0 ünite/mL). Aktivitesi 1000,0 ünite olan asetilkolinesteraz (Electrophorus electricus, electric eel, Type V-S) toplam hacim 10,0 mL olacak şekilde saf su ile seyreltildi ve her biri 0,5'er mL lik çözeltiler halinde deney tüplerine alındı (100,0 ünite/mL). Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltileri buzdolabında bekletildi, uzun süre kullanılmadığı durumlarda ise derin dondurucuda saklandı.

Asetilkolin çözeltisi: Katı asetilkolin klorürden uygun miktarda alınıp tampon çözelti içerisinde çözülerek istenilen derişimlerde asetilkolin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler her deney öncesinde taze olarak kullanıldı.

Asetiltiyokolin çözeltisi: Katı asetiltiyokolin iyodürden uygun miktarda alınıp tampon çözelti içerisinde çözülerek istenilen derişimlerde asetiltiyokolin çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler her deney öncesinde taze olarak kullanıldı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı sodyum hidroksitten uygun bir miktar alınıp saf suda çözülerek çalışılacak derişimlerdeki çözeltileri hazırlandı.

Hidrojen peroksit çözeltisi: %30,0'luk hidrojen peroksit çözeltisinden uygun bir miktar alınarak 1,0 M'lık stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden seyreltilerek istenilen derişimlerde hidrojen peroksit çözeltileri hazırlandı.

Glutaraldehit çözeltisi: % 25,0'lik glutaraldehit çözeltisi seyreltilerek önce %5,0'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlandı. Daha sonra % 5,0'lik glutaraldehit çözeltisinden %2,5'luk glutaraldehit çözeltisi hazırlandı.

Sodyum perklorat: Katı sodyum perklorattan uygun bir miktar tartılıp 1,0 M, 50,0 mL NaClO_4 çözeltisi hazırlandı.

L-Askorbik asit çözeltisi: Katı L-Askorbik asitten uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

Parasetamol çözeltisi: Katı parasetamolden uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek parasetamol çözeltisi hazırlandı.

Ürik asit çözeltisi: Katı ürik asitten uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek ürik asit çözeltisi hazırlandı.

L-Glukoz çözeltisi: Katı L-Glukozdan uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek glukoz çözeltisi hazırlandı.

L-Sistein çözeltisi: Katı L-Sisteinden uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek sistein çözeltisi hazırlandı.

L-Sistin çözeltisi: Katı L-Sistinden uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek sistein çözeltisi hazırlandı.

Metil alkol çözeltisi: Sıvı metanolden uygun bir miktar tampon çözelti içerisine alınarak metil alkol çözeltisi hazırlandı.

Etil alkol çözeltisi: Sıvı etanolden uygun bir miktar tampon çözelti içerisine alınarak etil alkol çözeltisi hazırlandı.

5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) çözeltisi: Katı 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) ve NaHCO_3 'dan uygun bir miktar tampon çözelti içerisinde çözülerek 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) çözeltisi hazırlandı +4 °C' de muhafaza edildi.

İnhibitör çözeltileri: İnhibitörlerden belli miktarlarda alınıp tampon çözelti içerisinde çözülerek istenilen derişimlerde ($1,0 \times 10^{-3}$ - $5,0 \times 10^{-8}$ M) çözeltileri hazırlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

3.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Elektrokimyasal analiz cihazı

Bütün elektrokimyasal deneyler bilgisayar bağlantılı BAS Epsilon-EC-Ver 1.40.67NT elektrokimyasal analiz cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Hücre ve elektrotlar

Amperometrik ölçümler, Resim 3.1'de görülen üç elektrotlu hücre sisteminde gerçekleştirildi. Çalışma elektrodu olarak $0,5 \text{ cm}^2$ yüzey alanlı PPy-PVS ile kaplanmış Pt levha elektrot, referans elektrot olarak BAS RE-5B no'lu Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak MW-1032 no'lu platin tel kullanıldı. Çalışma elektrodu her elektrokimyasal çalışma sonrası tampon çözelti içerisinde +4 °C'de muhafaza edildi.



Resim 3.1. Elektrokimyasal deneylerde kullanılan üç elektrotlu hücre sistemi

3.3.3. Element analizi cihazı

Element analizleri LECO-CHNS-9320 model element analizi cihazı ile Bozok Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde yapıldı.

3.3.4. Erime noktası tayini cihazı

Bileşiklerin erime noktası, Gallenkamp model erime noktası cihazı ile belirlendi.

3.3.5. Ultraviyole-görünür bölge (UV-GB) spektrofotometresi

UV-GB absorbans ölçümleri Shimadzu marka UV-1800 model spektrofotometre kullanılarak alınmıştır.

3.3.6. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrofotometresi

FT-IR spektrumları Bozok Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde, Perkin Elmer Spectrum Two FT-IR spektrofotometresi ile 4000-400 cm^{-1} aralığında alındı.

3.3.7. ^1H -Nükleer magnetik rezonans (^1H -NMR) spektrofotometresi

^1H -NMR spektrumları Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Analiz Laboratuvarı'ndaki, 300 MHz'lik Bruker Ultrashield AC300 Plus sıvı NMR Ultra-Shield ile 100 MHz'de $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ kullanılarak alındı.

3.3.8. ^{13}C -Nükleer magnetik rezonans (^{13}C -NMR) spektrofotometresi

^{13}C -NMR spektrumları; Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Analiz Laboratuvarı'ndaki, 300 MHz' lik Bruker Ultrashield AC300 Plus sıvı NMR Ultra-Shield ile 100 MHz'de $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ kullanılarak alındı.

3.3.9. Taramalı elektron mikroskobu

Numuneler 2 nm Au ile kaplanarak QUANTA 400F Field Emission cihazı kullanılarak ODTÜ merkez laboratuvarlarında yapıldı.

3.3.10. Termal gravimetrik analiz (TGA) cihazı

TGA ölçümleri Seiko, TG/DTA 6300 cihazı kullanılarak yapıldı.

3.3.11. pH metre

pH ölçümleri ORION Model 720A pH-iyonmetre ile alındı.

3.3.12. Su banyosu

Isıtma çalışmalarının gerektiği deneylerde Grant GD120 marka termostatlı dolaşımli su banyosu durumlarda kullanıldı.

3.3.13. Mikro pipet

10,0µL-1000,0 µL çözelti ilaveleri Brand marka $\pm 0,05$ µL hassasiyeti olan mikropipetler ile yapıldı.

3.3.14. Argon gazı

Çalışma elektrodun kaplanması sırasında Kargaz firmasından temin edilen % 99,999 saflıktaki argon gazı kullanıldı.

3.3.15. Saf su

Bütün deneylerde kullanılan çözeltiler GFL marka saf su cihazından sağlanan saf su ile hazırlanmıştır.

3.4. ACh Biyosensörünün Hazırlanması ve En İyi Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

3.4.1. Çalışma elektrodun hazırlanması: Platin elektroda PPy-PVS kaplanması

Kaplama işleminden önce platin levhanın yüzeyi mekanik ve kimyasal olarak temizlendi. Platin yüzey öncelikle sıfır numara zımpara ile parlatıldı, daha sonra aleve tutuldu. Bir müddet derişik hidroklorik asit çözeltisi içinde bekletildi. Tekrar aleve tutuldu, saf su ile yıkandı ve kurutuldu. Her kaplama öncesi Pt elektrot yüzeyi bu şekilde temizlendi [111].

Temizlenmiş Pt levha elektrot PVS'lı ortamda iletken bir polimer olan PPy ile kaplandı. Kaplama sırasında pirol elektrot yüzeyine elektropolimerleşme ile biriktirildi ve bu esnada PVS yüzeye taşınmış oldu. Kaplama işlemi şöyle yapıldı; hücre içi derişimi 0,1 M olacak şekilde pirol (71,0 μ L), 2,5 mL sodyum polivinilsülfonat (%25,0) ve 7,43 mL saf sudan oluşan 10,0 mL' lik çözeltiye diğer elektrotlar ile birlikte temizlenmiş platin elektrot daldırıldı. Çözeltideki oksijeni uzaklaştırmak için hücreden 10 dakika argon gazı geçirildi. Dönüşümlü voltametri tekniğı ile -1,0V - +2,0V arasında 50 mV/s tarama hızında farklı sayılarda çevrim alındı [112]. Kaplama işleminden sonra elektrot önce saf su sonra da tampon çözelti ile yıkanarak yüzeydeki kalıntılardan temizlendi. Pt/PPy-PVS elektrot bu şekilde hazırlandı ve kaplama işleminden sonra tampon çözelti içerisinde bekletildi.

3.4.2. Pt/PPy-PVS elektrodun sabit akıma getirilmesi

Elektrokimyasal hücre içerisine 9,0 mL tampon çözelti ve 1,0 mL NaClO₄ (destek elektrolit) konuldu. Pt/PPy-PVS çalışma elektrodu diğer elektrotlar ile birlikte hücre içerisine yerleştirildi. Çalışılacak potansiyelde elektrot akımı sabitleninceye kadar beklendi ve sabitlenen akım değeri denge akımı olarak kaydedildi. Bütün deneyler boyunca öncelikle bu işlem gerçekleştirildi.

3.4.3. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bu tezde hazırlanan biyosensörün ACh'e duyarlılığı AChE ve ChO enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucu açığa çıkan H₂O₂'in yükseltgenme akımının ölçümüne dayanmaktadır. H₂O₂'in en uygun yükseltgenme potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, farklı çalışma potansiyellerinde (+0,20 V - +0,50 V) eğriler çizildi. Deney şöyle

yapılmıştır; Pt/PPy-PVS elektrot uygun potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Hücre içi hidrojen peroksit derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ - $5,0 \times 10^{-3}$ M aralığında olacak şekilde hücreye peroksit ilaveleri yapıldı. Her ilave sonrası hücre 300 s manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve 200 s boyunca çalışılan potansiyelde akım değeri kaydedildi. Yapılan H_2O_2 ilavelerine karşı artan akım değeri grafiğe geçirildi. Bu işlemler sırasıyla çalışılan bütün potansiyellerde tekrarlandı.

3.4.4. PPy-PVS filmin çevrim sayısının seçicilik üzerine etkisinin incelenmesi

1, 2, 3 ve 4 çevrim uygulanarak 4 farklı film kalınlığına sahip elektrotlar Bölüm 3.4.1'e göre hazırlandı. +0,3 V'da sabit akıma getirilen her bir elektrodun $1,0 \times 10^{-4}$ M hidrojen peroksit, $3,0 \times 10^{-4}$ M ürik asit (ÜA) ve $1,0 \times 10^{-4}$ M askorbik asit (AA)'ya karşı göstermiş olduğu amperometrik cevapları grafik çizilerek incelendi ve karşılaştırıldı.

3.4.5. AChE ve ChO enzim miktarının belirlenmesi

Pt/PPy-PVSelektrot +0,3 V'da sabit akıma getirildikten sonra belirli miktarlarda AChE ve ChO elektrokimyasal hücre içerisine ilave edildi. Enzimli ortamda elektrodun tekrar dengeye gelmesi beklendi ve denge akımı kaydedildi. Hücre içi ACh derişimleri $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde ilaveler yapıldı. Her ilave sonrasında hücre 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım değışimi ölçüldü [71]. Artan ACh derişimine karşı değışen akım grafiğı çizildi.

3.4.6. Enzim immobilizasyon yönteminin belirlenmesi

Enzim elektrot 2 farklı immobilizasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı.

Hapsetme yöntemi ile immobilizasyon

Bu yöntemde, AChE ve ChO enzimleri, Pt elektrot yüzeyinde polimerin oluşumu esnasında hapsedildi. Deney şöyle yapıldı; 0,1 M (71,0 μ L) pirol 2,5 mL sodyum polivinilsülfonat (% 25,0), 5,429 mL saf su, 1mL AChE (5,0 ünite/mL) ve 1 mL ChO (5,0 ünite/mL) dan oluşan 10,0 ml'lik çözeltiye temizlenmiş platin elektrot ile referans ve karşıt

elektrotlar daldırıldı. 10 dakika boyunca hücreden argon gazı geçirilerek çözeltideki oksijen uzaklaştırıldı. -1,0V - +2,0V potansiyelleri arasında 50 mV/s tarama hızında, dönüşümlü voltametri ile 1 çevrim alındı. Pirolün polivinilsülfonatlı ortamda platin elektrot yüzeyinde elektropolimerleşmesiyle enzim moleküllerinin yüzeye taşınması sağlandı. Elde edilen enzim elektrot saf su ile yıkandı ve kullanılmadığı zamanlarda tampon çözelti içerisinde buzdolabında saklandı.

Çapraz bağlama yöntemi ile immobilizasyon

1,0 mg SSA, 50,0 μ L tampon çözelti, 50,0 μ L AChE (5,0 ünite/mL), 50 μ L ChO (5,0 ünite/mL) ve 15,0 μ L gluteraldehitten (% 2,5) oluşan bir karışım hazırlandı. Bu karışım, Bölüm 3.4.1'e göre hazırlanan PPy-PVS elektrodun her iki yüzeyine eşit miktarlarda damlatıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Hazırlanan enzim elektrot önce saf su ile sonra tampon çözelti ile yıkandı ve kullanılmadığı zamanlarda tampon çözelti içerisinde buzdolabında saklandı.

Her iki yöntemle de hazırlanan enzim elektrotların ACh'e duyarlılığı şöyle incelendi; elektrot +0,3 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonradenge akımı kaydedildi. Daha sonra artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) ACh ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. ACh derişimi-akım farkı grafiği çizildi.

Hazırlanan elektrotların tekrarlanabilirlikleri ise şu şekilde incelendi; elektrot +0,3 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. $1,0 \times 10^{-3}$ M derişiminde ACh çözeltileri ile arka arkaya ölçümler alındı. Her ölçüm için denge akımı ile ölçülen akım arasındaki farktan Δi değeri belirlendi. Ölçüm sayısına karşı Δi değerleri grafiğe geçirildi. Ayrıca her iki yöntem için tekrarlanabilirlik sonuçlarının bağıl standart sapması hesaplandı.

3.4.7. Çapraz bağlama yöntemine gluteraldehit miktarının etkisi

Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan gluteraldehit miktarının etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.4.6'ya göre hazırlanan ve kütlece % 0,11, % 0,23 ve % 0,38 gluteraldehit ihtiva eden PPy-PVS elektrotlar +0,3 V potansiyelde sabit akıma getirildi.

Denge akımları kaydedildikten sonra hücreye artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) ACh ilavesi yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. Eklenen ACh derişimine karşı akım farkı grafiğı çizildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3.4.8. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Optimum pH'nın tayini

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 7,0; 7,5; 8,0 fosfat tamponu; 8,0; 8,5; 9,0 glisin tamponu ve 9,0; 10,0 borat tampon çözeltileri hazırlandı. Bu tampon çözeltilerle aynı pH'da ACh çözeltileri hazırlandı. Elektrot+0,3 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Sonra hücreye artan miktarlarda ($1,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-3}$ M) çalışılan pH'daki ACh çözeltisi ilaveleri yapıldı. Her ilaveden sonra çözelti 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonra akım ölçüldü. Bu işlem yukarıda belirtilen farklı türde ve farklı pH değerindeki bütün tampon çözeltileri ile tekrarlandı. Her bir tampon çözeltisi için Lineweaver-Burke grafikleri çizildi ve bu grafiklerden yararlanarak $K_{m(göz)}$, $I_{max(göz)}$ ve $I_{max(göz)}/K_{m(göz)}$ değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo haline getirilerek karşılaştırıldı.

Optimum sıcaklık tayini

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için elektrot +0,3 V potansiyelde sabit akıma getirildikten sonra denge akımı kaydedildi. Grant GD 120 marka termostatlı dolaşım su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C'ye ayarlandı. Sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde ACh ilave edildi. 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonra akım değeri okunup, denge akımı ile farkı alınarak 20 °C için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler 30, 40, 50, 60, 65 ve 70 °C sıcaklıkları için de tekrarlandı. Farklı sıcaklıklardaki her bir çözelti için ölçülen amperometrik cevap akımları grafiğı geçirildi ve grafikten enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri bulundu.

Substrat derişiminin etkisi

Hazırlanan biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerine substrat derişiminin optimum şartlarda etkisini incelemek amacıyla önce biyosensör +0,30 V'da sabit akıma getirildi. Sonra hücre içerisine $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M derişimi aralığında ACh ilaveleri yapılarak amperometrik cevap akımları ölçüldü ve bulunan değerler ACh derişimine karşı grafiğe geçirildi (Michaelis-Menten eğrisi). Bu grafikten yararlanılarak biyosensörün kantitatif amaçla ACh tayini için kullanılabilecek çalışma aralıkları belirlendi. Enzimler için spesifik bir veri olan $K_{m(göz)}$ ve $I_{max(göz)}$ 'ı belirleyebilmek için ise Lineweaver-Burk grafiği çizildi.

Biyosensörün tekrar kullanılabiliirliğinin belirlenmesi

Hazırlanan biyosensörün optimum şartlarda tekrar kullanılabiliirliği incelendi. Bu amaçla önce biyosensör +0,30 V' da sabit akıma getirildi. $1,0 \times 10^{-5}$ M ACh derişimi ile arka arkaya yapılan ölçümler sonucu amperometrik cevap akımları elde edildi ve ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi.

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör dengeye getirildikten sonra optimum şartlarda raf ömrünü belirlemek için 35 gün boyunca +4 °C'da buzdolabında bekletildi. Değişik aralıklarla $1,0 \times 10^{-5}$ M ACh derişiminde biyosensörün amperometrik cevap akımı ölçüldü. Bekletme süresine karşı cevap akımları grafiğe geçirildi ve bu grafikten ölçülen akım değişimleri kullanarak aktivitedeki azalma değeri hesaplandı.

3.4.9.Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Kan serumunda bulunan ve girişim etkisi olan farklı türlerin ACh analizi üzerine etkisi incelendi. Bu türler ve derişimleri şöyledir; askorbik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M), ürik asit ($3,0 \times 10^{-4}$ M), etanol (0,0109 M), metanol ($5,0 \times 10^{-5}$ M), parasetamol ($1,0 \times 10^{-4}$ M), sistin ($6,5 \times 10^{-5}$ M), sistein ($1,0 \times 10^{-4}$ M) ve glukoz ($5,0 \times 10^{-3}$ M). ACh derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutuldu. Deneyler şöyle yapıldı; önce biyosensör +0,30 V' da sabit akıma getirildi. $5,0 \times 10^{-6}$ M ACh çözeltisinden ve girişimi incelenen türün yukarıda verilen derişimdeki çözeltisinden 200 kat seyrelme olacak şekilde hücreye ilave edildi ve sonrasında

amperometrik cevap akımı ölçüldü. Gözlenen cevap akımı, hücredeki ACh ve çalışılan derişimdeki girişimi incelenen türün oluşturduğu cevap akımlarının toplamıdır. Çalışılan türe karşılık gelen cevap akımı, toplam cevap akımı değerinden ACh'e karşılık gelen akımın çıkarılması ile elde edildi. Hesaplanan cevap akımları ile girişimi incelenen türlerin yüzde olarak ne kadar girişim yaptığı hesaplandı.

3.4.10. Sentetik kançözeltilisinde ACh tayini

Kan serumunda bulunan ve girişim yapabilecek türlerin Bölüm 3.4.9'da belirtilen miktarlarını içeren sentetik bir kan çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltideki ACh miktarı $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak tutuldu. Dengeye gelmiş hücre içerisine 200 kat seyrelme olacak şekilde sentetik numuneden ilave edildi ve amperometrik cevap akımı ölçüldü. Bu akım değerine karşı gelen ACh derişimi kalibrasyon grafiğı kullanılarak hesaplandı.

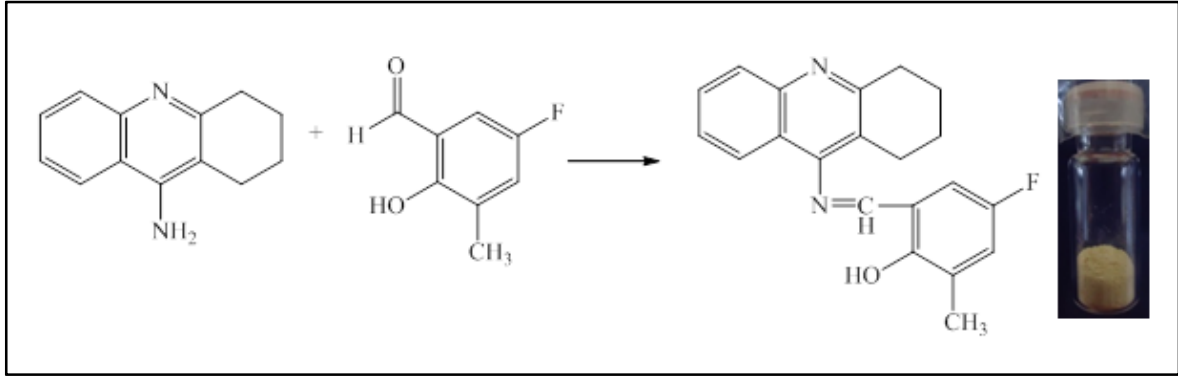
3.5. İnhibitör Sentezleri

3.5.1. Genel yöntem

$1,0 \times 10^{-3}$ mol takrin 10,0 mL metanolde çözülerek geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında ceketli ısıtıcı içerisinde karıştırılarak ısıtıldı. Hazırlanan bu çözeltiye $1,0 \times 10^{-3}$ mol aldehitin 10,0 mL metanol içerisindeki çözeltisi damla damla ilave edildi. Bu karışım, 6-8 saat boyunca ceketli ısıtıcı içerisinde kaynama sıcaklığında geri soğutucu altında karıştırılarak ısıtıldı. Bu süre sonunda, beher içine süzgeç yardımıyla süzülerek alınan çözelti 15 gün boyunca, ağzı kapalı bir şekilde kristallenmesi için bekletildi.

4-floro-2-metil-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5F3MetS]

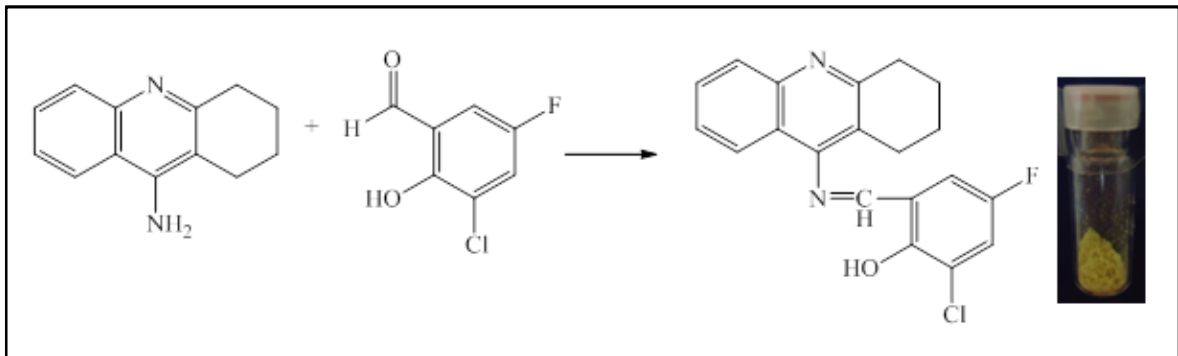
$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,154 g) 5-flor-3-metilsalisilaldehit alınarak 3.5.1'de belirtildiğı gibi hazırlandı. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. T5F3MetS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

2-kloro-4-floro-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T3Cl5FS]

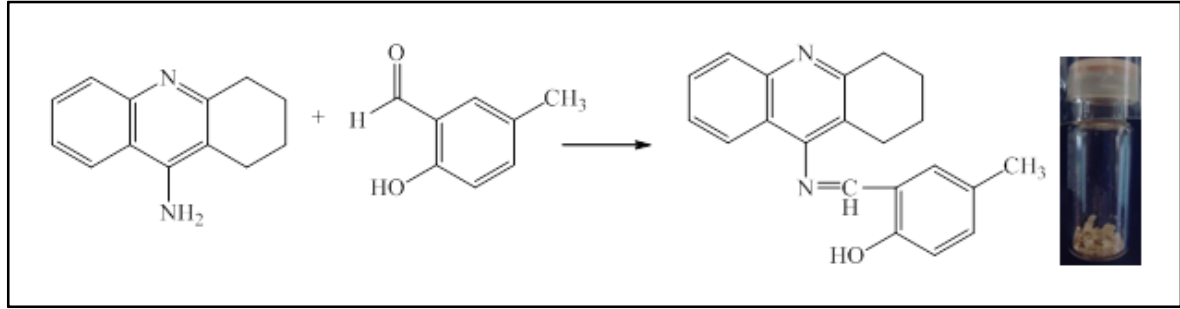
$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,175 g) 3-klor-5-flor-salisilaldehit alınarak 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. T3Cl5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

4-metil-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5MetS]

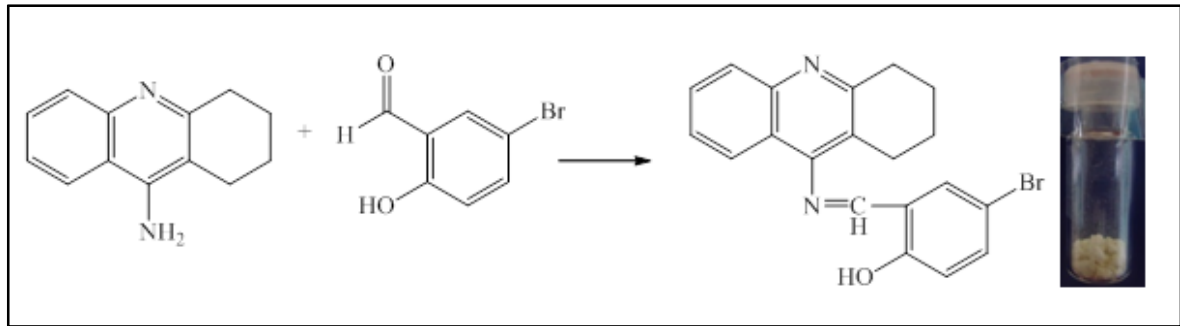
$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,136 g) 2-hidroksi-5-metilbenzaldehit alınarak 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. T5MetS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

4-bromo-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5BrS]

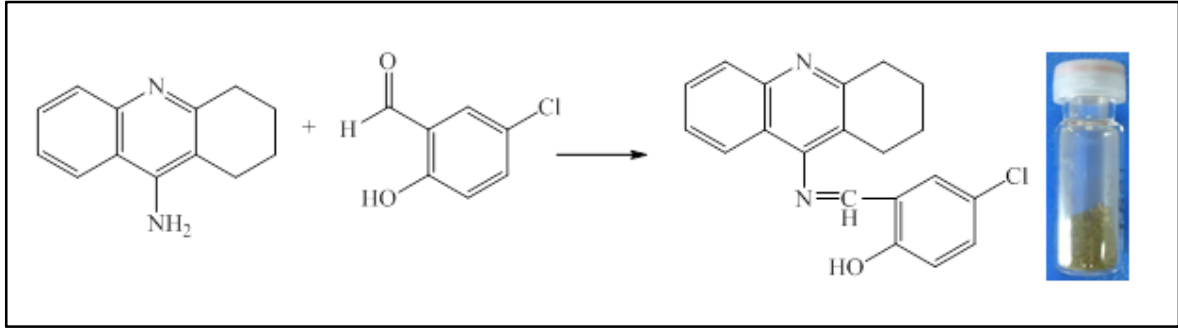
$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,201 g) 5-bromsalisilaldehit alınarak 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. T5BrS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

4-kloro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5ClS]

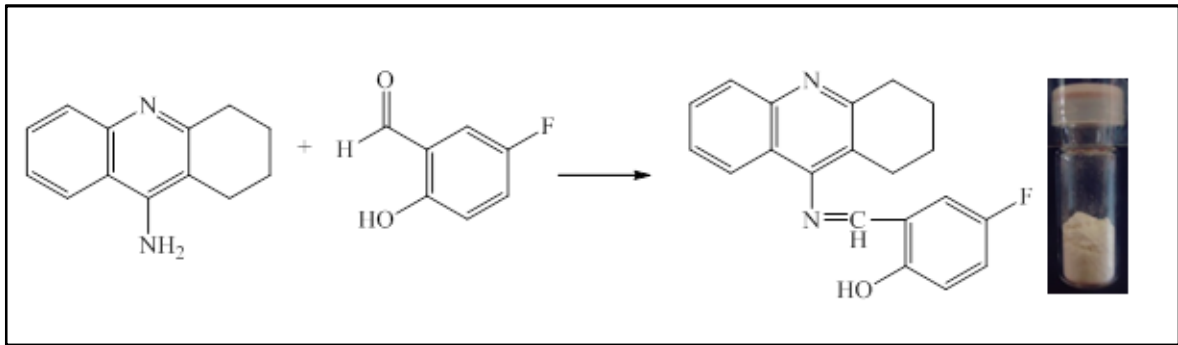
$1,0 \times 10^{-3}$ mol takrin (0,235 g) 2,5 mL DMSO’da çözülerek geri soğutucu altında kaynama sıcaklığında ceketli ısıtıcı içerisine karıştırılarak ısıtıldı. Hazırlanan bu çözeltiye $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,157 g) 5-klorsalisilaldehitin 2,5 mL DMSO’da çözülmüş çözeltisi damla damla ilave edildi. Bu karışım, 6-8 saat boyunca ceketli ısıtıcı içerisinde kaynama sıcaklığında geri soğutucu altında karıştırılarak ısıtıldı. Bu süre sonunda oluşan çözelti, ağzı kapalı bir şekilde kristallendirmeye bırakıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. T5CIS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

4-floro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5FS]

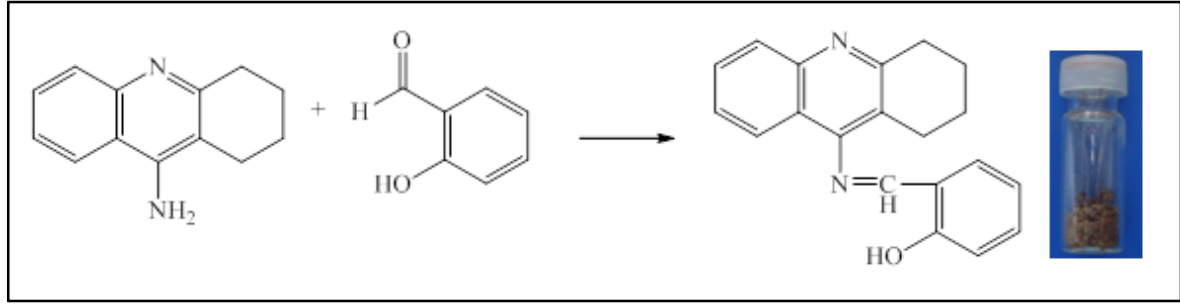
$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,140 g) 5-florsalisilaldehit alınarak 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. T5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [TS]

$1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,235 g) takrin ve $1,0 \times 10^{-3}$ mol (0,122 mL) salisilaldehit alınarak 3.5.1’de belirtildiği gibi hazırlandı. (Şekil 3.7).

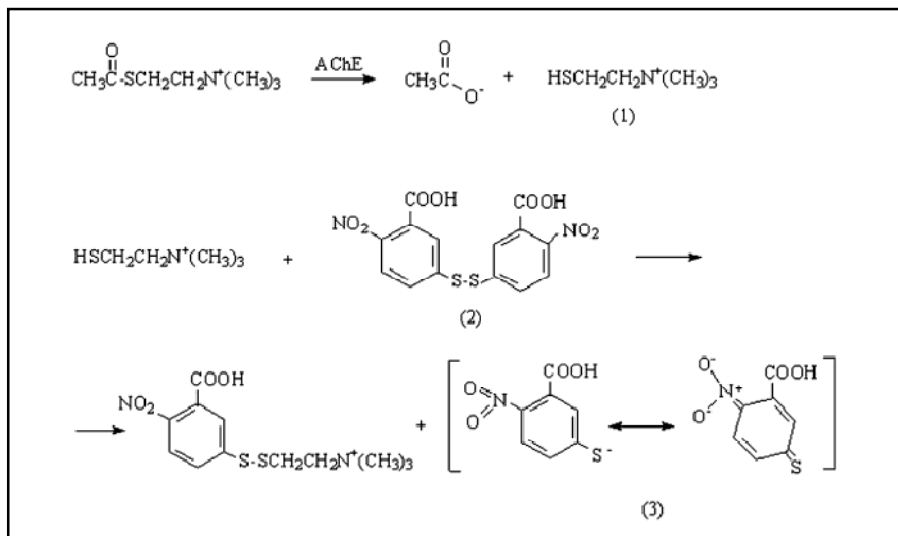


Şekil 3.7. T5FS Schiff bazının katılma ayrılma tepkimesi

3.6. İnhibitörlerin AChE Aktivitesinin Araştırılması

3.6.1. Spektrofotometrik olarak AChE aktivitesinin araştırılması

Sentezi gerçekleştirilen takrin türevi bileşiklerin AChE aktivitesi Ellman Yöntemi ile belirlendi [113]. Kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodunun prensibi şöyledir; AChE enzimi ATCh'in hidroliz reaksiyonunu katalizler (Şekil 3.8). Reaksiyon sonucu açığa çıkan tiyokolin (1), renklendirici olarak etki eden Ellman reaktifi olan 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (2) (DTNB) ile sarı renkte bir bileşik (3) meydana getirir. Açığa çıkan sarı bileşik, (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) spektrofotometrik olarak 412 nm dalga boyunda izlenerek AChE enzim aktivitesi ölçülebilir [113,114].



Şekil 3.8. Ellman metodunun prensibi [114]

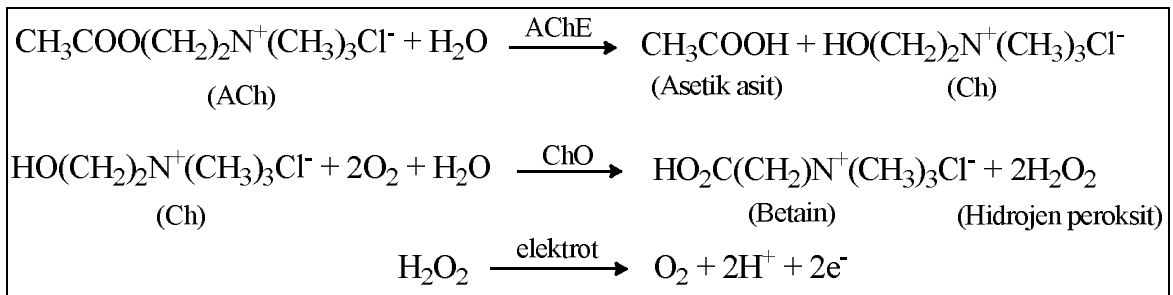
Deneyler şöyle yapıldı; ATCh ($39,5 \mu\text{L}$, $7,6 \times 10^{-3} \text{ M}$), DTNB ($50,0 \mu\text{L}$, $0,01 \text{ M}$), AChE ($25,0 \mu\text{L}$, $5,0$ ünite/mL) ve uygun miktarlarda inhibitör çözeltileri (hücre içi derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ - $2,5 \times 10^{-10} \text{ M}$) toplam hacim $3,0 \text{ mL}$ olacak şekilde pH $8,0$ fosfat tamponu ile karıştırıldı. Karışım 30 dakika inkübe edildikten sonra 412 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Referans olarak enzimin inhibitörsüz benzer çözeltisi aynı prosedürü takiben işlem gördü [113]. İnhibisyon sabiti (K_i) ve IC_{50} değerleri non-lineer regresyon analizini bir sigmoid doz-yanıt modeline karşı kullanılarak Graphad Prism programı ile tayin edildi. İnhibisyon türleri inhibitör varlığında ($1,0 \times 10^{-7}$, $5,0 \times 10^{-8}$ ve $1,0 \times 10^{-8} \text{ M}$) ve yokluğunda elde edilen absorbans değerlerinden yararlanarak çizilen Michealis Menten ve Lineweaver-Burke grafiklerinden belirlendi. Her bir ölçüm 3 kez tekrarlandı ve ortalama değer olarak sunuldu.

3.6.2. Elektrokimyasal olarak AChE aktivitesinin araştırılması

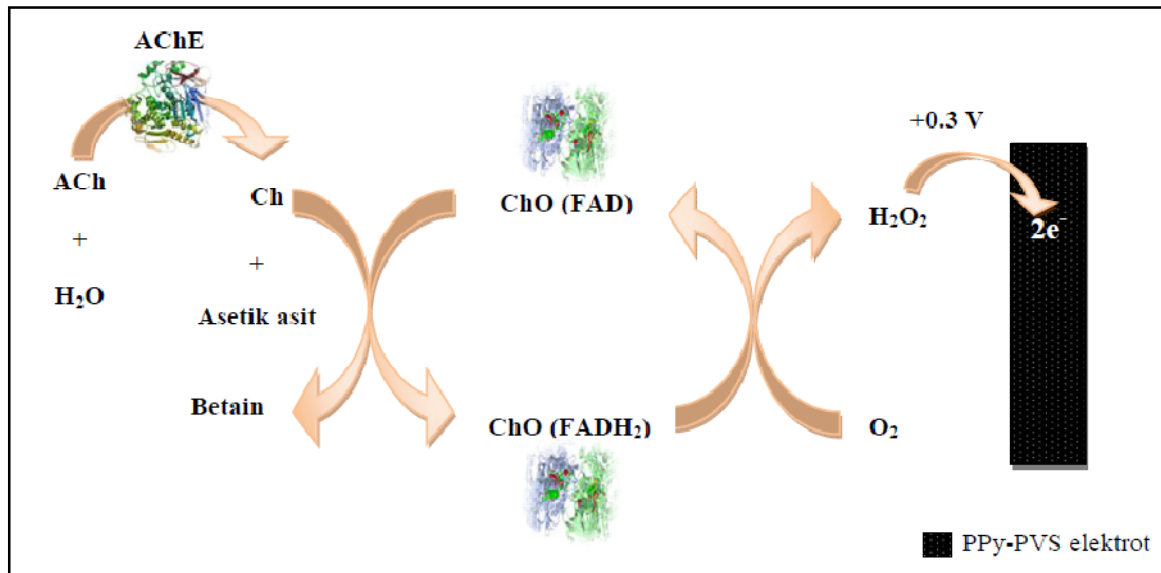
İnhibitörlerin IC_{50} değerleri elektrokimyasal olarak hazırlanan biyosensör ile gerçekleştirildi. Deneyler şöyle yapıldı; önce biyosensör $+0,30 \text{ V}$ ' da sabit akıma getirildi. Sonra hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ olacak şekilde ACh ilavesinden sonra 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım değişimi ölçüldü. Bu değer inhibitörsüz referans değer olarak kabul edildi. Sonra, hücre içi derişimi $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ olacak şekilde ACh ve farklı miktarlarda inhibitör çözeltileri ilave edildi. 15 dakika karıştırıldı ve 200 s sonundaki akım değişimleri ölçüldü. Her ACh ve inhibitör ilavesi sonrasında hücre değiştirildi ve enzim elektrot 10 dakika tampon çözelti içerisinde bekletildi. İnhibisyon sonrası enzim aktivite kaybının deneylerde hata getirmemesi için elektrot $3-4$ kullanımdan sonra yenisi hazırlandı. Elde edilen akım değerlerinden yararlanarak elektrokimyasal IC_{50} 'ler non-lineer regresyon analizini bir sigmoid doz-yanıt modeline karşı kullanılarak Graphad Prism programı ile tayin edildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması 3 kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda yeni bir amperometrik ACh biyosensörü hazırlandı. Bunun için öncelikle, Pt yüzey üzerine iletken bir polimer olan PPy, PVS'lı ortamda kaplandı. PPy-PVS filmin çevrim sayısı optimize edildi. Sonra, AChE ve ChO enzimleri glutaraldehit ve SSA ile çapraz bağlama yöntemini kullanarak immobilize edildi. ACh tayini, Şekil 4.1 ve 4.2'deki reaksiyonlar sonucu açığa çıkan H_2O_2 'in +0,3 V'da yükseltgenme akımının ölçülmesi ile yapıldı.



Şekil 4.1. ACh tayini reaksiyonları



Şekil 4.2. ACh tayininin reaksiyon şeması

Şekil 4.2'ye göre; PPy-PVS elektrot üzerinde immobilize olan AChE ve ChO enzimleri ile ACh arasında biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelmektedir. İlk olarak; ACh, AChE ile Ch ve asetik asite hidrolizlenir. Oluşan Ch, ChO ile betaine yükseltgenir. ChO' ın prostetik

grubu olan FAD, elektron alarak FADH_2 'ye indirgenir. Enzim içerisindeki FADH_2 reaksiyonu tersinir hale getirmek için çözelti içerisindeki oksijene elektronlarını vererek yükseltgenir. Böylelikle enzim ilk formuna geri döner. Oksijen, elektronları alarak H_2O_2 'ye indirgenir. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda açığa çıkan H_2O_2 PPy-PVS elektrot yüzeyinde oksijene yükseltgenir. ACh tayini elektrot yüzeyinde H_2O_2 'yanodik akımının ölçülmesi ile yapılır.

Hazırlanan biyosensörün performansını etkileyen parametreler (çevrim sayısının etkisi, enzim oranlarının optimizasyonu v.b) ve en iyi çalışma koşulları (pH, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik, raf ömrü v.b) araştırıldı. Daha önce PPy-PVS filme AChE ve ChO immobilize edilerek hazırlanmış bir biyosensör çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu yüzden yapılan biyosensör çalışması orjinal bir çalışmadır.

Çalışmanın ikinci kısmında AChE enzimini inhibe eden ve Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmış bir ilaç olan takrinin (9-amino-1,2,3,4-tetrahidroakridin) 7 farklı aldehit ile meydana getirdiği Schiff bazları sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin karakterizasyonu elementel analiz, TGA, FT-IR, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektroskopisi ile aydınlatıldı. Daha önce takrinin bu tezde kullanılan aldehitler ile meydana getirdiği Schiff bazları sentezlenmemiştir. Bu yüzden yapılan bu sentezler ve bunların AChE inhibisyon etkilerinin incelenmesi orjinal bir çalışmadır.

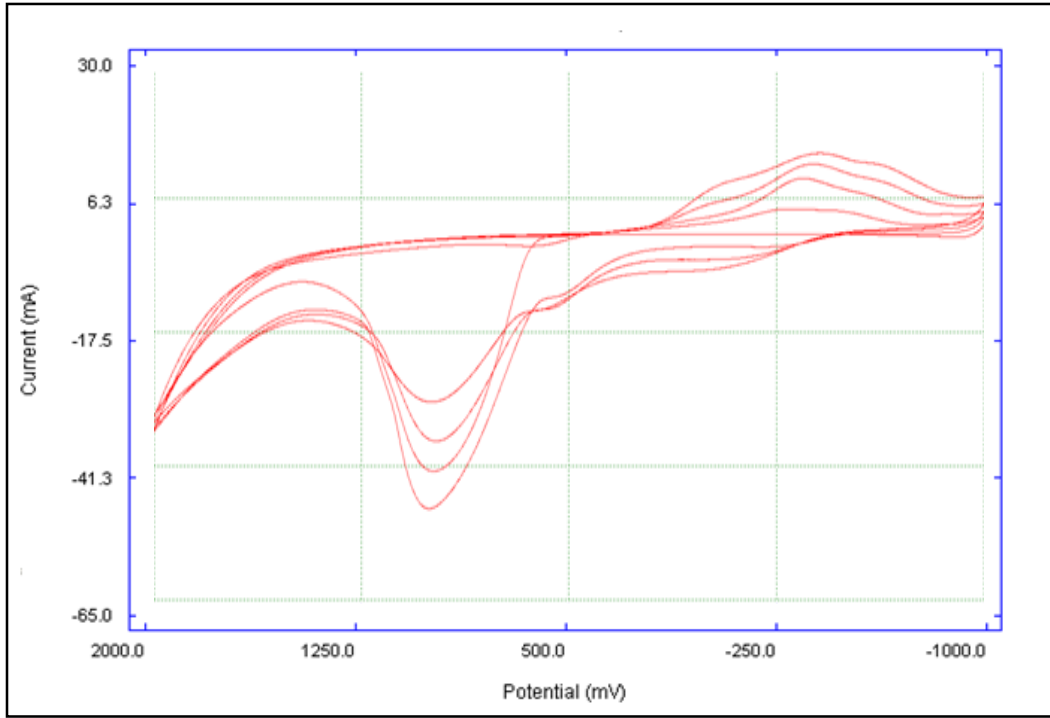
Çalışmanın üçüncü kısmında sentezlenen inhibitörlerin AChE aktivitesi hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal olarak araştırıldı. Spektrofotometrik Ellman yöntemi kullanılarak yapılan deneyler sonucunda inhibitörlerin IC_{50} , K_i , K_m , $V_{\max}$ değerleri hesaplandı. Bileşiklerin IC_{50} değerleri hazırlanan ACh biyosensörü ile elektrokimyasal olarak da tayin edildi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

Bu çalışmada yapılan bütün deneylere ait sonuç ve yorumlar aşağıda sunulmuştur.

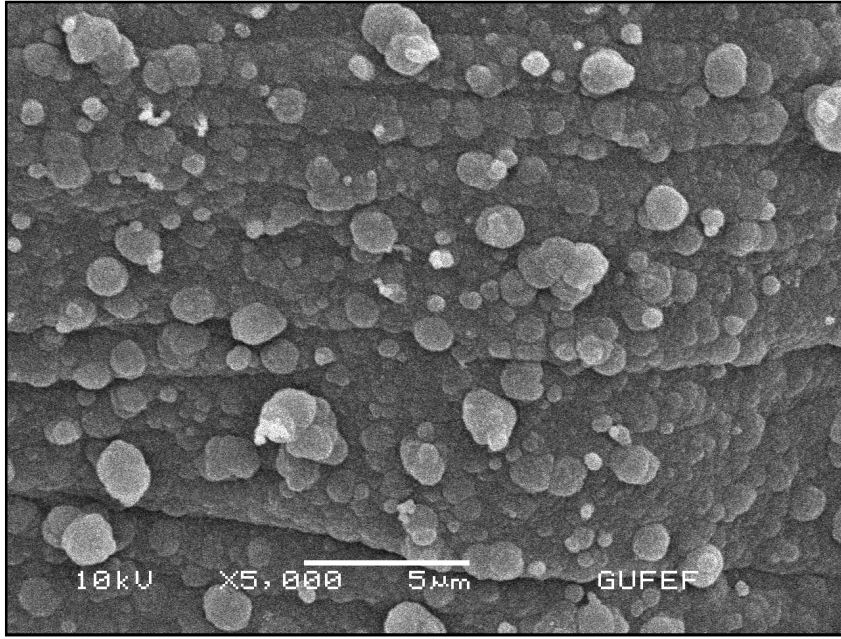
4.1. ACh Biyosensörünün Hazırlanması

4.1.1. Platin elektroda PPy-PVS kaplanması

Pt yüzeye PPy-PVS'ın kaplanması dönüşümlü voltametri tekniği ile çevrim alınarak gerçekleştirildi. Kaplama -1,0 V - +2,0 V potansiyel aralığında farklı çevrim sayıları ile yapıldı (Resim 4.1). Hazırlanan Pt/PPy-PVS elektrot yüzeyindeki filmin taramalı elektron mikroskobu ile çekilen resmi Resim 4.2'de görülmektedir. PPy-PVS'nin yüzey morfolojisinin düzensiz karnabahar görünümünde olduğu gözlemlendi.



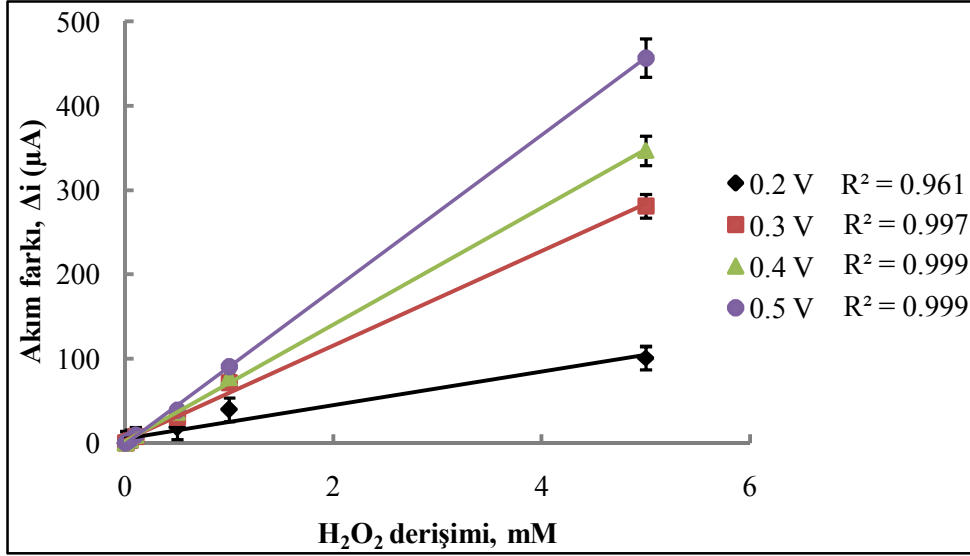
Resim 4.1. PPy-PVS filmin dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramı



Resim 4.2. PPy-PVS filmin taramalı elektron mikroskobu resmi

4.1.2. Çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Biyosensör yapımı için kullanılacak Pt/PPy-PVS elektrodun H_2O_2 'e duyarlılığı incelenirken, H_2O_2 'in yükseltgenmesi için farklı potansiyellerde çalışmalar yapılarak H_2O_2 derişimine karşı akım değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.3). Şekil 4.3 incelendiğinde, yüksek potansiyellerdeki akım değışimlerinin düşük potansiyeldeki akım değışimlerinden daha fazla olduğu görölmektedir. Çalışılan en düşük potansiyel olan +0,2 V'daki akımlar, diğeri potansiyelde elde edilen akımlar ile karşılaştırıldığında çok düşük olduğu görölmektedir, ayrıca lineer regresyon katsayısı da en düşüktür. Yüksek potansiyellerde ise vücut sıvısında bulunan bazı türlerin (askorbik asit, ürik asit v.b) girişim etkisi oldukça fazla olduğu bilinmektedir [115]. Bu sebeple sıçramalarının yüksek, doğrusallığın iyi olduğu ve girişim etkisinin düşük olacağı +0,3 V'un çalışma potansiyeli olmasına karar verildi ve bundan sonraki bütün deneyler +0,3 V'da gerçekleştirildi.

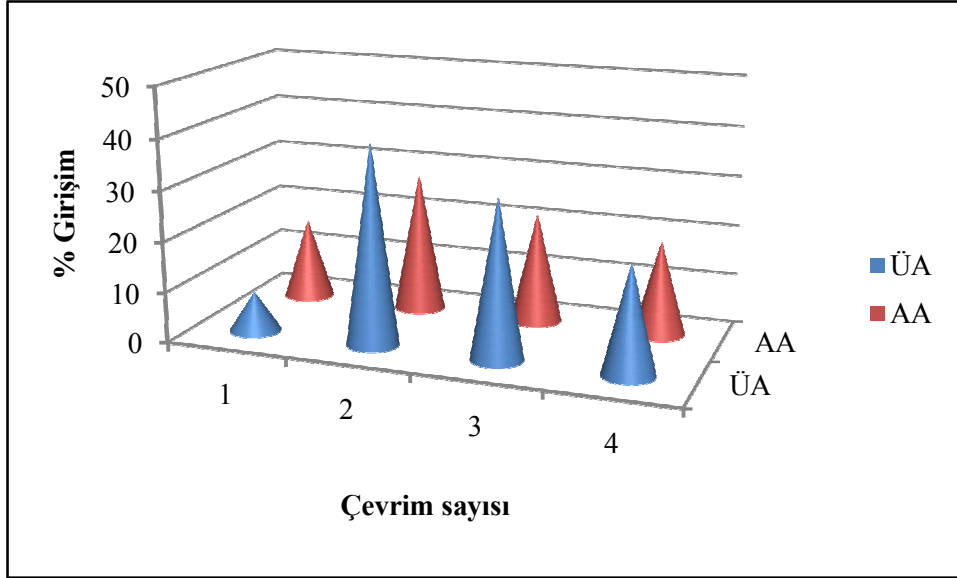


Şekil 4.3. Pt/PPy-PVS elektrodun H_2O_2 'ye duyarlılığı üzerine potansiyelin etkisi (pH 9,0 glisin tamponu)

Literatürde farklı materyallerle yapılmış H_2O_2 duyarlı enzim elektrotların farklı potansiyellerde çalışmalarına rastlanmıştır. Bunların büyük bir kısmı +0,35 V, +0,65 V ve +0,7 V'daki çalışmalardır [5,91,116].

4.1.3. PPy-PVS filmin çevrim sayısının seçicilik üzerine etkisinin incelenmesi

Seçicilik bir biyosensör için önemli bir parametredir. Seçicilik ve hassasiyet arasındaki en iyi uyumu elde etmek amacıyla, farklı çevrim sayıları uygulanarak elde edilen Pt/PPy-PVS elektrodun H_2O_2 , AA ve ÜA'ye karşı amperometrik cevabı incelenmiştir [10,117]. AA ve ÜA kanda en çok girişim yapan türlerden ikisidir. Girişim etkisini azaltmak amacıyla, film kalınlığı optimize edilmiştir. Film kalınlığı çevrim sayısı ile tanımlanmıştır. Çevrim sayısı artırıldığında film kalınlığı da artmaktadır. Film kalınlığı artıkça hassasiyet azalmaktadır, çünkü film kalınlığı iletkenlik ile orantılıdır. Farklı çevrim sayıları uygulanarak elde edilen farklı film kalınlığındaki Pt/PPy-PVS elektrotların $1,0 \times 10^{-4}$ M H_2O_2 , $3,0 \times 10^{-4}$ M ÜA ve $1,0 \times 10^{-4}$ M AA'ya karşı göstermiş olduğu amperometrik cevapları grafik çizilerek incelendi ve karşılaştırıldı (Şekil 4.4).



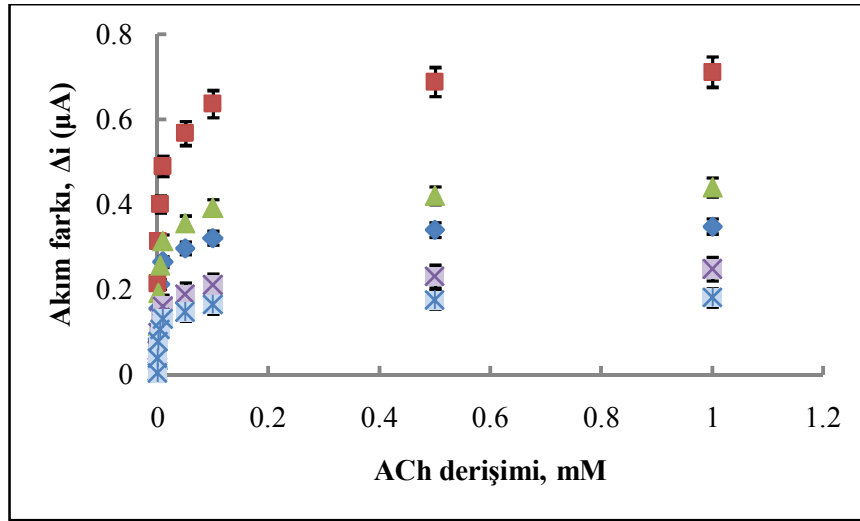
Şekil 4.4. Çevrim sayısının ÜA ve AA'nın cevap akımına karşı etkisi (pH 9,0 glisin tamponu, +0,3 V)

Şekil 4.4'de ÜA ve AA akımlarının 2 çevrimde en yüksek değerde olduğu, çevrim sayısı 2-4 arasında artırıldığında ÜA ve AA'nın girişiminin azaldığı görülmektedir. En düşük girişim etkisi ise 1 çevrimlik elektrottan elde edilmiştir. Ayrıca, çevrim sayısı arttıkça hidrojen peroksit karşı hassasiyetin azaldığı gözlemlendi. İnce polimer tabakaları enzim kıvrılmalarını ve elektrot yüzeyinin biyokomponent tarafından bloke edilmesi riskinden korumaktadır [118]. Bütün bu sebeplerden dolayı çevrim sayısının 1 olmasına ve bundan sonraki bütün deneylerin 1 çevrim alınarak elde edilen Pt/PPy-PVS elektrot ile yapılmasına karar verildi.

4.1.4. AChE ve ChO enzim miktarının belirlenmesi

Bu tezde enzim aktivitesi AChE ve ChO enzimlerinin immobilize edilerek hazırlandığı amperometrik bir ACh sensörü ile belirlendi. AChE tarafından katalizlenen ACh hidroliz reaksiyonu kinetik kontrollü, ChO tarafından katalizlenen Ch oksidasyon reaksiyonu ise difüzyon kontrollüdür [14,119]. Ayrıca enzim elektrodun yapımında enzim derişimi önemli bir parametredir. Çünkü polimerik yapı içerisinde tutuklanan enzim miktarı akım değişimini etkilemektedir [120]. Bütün bu sebeplerden dolayı enzim elektrodun yapımı için en uygun enzim oranı belirlendi.

İlk önce ChO miktarı (0,024 ünite/mL) sabit tutularak AChE miktarı optimize edildi. AChE miktarı 0,024 ünite/mL'den 0,048 ünite/mL'ye çıkarıldığında akım değerlerinin düştüğü görüldü (Şekil 4.5). Bu sebeple, AChE miktarı 0,024 ünite/mL olarak belirlendi. Sonra, AChE miktarı (0,024 ünite/mL) sabit tutularak ChO miktarı optimize edildi. 0,024-0,096 ünite/mL arasında 4 farklı ChO miktarı denendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. En fazla aktivite 0,024 ünite/mL ChO miktarından elde edildi. Şekil 4.5 incelendiğinde enzim miktarı arttıkça akım değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durum literatürde şöyle açıklanmaktadır; enzim miktarı artırıldığında enzim tabakası kalınlaşır ve elektron transferi yavaşlayarak substratın difüzyonlanması engellenir [98]. Bundan sonraki deneylerde enzim elektrodun hazırlanması sırasında immobilize edilecek enzim miktarlarının 0,024 ünite/mL AChE ve 0,024 ünite/mL ChO olmasına karar verildi. *Şen ve arkadaşları* (2004) tarafından yapılan bir ACh biyosensörü çalışmasında AChE ve ChO enzim oranının 1:1 olduğu görülmektedir [97].



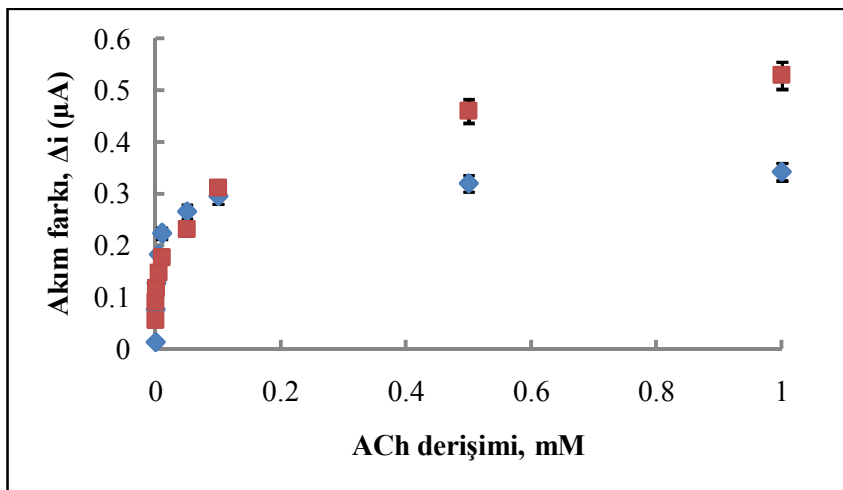
Şekil 4.5. AChE ve ChO miktarının biyosensör cevap akımı üzerine etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V) (■) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,024 ünite/mL ChO (1:1) (▲) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,048 ünite/mL ChO (1:2) (◆) 0,048 ünite/mL AChE ve 0,024 ünite/mL ChO (2:1) (✕) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,072 ünite/mL ChO (1:3) (✱) 0,024 ünite/mL AChE ve 0,096 ünite/mL ChO (1:4)

4.1.5. Enzim immobilizasyon yönteminin belirlenmesi

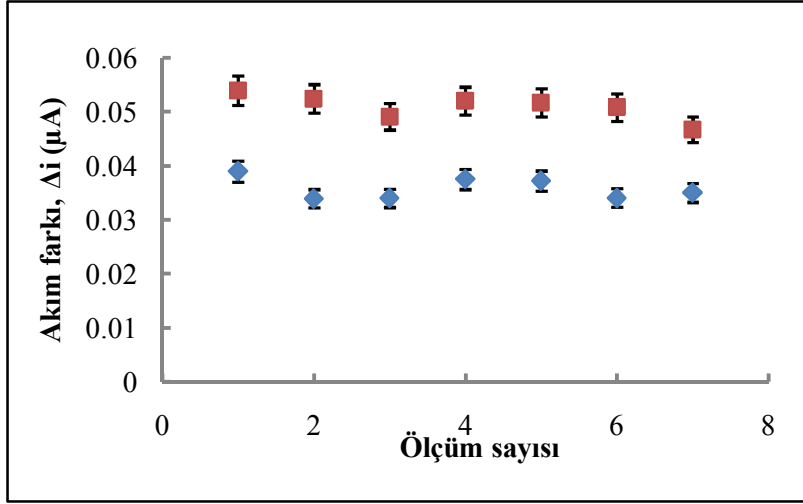
Çalışma elektrodu yüzeyine enzim immobilizasyonu bir biyosensör tasarımı esnasındaki en önemli basamaklardan birisidir. Çünkü biyosensörün kararlılığı, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için enzim ve elektrot yüzeyi arasında güçlü etkileşimlerin olması

gerekir [1]. Bu nedenle bu çalışmada iki farklı immobilizasyon yöntemi ile hazırlanan enzim elektrotların tekrarlanabilirliği ve ACh'e hassasiyetleri belirlendi ve sonuçlar karşılaştırılarak en iyi yönteme karar verildi.

Deneylerde öncelikle enzim elektrotların ACh'e duyarlılığı incelendi. Artan miktarlarda ilave edilen ACh'e karşılık elde edilen akım değerlerinden yararlanarak Michealis-Menten grafikleri çizildi (Şekil 4.6). Enzimin substrata ilgisini ifade eden $K_{m(göz)}$ sabiti $1/[ACh] - 1/\Delta i$ grafiğinden (Lineweaver-Burke grafiği) yararlanarak hesaplandı. $K_{m(göz)}$ çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde $2,10 \times 10^{-4}$ mM, hapsetme yönteminde ise $2,69 \times 10^{-3}$ mM olarak bulundu. $I_{max(göz)}/K_{m(göz)}$ oranı ise çapraz bağlama ile immobilizasyon yönteminde 1000,0 hapsetme yönteminde ise 142,7 olarak hesaplandı. Sonuçlara bakıldığında enzimin substrata karşı ilgisinin çapraz bağlama yönteminde daha fazla olduğu görüldü. Ayrıca her iki yöntemle hazırlanan enzim elektrotların tekrar kullanılabilirlikleri karşılaştırıldığında çapraz bağlama yöntemindeki akım farkının hapsetme yöntemine göre daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.7). Sabit ACh derişiminde ($1,0 \times 10^{-3}$ M) yapılan 7 ölçüm sonucunda elde edilen akım değışimlerinden hesaplanan bağıl standart sapma hapsetme yöntemi için %5,7; çapraz bağlama yöntemi için %4,68 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanan enzim elektrodun tekrarlanabilirliğinin hapsetme yöntemi ile hazırlan elektrottan daha iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. Hapsetme (♦) ve çapraz bağlama (■) immobilizasyon yöntemi ile elde edilen enzim elektrotlara ait ACh derişimi-akım farkı grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V)



Şekil 4.7. Hapsetme (♦) ve çapraz bağlama (■) immobilizasyon yöntemi ile elde edilen enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V)

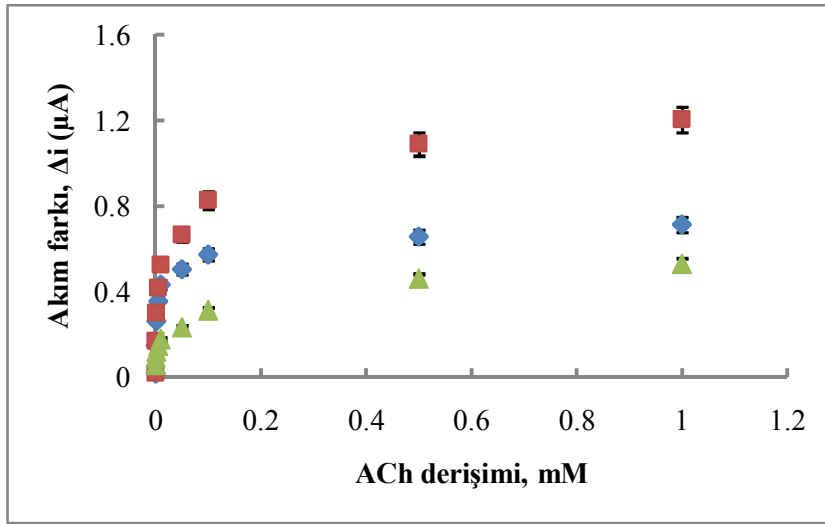
Bütün bu değerlendirmeler sonucunda çapraz bağlama yönteminin en iyi immobilizasyon yöntemi olduğuna karar verildi ve bundan sonraki bütün deneylerde çapraz bağlama yöntemi ile hazırlanan enzim elektrot kullanıldı.

4.1.6. Çapraz bağlama yöntemine gluteraldehit miktarının etkisi

Çapraz bağlama biyosensör tasarımı sırasında en çok tercih edilen enzim immobilizasyon yöntemlerinden birisidir. Bu yöntem uygulanabilirlik açısından basit ve kolaydır, ayrıca biyomolekül ve taşıyıcı arasında güçlü kimyasal bağlanma sağlar. Ancak çapraz bağlama boyunca enzimin aktif bölgesinde meydana gelen kimyasal değişimlerden dolayı aktivite kaybına da yol açabilmektedir [41].

Gluteraldehit ($\text{CHO-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CHO}$) en çok tercih edilen çapraz bağlama reaktiflerinden birisidir. Enzim moleküllerinin amin grupları ile etkileşime girerek bağlanmayı gerçekleştirir. Ancak gluteraldehit sadece enzim yüzeyindeki amin grupları ile etkileşime girmez, küçük bir molekül olduğu için enzimin iç kısımlarına kadar difüzyonlanıp iç amin grupları ile de etkileşime girebilir. Bu durum ise enzimin üç boyutlu yapısını ve dolayısıyla katalitik aktivitesini etkileyebilmektedir, çünkü enzimin aktif bölgesi fazla çaprazbağlanma ile bloke olabilir [121]. Bu sebeple, eğer gluteraldehit ile çapraz bağlama yöntemi kullanılacak ise gluteraldehit miktarının aktiviteye etkisinin araştırılması yararlı olacaktır.

Bu çalışmada 3 farklı miktarda (kütlece %0,11, %0,23 ve %0,38) gluteraldehit kullanılarak hazırlanan enzim elektrotlara ait ACh derişimi-akım grafikleri çizildi (Şekil 4.8). Gluteraldehit miktarı %0,11'den %0,23'e çıkarıldığında akımların arttığı; ancak miktarın %0,38'e çıkarıldığında ise aktivite kaybının yaşandığı görüldü. Bu sonucu şöyle yorumlamak mümkündür; %0,11 derişimdeki gluteraldehit yeterli enzim etkileşimi yapmak için yeterli gelmemiş, %0,38 derişimindeki gluteraldehit ise çok fazla gelerek aşırı bağlanma sonucu enzim aktivite kaybına sebep olmuştur. Bu çalışmada en fazla aktivitenin %0,23 derişimindeki gluteraldehitten sağlandığına karar verildi ve bundan sonraki çalışmalarda bu derişimde gluteraldehit kullanarak enzim elektrotlar hazırlandı.



Şekil 4.8. Çapraz bağlama immobilizasyon yönteminde kullanılan gluteraldehit miktarının etkisinin incelendiği derişim-akım farkı grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, +0,3V) (■) %0,23 gluteraldehit, (◆) %0,11 gluteraldehit, (▲) %0,38 gluteraldehit

4.1.7. Enzim elektrodun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Enzim elektrotların cevabına etki eden çeşitli parametreler vardır. Bunlar pH, sıcaklık, substrat derişimi, raf ömrü ve tekrarlanabilirlik parametreleridir. Bu çalışmada hazırladığımız ACh biyosensörünün amperometrik cevabına söz konusu olan değişkenlerin etkisi incelendi ve ilgili sonuçlar aşağıda verildi.

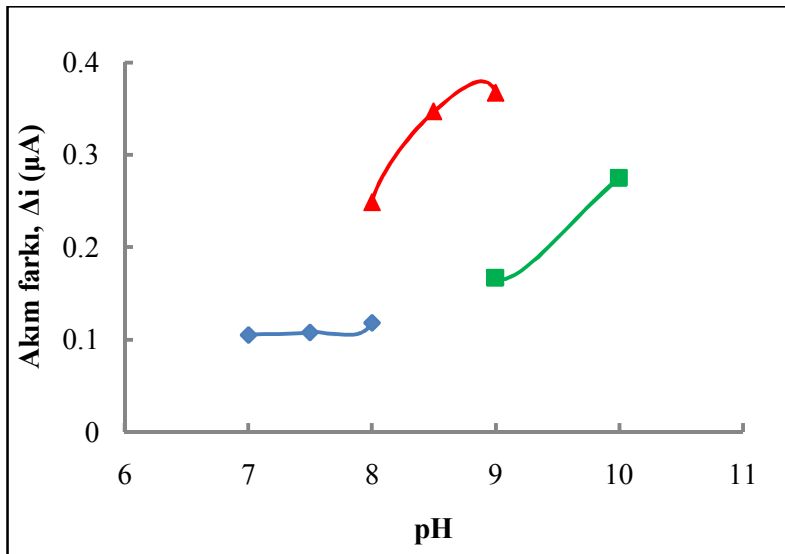
Optimum pH'nın tayini

pH, enzimin uygun konformasyonunun muhafaza edilmesinde önemli bir rol oynar, çünkü enzim aktivitesi, aktif bölgedeki aminoasitlerin iyonizasyon durumuna bağlıdır [122]. Bu amaçla bu çalışmada hazırlanan ACh biyosensörünün cevap akımı üzerine pH etkisi araştırıldı. Deneyler öncelikle pH 6,0-10,0 arasındaki 0,1 M fosfat tampon çözeltileri ile yapıldı. Fakat fosfat tamponu ile yapılan deneyler sonucunda optimum pH değeri gözlenemedi. Bundan dolayı farklı tampon türleri ile çalışmalara devam edilmeye karar verildi. *Kok ve arkadaşlarının* (2001) bir çalışması bu noktada bize yol gösterdi [89]. Bu çalışmadan yola çıkarak, pH değerleri 7,0-10,0 arasında değişen fosfat, glisin ve borat tampon çözeltileri ile optimum pH deneyleri yapıldı. Her bir pH değeri için $1,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-3}$ M ACh ilavelerine karşı elde edilen akım değerlerinden yararlanarak Lineweaver-Burke grafikleri çizildi. Bu grafiklerden $K_{m(göz)}$, $I_{max(göz)}$ ve $I_{max(göz)}/K_{m(göz)}$ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.1). Enzimler için spesifik bir veri olan Michealis-Menten sabiti (K_m), enzimin substratına karşı ilgisini ifade eder ve düşük K_m , yüksek I_{max} ve yüksek $I_{max}/K_{m(göz)}$ değerleri enzimin substratına yüksek ilgisini gösterir. Çizelge 4.1'e bakıldığında azalan $K_{m(göz)}$, artan $I_{max(göz)}$ ve artan $I_{max(göz)}/K_{m(göz)}$ eğilimine en iyi pH 9,0 glisin tamponunun sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca her bir pH değeri ve türü için sabit ACh ($1,0 \times 10^{-3}$ M) derişiminde elde edilen akım değerleri grafiğe geçirildiğinde en yüksek akımın pH 9,0 glisin tamponundan elde edildiği görüldü (Şekil 4.9). Elde edilen bu sonuçlar dahilinde biyosensörün optimum pH'sının 9,0 olduğuna karar verildi. Bu sonuç *Kok ve arkadaşlarının* (2001) yaptığı çalışma ile de son derece uyumludur. Biyosensör yapımı için AChE ve ChO enzimlerinin pHEMA'ya immobilizasyon koşullarının araştırıldığı bu çalışmada optimum pH 9,0 (glisin tamponu) olarak bulunmuştur.

Fizyolojik koşullardan farklı pH değerleri PPy-PVS ile hazırlanmış biyosensörlerde karşılaşılan bir durumdur [3,6]. AChE-ChO enzimleri PPy-PVS'ye immobilize edildiğinde yüksek pH'larda dahi aktivitesini koruyabilmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı pH koşulları altında ACh biyosensörüne ait $K_m(\text{göz})$, $I_{\text{maks}(\text{göz})}$ ve $I_{\text{maks}(\text{göz})}/K_m(\text{göz})$ değerleri

Tampon türü ve pH	$K_m(\text{göz})(\text{mM})$	$I_{\text{maks}(\text{göz})} (\mu\text{A})$	$I_{\text{maks}(\text{göz})}/K_m(\text{göz})$
Fosfat tamponu	pH 7,0	0,284	0,235
	pH 7,5	0,0331	0,0730
	pH 8,0	0,0252	0,0560
Glisin tamponu	pH 8,0	0,0375	0,226
	pH 8,5	0,0225	0,273
	pH 9,0	0,00458	0,286
Borat tamponu	pH 9,0	0,0369	0,229
	pH 10,0	0,00413	0,178



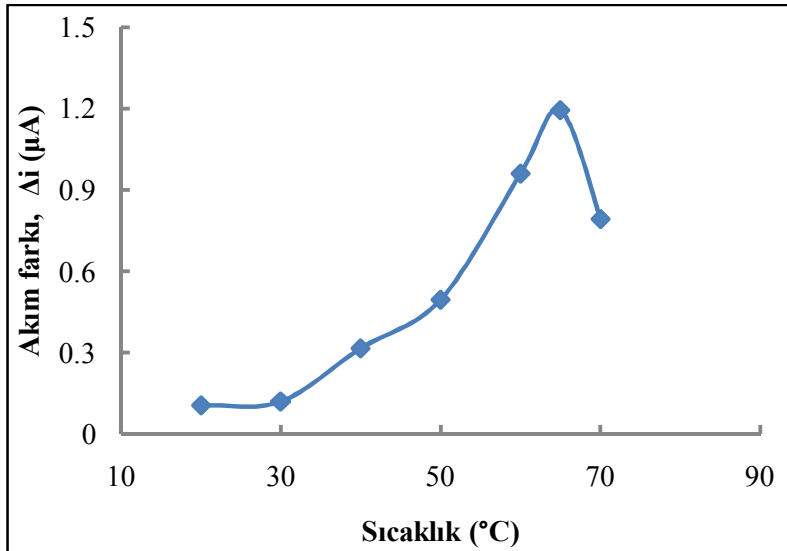
Şekil 4.9. Biyosensörün ACh'ye duyarlılığına pH'nın etkisi (◆) 0,1 M fosfat tamponu (▲) 0,1 M glisin tamponu (■) 0,1 M borat tamponu (25 °C, $1,0 \times 10^{-3}$ M ACh, +0,3V)

Literatürde farklı materyallerle yapılmış ACh biyosensörü çalışmalarında bizim çalışmamızla uyumlu optimum pH değerleri görülmektedir. Örneğin, 9,5 [91], 8,0-9,0 [96]. 9,0'dan farklı pH değerlerinin olduğu çalışmalarda mevcuttur. Örneğin; 7,4 [10], 7,5 [95]. pH değerlerindeki bu değişim immobilize edilen polimer materyali ve immobilizasyon

türünün farklı olmasından kaynaklanabilir. Çünkü enzim aktif bölgesinin çevresindeki değişimler enzim ve immobilizasyon materyali arasında değişik etkileşimlere yol açabilir [89,123,124]. Ayrıca immobilize enzimler serbest formları ile karşılaştırıldıklarında daha kararlı substrat-enzim kompleksi oluşturabilmekte ve farklı pH'larda yüksek aktivite gösterebilmektedirler.

Optimum sıcaklık tayini

Sıcaklık, enzim aktivitesi üzerine etkisi olan bir diğer önemli parametredir. Enzim elektrodun sıcaklığa bağımlı cevabını araştırmak bu sebeple önemlidir. Enzim reaksiyon hızı ile sıcaklık arasında üstel olarak değişen bir ilişki vardır [122]. Hazırlanan biyosensörün sabit ACh derişiminde ($1,0 \times 10^{-3} \text{M}$) farklı sıcaklıklardaki (20-70 °C) amperometrik cevap akımları elde edilerek grafiğe geçirildi (Şekil 4.10). Şekil 4.10 incelendiğinde, akım farkı değerleri 65 °C'e kadar artmakta ve 65 °C'dan sonra azalmaktadır. En yüksek akım farkı 65 °C'da elde edilmiştir. Bu sıcaklıktan sonra ise enzimlerin denature olduğu düşünülmüştür Çalışma şartlarının kolay olmasını sağlamak amacıyla bundan sonraki çalışmalarda oda sıcaklığı olan 25 °C seçilmiştir.



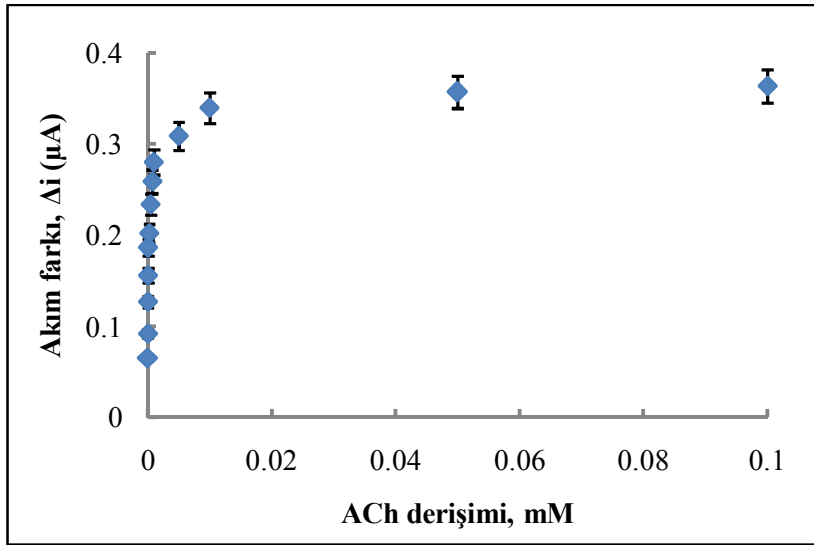
Şekil 4.10. Biyosensörün ACh'ye duyarlılığına sıcaklığın etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ ACh, +0,3V)

Literatürde 65 °C'dan farklı optimum sıcaklık değerine sahip ACh biyosensörü çalışmaları mevcuttur, örneğin 35 °C [91] ve 55 °C [97]. Bu farklılık kullanılan immobilizasyonda

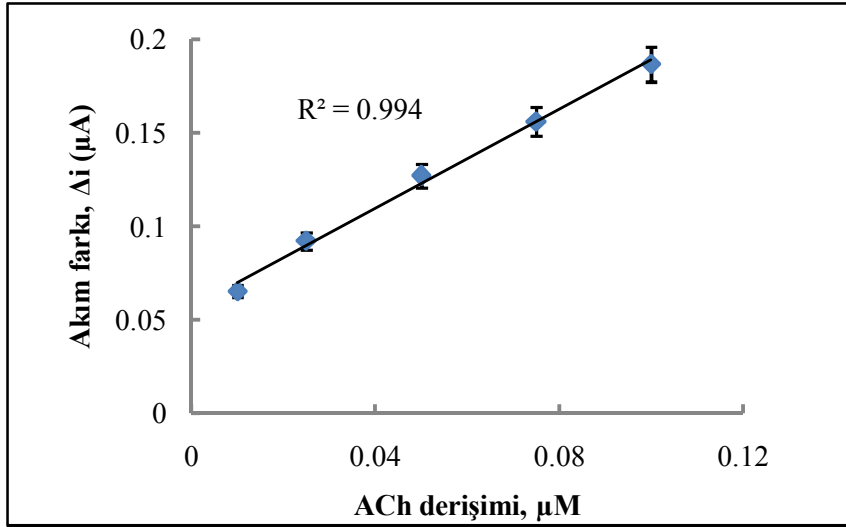
kullanılan polimerin ve immobilizasyon türünün değişikliğinden kaynaklanabilir. Ayrıca, immobilize enzimler fizyolojik sıcaklıktan farklı sıcaklıklar altında serbest formları ile karşılaştırıldığında daha yüksek aktivite gösterebilirler. Yüksek optimum sıcaklık değerleri PPy-PVS polimerleri ile hazırlanan biyosensör çalışmalarında da görülmektedir [4,6,125].

Substrat derişiminin etkisi

İmmobilize AChE ve ChO enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon hızları üzerine substrat derişimin etkisi $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M ACh derişim aralığında incelendi (Şekil 4.11). $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M ($R^2 = 0,994$, Şekil 4.12) ile $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ($R^2 = 0,994$, Şekil 4.13) aralıklarında iki adet doğrusal bölge olduğu tayin edildi. Her iki grafiğin de doğrusallıklarının oldukça iyi olduğu ve kantitatif amaçla ACh tayini için kullanılabileceği söylenebilir. Literatür ile karşılaştırıldığında ($2,0 \times 10^{-4}$ - $1,3 \times 10^{-3}$ M [95] ve $1,2 \times 10^{-4}$ - $1,0 \times 10^{-2}$ M [98]) hazırlanan biyosensörün çalışma aralığının geniş ve düşük ACh derişimlerine karşı hassas olduğu görülmektedir.

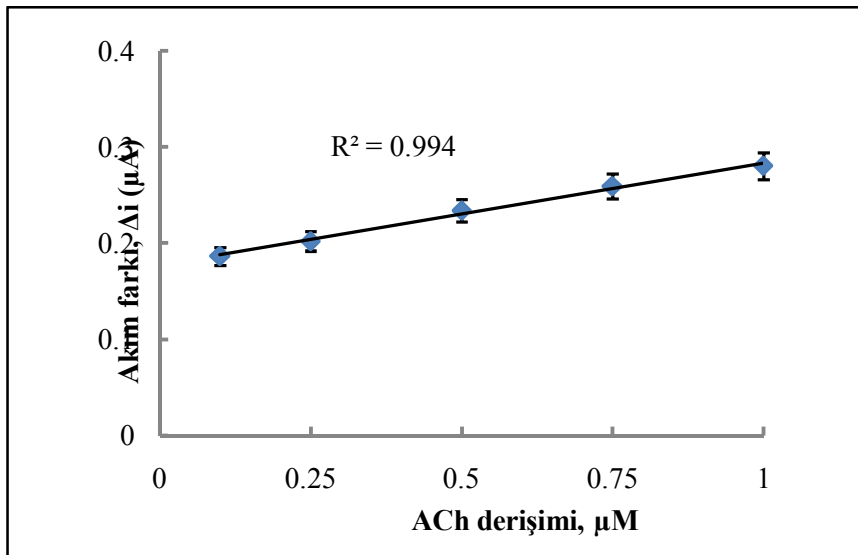


Şekil 4.11. Biyosensörün amperometrik cevabına karşı ACh derişiminin etkisi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)

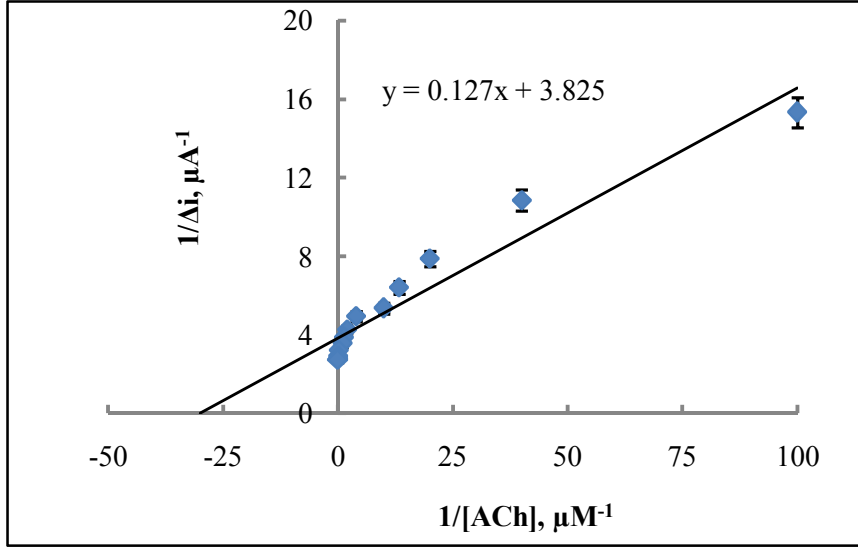


Şekil 4.12. ACh biyosensörü için kalibrasyon grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)

Hazırlanan ACh biyosensörü için alt tayin sınırı $5,0 \times 10^{-9}$ M ve cevap süresi 200 s olarak belirlendi. Alt tayin sınırı literatürdeki ACh biyosensörlerinin alt tayin sınırı değerlerinden daha düşük olduğu görüldü ($2,0 \times 10^{-6}$ M [91] ve $6,0 \times 10^{-7}$ M [10]). Geniş bir çalışma aralığına ve düşük tayin alt sınırına sahip olması sebebiyle, bu çalışmada hazırlanan ACh biyosensörü ile farklı örneklerden ACh tayini yapmak mümkündür. $K_{m(\text{göz})}$ sabitini bulmak amacıyla ACh derişimine karşı akım değışimi verilerinden yararlanıldı ve $1/[\text{ACh}] - 1/\Delta i$



Şekil 4.13. ACh biyosensörü için kalibrasyon grafiği (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)



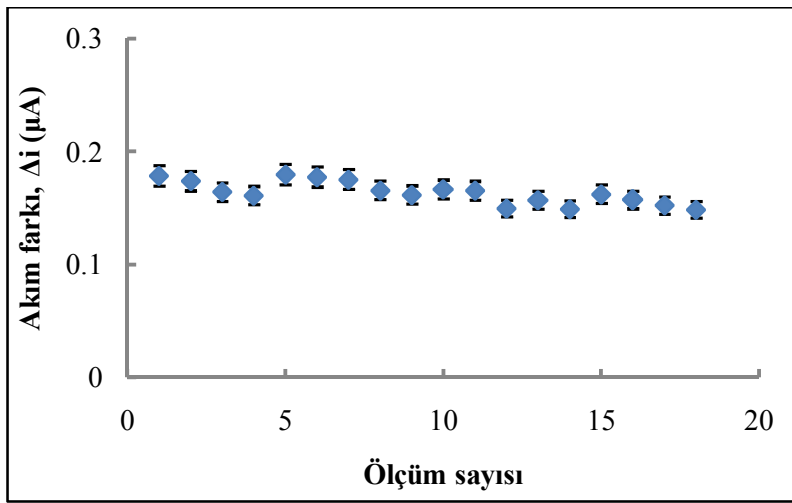
Şekil 4.14. Biyosensörün amperometrik cevabına ACh derişiminin etkisi (Lineweaver-Burk grafiğı, 0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)

grafiğı (Lineweaver-Burke eğrisi, Şekil 4.14) çizildi. $K_{m(göz)}$ ve $I_{max(göz)}$ değerleri sırasıyla 0,0332 μM ve 0,261 μA olarak hesaplandı. Hazırlanan biyosensörün ACh'e ilgisini gösteren $K_{m(göz)}$ değeri literatürde verilen $K_{m(göz)}$ değerlerinden (1,74 mM [97] ve 0,4 mM [91]) daha düşüktür.

Bu çalışmada kullanılan PPy-PVS film, enzimlerin substratlarına ilgisini artırmıştır. Ayrıca geniş bir çalışma aralığı ve düşük tayin alt sınırının gözlenmesinin yine PPy-PVS polimerlerine bağlı olduğu düşünülmektedir. PPy iletken bir polimerdir [126,127], ayrıca kolay polimerize olması, membran oluşum kolaylığı ve yüksek iletkenlik gibi çok iyi özelliklere sahiptir [112]. Bu çalışmada PPy iletken polimeri PVS ile doplanmıştır. Literatürde, iletken polimerlerin *para*-toluen sülfonat, polistiren sülfonat, polivinil sülfonat (PVS) gibi büyük polimerik anyonlar ile birlikte kullanıldığı zaman çevresel kararlılığın, biyo-uyumluluğun ve iletkenliğin iyileştirildiğı belirtilmektedir. Bu tipteki dopantlar indirgenme işlemi boyunca yük nötrallliğini korumaya yardımcı olur [112,128]. Geniş bir çalışma aralığı ve düşük tayin alt sınırının gözlenmesinin nedeni PPy-PVS polimerinin bu eşsiz özelliklerinden olabileceğı düşünülmektedir.

Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin belirlenmesi

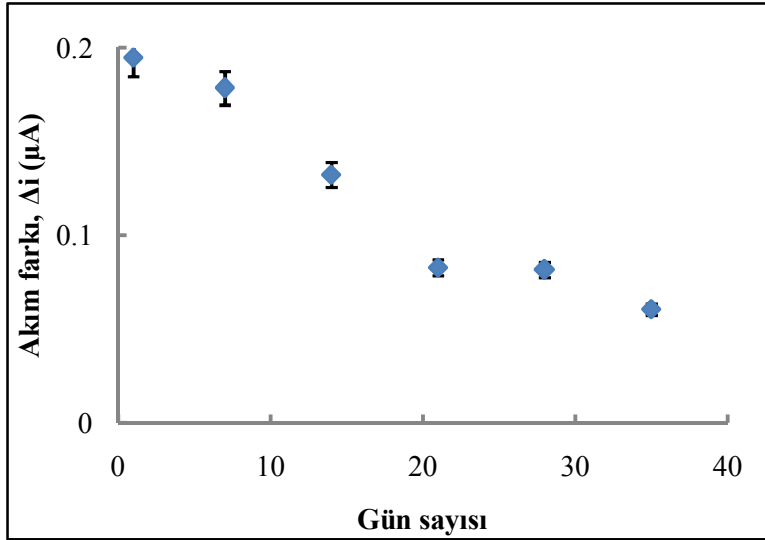
Hazırlanan enzim elektrodun tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla sabit ACh derişiminde ardı ardına yapılan ölçümler sonucu elde edilen akım değışimleri, ölçüm sayısına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.15). Sabit ACh derişiminde ($1,0 \times 10^{-5}$ M) yapılan 18 ölçüm sonucunda elde edilen akım değışimlerinden hesaplanan bağıl standart sapma %4,4 olarak bulundu. 18 ölçüm sonunda biyosensör başlangıç aktivitesinin %16,9'unu kaybettiği gözlemlendi.



Şekil 4.15. Biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)

Biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi

Enzim elektrodun buzdolabında (+4 °C) pH 9,0 glisin tamponu içinde bekletilerek, 35 gün boyunca belirli aralıklarla sabit ACh derişiminde ($1,0 \times 10^{-5}$ M) ölçülen akım değerlerinden raf ömrünün belirlenmesi çalışması yapıldı. Saklama süresine karşı akım değışimi değerleri grafiğe geçirildi (Şekil 4.16). Şekil 4.16 incelendiğinde, ilk 7 gün boyunca herhangi bir değışimin olmadığı, 7-21 günler arasında hızlı bir akım düşüşünün olduğu, 21. günden sonra ise önemli bir değışim olmadığı görülmektedir. Biyosensör 35 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %31'ini koruduğu görüldü.



Şekil 4.16. Biyosensörün raf ömrü (0,1 M pH 9,0 glisin tamponu, 25 °C, 0,3 V)

4.1.8. Biyosensör üzerine girişim yapan türlerin etkisinin incelenmesi

Kan serumunda bulunan ve girişim etkisi olan bazı maddelerin ACh analizi üzerine etkisi incelendi. Bu türler ve derişimleri şöyledir; askorbik asit ($1,0 \times 10^{-4}$ M), ürik asit ($3,0 \times 10^{-4}$ M), etanol (0,0109 M), metanol ($5,0 \times 10^{-5}$ M), parasetamol ($1,0 \times 10^{-4}$ M), sistin ($6,5 \times 10^{-5}$ M), sistein ($1,0 \times 10^{-4}$ M) ve glukoz ($5,0 \times 10^{-3}$ M). ACh derişimi $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak sabit tutuldu. Bu maddelerin 200 kat seyrelme sonucu girişim etkisi incelendi ve herhangi bir girişim etkisine rastlanmadı. Çünkü bütün maddelerden elde edilen akım değerleri çok küçük olduğu için hepsi kalibrasyon grafiğinin dışında kaldı. Girişim etkisi, amperometrik biyosensör çalışmalarının gerçek numune analizleri esnasında karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Bu sebeple bu çalışmanın ilk başlarında girişim etkisi sorununu ortadan kaldırmak için çevrim sayısının seçicilik üzerine etkisi araştırılmış ve en çok girişim etkisi görülen iki tür olan AA ve ÜA'nın değişen çevrim sayısına karşı amperometrik cevabı incelenmiştir. En düşük girişim etkisinin görüldüğü çevrim sayısı belirlenmiştir. Dolayısı ile girişim etkisinin bertaraf edilmesi beklenen bir sonuç olmuştur. Seyrelme etkisinden de yararlanarak girişim etkisi tamamen yok edilmiş oldu. Çünkü seyrelme, girişimin engellenmesi için sıkça kullanılan bir yöntemdir [129,130]. Girişimin yok edilmesi gerçek numune analizlerinin doğruluğu hakkında bir garanti sağlamıştır.

4.1.9. Sentetik kan çözeltisinde ACh tayini

Kan serumunda bulunan ve girişim yapabilecek bazı türlerin Bölüm 4.1.8’de belirtilen miktarlarını içeren sentetik bir kan çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltideki ACh miktarı $5,0 \times 10^{-6}$ M olarak tutuldu. 200 kat seyrelme olacak şekilde sentetik numuneden ilave edilerek amperometrik cevap akımı ölçüldü. Yapılan 3 deneme sonrasında kalibrasyon grafiği kullanılarak ACh derişimi $(4,80 \pm 0,21) \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. ACh’nin fizyolojik derişimi nanomolar seviyelerindedir [131]. Literatürde insan kanındaki ACh tayini çalışmalarında ACh miktarı $(3,23 \pm 0,23) \times 10^{-9}$ M [132], $(8,66 \pm 1,0) \times 10^{-9}$ M [133] olarak bulunmuştur.

4.2. İnhibitör Sentezleri

4.2.1. Erime noktası ve elementel analiz sonuçları

Schiff bazlarının erime noktası ile C, H, N ve S yüzdeleri Bölüm 3.3.3 ve 3.3.4’de anlatıldığı gibi belirlendi ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2 incelendiğinde önerilen yapılar için deneysel ve hesaplanan verilerin uyumlu olduğu görüldü.

Çizelge 4.2. Schiff bazlarının element analiz sonuçları ve fiziksel özellikleri

Bileşik	Kapalı Formül (Mol kütlesi, g/mol)	% Bulunan/(Hesaplanan)				Erime noktası (°C) Renk
		C	H	N	S	
T5F3MetS	$C_{21}H_{19}N_2FO.2H_2O$ (370)	68,15 (68,04)	6,52 (6,21)	7,13 (7,56)	-	215-218 Açık sarı
T5MetS	$C_{21}H_{20}N_2O.2H_2O$ (352)	71,84 (71,59)	6,79 (6,82)	7,63 (7,95)	-	160-162 Açık kahverengi
T3Cl5FS	$C_{20}H_{16}N_2ClFO.2H_2O$ (390,5)	62,09 (61,56)	4,82 (5,12)	6,74 (7,17)	-	201-203 Sarı
T5BrS	$C_{20}H_{17}N_2BrO.H_2O$ (399)	59,75 (60,15)	4,38 (4,76)	6,93 (7,02)	-	209-211 Açık sarı
T5ClS	$C_{20}H_{17}N_2ClO.0,5$ $DMSO.4H_2O$ (447,5)	52,16 (51,74)	5,59 (5,04)	6,62 (7,10)	3,58 (3,57)	225-227 Kahverengi
T5FS	$C_{20}H_{17}N_2FO.1,5H_2O$ (347)	68,55 (69,00)	5,98 (5,76)	8,53 (8,07)	-	219-220 Beyaz
TS	$C_{20}H_{18}N_2O.4H_2O$ (374)	64,17 (64,25)	4,81 (5,25)	4,42 (4,01)	-	165-168 Kahverengi

4.2.2. Isıl analiz

Schiff bazlarının TGA analizleri ile ısı özellikleri incelendi. Termogramlardan elde edilen bozunma sıcaklıkları ($T_{\text{kristal suyu}}$, T_i , T_{max} , T_s) Çizelge 4.3’de verildi. Bozunma sıcaklıkları incelendiğinde (Ek 1), tüm bileşiklerin tek basamakta bozunduğu görüldü.

Çizelge 4.3. Schiff bazlarının ısı analiz sonuçları

Bileşik	Isıl bozunma (°C)			
	T _{kristal suyu}	T _i	T _{max}	T _s
T5F3MetS	70-125	308	325	358
T5MetS	70-113	250	305	318
T3Cl5FS	90-160	275	310	338
T5BrS	85-138	318	345	370
T5ClS	100-258*	305	325	365
T5FS	70-130	313	338	363
TS	108-110	243	273	305

T_i: Başlangıç bozunma sıcaklığı (°C), T_{max}: Maksimum bozunma sıcaklığı, (°C)

T_s: Bozunmanın tamamlandığı sıcaklık, (°C)

* Yapıda hem kristal su hem de DMSO vardır.

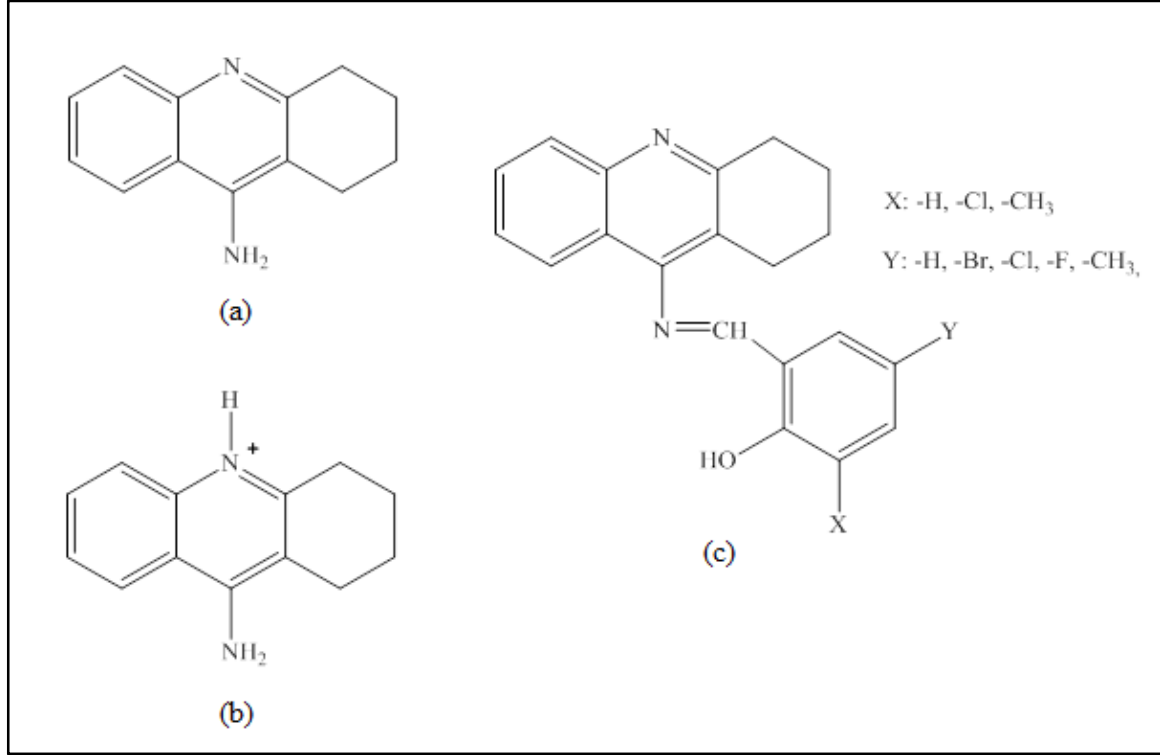
Bileşiklerin yapılarında kristal suyun bulunduğu termogramlardan anlaşılmaktadır. Bileşiklerde 70,0-160,0 °C arasında kristal sudan kaynaklanan bir kütle kaybının olduğu görülmektedir.

4.2.3. FT-IR spektrumları

Schiff bazlarının Bölüm 3.3.6’da anlatıldığı şekilde alınan FT-IR spektrumlarına ait karakteristik pikler Çizelge 4.4’de, spektrumlar ise Ekler bölümünde (Ek 2) verildi.

Sentezlenen tüm Schiff bazlarının yapısında suyun bulunabileceği TGA analizleri sonucunda öngörüldü (Bölüm 4.2.2). 3136-3181 cm⁻¹ arasında gözlenen titreşim piklerinin, -O-H gerilme titreşimlerine, kristal suya ait titreşim frekansına ve akrinin -NH protonuna ait titreşimler olabileceği öngörüldü. (Şekil 4.17). Tüm Schiff bazlarında aromatik -C-H

titreşimleri $2933\text{--}2952\text{ cm}^{-1}$ aralığında; siklo C-H titreşimleri $2858\text{--}2871\text{ cm}^{-1}$ aralığında olabileceği öngörüldü. Schiff bazlarına ait --CH=N gerilme titreşimleri $1653\text{--}1659\text{ cm}^{-1}$ arasında; C-X ($\text{--F/ --Cl/ --Br/ --Me}$) titreşimleri ise sırasıyla $1133, 1179, 1032\text{ cm}^{-1} / 768, 700\text{ cm}^{-1} / 592\text{ cm}^{-1} / 784, 705\text{ cm}^{-1}$ 'de olabileceği gözlemlendi [134].



Şekil 4.17. (a) Takrin (b) Takrinin protonlanmış yapısı [103] (c) Schiff bazı formunda sentezlenen inhibitörlerin yapısı

Çizelge 4.4. Schiff bazlarının belirgin IR frekansları (cm^{-1}) ve elektronik spektrum verileri (nm)

İnhibitör	ν_{NH_2}	$\nu_{\text{CH=N}}$	$\nu_{(\text{O-H/H}_2\text{O/ar-N-H+})}$	$\nu_{\text{C-H}}$ (aromatik) $\nu_{\text{C-H}}$ (siklo)	$\nu_{\text{C-X}}$
Takrin	3333 3175	-	-	2933 2871	-
T5FS	-	1659	3156	2945 2881	1133
T5BrS	-	1653	3174	2945 2874	592
T3Cl5FS	-	1657	3149	2945 2861	700 1179
T5MetS	-	1653	3149	2945 2858	784
T5F3MetS	-	1654	3181	2952 2865	1032 705
TS	-	1657	3172	2934 2865	-
T5ClS	-	1630	3131	2943 2870	768

(X: -F, -Cl, -Br, -CH₃)

4-floro-2-metil-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5F3MetS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1653 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin

katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2865 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2952 cm^{-1} ye kayması aldehit katılıminin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılıminin meydana geldiğinin bir delili, 3181 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 1032 cm^{-1} 'de C-F ve 705 cm^{-1} 'de C-CH₃'den dolayı yeni titreşim frekansları ortaya çıktığı öngörüldü.

2-kloro-4-floro-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T3Cl5FS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1657 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2861 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2945 cm^{-1} ye kayması aldehit katılıminin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılıminin meydana geldiğinin bir delili, 3149 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 1179 cm^{-1} 'de C-F ve 700 cm^{-1} 'de C-Cl'den dolayı yeni titreşim frekansları ortaya çıktığı öngörüldü.

4-metil-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5MetS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1653 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2858 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2945 cm^{-1} ye kayması aldehit katılıminin bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılıminin meydana geldiğinin bir delili, 3149 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 784 cm^{-1} 'de C-CH₃'den dolayı yeni titreşim bir frekansı ortaya çıktığı öngörüldü.

4-bromo-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5BrS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1653 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2874 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2945 cm^{-1} 'ye kayması aldehit katılımının bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılımının meydana geldiğinin bir delili, 3174 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 592 cm^{-1} 'de C-Br'den dolayı yeni titreşim bir frekansı ortaya çıktığı öngörüldü.

4-kloro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5ClS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1630 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2870 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2943 cm^{-1} 'ye kayması aldehit katılımının bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılımının meydana geldiğinin bir delili, 3131 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 768 cm^{-1} 'de C-Cl'dan dolayı yeni titreşim bir frekansı ortaya çıktığı öngörüldü.

4-floro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5FS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1659 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2881 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2945 cm^{-1} 'ye kayması aldehit katılımının bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılımının meydana geldiğinin bir delili, 3156 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H^+ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan

$\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü. Ayrıca 1133 cm^{-1} 'de C-F'dan dolayı yeni titreşim bir frekansı ortaya çıktığı öngörüldü.

2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [TS]

Amin titreşim frekanslarına ait olan 3333 cm^{-1} ve 3175 cm^{-1} titreşim frekanslarının gözlenmemesi, ancak 1657 cm^{-1} 'de yeni titreşim frekansının ortaya çıkması, aldehit-amin katılma ve ayrılma tepkimesinin meydana geldiğini düşündürdü. Siklo halkaya ait olan $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2865 cm^{-1} ve aromatik $\nu(\text{C-H})$ titreşim frekansının 2934 cm^{-1} 'ye kayması aldehit katılımının bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Ayrıca aldehit katılımının meydana geldiğinin bir delili, 3172 cm^{-1} 'de yeni bir titreşim frekansının gözlenmesidir. Bu frekansın $\nu(\text{O-H})$, ar-N-H⁺ veya yapıdaki kristal sudan kaynaklanan $\nu(\text{H}_2\text{O})$ titreşim frekansına ait olabileceği düşünüldü.

4.2.4. ¹H-NMR spektrumları

Schiff bazlarının Bölüm 3.3.7'de anlatıldığı şekilde alınan ¹H-NMR spektrumlarına ait karakteristik pikler Çizelge 4.5'de, spektrumlar ise Ekler bölümünde (Ek 3) verilmiştir.

4-floro-2-metil-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5F3MetS]

8,5 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının (-CH=N) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki (-CH)_a ve (-CH)_c protonları 2,5-3,0 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,8-2,1 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu piklerin yine takrinin (-CH)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,8-7,9 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin (-CH)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,5-7,7 ppm aralığında 2 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin (-CH)_{arom} protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 13,6 ppm'de tek protona karşılık gelen pikin -OH'a ait olabileceği öngörülmüştür. 1,8-2,1'de gözlenen çoklu piklerin aldehitteki -CH₃ grubuna ait 3 protona karşılık gelebileceği düşünülmüştür.

2-kloro-4-floro-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T3Cl5FS]

8,5 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının (-CH=N) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki (-CH)_a ve (-CH)_c protonları 2,4-3,1 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,7-1,9 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu piklerin yine takrinin (-CH)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,7-8,4 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin (-CH)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,1-7,5 ppm aralığında 2 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin (-CH)_{arom} protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 10,2 ppm'de tek protona karşılık gelen ikili pikin -OH'a ait olabileceği öngörülmüştür.

4-metil-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5MetS]

8,5 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının (-CH=N) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki (-CH)_a ve (-CH)_c protonları 3,0-3,5 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,7-1,9 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu piklerin yine takrinin (-CH)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,8-7,9 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin (-CH)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,5-7,6 ppm aralığında 3 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin (-CH)_{arom} protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 13,6 ppm'de tek protona karşılık gelen pikin -OH'a ait olabileceği öngörülmüştür. 2,4-

2,7'de gözlenen çoklu piklerin aldehitteki $-CH_3$ grubuna ait 3 protona karşılık gelebileceği düşünülmüştür.

4-bromo-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5BrS]

8,55 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının ($-CH=N$) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki ($-CH$)_a ve ($-CH$)_c protonları 2,5-3,0 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,7-2,0 ppm aralığında ise 4 protona karşılık tekli pikin yine takrinin ($-CH$)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,8-8,0 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin ($-CH$)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,5-7,6 ppm aralığında 3 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin ($-CH$)_{arom} protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 14,0 ppm'de tek protona karşılık gelen pikin $-OH$ 'a ait olabileceği öngörülmüştür.

4-kloro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5ClS]

8,6 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının ($-CH=N$) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki ($-CH$)_a ve ($-CH$)_c protonları 3,2-3,8 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,8-2,3 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu pikin yine takrinin ($-CH$)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,6-8,8 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin ($-CH$)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,0-7,5 ppm aralığında 3 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin ($-CH$)_{arom} protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 10,2 ppm'de tek protona karşılık gelen pikin $-OH$ 'a ait olabileceği öngörülmüştür.

4-floro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5FS]

8,5 ppm'de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının ($-CH=N$) meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki ($-CH$)_a ve ($-CH$)_c protonları 2,5-3,0 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,8-2,0 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu pikin yine takrinin ($-CH$)_b protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,8-8,0 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin ($-CH$)_{arom} protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,5-7,6 ppm aralığında 3 protona

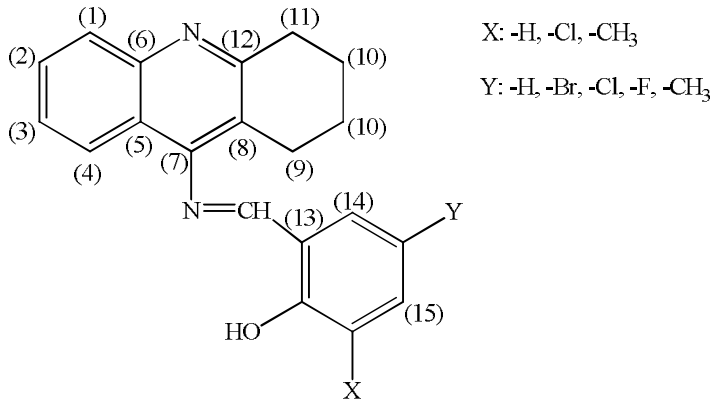
karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin $(-\text{CH})_{\text{arom}}$ protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 13,9 ppm’de tek protona karşılık gelen pikin $-\text{OH}$ ’a ait olabileceği öngörülmüştür.

2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [TS]

8,15 ppm’de tek protona karşılık olan ikili pikin ortaya çıkması Schiff bazının $(-\text{CH}=\text{N})$ meydana geldiğinin bir delili olarak bakılabilir. Takrinin siklo halkasındaki $(-\text{CH})_{\text{a}}$ ve $(-\text{CH})_{\text{c}}$ protonları 2,5-2,9 ppm aralığında 4 protona karşılık, çoklu pik olarak gözlenmiştir. 1,7-1,9 ppm aralığında ise 4 protona karşılık çoklu pikin yine takrinin $(-\text{CH})_{\text{b}}$ protonları olabileceği ön görülmüştür. 7,4-7,7 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin takrinin $(-\text{CH})_{\text{arom}}$ protonları olabileceği ön görülmüştür. 6,8-7,3 ppm aralığında 4 protona karşılık gelen çoklu piklerin aldehitin $(-\text{CH})_{\text{arom}}$ protonları olarak öngörülmüştür. Ayrıca 10,3 ppm’de tek protona karşılık gelen pikin $-\text{OH}$ ’a ait olabileceği öngörülmüştür.

4.2.5. ^{13}C -NMR spektrumları

Schiff bazlarının Bölüm 3.3.8’de anlatıldığı şekilde alınan ^{13}C -NMR spektrumlarına ait karakteristik pikler Çizelge 4.6’da, spektrumlar ise Ekler bölümünde (Ek 4) verilmiştir.

Çizelge 4.6. Schiff bazlarının ^{13}C -NMR spektrumları

Bileşik (Sembol)	C ₁₋₅	C ₆₋₉	C ₁₀ C ₁₀ ^a	C ₁₁	C ₁₂₋₁₅	-N=CH C _{-OH}	-C-X -CH ₃	-C-Y -CH ₃
T5FS	39,15- 40,55	23,03- 109,51	20,96 21,50	28,19	115,20- 133,28	155,81 151,79	119,45 -	137,49 -
T5BrS	39,14- 40,54	23,04- 115,19	20,96 21,51	28,19	123,91- 137,55	155,71 151,75	119,46 -	109,43 -
T3Cl5FS	39,15- 40,55	23,13- 120,30	21,17 21,64	28,74	109,52- 132,85	155,16 152,37	125,61 -	138,36 -
T5MetS	39,43- 40,54	28,19- 133,30	21,50 23,02	39,15	115,20- 137,49	155,82 151,80	119,46 -	109,52 20,96
T5F3MetS	39,44- 40,55	28,41- 109,51	21,55 23,07	39,16	115,29 133,12	155,56 152,02	119,79 21,04	137,83 -
TS	39,15- 40,54	24,05- 109,34	22,91 22,97	33,61	117,37- 149,01	162,54 157,39	128,63 -	129,24 -
T5ClS	31,59- 40,81	23,12- 110,56	19,19 22,11	23,99	112,08- 133,41	155,58 135,57	119,6 -	123,45 -

4-floro-2-metil-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5F3MetS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,44-40,55 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 28,41-109,51 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 21,55-133,12 ppm aralığında beklenen değerlerde gözlemlendiği öngörüldü. 155,56 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon

atomuna ait olabileceği öngörüldü. 152,02 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağlı olan -OH grubunun bağlı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 137,83 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -F atomunun bağlı olduğu karbon atomuna ait ve 21,04 ppm'deki pikin X grubu olarak ifade edilen -CH₃ grubundaki karbon atomuna ait olabileceği düşünüldü.

2-kloro-4-floro-6-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T3Cl5FS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,15-40,55 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 23,31-120,30 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 21,17-132,85 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 155,16 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 152,37 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağlı olan -OH grubunun bağlı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 138,36 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -F atomunun bağlı olduğu karbon atomuna ait ve 125,66 ppm'deki pikin X grubu olarak ifade edilen -Cl grubunun bağlı olduğu karbon atomuna ait olabileceği düşünüldü.

4-metil-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5MetS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,43-40,54 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 28,19-133,30 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 21,50-137,49 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 155,82 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 151,80 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağlı olan -OH grubunun bağlı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 20,96 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -CH₃ grubundaki karbon atomuna ait olabileceği düşünüldü.

4-bromo-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5BrS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,14-40,54 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 23,04-115,19 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 20,96-137,55 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 155,71 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 151,75 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağlı

olan -OH grubunun bağılı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 109,43 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -Br atomunun bağılı olduğu karbon atomuna ait ait olabileceği düşünöldü.

4-kloro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5CIS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 31,59-40,81 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 23,12-110,56 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 19,19-133,41 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 155,58 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 135,57 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağılı olan -OH grubunun bağılı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 123,45 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -Cl atomunun bağılı olduğu karbon atomuna ait ait olabileceği düşünöldü.

4-floro-2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [T5FS]

C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,15-40,55 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 23,03-109,51 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 20,96-133,28 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 155,81 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 151,79 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağılı olan -OH grubunun bağılı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü. 137,49 ppm'deki pikin Y grubu olarak ifade edilen -F atomunun bağılı olduğu karbon atomuna ait ait olabileceği düşünöldü.

2-(((1,2,3,4-tetrahidroakridin-9-il)imino)metil)fenol [TS]

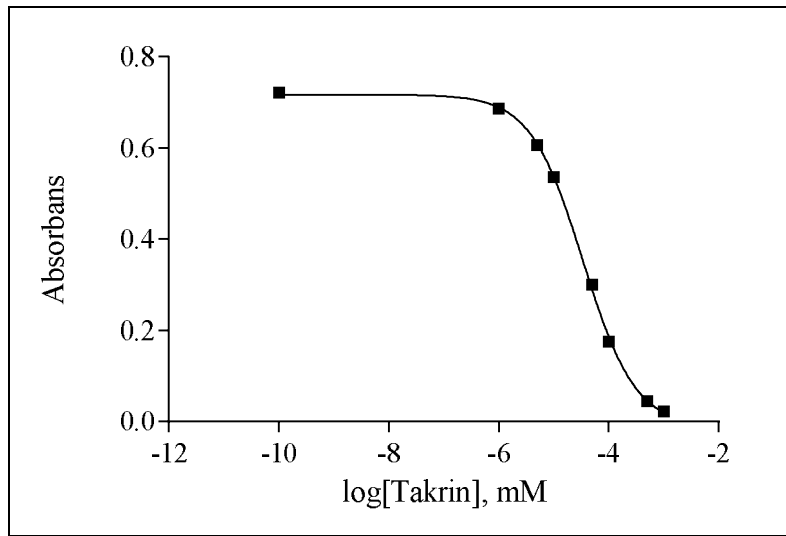
C₁₋₅ karbonlarına ait pikler 39,15-40,55 ppm aralığında, C₆₋₉ karbonlarına ait pikler 24,05-109,34 ppm aralığında, C₁₀₋₁₅ karbonlarına ait pikler 22,91-149,01 ppm aralığında beklenen değerlerde gözleendiği öngörüldü. 162,54 ppm'deki pikin -CH=N- grubundaki karbon atomuna ait olabileceği öngörüldü. 157,39 ppm'de gözlenen pikin, aromatik halkaya bağılı olan -OH grubunun bağılı olduğu karbon atomunun piki olarak öngörüldü.

4.3. İnhibitörlerin AChE Aktivitesinin Araştırılması

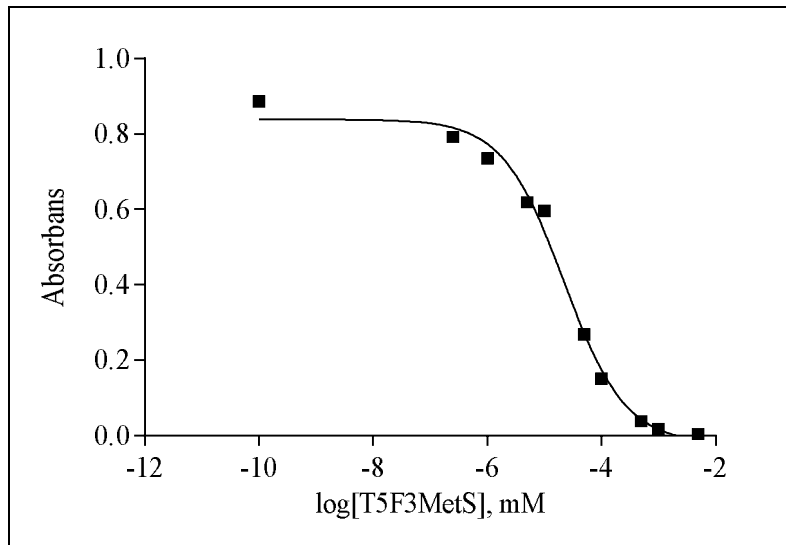
4.3.1. Spektrofotometrik olarak AChE aktivitesinin araştırılması

IC₅₀ Hesaplamaları

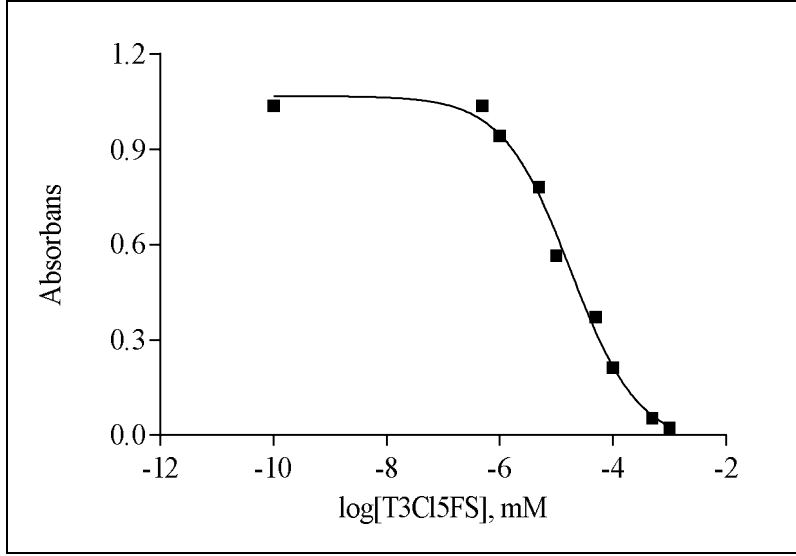
Sentezi yapılan inhibitörlerin IC₅₀ değerleri log[inhibitör]-absorbans grafikleri çizilerek incelendi (Şekil 4.18-4.25). Sonuçlar Çizelge 4.7’de verildi.



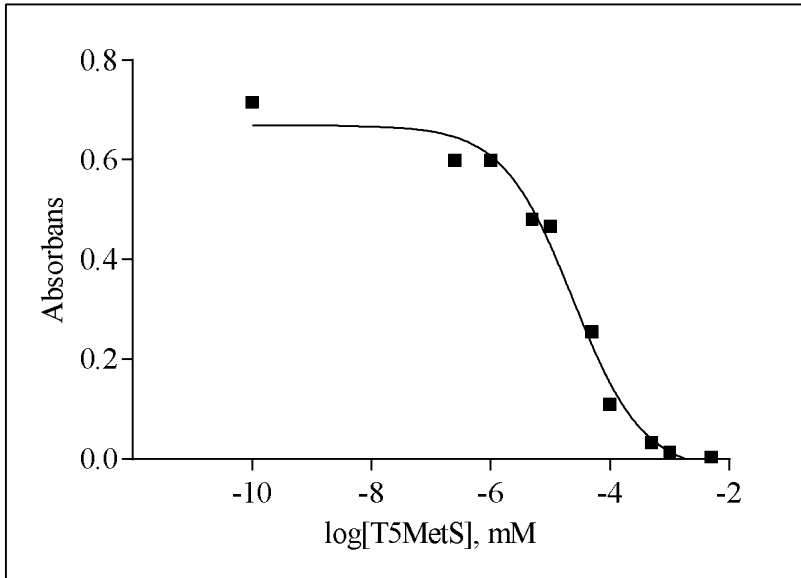
Şekil 4.18. Takrinin IC₅₀ grafiği



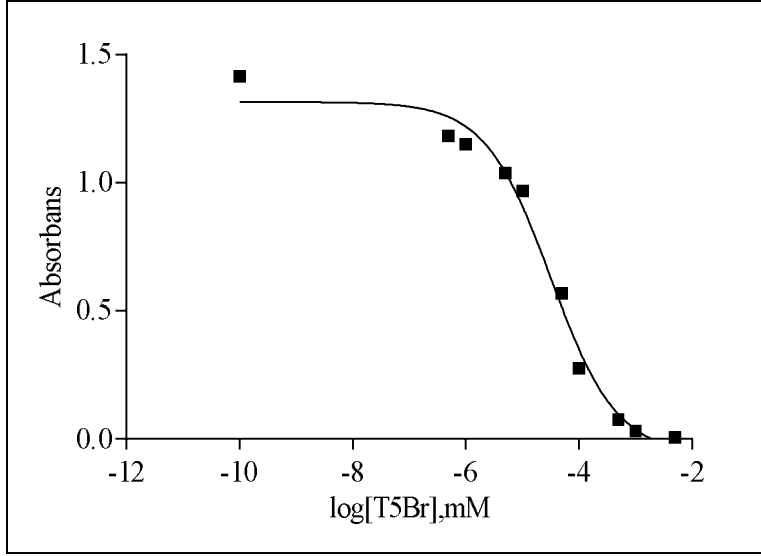
Şekil 4.19. T5F3MetS inhibitörünün IC₅₀ grafiği



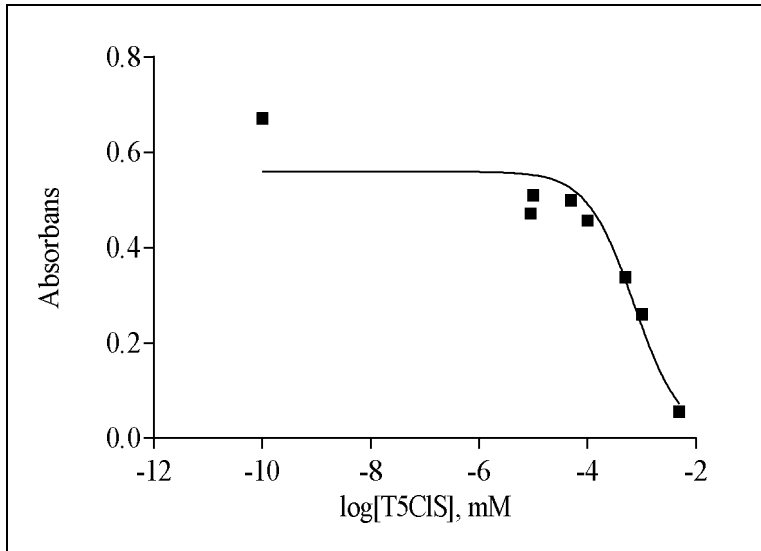
Şekil 4.20. T3Cl5FS inhibitörünün IC_{50} grafiği



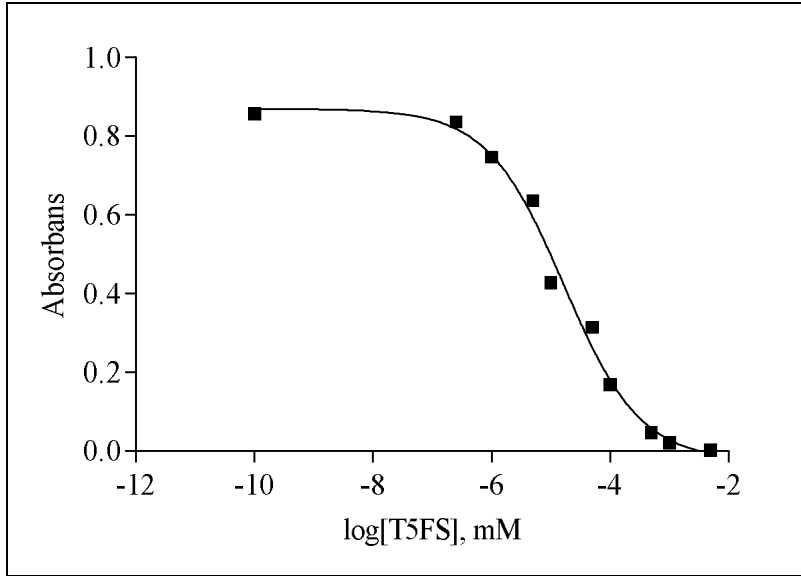
Şekil 4.21. T5MetS inhibitörünün IC_{50} grafiği



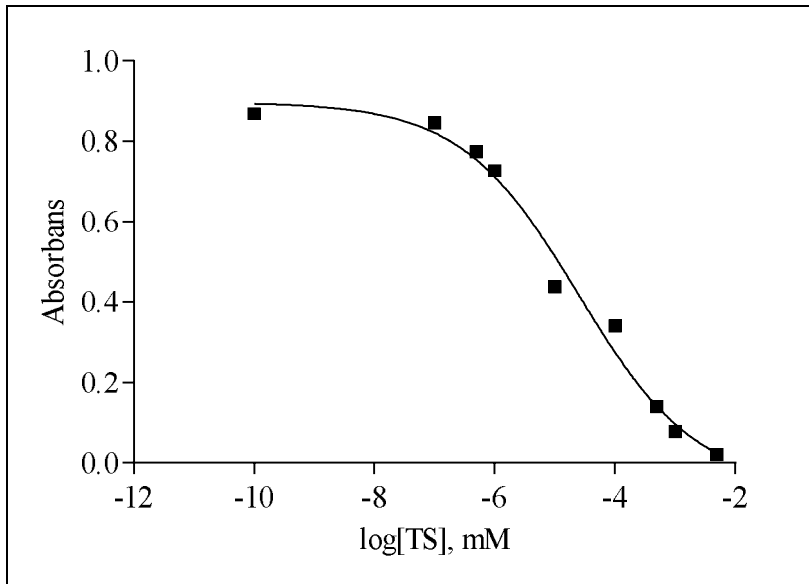
Şekil 4.22. T5BrS inhibitörünün IC_{50} grafiği



Şekil 4.23. T5ClS inhibitörünün IC_{50} grafiği



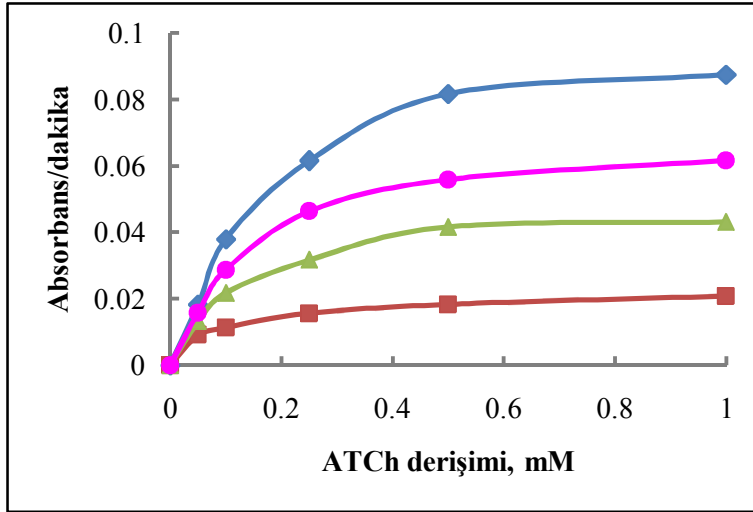
Şekil 4.24. T5FS inhibitörünün IC_{50} grafiği



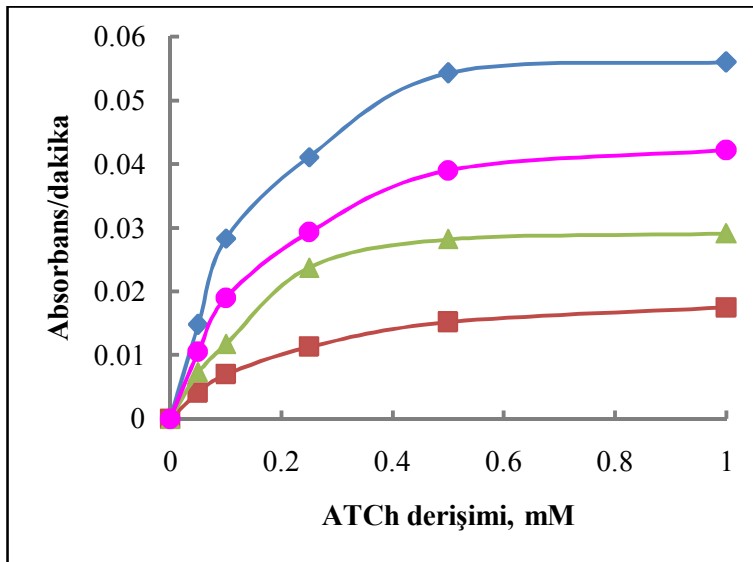
Şekil 4.25. TS inhibitörünün IC_{50} grafiği

K_m , V_{max} ve K_i Hesaplamaları

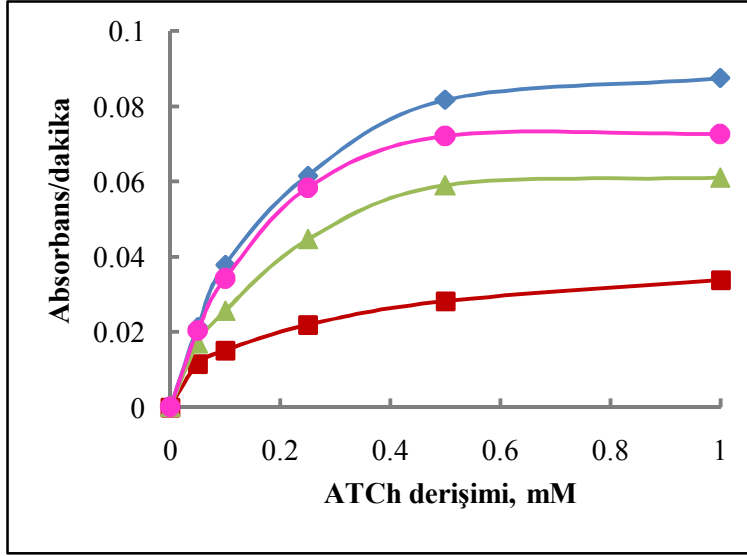
Inhibitörlerin inhibisyon türleri, K_i , K_m ve V_{max} sabitleri Michealis-Menten (Şekil 4.26-4.32) ve Lineweaver-Burke (Şekil 4.33-4.39) grafikleri çizilerek incelendi. Grafikler çizilirken $1,0 \times 10^{-8}$ M, $5,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M olmak üzere üç farklı inhibitör derişimi kullanıldı. Hesaplanan parametreler tablo halinde değerlendirildi (Çizelge 4.7).



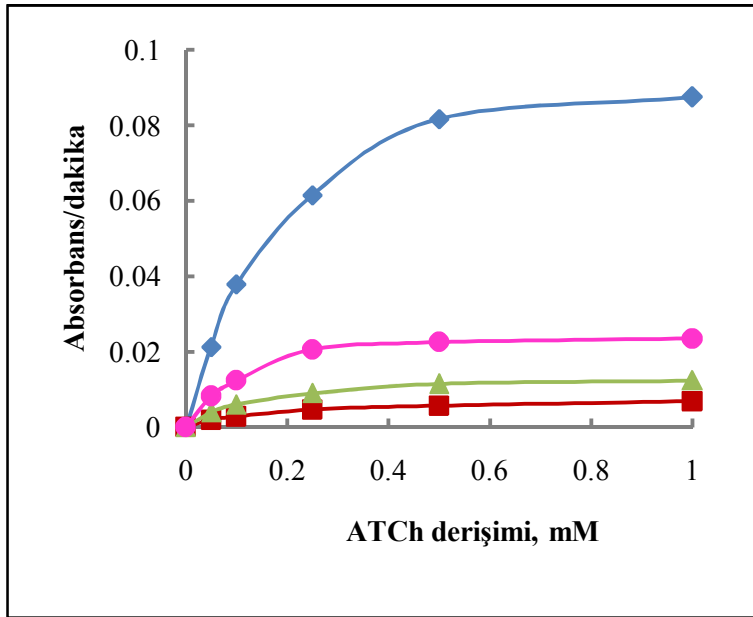
Şekil 4.26. TS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [TS]=1,0x10⁻⁸ M ▲ [TS]= 5,0x10⁻⁸ M, ■ [TS]= 1,0x10⁻⁷ M)



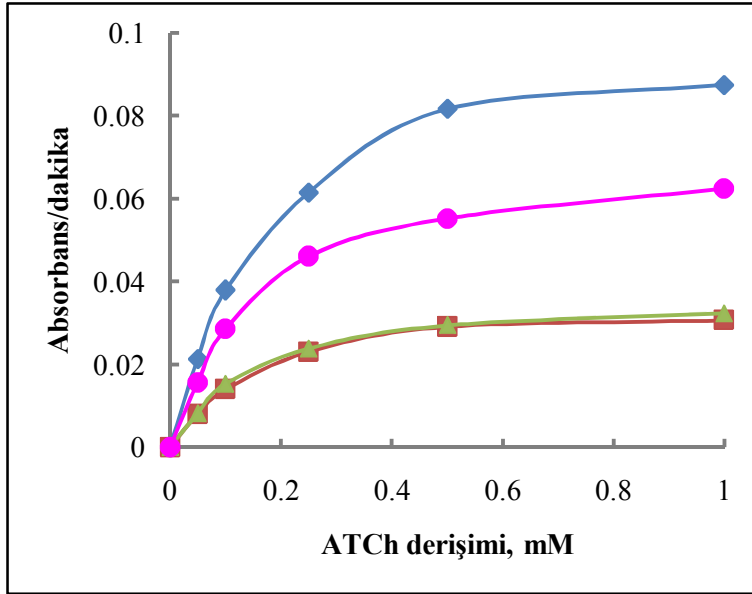
Şekil 4.27. T5FS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5FS]=1,0x10⁻⁸ M, ▲ [T5FS]= 5,0x10⁻⁸ M, ■ [T5FS]= 1,0x10⁻⁷ M)



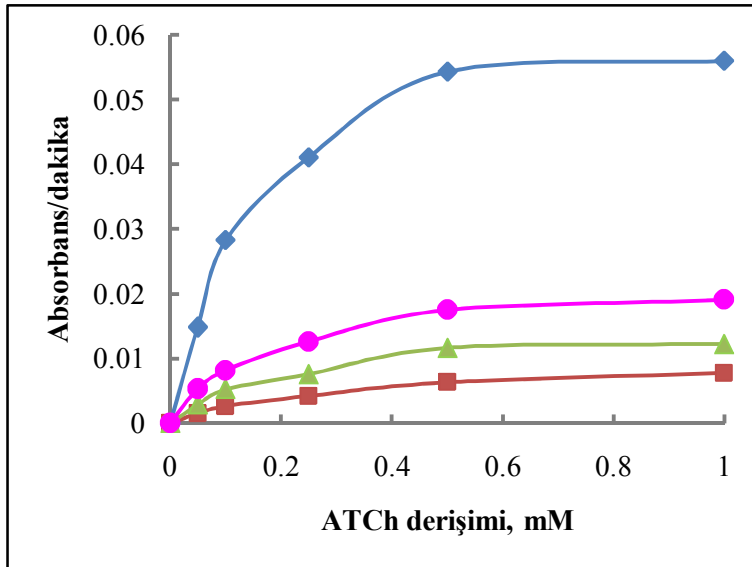
Şekil 4.28. T5BrS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiğı (◆ İnhibitörsüz, ● [T5BrS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5BrS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5BrS]= 1×10^{-7} M)



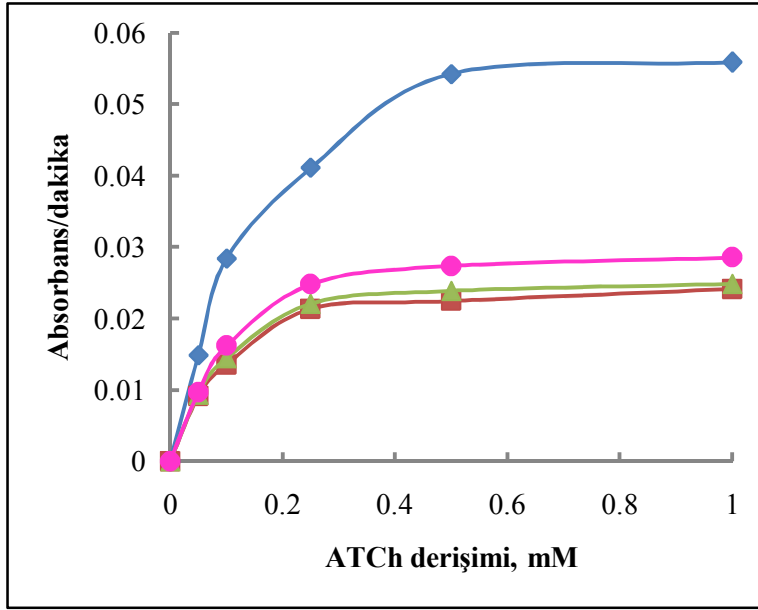
Şekil 4.29. T5MetS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiğı (◆ İnhibitörsüz, ● [T5MetS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5MetS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5MetS]= 1×10^{-7} M)



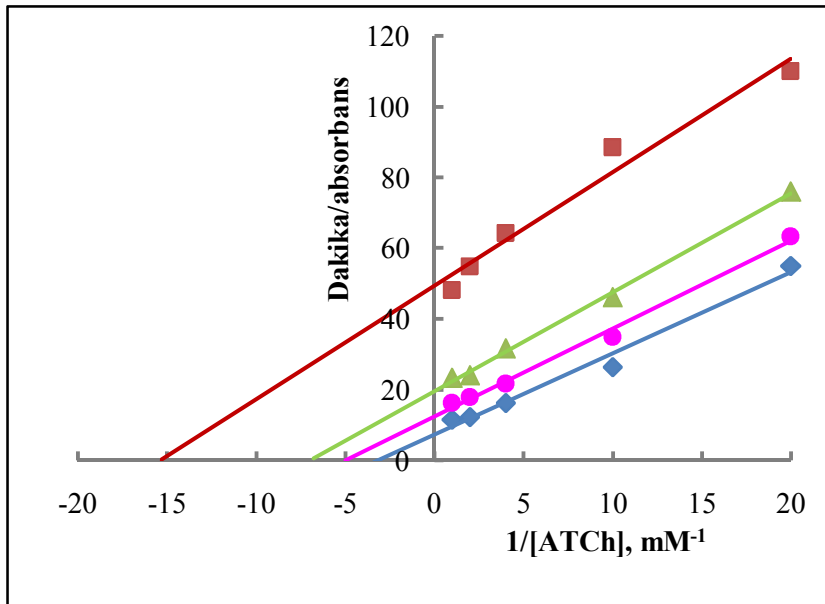
Şekil 4.30. T3Cl5FS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiğı (◆ İnhibitorsüz, ● [T3Cl5FS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T3Cl5FS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T3Cl5FS]= 1x10⁻⁷ M)



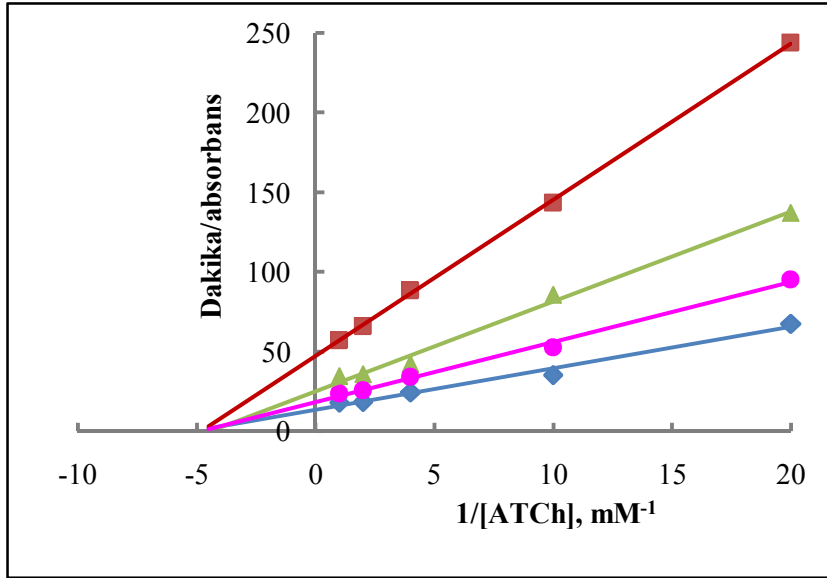
Şekil 4.31. T5F3MetS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiğı (◆ İnhibitorsüz, ● [T5F3MetS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T5F3MetS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T5F3MetS]= 1x10⁻⁷ M)



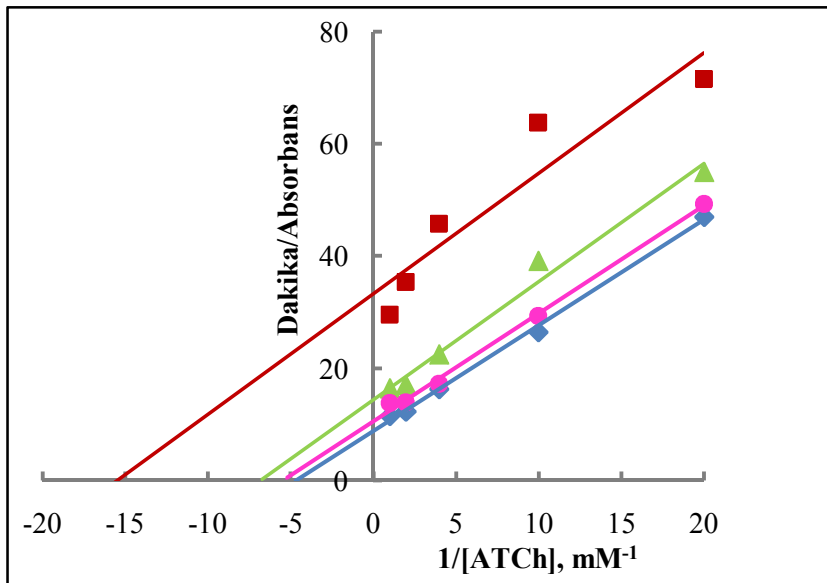
Şekil 4.32. T5CIS inhibitörüne ait Michealis-Menten grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5CI]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5CI]= 5×10^{-8} M, ■ [T5CI]= 1×10^{-7} M)



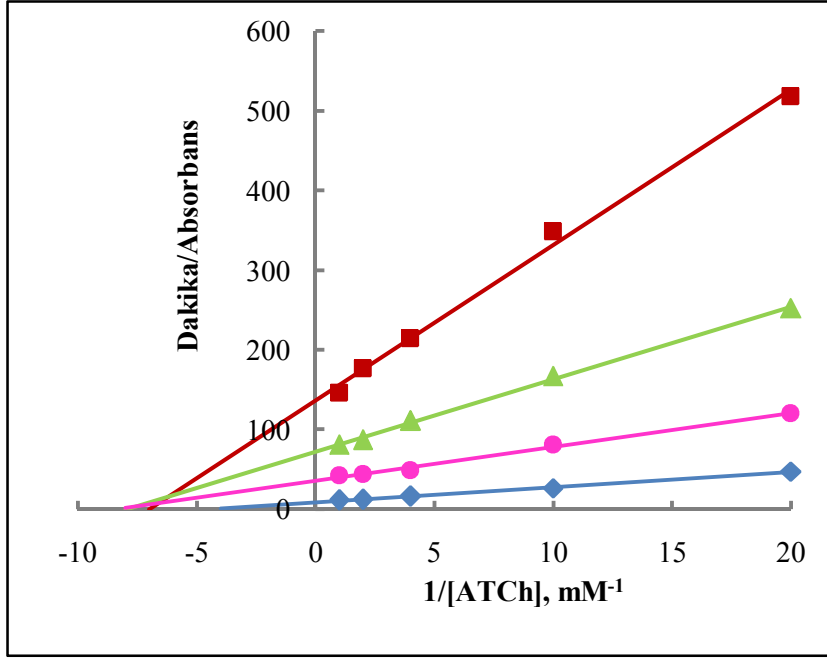
Şekil 4.33. TS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [TS]= 1×10^{-8} M, ▲ [TS]= 5×10^{-8} M, ■ [TS]= 1×10^{-7} M)



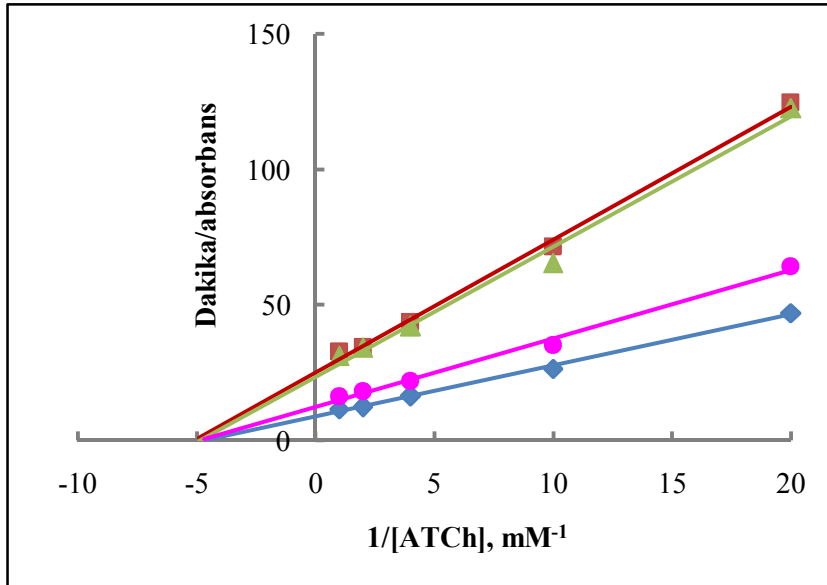
Şekil 4.34. T5FS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5FS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T5FS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T5FS]= 1x10⁻⁷ M)



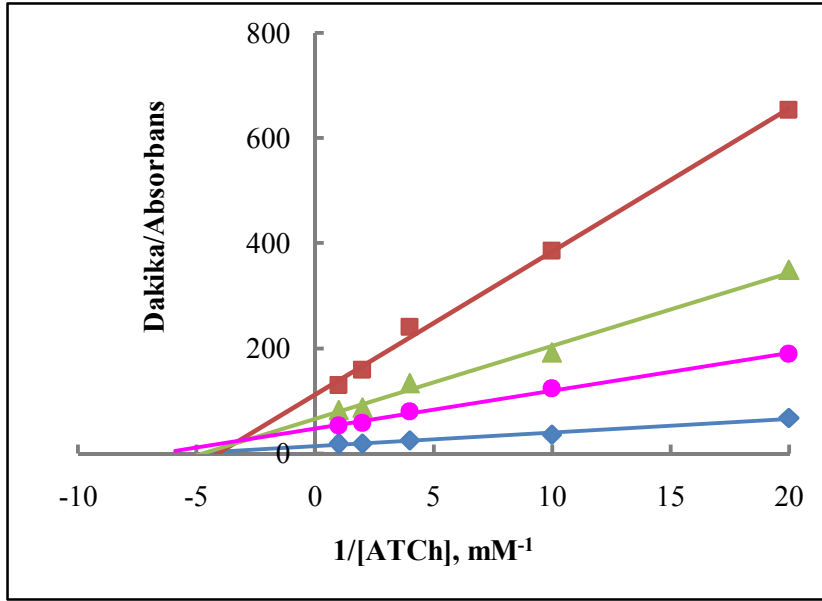
Şekil 4.35. T5BrS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (◆ İnhibitörsüz, ● [T5BrS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T5BrS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T5BrS]= 1x10⁻⁷ M)



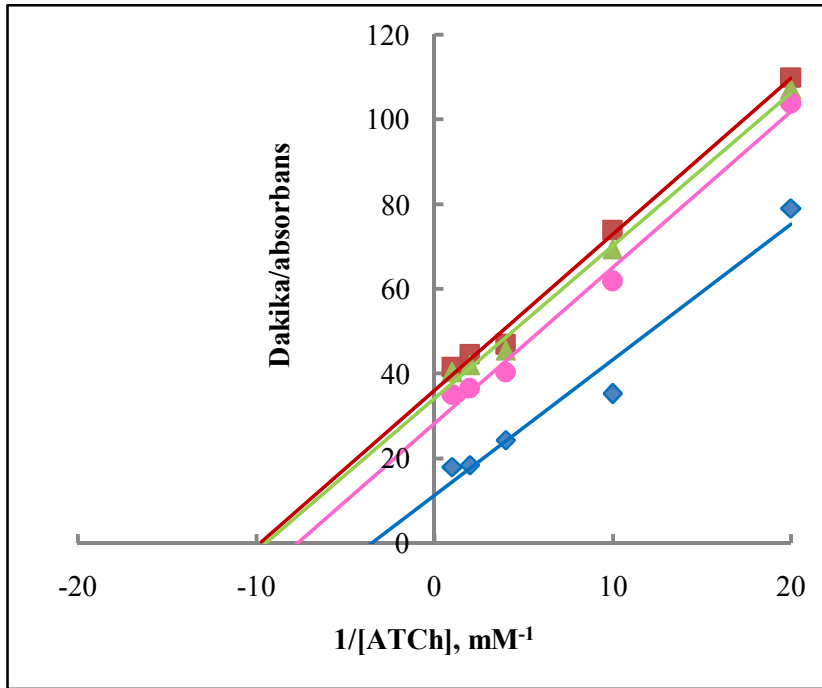
Şekil 4.36. T5MetS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (♦ İnhibitörsüz, ● [T5MetS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T5MetS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T5MetS]= 1x10⁻⁷ M)



Şekil 4.37. T3Cl5FS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (♦ İnhibitörsüz, ● [T3Cl5FS]= 1x10⁻⁸ M, ▲ [T3Cl5FS]= 5x10⁻⁸ M, ■ [T3Cl5FS]= 1x10⁻⁷ M)



Şekil 4.38. T5F3MetS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (♦ İnhibitörsüz, ● [T5F3MetS]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5F3MetS]= 5×10^{-8} M, ■ [T5F3MetS]= 1×10^{-7} M)



Şekil 4.39. T5ClS inhibitörüne ait Lineweaver-Burk grafiği (♦ İnhibitörsüz, ● [T5Cl]= 1×10^{-8} M, ▲ [T5Cl]= 5×10^{-8} M, ■ [T5Cl]= 1×10^{-7} M)

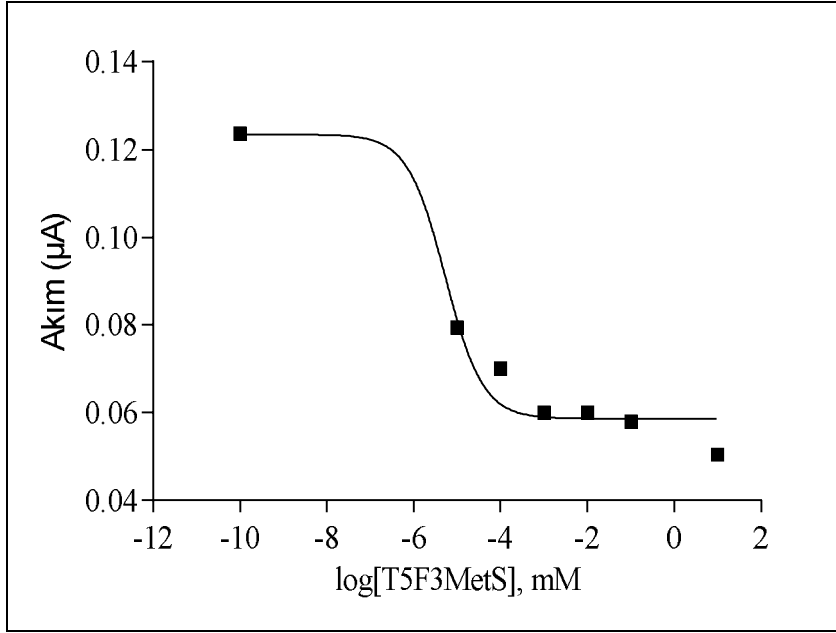
Çizelge 4.7. İnhibitörlerin spektrofotometrik AChE inhibisyon çalışmaları sonuçları

İnhibitör	IC ₅₀ (nM)	K _i (mM)	K _m (mM)	V _{max} (mM/dak)	İnhibisyon türü
T5F3MetS	22,1±1,11	2,14±0,89	0,145±0,023	0,066±0,003	Tersinir karışık (mix)
T5MetS	23,9±1,10	3,77±1,28	0,179±0,015	0,106±0,003	Tersinir karışık (mix)
TS	25,0±1,32	10,2±0,79	0,218±0,020	0,110±0,004	Tersinir yarı yarışmalı (uncompetitive)
T3Cl5FS	27,5±1,10	13,6±2,18	0,170±0,035	0,103±0,007	Tersinir yarışmasız (noncompetitive)
T5FS	30,5±1,09	17,3±1,34	0,202±0,022	0,111±0,005	Tersinir yarışmasız (noncompetitive)
T5BrS	32,1±1,11	21,9±2,38	0,159±0,015	0,066±0,002	Tersinir yarı yarışmalı (uncompetitive)
T5ClS	730±1,52	14,86±4,7	0,157±0,057	0,059±0,008	Tersinir yarı yarışmalı (uncompetitive)

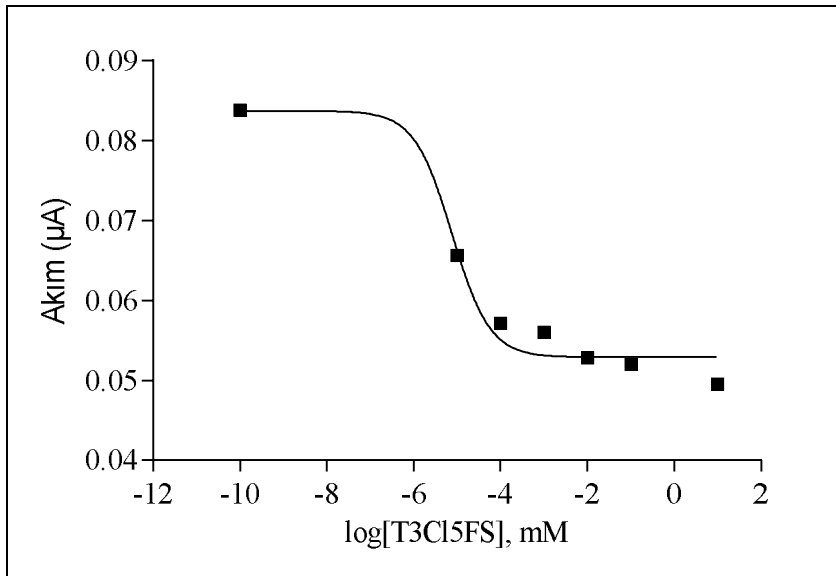
Sentezlenen inhibitörlerin AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi spektrofotometrik Ellman yöntemi ile araştırıldı. Öncelikle tüm inhibitörlerin suda çözünebilen tersinir AChE inhibitör özelliği taşıdığı görüldü. İnhibitörlerin IC₅₀ değerleri; T5F3MetS<T5MetS<TS<T3Cl5FS<T5F<T5Br<T5ClS olarak bulundu. T5ClS dışında sentezlenen tüm inhibitörlerin takrinden daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu görüldü. Bu durum takrinden daha etkili inhibitörler sentezlendiğinin bir göstergesi oldu. T5F3MetS ve T5MetS'nin tersinir karışık (mix); T3Cl5FS ve T5FS'nin tersinir yarışmasız (noncompetitive); TS, T5BrS ve T5ClS'nin tersinir yarı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon türüne sahip oldukları belirlendi. İnhibitörlerin K_i değerleri T5F3MetS<T5MetS<TS<T3Cl5FS<T5F<T5Br<T5ClS'dir. İnhibitörlerin IC₅₀ değerleri K_i değerleri ile paraleldir, aynı eğilime sahiptir (T5ClS dışında). En iyi inhibisyon özelliği gösteren T5F3MetS'in K_i değeri en düşüktür.

4.3.2. Elektrokimyasal olarak AChE aktivitesinin araştırılması

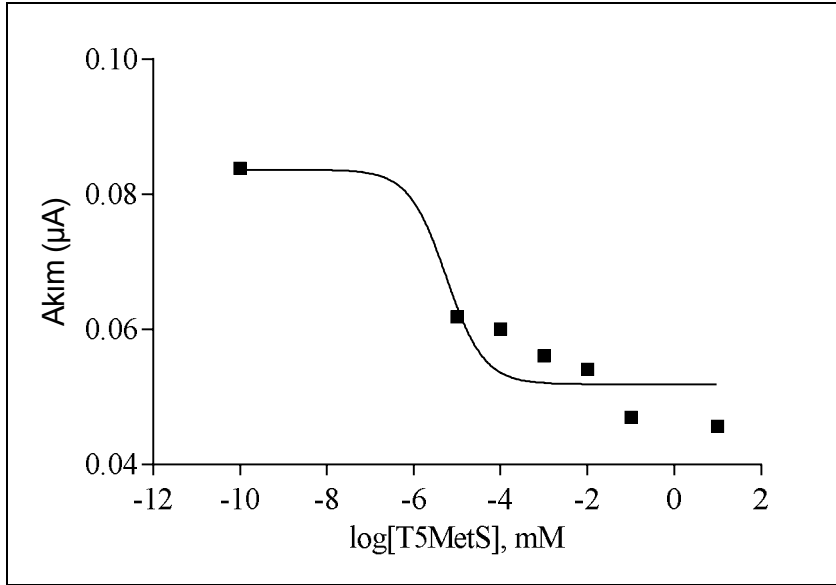
İnhibitörlerin ACh biyosensörü ile IC_{50} değerleri $\log[\text{inhibitör}]$ -akım grafikleri çizilerek incelendi (Şekil 4.40-4.46). Sonuçlar Çizelge 4.8’de verildi.



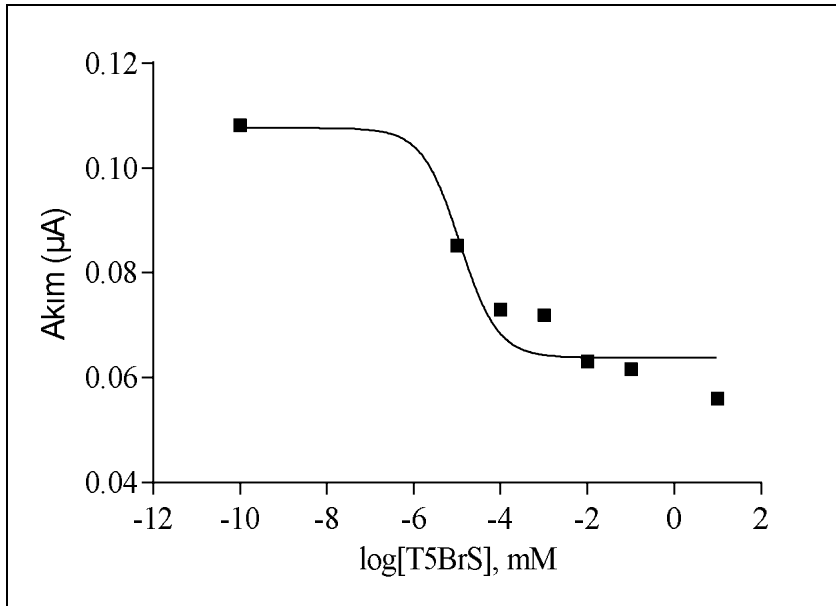
Şekil 4.40. T5F3MetS inhibitörünün IC_{50} grafiği



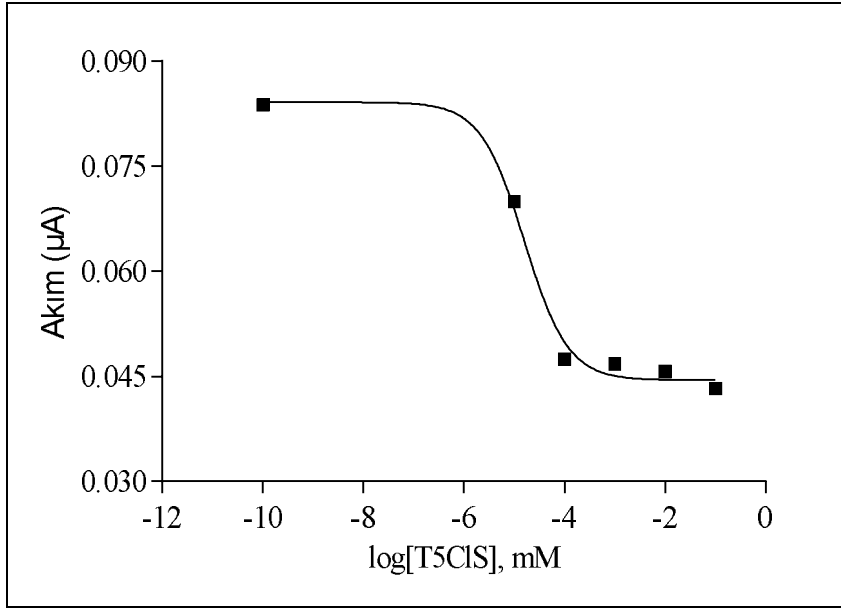
Şekil 4.41. T3Cl5S inhibitörünün IC_{50} grafiği



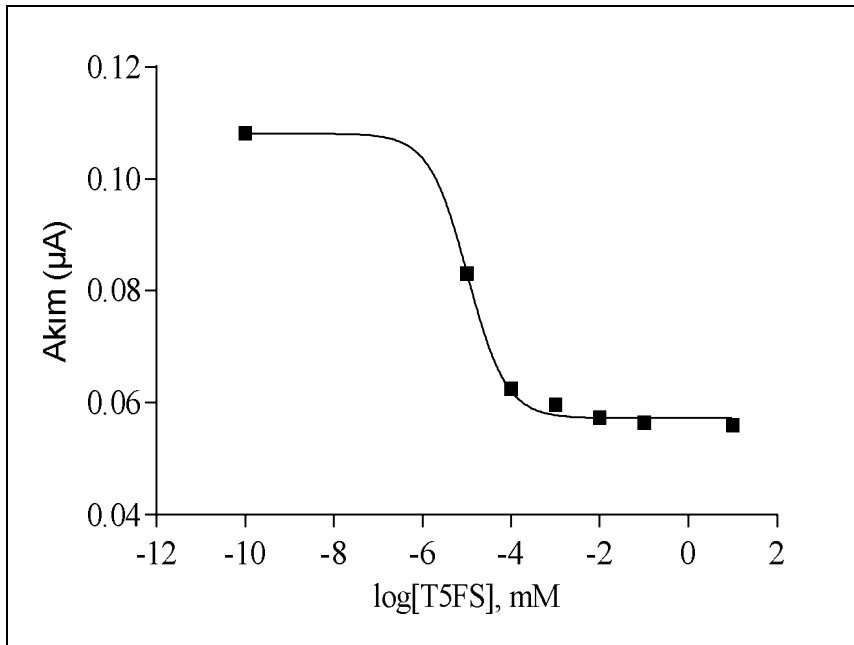
Şekil 4.42. T5MetS inhibitörünün IC_{50} grafiği



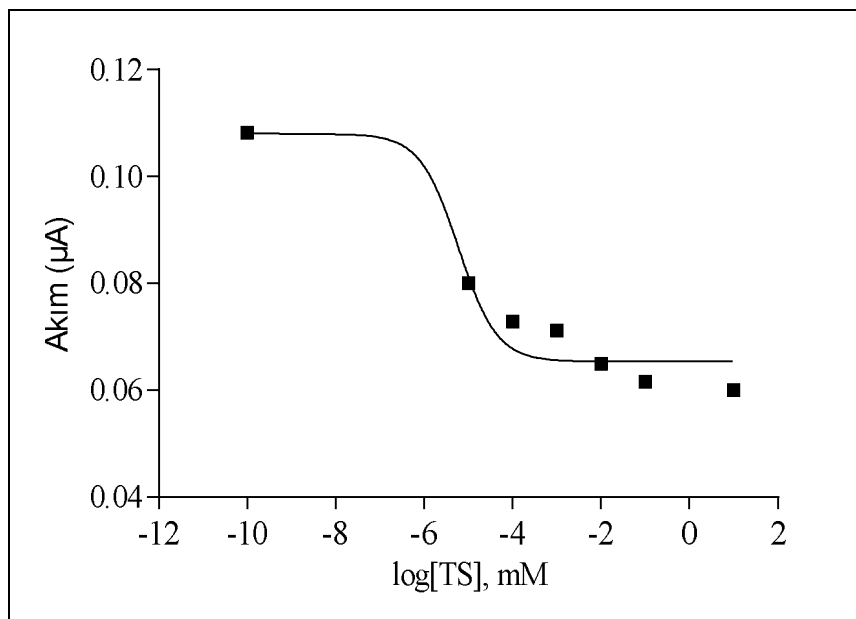
Şekil 4.43. T5BrS inhibitörünün IC_{50} grafiği



Şekil 4.44. T5ClS inhibitörünün IC_{50} grafiği



Şekil 4.45. T5FS inhibitörünün IC_{50} grafiği



Şekil 4.46. TS inhibitörünün IC_{50} grafiği

Çizelge 4.8. İnhibitörlerin elektrokimyasal ve spektrofotometrik yöntem ile hesaplanan IC_{50} değerleri

İnhibitör	IC_{50} (nM) Elektrokimyasal yöntem	IC_{50} (nM) Spektrofotometrik yöntem
T5F3MetS	5,32±1,56	22,1±1,11
T5MetS	5,63±2,35	23,9±1,10
TS	5,98±1,75	25,0±1,32
T3Cl5FS	7,64±1,45	27,5±1,10
T5FS	10,52±1,11	30,5±1,09
T5BrS	11,53±1,89	32,1±1,11
T5ClS	16,0±1,28	730±1,52

İnhibitörlerin elektrokimyasal yöntem ile tayin edilen IC_{50} değerleri; T5F3MetS<T5MetS<TS<T3Cl5FS<T5F<T5Br<T5ClS olarak bulundu. Bu eğilimin spektrofotometrik olarak belirlenen IC_{50} sıralamasıyla aynı olduğu görüldü.

İnhibitörlerin hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal yöntemle belirlenen IC_{50} değerleri farklı olmasına karşın aynı eğilime sahiptir. Literatürde *Lenigk ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada bu durum ile benzer bir sonuca sahiptir [135].

Hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal yöntemle yapılan deneyler sonucunda, takrin türevleri arasında en iyi sonuç 3 konumunda $-CH_3$ ve 5 konumunda $-F$ grubu bulunan salisilaldehit türevinden elde edildiği görüldü. T5F3MetS'in takrinden yaklaşık 1,5 kat daha fazla aktif olduğu sonucuna ulaşıldı.

T5ClS, serideki diğer inhibitörler kadar iyi inhibisyon özelliği gösterememiş hem de IC_{50} ve K_i değerleri birbiriyle paralel çıkmamıştır. Bunun sebebi serideki diğer inhibitörlerin sentezinde çözücü olarak metanol kullanılırken T5ClS'nin sentezinde DMSO kullanılması olabilir. Metanol içerisinde T5ClS sentezi bütün denemelere rağmen gerçekleşmemiştir. DMSO kullanılması sonucu inhibitörün mol kütlesi artmış, ayrıca bütün inhibitörler suda çok rahat bir şekilde çözünürken T5ClS'nin sudaki çözünürlüğü oldukça azalmıştır. Bu sebeplerden dolayı T5ClS, serideki diğer inhibitörler kadar iyi inhibisyon özelliği gösterememiştir.

Yalnızca halojen sübstitüenti içeren inhibitörlerin (T5FS<T5BrS<T5ClS) aktifliklerini kendi arasında karşılaştırıldığında, sübstitüentlerin elektronegatiflikleri ile inhibitör aktiviteleri arasında net bir bağlantı kurulamadı. Literatürde halojen sübstitüentlerin elektronegatiflikleri ile bu sübstitüentleri içeren inhibitörlerin aktiviteleri arasında kesin ve net bir ilişki yoktur [136-140]. Bu çalışmada en iyi aktivite $-F$ sübstitüenti içeren inhibitörde gözlemlendi. *Mohsen*'in çalışmasında ise görülen halojen sübstitüentli inhibitörlerin IC_{50} eğilimi bizim çalışmamız ile aynı olduğu görüldü [136].

En iyi inhibisyon özelliği gösteren T5F3MetS ve T5MetS inhibitörlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında (T5F3MetS<T5MetS) $-F$ sübstitüenti içeren T5F3MetS'nin en iyi aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı. $-F$ ' un inhibitör aktivite üzerindeki olumlu etkisi burada da görüldü.

Yapısında $-Cl$ sübstitüenti içeren T3Cl5FS ve T5ClS inhibitörlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında (T3Cl5FS<T5ClS) yine yapıda $-F$ sübstitüenti içeren T3Cl5FS'in en iyi

aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı. -F' un inhibitör aktivite üzerindeki olumlu etkisi bir kez daha durum ile ispatlandı.

Yapısında -F sübstitüenti içeren T5F3MetS ve T5FS inhibitörlerinin aktiviteleri karşılaştırıldığında ($T5F3MetS < T5FS$) -CH₃ sübstitüenti içeren T5F3MetS'nin en iyi aktiviteye sahip olduğu görüldü.

En iyi inhibisyon özelliği gösteren T5F3MetS ve T5MetS'nin türü karışık inhibisyon olarak bulunmuştur. Buna göre, inhibitör hem serbest enzime, hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilir, ama bu bağlanmalar farklı afinitededir [34].

Tüm seri kendi içerisinde karşılaştırıldığında en iyi inhibitör aktivitesi -CH₃ sübstitüenti içeren inhibitörler T5F3MetS ve T5MetS'ye aittir. Literatürde, farklı sübstitüentler takılarak türevlendirilen AChE inhibitörlerinin aktifliklerine ait çalışmalarda en aktif inhibitörün elektron salıcı bir grup olan -CH₃ gruplu inhibitörler olduğu çalışmalar mevcuttur [139,140]. Hatta *Huang ve arkadaşlarının* çalışmasında en aktif tür olan -CH₃ gruplu inhibitörün inhibisyon türü karışık tip inhibisyon olarak bulunmuştur [139] ve bu sonucun bizim çalışmamızla uyumlu olduğu görülür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının birinci kısmında hazırlanan ACh biyosensörü;

1. Geniş bir derişim aralığında ($1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M, $R^2 = 0,994$ ve $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M, $R^2 = 0,994$) çalışabilmektedir,
2. Düşük bir tayin sınırına sahiptir ($5,0 \times 10^{-9}$ M),
3. Kabul edilebilir bir cevap süresine sahiptir (200 s),
4. Tekrarlanabilirliği oldukça iyidir (18 ölçüm için bulunan bağıl standart sapma %4,4).
5. Raf ömrü ilk bir hafta için % 92 dir. (35 gün sonra başlangıç amperometrik cevabının % 31'ini korumaktadır).
6. Hazırlanması kolay ve ucuzdur.
7. İmmobilize enzimler için optimum pH 9,0; sıcaklık 65 °C olarak bulunmuştur.
8. PPy-PVS filme immobilize edilen AChE ve ChO enzimlerinin $K_{m(göz)}$ ve $I_{max(göz)}$ değerleri sırasıyla 0,0332 μ M ve 0,261 μ A olarak tespit edilmiştir.
9. PPy-PVS filmin çevrim sayısı optimize edilerek ve seyrelme etkisinin de yardımıyla biyosensör çalışmalarında sıkça rastlanan bir sorun olan girişim ortadan kaldırılmıştır.

ACh biyosensörü çalışmasının literatür sonuçları ile karşılaştırılması

Hazırlanan ACh biyosensörü ile incelenen bazı literatürlere ait veriler, Çizelge 5.1'de verilmiştir.

- Biyosensör çalışmamızda doğrusal çalışma aralıkları $1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$ M ($R^2=0,994$) ve $1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M ($R^2=0,994$) olarak bulundu. Literatür ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün çalışma aralığının geniş ve düşük ACh derişimlerine karşı hassas olduğu görülmektedir.
- Hazırlanan biyosensör düşük tayin sınırına sahiptir. Tayin sınırının düşüklüğü, küçük derişimlerdeki madde miktarı tayinine olanak tanınması açısından önemlidir.
- Biyosensöre ait optimum çalışma sıcaklığı 65°C olarak bulunmuştur. Enzimlerin immobilize edildiği PPy-PVS filmin, enzimlerin termal kararlılığını artırdığı söylenebilir. Böylelikle PPy-PVS film ile enzimler yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı hale gelmişlerdir.

- Biyosensörün $K_{m(göz)}$ değeri, 0,0332 μ M olarak bulundu. Literatürdeki diğer ACh biyosensörlerine ait K_m değerleri ile kıyaslandığında biyosensörümüze ait değerin daha düşük olduğu görüldü. K_m değerinin küçük olması sayesinde, enzimlerin immobilize edildiği PPy-PVS filmin enzimlerin substratlara karşı ilgisini artırdığı söylenebilir.

Çizelge 5.1. Çalışma sonuçları ile literatürün karşılaştırılması

Taşıyıcı	ACh tayin prensipli	Doğrusal aralık	İmmobilizasyon teknigi	Tayin sınırı	K_m	Opt. pH	Opt. sıcaklık	Raf ömrü	Ref.
Hibrit mezofor silika membran	H ₂ O ₂ , +0,6 V	6,0-800,0 μ M	Adsorpsiyon	5,2 μ M	-	8,0-9,0	-	80 gün sonunda % 80 aktivite kalmıştır	96
Poli(4-(2,5-di(tiyofen-2-il)-1H-pirol-1-yl)benzamin)	Oksijen, -0,7 V	0,12-10,0 mM	Kovalent bağlama	0,11 mM	-	7,5	-	30 gün	98
Poli(vinil alkol) kriyojel membran	H ₂ O ₂ , +0,65 V	5,0-100,0 μ M	Adsorpsiyon	2,0 μ M	0,4 mM	9,5	35°C	30 gün	91
Polivinil ferrosenyum perklorat	H ₂ O ₂ , +0,70 V	0-12,0 mM	Adsorpsiyon	1,0 μ M	1,74 mM	7,4	55°C	30 gün sonunda % 50 aktivite kalmıştır	97
Au nanopartüklü ve çok duvarlı karbon nanotüp	H ₂ O ₂ , +0,35 V	0,005-0,4 mM	Birden fazla teknik	1,0 μ M	-	-	-	60 gün sonunda % 80aktivite kalmıştır	99
PPy-PVS film	H ₂ O ₂ , +0,30 V	0,01-1,0 μ M	Çapraz bağlama	5,0 nM	0,0332 μ M	9,0	65°C	35 gün sonunda % 31 aktivite kalmıştır	Bu çalışma

Tezin ikinci kısmında, takrinin, farklı sübstituentler içeren salisilaldehit ile Schiff bazı türevleri sentezlendi, üçüncü kısmında ise sentezi yapılan inhibitörlerin AChE aktivitesi spektrofotometrik olarak Ellman metodu ile incelendi ve her bir inhibitörün IC₅₀ değeri, inhibisyon türü, K_i , K_m ve V_{max} sabitleri araştırıldı. Sonrasında sentezlenen bu inhibitörlerin hazırlanan ACh biyosensörü ile elektrokimyasal inhibisyon çalışmaları yapıldı. Sonuçlar şöyledir;

1. Sentezi yapılan bileşiklerin karakterizasyonu element analizleri, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spektroskopisi ile aydınlatıldı.

2. Sentezlenen bileşiklerin AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi spektrofotometrik Ellman yöntemi ile araştırıldı ve tüm bileşiklerin suda çözünebilen tersinir AChE inhibitör özelliği taşıdığı görüldü.
3. Spektrofotometrik yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda; T5F3MetS ve T5MetS'nin tersinir karışık (mix); TS, T5BrS ve T5ClS'nin tersinir yarı yarışmalı (uncompetitive); T3Cl5F ve T5FS'nin tersinir yarışmasız (noncompetitive) inhibisyon türüne sahip olduğu belirlendi.
4. İnhibitörlerin IC_{50} değerleri hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal olarak belirlendi. Her iki yöntemde de IC_{50} eğilimi; T5F3MetS<T5MetS<TS<T3Cl5FS<T5F<T5Br<T5ClS olarak bulundu. İnhibitörlerin hem spektrofotometrik hem de elektrokimyasal yöntemle belirlenen IC_{50} değerlerinin farklı olmasına karşın aynı eğilime sahip olduğu görüldü.
5. İnhibitörlerin spektrofotometrik yöntem ile yapılan deneyler sonucunda hepsinin takrinden daha düşük IC_{50} değerine sahip olduğu görüldü (T5ClS dışında). Bu durum takrinden daha iyi inhibitörler sentezlendiğinin bir göstergesi oldu.
6. Sentezlenen takrin türevleri arasında en iyi sonuç 3 konumunda -CH₃ ve 5 konumunda -F grubu bulunan salisilaldehit türevinden elde edildi. T5F3MetS'in takrinden yaklaşık 1,5 kat daha fazla aktif olduğu sonucuna ulaşıldı.
7. İnhibitörlerin K_i eğilimleri T5F3MetS<T5MetS<TS<T3Cl5FS<T5F<T5Br<T5ClS'dir. İnhibitörlerin IC_{50} değerleri K_i değerleri ile paraleldir, aynı eğilime sahiptir (T5ClS dışında). En iyi inhibisyon özelliği gösteren T5F3MetS'in K_i değeri en düşüktür.
8. T5ClS, serideki diğer inhibitörler kadar iyi inhibisyon özelliği gösterememiş hem de IC_{50} ve K_i değerleri birbiriyle paralel çıkmamıştır. Bunun sebebinin, bu bileşiğin serideki diğer bileşiklerden farklı sentezlenme yöntemine sahip olmasından ileri gelebileceği düşünüldü.
9. Yalnızca halojen süstitüenti içeren inhibitörlerin (T5FS<T5BrS<T5ClS) aktifliklerini kendi arasında karşılaştırıldığında, süstitüentlerin elektronegatiflikleri ile inhibitör aktiviteleri arasında net bir bağlantı kurulamadı. En iyi aktivite -F süstitüenti içeren inhibitörde gözlemlendi.
10. En iyi inhibisyon özelliği gösteren T5F3MetS ve T5MetS inhibitörlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında (T5F3MetS<T5MetS) -F süstitüenti içeren T5F3MetS'nin en iyi aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı. -F' un inhibitör aktivite üzerindeki olumlu etkisi burada da görüldü.

11. Yapısında -Cl sübstitüenti içeren T3Cl5FS ve T5ClS inhibitörlerin aktiviteleri karşılaştırıldığında ($T3Cl5FS < T5ClS$) yine yapıda -F sübstitüenti içeren T3Cl5FS'in en iyi aktivite gösterdiği sonucuna ulaşıldı. -F' un inhibitör aktivite üzerindeki olumlu etkisi bir kez daha durum ile ispatlandı.
12. Yapısında -F sübstitüenti içeren T5F3MetS ve T5FS inhibitörlerinin aktiviteleri karşılaştırıldığında ($T5F3MetS < T5FS$) -CH₃ sübstitüenti içeren T5F3MetS'nin en iyi aktiviteye sahip olduğu görüldü.
13. Tüm seri kendi içerisinde karşılaştırıldığında en iyi inhibitör aktivitesi -CH₃ sübstitüenti içeren inhibitörler T5F3MetS ve T5MetS'ye aittir.

KAYNAKLAR

1. Andreescu, S., and Marty, J. L. (2006). Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*, 23(1), 1-15.
2. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., and Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, (21), 1405-1423.
3. Arslan, H., and Arslan, F. (2011). Preparation of a polypyrrole-polyvinylsulphonate composite film biosensor for determination of phenol based on entrapment of polyphenol oxidase, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. (39), 341-345.
4. Çolak, Ö., Yaşar, A., Çete, S., and Arslan, F. (2012). Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly(vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, (40), 354-361.
5. Hou, S., Ou, Z., Chen, Q., and Wu, B., (2012). Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of goldnanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbonnanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, (33), 44-49.
6. Özdemir, M., Arslan, F., and Arslan, H., (2012). An amperometric biosensor for choline determination prepared from choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulfonate film, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. (40), 280-284.
7. Liu, B., Yang, Y.H., Wu, Z.Y., Wang, H., Shen, L.S., and Yu, R.Q., (2005). A potentiometric acetylcholinesterase biosensor based on plasma-polymerized film. *Sensor and Actuators B Chemical*, (104), 186-190.
8. Wilson, I. B., and Nachmansohn, D. (1954). *Ion Transport Across Membranes*. Academic Pres Inc., New York, 35.
9. Akman, E. (2007). *Van gölü balığının (Chalcalburnus Tarichi P.1811) beyin ve karaciğerinden asetilkolinesteraz (E.C.3.1.1.7) enziminin afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 5.
10. Yang, M., Yang, Y., Yang, G., Shen, and R Yu. (2005). Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membrane. *Analytica Chimica Acta*, 530, 205-211.
11. Guerrieri, A., Lattanzio, A.V., Palmisano, F., and Zambonin, P.G., (2006). Electrosynthesized poly(pyrrole)/poly(2-naphthol) bilayer membrane as an effective anti-interference layer for simultaneous determination of acethylcholine and choline by a dual electrode amperometric biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 21, 1710-1718.

12. Rizzo, S., Rivière, C., Piazzzi, L., Bisi, A., Gobbi, S., Bartolini, M., Andrisano, V., Morroni, F., Tarozzi, A., Monti, J.P., and Rampa, A. (2008). Benzofuran-based hybrid compounds for the inhibition of cholinesterase activity, β amyloid aggregation, and A β neurotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 2883-2886.
13. Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., and Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry*, 66, 137-147.
14. Zhang, S., Zhao, H., and John, R., (2001). A theoretical model for immobilized enzyme inhibition biosensors. *Electroanalysis*, 13, 1528-1534.
15. Ciucu, A.A., Negulescu, C., and Baldwin, R.P., (2003). Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 303-310.
16. Marty, J.L., Sode, K., and Karube, I., (1992) Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Electroanalysis*, 4, 249-252.
17. Mionetto, N., Rouillon, R., and Marty, J.L. (1992). Inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus and carbamate compounds. Studies on free and immobilized enzymes. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung*, 25, 171-174.
18. Şahin, H.A. (2002). Asetilkolin, kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı. *Demans Dergisi*, 2, 69-73.
19. Orhan, G, Orhan, İ, Subutay-Öztekin, N, Ak, F, and Şener, B. (2009). Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's Disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 4, 43-51.
20. Crismon, M.L. (1994). Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 28,744-751.
21. Wu, D. C., Xiao, X. Q., and Ng, A.K., (2000). Protection against ischemic injury in primary cultured mouse astrocytes by bis(7)-tacrine, a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Neuroscience Letters*, 288, 95-98.
22. Rydberg, E. H., Bruhamshtein, B., and Greenblatt, H. M., (2006). Complexes of alkylene-linked tacrine dimers with torpedo californica acetylcholinesterase: binding of bis(5)-Tacrine produces a dramatic rearrangement in the active-site gorge. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 5491-5500.
23. Recanatani, M., Cavalli, A., Belluti, F., Piazzzi, L., Rampa, A., and Bisi, A. (2000). SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43,2007-2018.
24. Shao, D., Zou, C. H., Luo, C. H., Tang, X., and Li, Y. (2004). Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's Disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4639-4642.

25. Telefoncu, A., ve Kılınç, A., (2012). *Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler*, Biyosensörler: Metodlar, Uygulamalar ve Son Gelişmeler Lisans Üstü Yaz Okulu, Muğla, 1-36.
26. Topcu Sulak, M. (2009). *Laccase enzimini temel alan amperometrik fenol biyosensörünün geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, 6-8.
27. Tan, İ. (2008). *Bazı ağır metal ve kirleticilerin laktat dehidrogenaz enzimi üzerindeki engelleyici etkilerinin belirlenmesi ve enzim inhibisyonuna dayalı biyosensör geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gebze, 15, 25, 26.
28. Yavuz, A.G. (2005). *Polivinil ferrosen modifiye elektrodunu temel alan glukoz biyosensörünün geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 12,14.
29. Sezgintürk, M.K. (2007). *β -galaktozidaz aktivitesinin belirlenmesinde biyosensör temelli ölçüm sistemlerinin geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 42-44.
30. Önal, S.Ç. (2000). *Karpuz (Citrullus Vulgaris) α -galaktosidazının doğal ve sentetik polimerlerde immobilizasyonu*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 39-41.
31. Aynacı, E. (2009). *(Aminometil)polistirene takılı Schiff bazı ve O'nun Ni(II) kompleksinin sentezi, karakterizasyonu ve β -galaktosidaz enziminin immobilizasyon özelliklerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 14-17.
32. Dolmacı, N. (2009). *Balık eti tazeliğinin tespiti için ksantin oksidaz enziminin polipirrol-polivinilsülfonat filme immobilizasyonu ile amperometrik biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 29-31.
33. Yıldırımoglu, F. (2009). *Kolesterol tayini için yeni bir biyosensör hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 42-43, 17-19.
34. Keha, E., ve Küfrevioğlu, İ. (2009). *Biyokimya*, (6. Baskı). İstanbul: Aktif Yayınevi, 93-95, 116-123.
35. Fennema, O.R. (1985). *Food Chemistry* (2nd edition). New York: Macel Dekker Inc, 994.
36. Telefoncu, A. (1986). *İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri*, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 1-16, 193-249.
37. Dinçkaya, E. (1999). *Enzim Sensörleri, Biyosensörler*, Ege Üniversitesi, İzmir, 81-142.

38. Çoban, E. (2010). *Formaldehyde dehydrogenase enzimi kullanılarak amperometrik formaldehit biyosensörlerinin geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 14-19.
39. Özdemir, Ç. (2010). *Farklı nanomalzemeler ile glukoz biyosensörlerinin hazırlanması ve uygulama potansiyellerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 3-6.
40. Öcal, B.L., (2007). *Poli(vinil alkol)-kalsiyum aljinat, poli(n-izopropilakrilamit)-kalsiyum aljinat kürelerine β -galaktosidaz immobilizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2, 3, 10-11.
41. Sassolas, A., Blum, L.J., and Leca-Bouvier, B.D., (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30 489-511.
42. Aynacı, E., Arslan, F., and Yaşar, A. (2014). An amperometric biosensor for acetylcholine determination prepared from acetylcholinesterase-choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulfonate film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202:1028-1036.
43. Saçak, M. (2004). *Polimer Kimyası* (2. Baskı). Türkiye: Gazi Kitabevi, 423-440.
44. Akbulut, U., ve Telefoncu, A., (1999). “İletken polimerlerle transduser hazırlanması”, *Biyosensörler*, *Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*, Kuşadası, 10-16.
45. İnternet: URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholine>, Son Erişim Tarihi: 21.02.2015.
46. Carlson, P. (1992). *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya* (Editör: Telefoncu, A.,) Kırıkkale, 420.
47. Temel, H.E., (2008). *Demanslı hastalarda asetilkolinesteraz aktivitesi ve oksidatif stresin asetilkolinesteraz enzim inhibitörleri ile değişimi*, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 32-34,
48. Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Üçüncü Baskıdan çeviri, Çeviri Editörü: Kılıç, N.), Türkiye: Palme Yayıncılık, 444.
49. İnternet: URL: http://faculty.pasadena.edu/dkwon/chap%208_files/textmostly/slide58.htm, Son Erişim Tarihi: 21.02.2015.
50. Chang, M.S., and Strichartz, G.R., (2005). *Cholinergic pharmacology* (Editörler: Golan, D.E ve Tashjian, A.H.). Principles of Pharmacology, Wolters Kluwer Company, New York, 89-93,
51. Çınkılıoğlu, E., (2007). *Cyprinus Carpio’da beyin dokusunda fenthionun antioksidant savunma sistemi, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesine N-asetilsistein modülatörlüğünde etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 18.

52. Allam, A.R., Sridhar, G.R., and Das, U.N., (2007). Elevated butrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Medical Hypothesis*, 69, 6, 1272-1276.
53. Neşe, Ç., (2003). Butrylcholinesterase: Structure And Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28(2); 54-61.
54. David, G., Wilkinson, P.T., Schwam, E., and Parrish, J.P., (2004). Cholinesterase inhibitors used in the treatment of alzheimer's disease. the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy. *Drugs Aging*, 21, 7, 453-478.
55. Phillips, D. C., (1996). The Tree-dimensional Structure of an Enzymes Molecule. *Science*, 215:78.
56. İnternet:URL:<http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylcholinesterase>, Son Erişim Tarihi: 22.02.2015.
57. Çakıroğlu, G., (2009). "Asetilkolinesteraz inhibitörleri olarak bazı piridin türevleri üzerinde sentez ve biyoaktivite çalışmaları", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 17-19.
58. Pohanka, M., (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Papers* ", 155(3), 219-230,
59. Ripoll, D.R., Faerman, C.H, Axelsen, P.H, Silman, I, and Sussman, J.L. (1993). An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci, USA*; 90:5128-32.
60. Koellner, G, Steiner, T, Millard, C.B, Silman, I, and Sussman, J.L. (2002). A neutral molecule in a cation-binding site: specific binding of a PEGSH to acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *Journal of Molecular Biology*, 320, 721-5.
61. Silman, I, and Sussman, J.L. (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function?, *Chemico Biological Interactions*, 175, 3-10.
62. Delfino, R.T., Ribeiro, T.S. and Figueroa-Villar, J.D., (2009). Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20:3, 407-428.
63. Talesa, V.N., (2001). Acetylcholinesterase in alzheimer's disease. *Mechanism of Ageing Development*, 122, 1961-1969.
64. Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., and Soreq, H., (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry*, 264, 672-686.
65. Dodson, G., and Wlodawer, A., (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends in Biochemical Sciences*, 23:(9), 347-352.

66. Fuxreiter, M., and Warshel, A., (1998). Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: computer simulation studies. *Journal of The American Chemical Society*, 120(1), 183-194.
67. Enyedy, I.J., Kovach, I.M., and Brooks, B.R., (1998). Alternate pathways for acetic acid and acetate ion release from acetylcholinesterase: a molecular dynamics study. *Journal of The American Chemical Society*, 120(32), 8043-8050.
68. Harel, M., Quinn, D.M., Nair, H.K., Silman, I., and Sussman, J.L., (1996). The x-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *Journal of The American Chemical Society*, 118(10), 2340-2346.
69. Nemukhin, A.V., Lushchekina, S.V., Bochenkova, A.V., Golubeva, A.A., and Varfolomeev, S.D., (2008). Characterization of a complete cycle of acetylcholinesterase catalysis by *ab initio* QM/MM modeling. *Journal of Molecular Modeling*, 14(5), 409-416.
70. Rand, T., Halkier, T., and Hansen, O.C., (2003). Structural characterization and mapping of the covalently linked FAD cofactor in choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochemistry*, 42, 7188-7194.
71. Özdemir, M. (2012). “*Kolin Tayini İçin Polipirol-Polivinilsülfonat Filme Kolin Oksidaz Enziminin İmmobilizasyonu İle Biyosensör Hazırlanması*”, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 10-40,56,57,69,70.
72. Rozwadowski, K.L., Khachatourians, G.G. and Selvaraj, G. (1991). Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthobacter pascens*, facilitates adaption to osmotic stress in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 472-478.
73. Fan, F., and Gadda, G. (2005). On the catalytic mechanism of choline oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 2067-2074.
74. Fan, F., Germann, M. W. and Gadda, G. (2006). Mechanistic studies of choline oxidase with betaine aldehyde and its isosteric analogue 3,3-dimethylbutyraldehyde. *Biochemistry*, 45, 1979-1986.
75. Gadda, G. (2003). pH and deuterium kinetic isotope effects studies on the oxidation of choline to betaine-aldehyde catalyzed by choline oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1646, 112-118.
76. Ghanem, M. Fan, F., Francis, K. and Gadda, G. (2003). Spectroscopic and kinetic properties of recombinant choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *Biochemistry*, 42, 15179-15188.
77. Çalış, Ü., (2000), *Alzheimer Tedavisinde Kullanılan İlaçlar*; Farmasötik Kimya, Cilt I, Irmak Matbaası, Ankara, 531-536.

78. Ercan, S., (2002). Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleri. *Demans Dergisi*, 2, 5-9.
79. Orhan, G., Orhan, İ., Subutay-Öztekin, N., Ak, F., and Şener, B. (2009). Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of alzheimer's disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 4, 43-51.
80. Davis, K.L., and Mohs, R.S., (1982). Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple-dose intravenous physostigmine. *The American Journal of Psychiatry*, 139, 1421-1424.
81. Deutsch, J.A., (1971). A cholinergic synapse and the site of memory, *Science*, 174, 788-794.
82. Petersen, R.C., (1979). Scopolamine state-dependent memory processes in man. *Psychopharmacology*, 64, 309-314.
83. Shaw, H., and Bentley, G., (1953). Anticholinesterase properties of tetrahydroaminoacridine. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science.*, 31, 573-578.
84. Summers, K., Majovski, L.V., Marsh, G.M., Tachiki, K., and Kling, A., (1986). Oral tetrahydroaminoacridine in long-term Treatment of senile Dementia, Alzheimer type. *The New England Journal of Medicine*, 315, 1241-1245.
85. Rogers, S.L., Doody, R.S., Mohs, and R.C., (1998). Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer's disease: A 15-Week, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Archives of Internal Medicine*, 158, 1021-1031.
86. Jacobsen, F.M., and Comas-Díaz, L., (1999). Donepezil for psychotropic-induced memory loss. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 60(10), 698-704.
87. Rosler, M., Anand, R., Cicin-Sain, A., Gauthier, S., Agid, Y., Dal-Bianco, P., and Stahelin, H.B., (1999). Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: International randomised controlled-trial commentary: another piece of the Alzheimer's jigsaw. *BMJ*, 318, 633-640.
88. Corey-Bloom, J., Anand, R., and Veatch, J., (1998). A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric, Psychopharmacology*, 1:2, 55-65.
89. Kok, F.N., Bozoğlu, F., and Hasirci, V., (2001). Immobilization of acetylcholinesterase and choline oxidase in/on pHEMA membrane for biosensor construction. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 12:11, 1161-1176.
90. Yang, M., Yang, Y., Yang, Y., Shen, G., and Yu, R., (2005). Microbiosensor for acetylcholine and choline based on electropolymerization/sol-gel derived composite membran. *Analytica Chimica Acta*, 530, 205-211.

91. Doretto, L., Ferrara, D., Lora, S., Schiavon, F., and Veronese, F.M., (2000). Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 279-285.
92. Chen, Q., Kobayashi, Y., Takeshita, H., Hoshi, T., and Anzai, J., (1998). Avidin-biotin system-based enzyme multilayer membranes for biosensor applications: optimization of loading of choline esterase and choline oxidase in the bienzyme membrane for acetylcholine biosensors. *Electroanalysis*, 10:2, 94-97.
93. K k, F.N., and Hasirci, V., (2004). Determination of binary pesticide mixtures by an acetylcholinesterase–choline oxidase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 661-665.
94. Gyurcs nyi, R.E., V gf ldi, Z., T th, K., Nagy, G., (1999). Fast response potentiometric acetylcholine biosensor. *Electroanalysis*, 11, 712-718.
95. Snejdarkova, M., Svobodova, L., Evtugyn, G., Budnikov, H., Karyakin, A., Nikolelis, D.P., and Hianik, T., (2004). Acetylcholinesterase sensors based on gold electrodes modified with dendrimer and polyaniline A comparative research. *Analytica Chimica Acta*, 514, 79-88.
96. Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Mizukami, F., and Ono, M., (2009). Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine, *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 443-448.
97.  en, S., G lce, A., and G lce, H., (2004). Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 1261-1268.
98. Kanik, F.E., Kolb, M., Timur, S., Bahadir, M., and Toppare, L., (2013). An amperometric acetyl-choline biosensor based on a conducting polymer, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 111-118.
99. Hou, S., Ou, Z., Chen, Q., and Wu, B. (2012). Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 33, 44-49.
100. McGleenon, M., Dynan, K.B., and Passmore, A.P., (1999). Acetylcholinesterase inhibitors Alzheimer's Disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48, 471-480.
101. Harel, M., Schalk, I., and Ehret-Sabatier, L., (1993). Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America*, 90, 9031-9035.

102. Kapkova, P., Stiefl, N., Sürig, U., Engels, B., Baumann K., and Holzgrabe, U., (2003). Synthesis and biological activity and docking studies of new acetylcholinesterase inhibitors of the bispyridinium type. *Archiv der Pharmazie*, 336, 523-540.
103. Jaén, J.C., Gregor, V.E., Lee, C., Davis, R., and Emmerling, M., (1996). Acetylcholinesterase inhibition by fused dihydroquinazoline compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6:6, 737-742.
104. Pang, Y.P., Quiram, P., Jelacic, T., Hong, F., and Brimijoin, S., (1996). Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 23646-23649.
105. Fang, L., Kraus, B., Lehmann, J., Heilmann, J., Zhang, Y., and Decker, M., (2008). Design and synthesis of tacrine-ferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 2905-2909.
106. Fernández-Bachiller, M.I., Pérez, C., González-Muñoz, G.C., Conde, S., López, M.G., Villarroya, M., García, A.G., Rodríguez-Franco, M.I., (2010). Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 4927-4937.
107. Fernández-Bachiller, M.I., Pérez, C., Campillo N.E., Páez J.A., González-Muñoz, G.C., Usán, P., García-Palomero, E., López, M.G., Villarroya, M., García, A.G., Martínez, A., and Rodríguez-Franco, M.I., "Tacrine-melatonin hybrids as multifunctional agents for Alzheimer's disease, with cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties", *Chemmedchem*, 4, 5, 828-841 (2009).
108. Camps, P., Achab, R.E., Morral, Muñoz-Torrero, D., Badia, A., Baños, J.E., Vivas, N.M., Barril, X., Orozco, M., and Luque, F.J., (2000). New tacrine-huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 4657-4666.
109. Shao, D., Zou, C., Luo, C., Tang, X., and Li, Y., (2004). Synthesis and evaluation of tacrine-E2020 hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4639-4642.
110. Hamulakova, S., Janovec, L., Hrabínova, M., Kristian, P., Kuca, K., Banasova, M., and Imrich, J., (2012). Synthesis, design and biological evaluation of novel highly potent tacrine congeners for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 23-31.
111. Gros, P., Durliat, H., and Comtat, M., (2000). Use of polypyrrole film containing $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ as pseudo-reference electrode: application for amperometric biosensors. *Electrochimica Acta*, 46, 643-650.

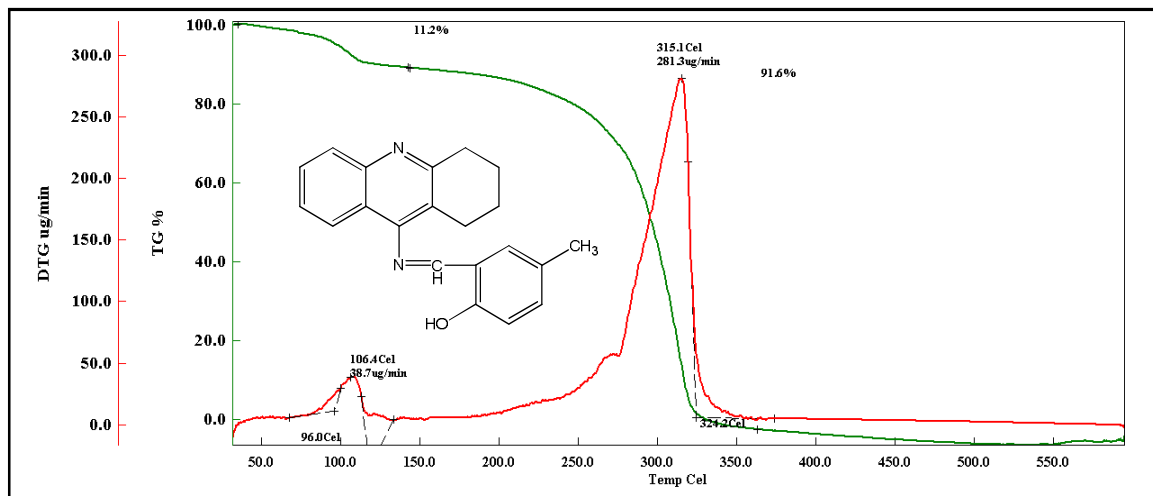
112. Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S., and Malhotra, B.D., (2000). Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta*, 46 723-729.
113. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
114. Gabrovska, K., Nedelcheva, T., Godjevargova, T., Stoilovab, O., Manolova N., and Rashkov I., (2008). Immobilization of acetylcholinesterase on new modified acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 55, 169-176.
115. Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., and Choi, M.M., (2007). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1791-1797.
116. Palchetti, I., Cagninia, A., Carlo, M., Coppi, C., Mascini, M., and Turner, A. (1997). Determination of anticholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 337, 315-321.
117. Luque, G.L., Rodríguez, M.C., Rivas, G.A., (2005). Glucose biosensors based on the immobilization of copper oxide and glucose oxidase within a carbon paste matrix, *Talanta*, 66, 467-471.
118. Razola, S.S., Lopez Ruiz, B., Mora Diez, N., Mark Jr, H.B., and Kauffmann, J.-M., (2002). Hydrogenperoxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 921-928.
119. Zhang, S., Zhao, H., and John, R., (2001). Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for inhibition biosensors-theoretical and practical considerations, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 1119-1126.
120. Şen, S., "Enzim tutuklanmış polivinilferrosenyum perklorat modifiye elektrodu ile asetilkolin tayini", Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, 53 (2002).
121. Xin, Q., and Wightman, R.M., (1997). Enzyme modified amperometric sensors for choline and acetylcholine with tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane as the electron-transfer mediator. *Analytica Chimica Acta*, 341, 43-51.
122. Özdemir, M., and Arslan, H., (2014). Choline-sensing carbon paste electrode containing polyaniline (PANI)-silicon dioxide composite-modified choline oxidase. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 42 (1), 27-31.

123. Aynacı, E., Sarı, N., and Tümtürk, H., (2011). Immobilization of β -galactosidase on novel polymers having Schiff bases. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39, 259-266.
124. Erduran, V., Tümtürk, H., Aynacı, E., and Sarı, N., (2013). Immobilization of β -galactosidase on Polystyrene Microspheres Attached L-Alanine. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 50, 871-878.
125. Dolmacı, N., Çete, S., Arslan, F., and Yaşar, A., (2012). An amperometric biosensor for fish freshness detection from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40, 275-279.
126. Sarı, B., and Talu, M., (1998). Electrochemical copolymerization of pyrrole and aniline. *Synthetic Metals*, 94 221-227.
127. Sarı, B., Gök, A., and Şahin, D. (2006). Synthesis and properties of conducting polypyrrole, polyalkylanilines and composites of polypyrrole and poly(2-ethylaniline), *Journal of Applied Polymer Science*, 101, 241-249.
128. Arora, K., Prabhakar, N., Chand, S., and Malhotra, B.D., (2007). Immobilization of single stranded DNA probe onto polypyrrole-polyvinylsulfonate for application to DNA hybridization biosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 126, 655-663.
129. Perez D.M., Ferrer M.L., and Mateo C.R., (2003). A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids, *Analytical Biochemistry*, 322, 238-242.
130. Çete S, Yaşar A, and Arslan F. (2006). An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 34, 367-380.
131. Kirsch, S.H., Herrmann, W., Rabagny, Y., and Obeid, R., (2010). Quantification of acetyl-choline, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable isotope dilution ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 878, 3338-3344.
132. Hasegawa, Y., Kuniyara, M., and Maruyama, Y., (1982). Determination of picomole amounts of choline and acetylcholine in blood by gas chromatography-mass spectrometry equipped with a newly improved pyrolyzer, *Journal of Chromatography A*, 239, 335-342.
133. Kawashima, K., Fujii, T., Watanabe, Y., and Misawa, H., (1998). Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-Lymphocytes, *Life Sciences*, 62, 1701-1705.
134. Gündüz, T., *İnstrümental Analiz*, 6. Baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, 2002, 321-400.

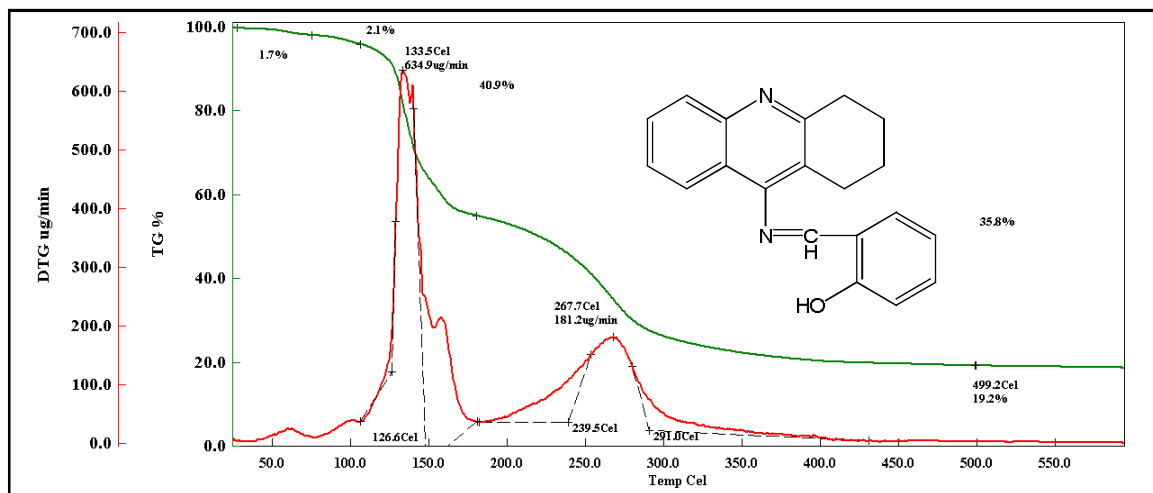
135. Lenigk, R., Lam, E., Lai, A., Wang, H., Han, Y., Carlier, P., and Renneberg, R., (2000). Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 541-547.
136. Mohammadi-Farani, A., Ahmadi, A., Nadri, H., and Aliabadi, A., (2013). Synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory assessment of 2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione derivatives with potential anti-Alzheimer effects. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21-47.
137. Marco-Contelles, J., León, R., López, M.G., García, A.G., and Villarroya, M. (2006). Synthesis and biological evaluation of new 4H-pyrano[2,3-b]quinoline derivatives that block acetylcholinesterase and cell calcium signals, and cause neuroprotection against calcium overload and free radicals. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 1464-1469.
138. Mohsen, U.A., (2012). Studies on imidazopyridine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors, *Journal of Marmara University Institute of Health Sciences*, 2:3, 119-123.
139. Huang, L., Luo, Z., He, F., Lu, J., and Li, X., (2010). Synthesis and biological evaluation of a new series of berberine derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 4475-4484.
140. Rehman, A., Fatima, A., Abbas, N., Abbasi, M.A., Khan, K.M., Ashraf M., Ahmad, I., and Ejaz, S.A., (2013). Synthesis, characterization and biological screening of 5-substituted-1,3,4-oxadiazole-2-yl-N-(2-methoxy-5-chlorophenyl)-sulfanyl acetamide *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 345-352.

EKLER

EK-1. TGA eğrileri

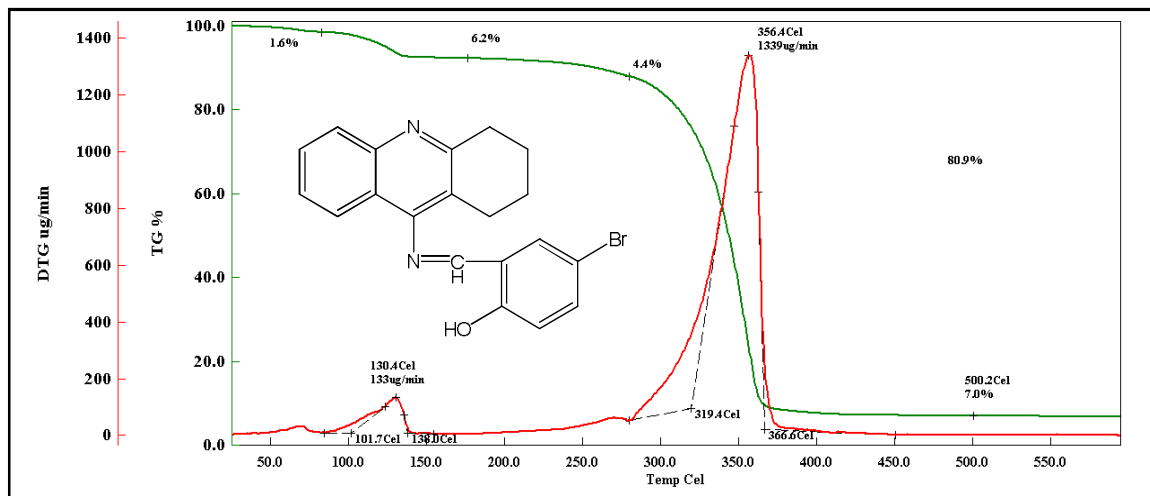


[T5MetS], TGA eğrisi

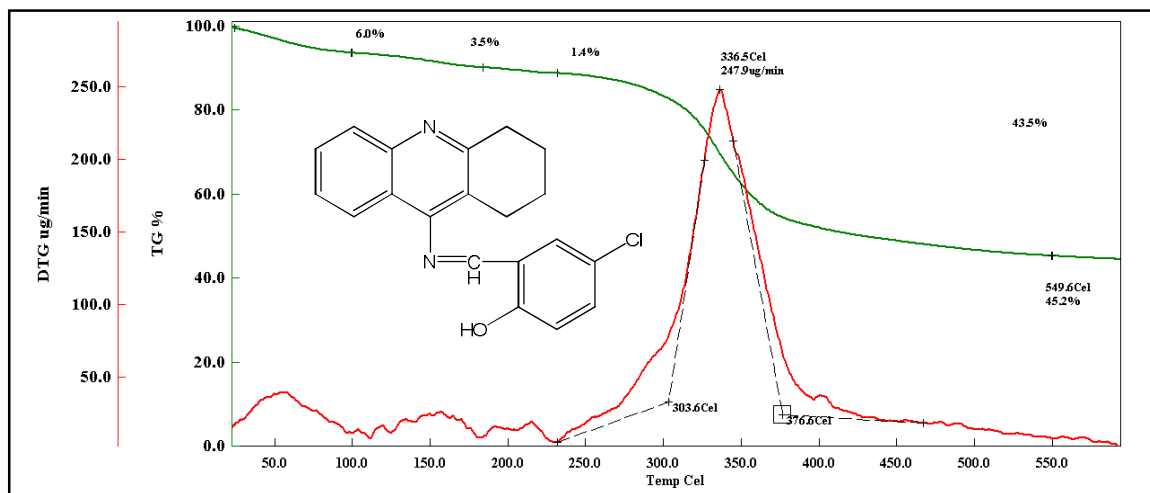


[TS], TGA eğrisi

EK-1. (devam) TGA eğrileri

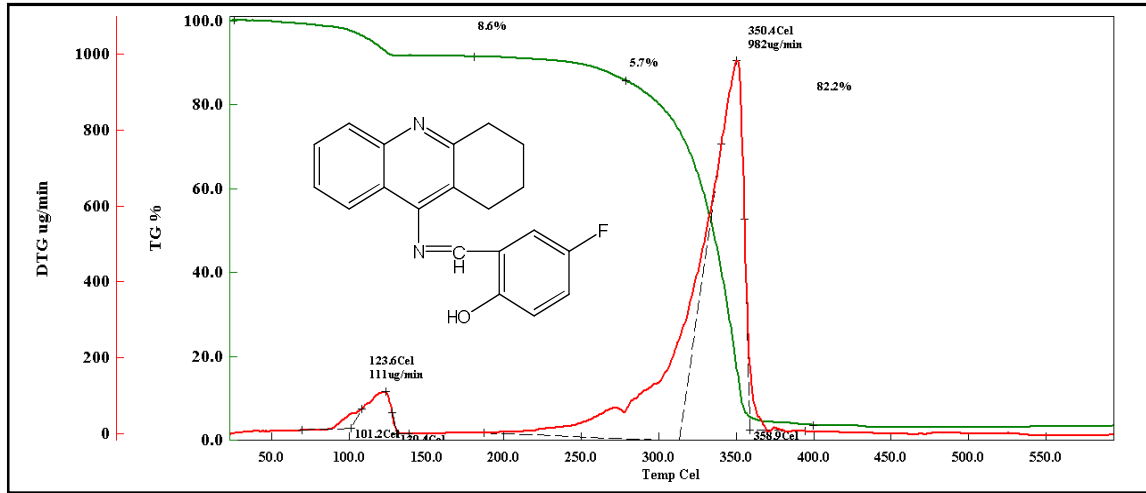


[T5BrS], TGA eğrisi

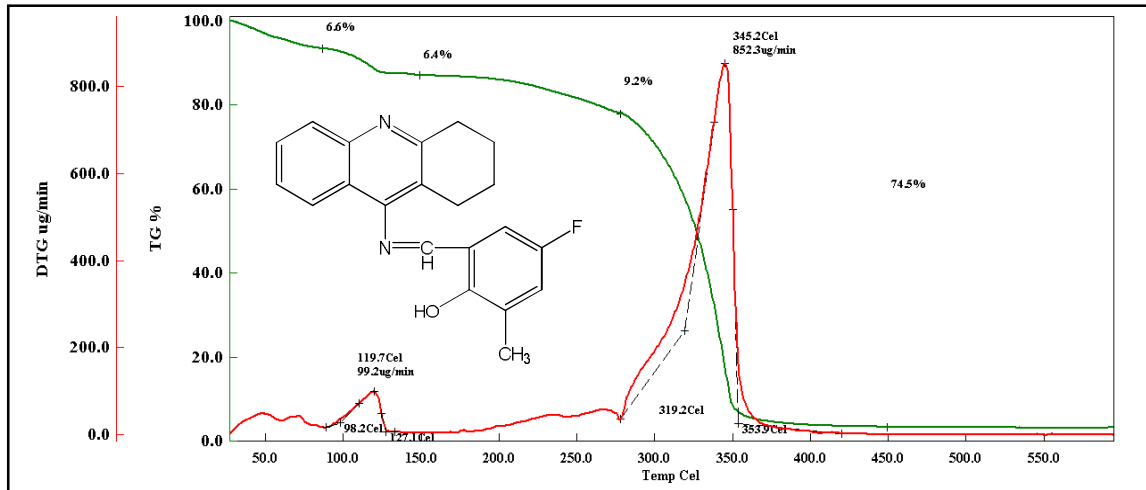


[T5ClS], TGA eğrisi

EK-1. (devam) TGA eğrileri

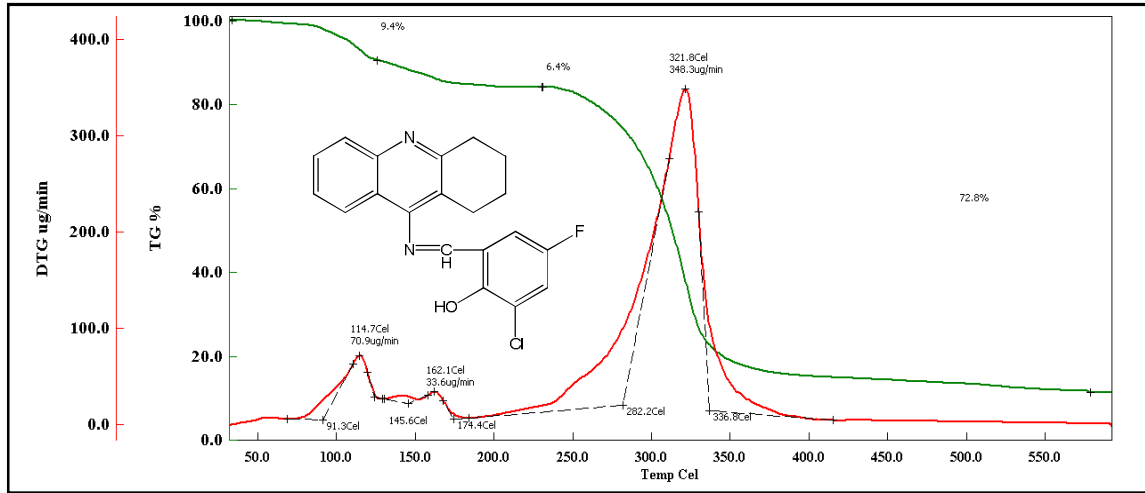


[T5FS], TGA eğrisi



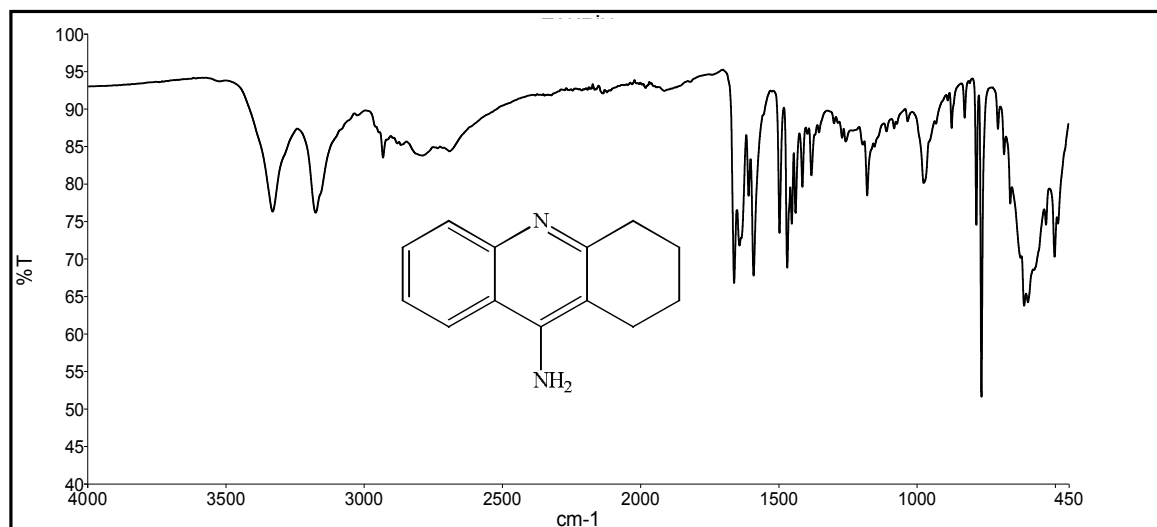
[T5F3MetS], TGA eğrisi

EK-1. (devam) TGA eğrileri

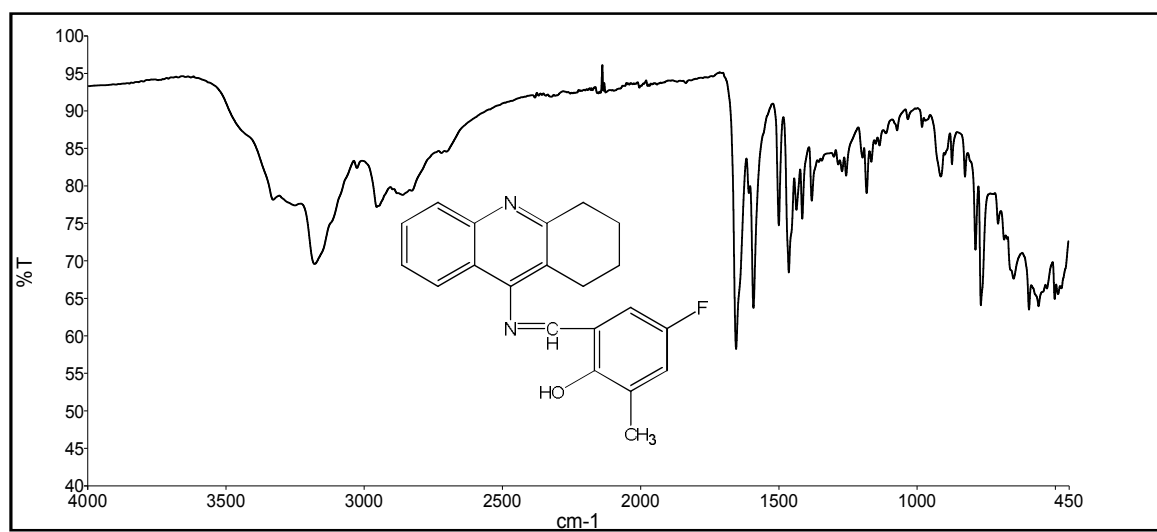


[T3Cl5FS], TGA eğrisi

EK-2. FT-IR spektrumları

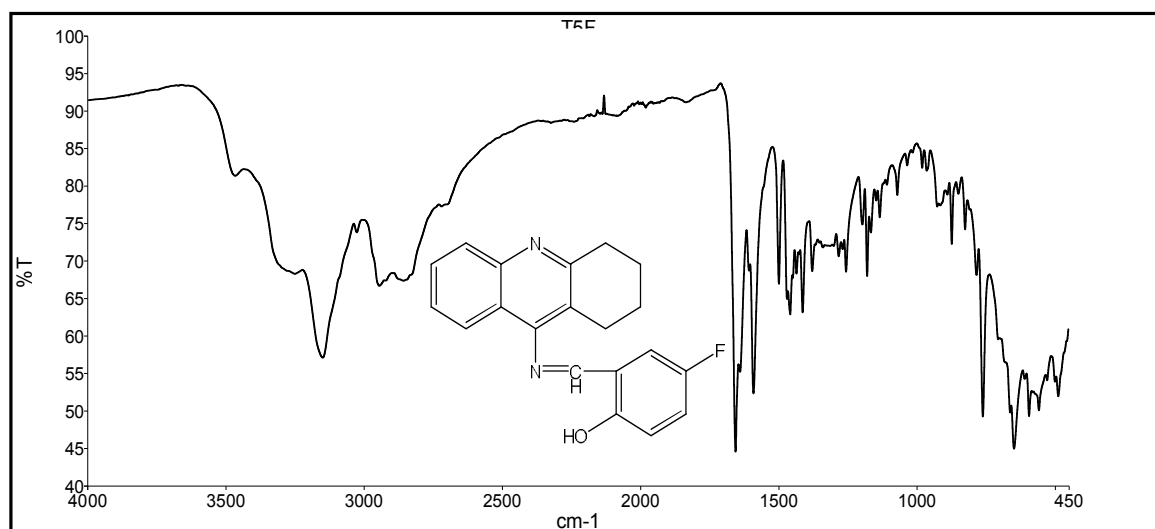


Takrin, FT-IR spektrumu

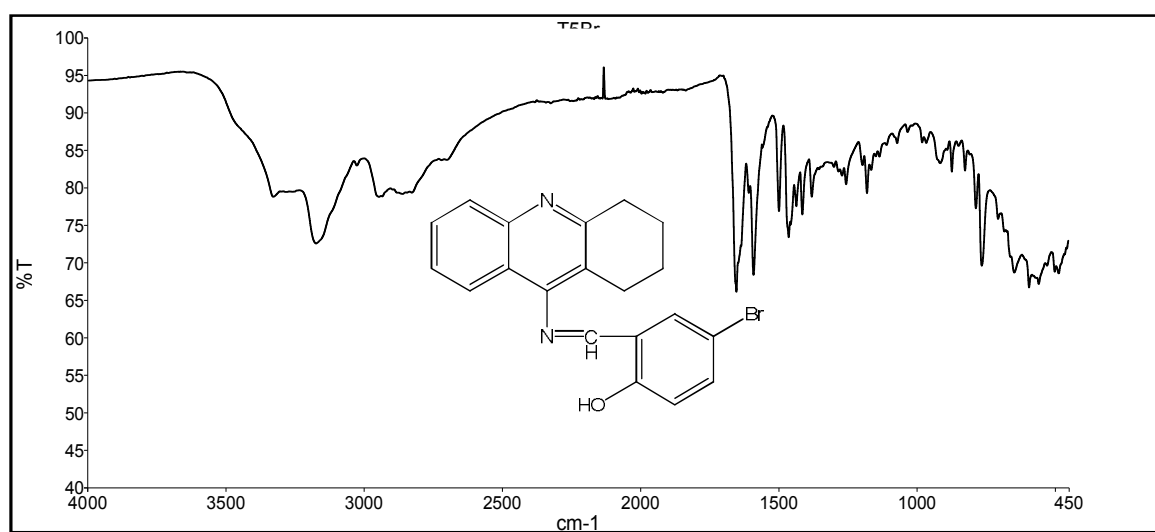


[T5F3MetS], FT-IR spektrumu

EK-2. (devam) FT-IR spektrumları

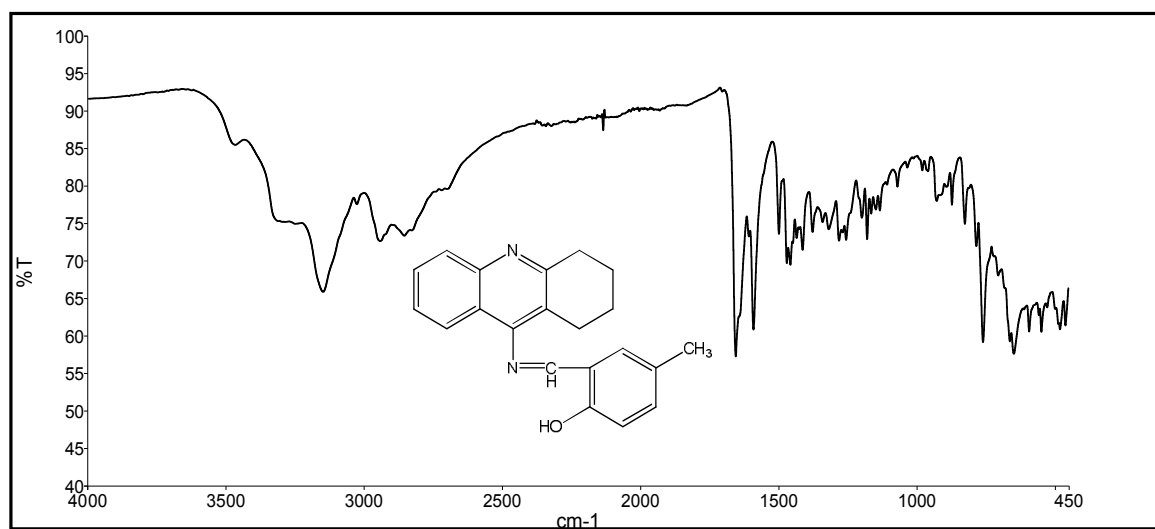


[T5FS], FT-IR spektrumu

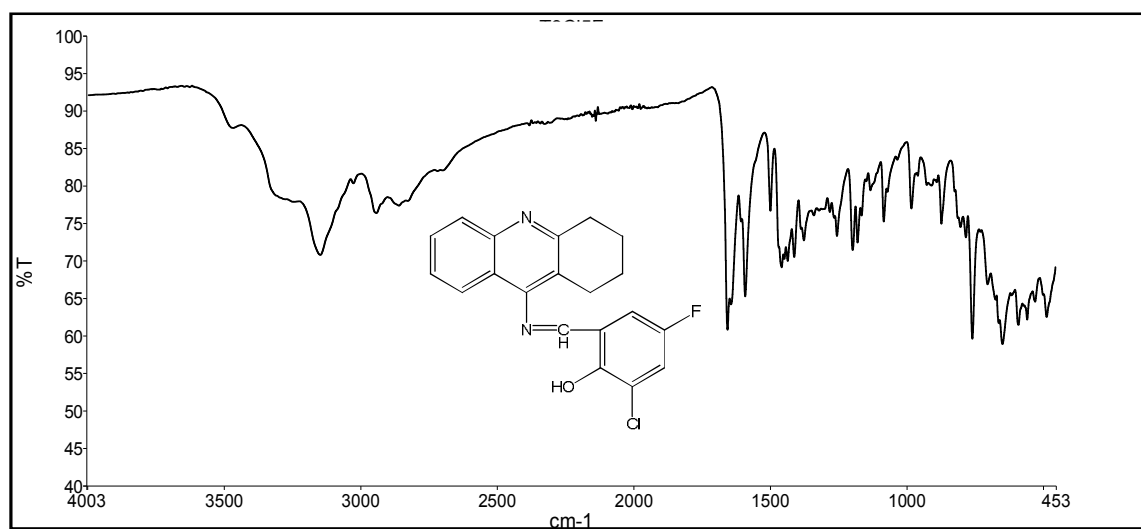


[T5BrS], FT-IR spektrumu

EK-2. (devam) FT-IR spektrumları

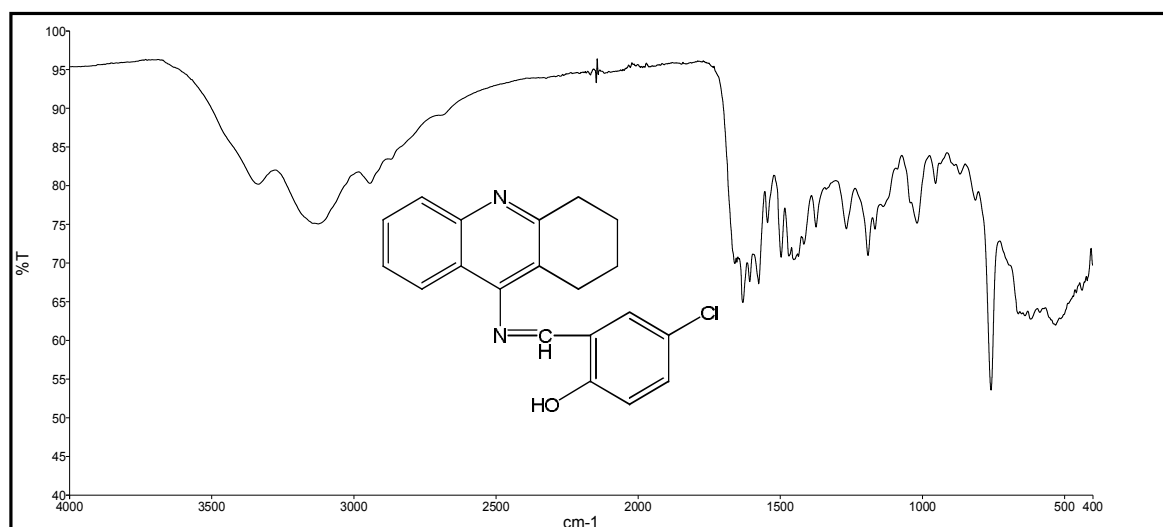


[T5MetS], FT-IR spektrumu

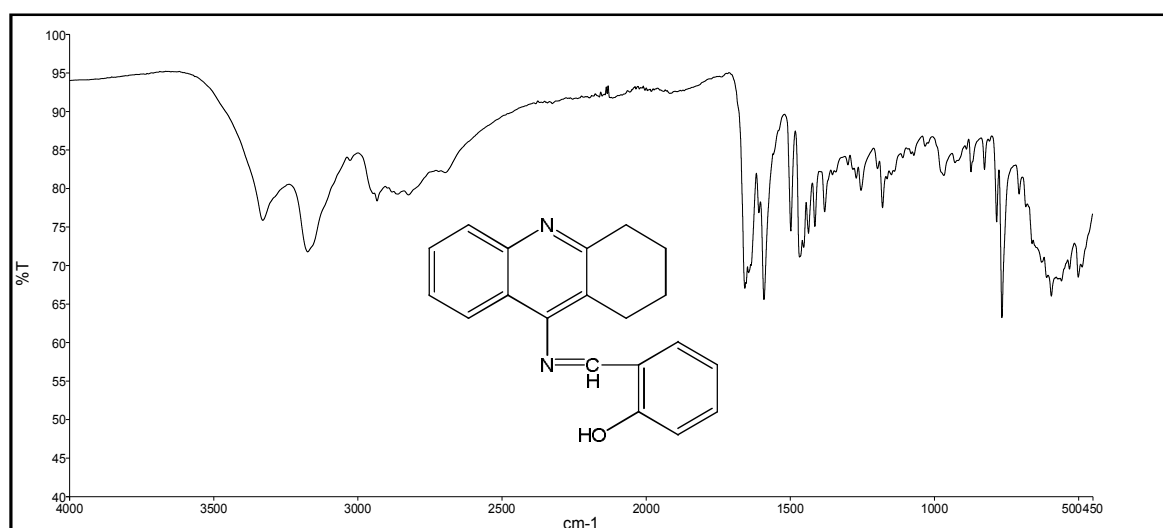


[T3Cl5FS], FT-IR spektrumu

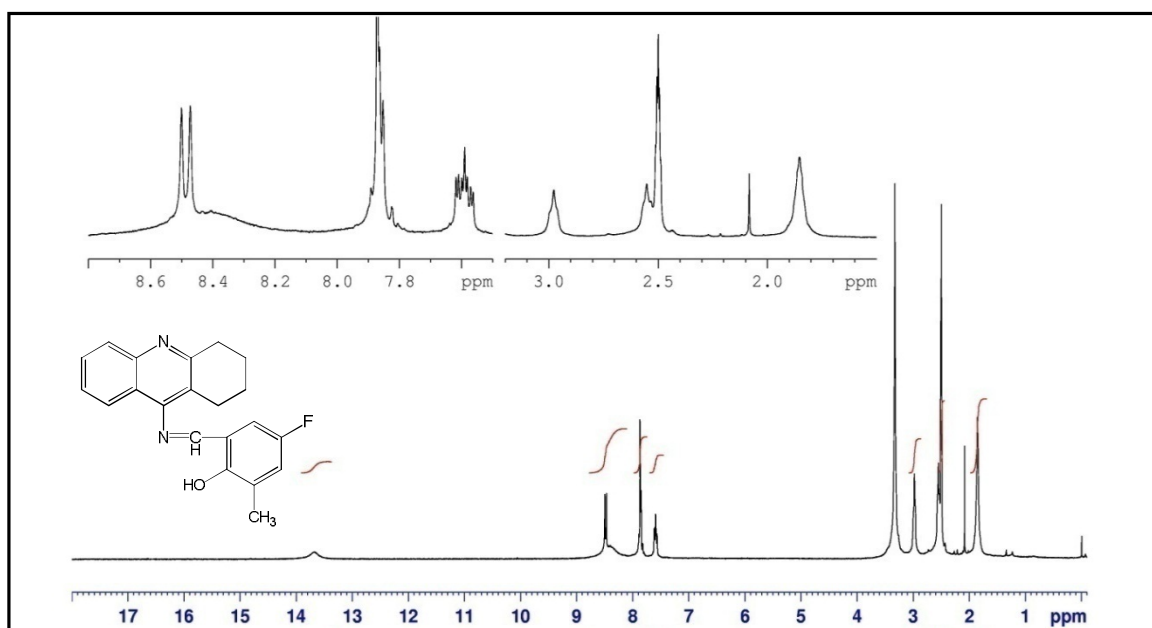
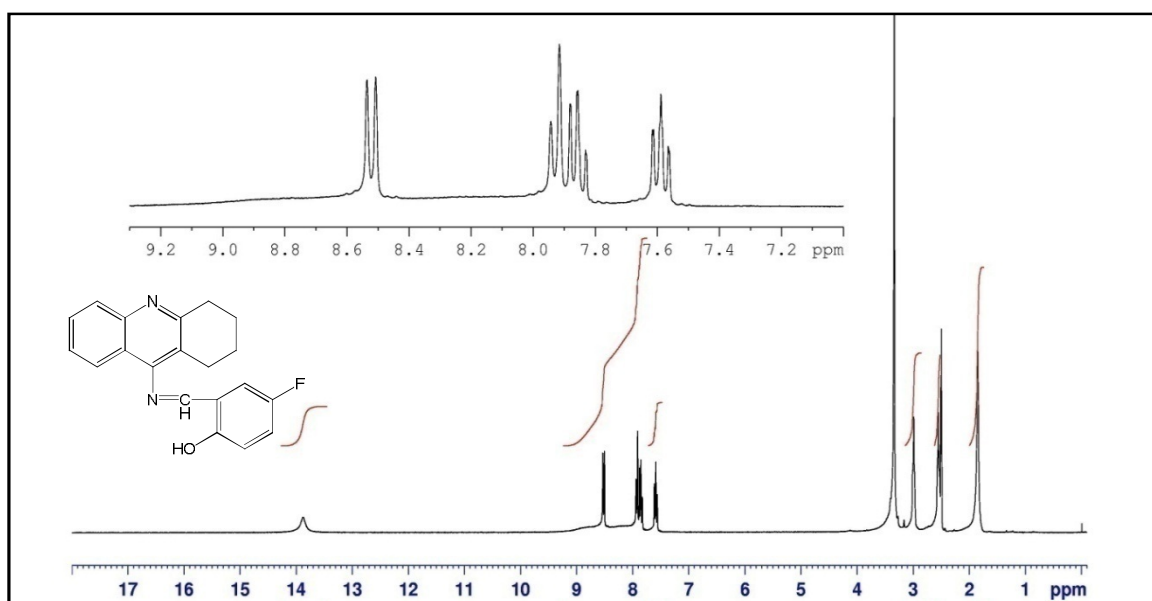
EK-2. (devam) FT-IR spektrumları

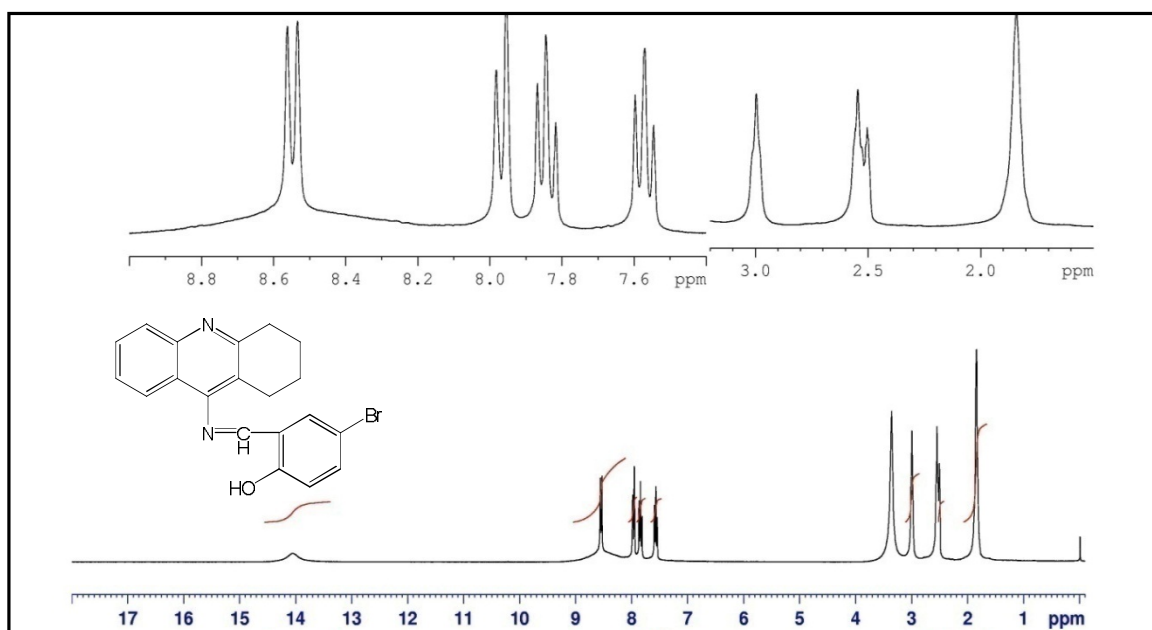
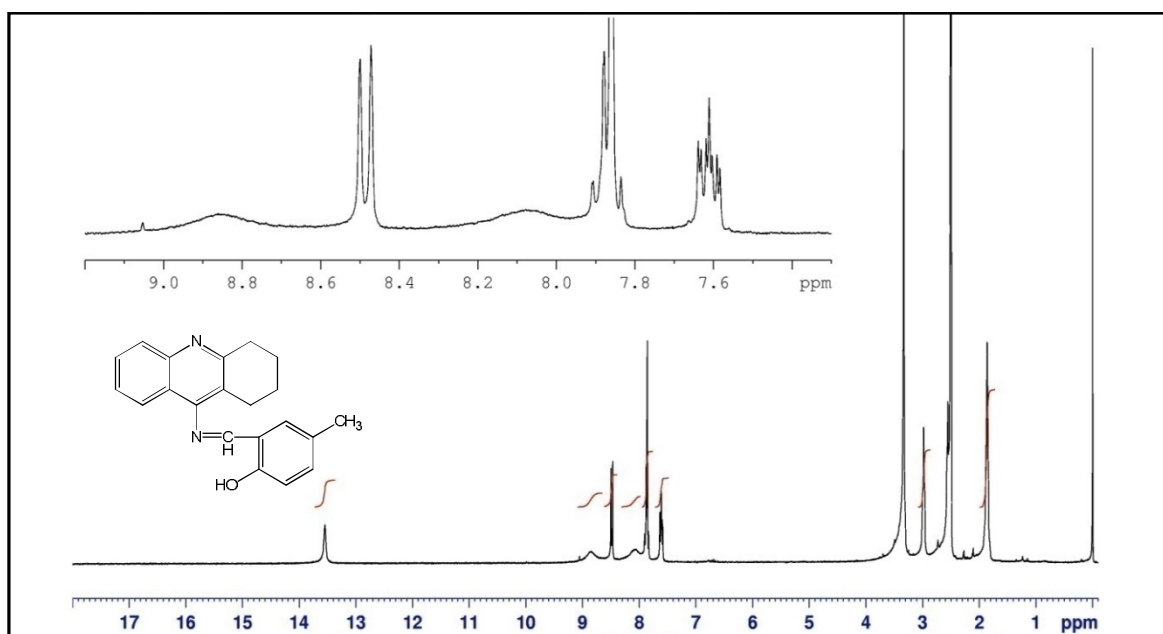


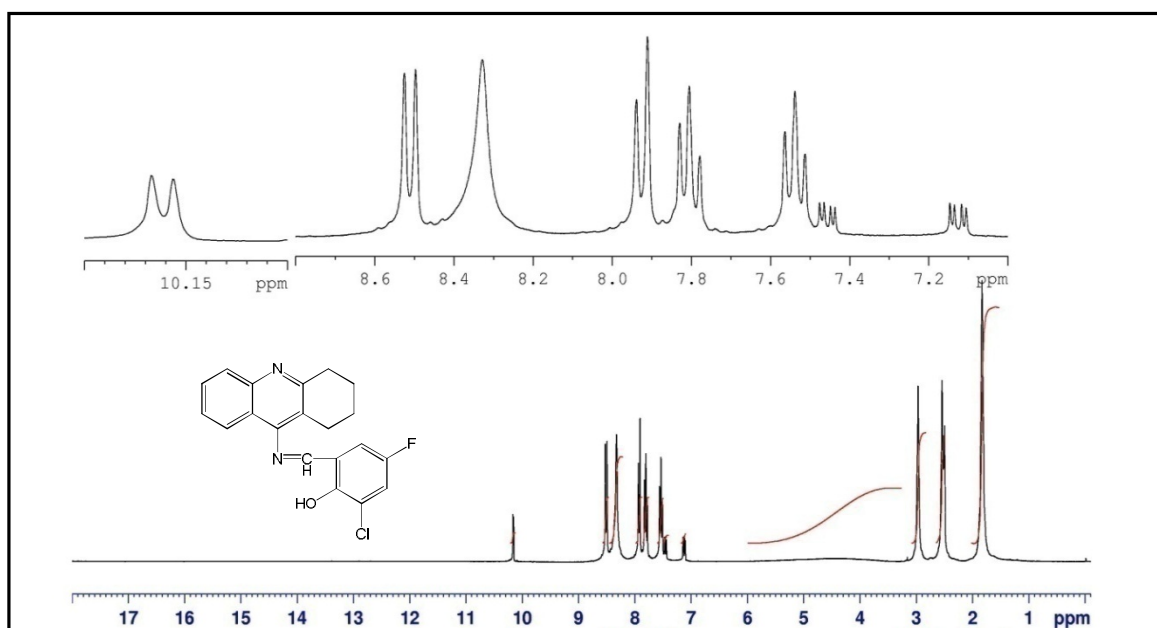
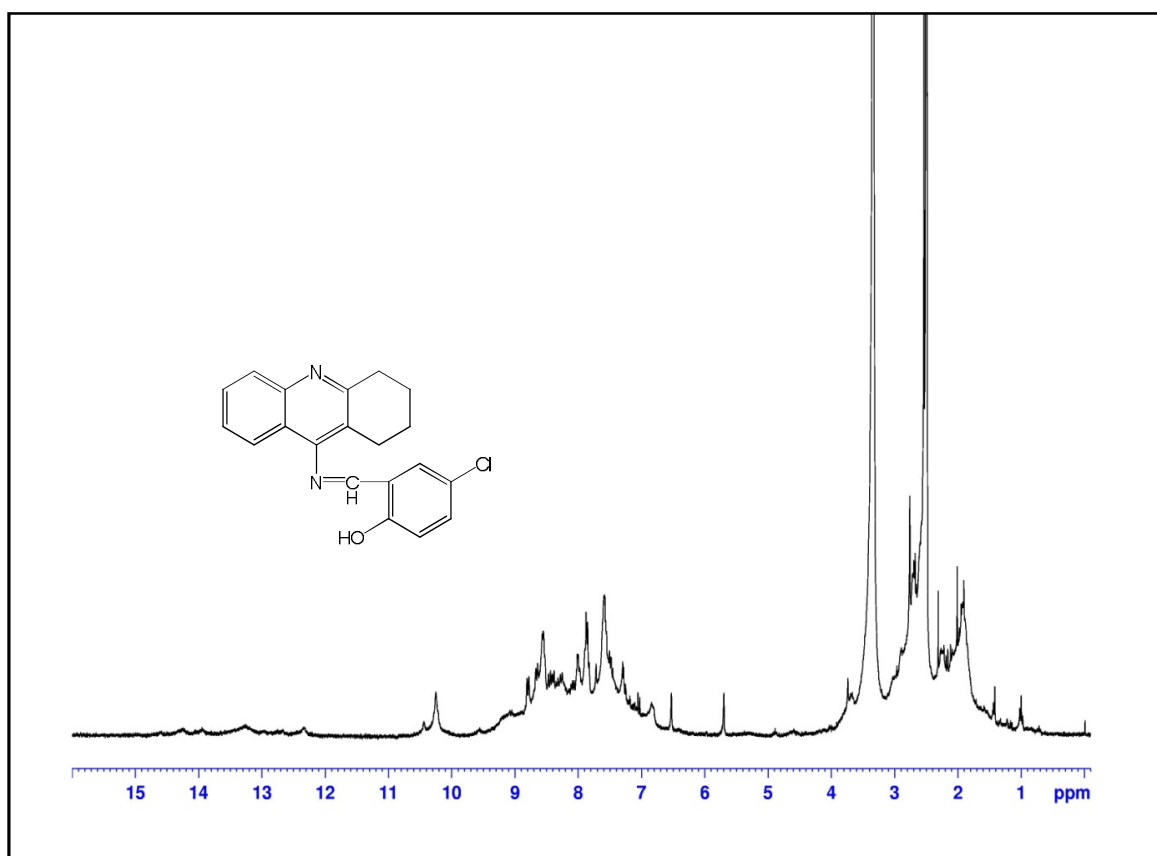
[T5ClS], FT-IR spektrumu

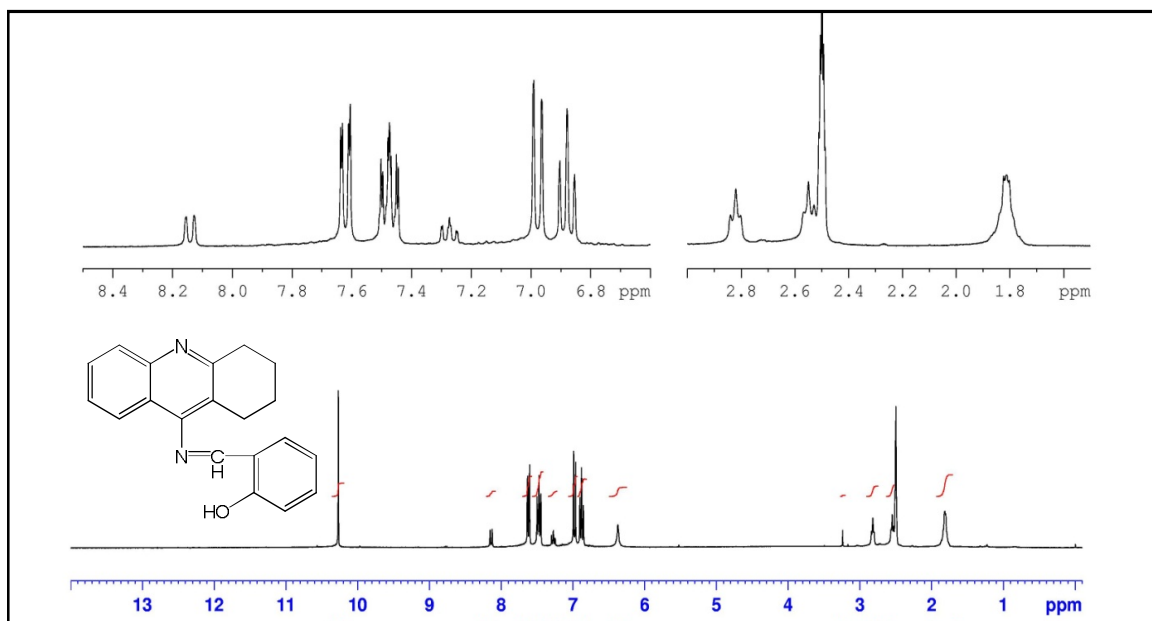


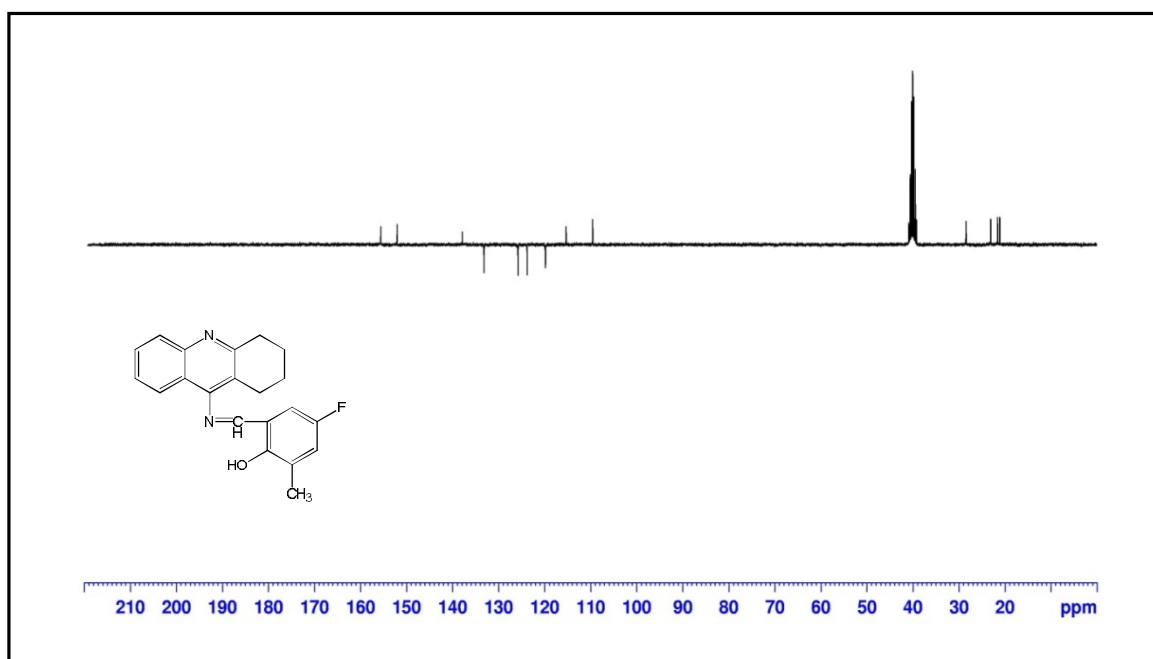
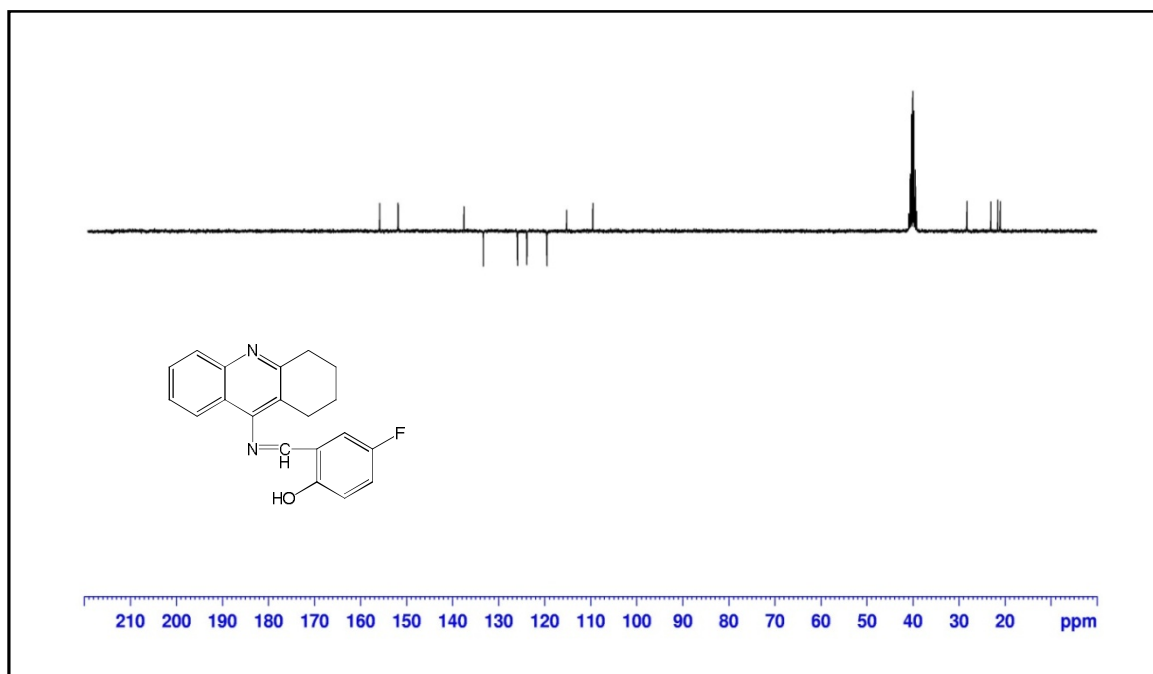
[TS], FT-IR spektrumu

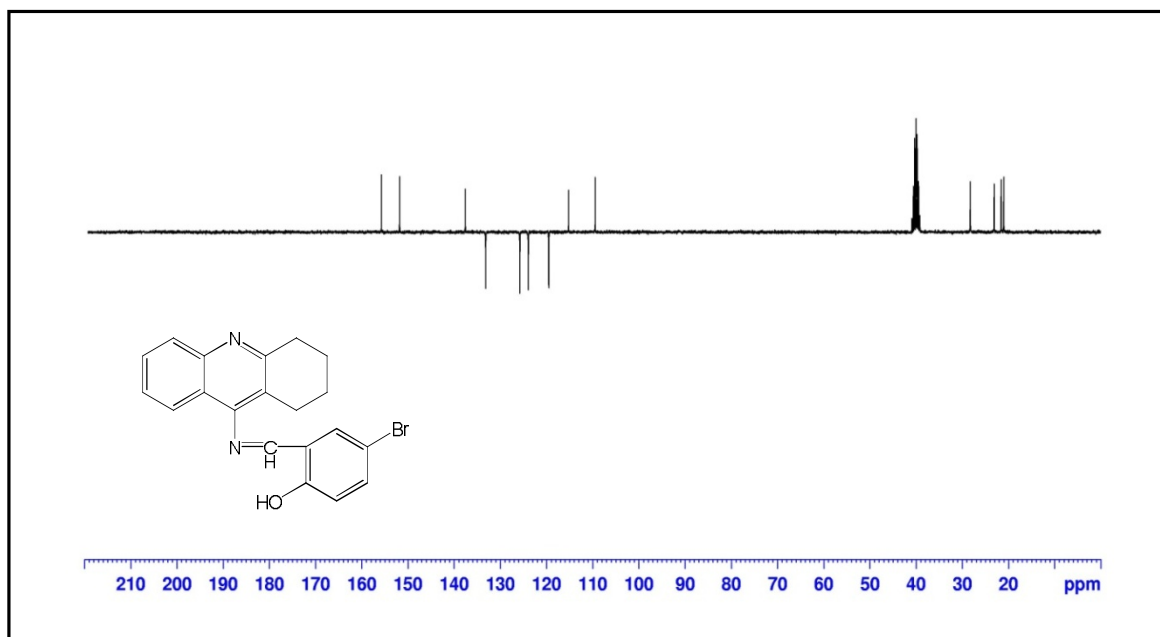
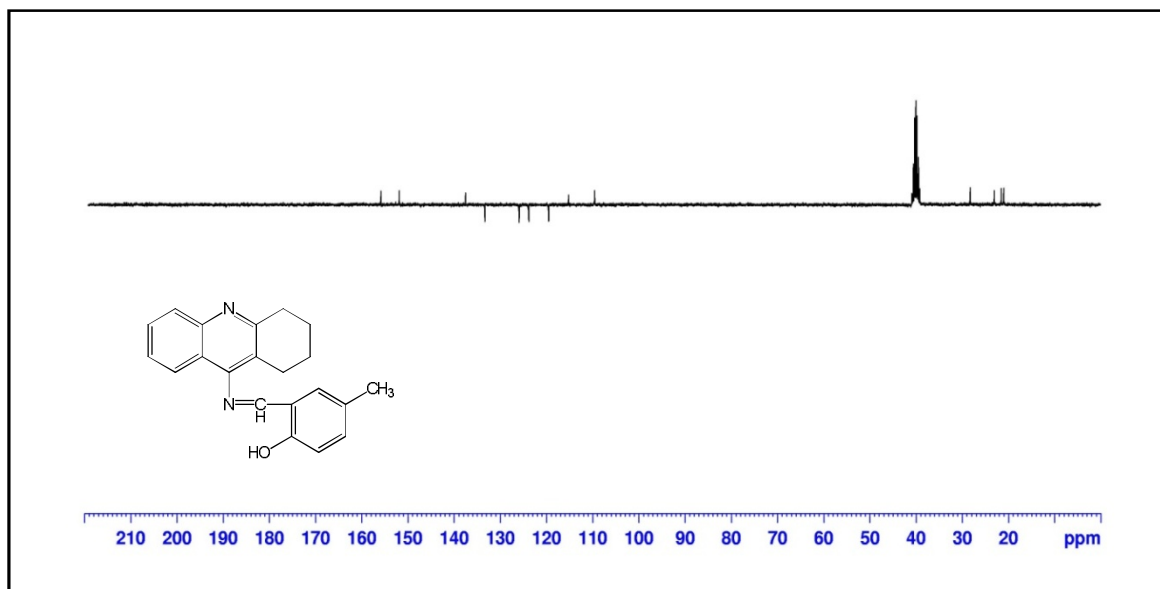
EK-3. ^1H -NMR spektrumları[T5F3MetS], ^1H -NMR spektrumu[T5FS], ^1H -NMR spektrumu

EK-3. (devam) ^1H -NMR spektrumları[T5BrS], ^1H -NMR spektrumu[T5MetS], ^1H -NMR spektrumu

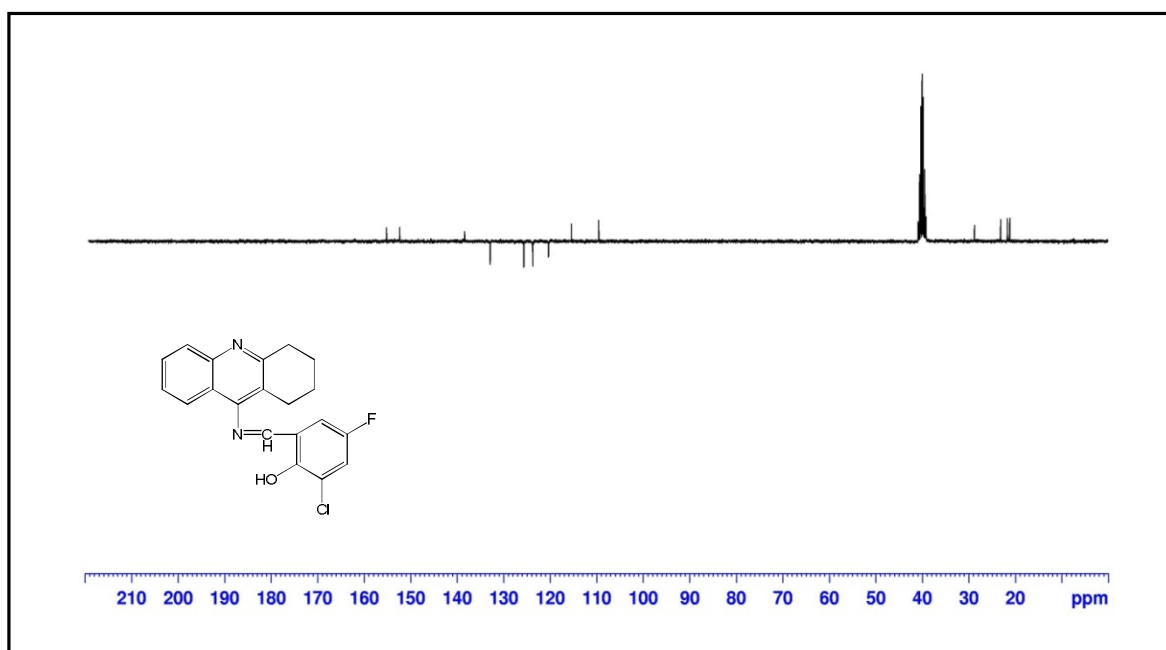
EK-3. (devam) ^1H -NMR spektrumları[T3Cl5FS], ^1H -NMR spektrumu[T5ClIS], ^1H -NMR spektrumu

EK-3. (devam) ^1H -NMR spektrumları[TS], ^1H -NMR spektrumu

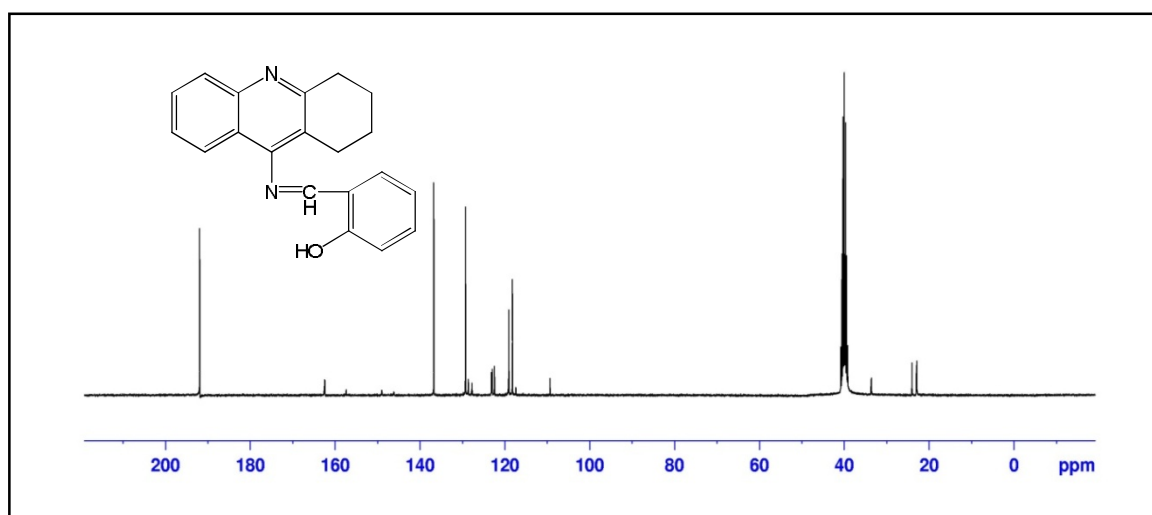
EK-4. ^{13}C -NMR spektrumları[T5F3MetS], ^{13}C -NMR spektrumu[T5FS], ^{13}C -NMR spektrumu

EK-4. (devam) ^{13}C -NMR spektrumları[T5BrS], ^{13}C -NMR spektrumu[T5MetS], ^{13}C -NMR spektrumu

EK-4. (devam) ^{13}C -NMR spektrumları

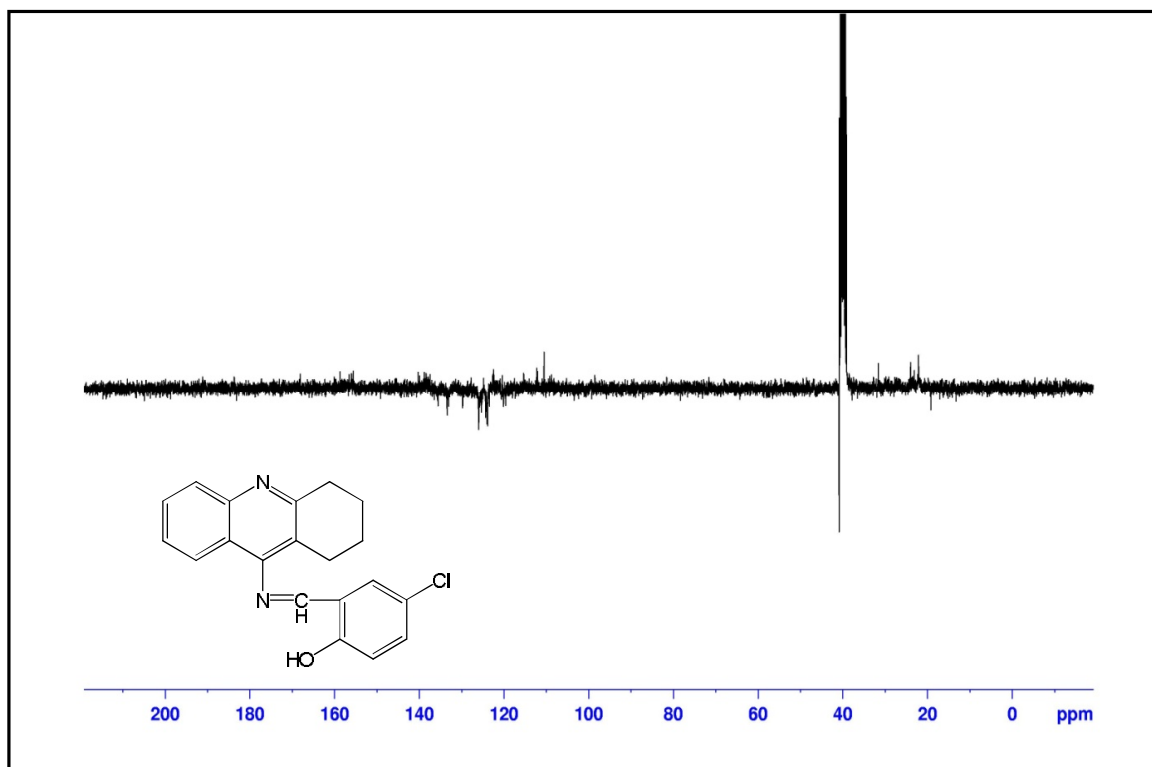


[T3Cl5FS], ^{13}C -NMR spektrumu



[TS], ^{13}C -NMR spektrumu

EK-4. (devam) ^{13}C -NMR spektrumları



[T5ClS], ^{13}C -NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı :AYNACI, Elif
 Uyuğu :T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :20.08.1985, Ankara
 e-mail :elif.aynaci@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya	2009
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya	2007
Lise	Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Aynacı E., Sarı, N., and Tümtürk, H., (2011). Immobilization of β -galactosidase on Novel Polymers Having Schiff Bases. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39, 259-266.

Erduran, V., Tümtürk, H., Aynacı, E., and Sarı, N., (2013). Immobilization of β -galactosidase on Polystyrene Microspheres Attached L-Alanine. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 50, 871-878.

Aynacı, E., Yaşar, A., and Arslan, F., (2014). An amperometric biosensor for acetylcholine determination prepared from acetylcholinesterase-choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 1028-1036.

Şimşek, Ş., Aynacı, E., and Arslan, F., (2015). An amperometric biosensor for L-glutamate determination prepared from L-glutamate oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, Early Online: 1-6.



GAZİ GELECEKTİR..