

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI İLETKEN POLİMER MODİFİYE ELEKTROTLARIN
HAZIRLANMASI ve dsDNA-İLAÇ ETKİLEŞİMİNİN
ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Gözde AYDOĞDU TİĞ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

21.12.2015

Gözde AYDOĞDU TİĞ

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI İLETKEN POLİMER MODİFİYE ELEKTROTLARIN HAZIRLANMASI ve dsDNA-İLAÇ ETKİLEŞİMİNİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Gözde AYDOĞDU TİĞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Bu tez çalışmasında nitrofurantoin ve gempitabin ilaçlarının çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimleri için polimer film temelli elektrotlar hazırlandı. Bu amaçla camı karbon elektrotlar (GCE) 5-amino-2-merkaptio-1,3,4 tiyadiazol (AMT) içeren 0,1 M H₂SO₄ veya 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA) içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanılarak dönüşümlü voltametri tekniği ile polimer filmlerle kaplandı. dsDNA, GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotlarının yüzeyine immobilize edildi. dsDNA immobilizasyon süresi ve derişimi optimize edildi. Nitrofurantoin ve gempitabin tayini, geliştirilen GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlar kullanılarak yapıldı. Nitrofurantoin'in dsDNA ile etkileşimi sonrası, dsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun nitrofurantoin için doğrusal çalışma aralığı 2,0–25,0 mg/L, teşhis sınırı 0,65 mg/L ve tayin alt sınırı 2,17 mg/L olarak bulundu. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun nitrofurantoin için doğrusal çalışma aralığı 1,0–20,0 mg/L, teşhis sınırı 0,309 mg/L ve tayin alt sınırı 1,03 mg/L olarak bulundu. Gempitabin'in dsDNA ile etkileşimi sonrası, dsDNA'nın guanin bazının yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun gempitabin için doğrusal çalışma aralığı 2,5–30,0 mg/L, teşhis sınırı 0,69 mg/L ve tayin alt sınırı 2,29 mg/L olarak bulundu. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun gempitabin için doğrusal çalışma aralığı 1,0–30,0 mg/L, teşhis sınırı 0,276 mg/L ve tayin alt sınırı 0,922 mg/L olarak belirlendi. dsDNA ile ilaç etken maddelerin etkileşim türlerini belirlemek için spektroskopik ve viskozite ölçümü yöntemleri kullanıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda, nitrofurantoin'in dsDNA'yla interkalasyon ve elektrostatik bağlanma ile gempitabin'in ise oluk bağlanması ile etkileştiği sonucuna varılabilir.

Aralık 2015, 164 sayfa

Anahtar kelimeler: dsDNA, Biyosensör, Nitrofurantoin, Gempitabin, Polimer film

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PREPARATION OF MODIFIED ELECTRODES BASED ON SOME CONDUCTING POLYMERS AND INVESTIGATION OF dsDNA-DRUG INTERACTIONS USING ELECTROCHEMICAL METHODS

Gözde AYDOĞDU TİĞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

In this thesis, the polymer film-based electrodes were prepared for the interaction between dsDNA and nitrofurantoin/gemcitabine. For this purpose, glassy carbon electrodes were coated with polymer films from 0.1 M H₂SO₄ media containing 5-amino-2-mercapto-1,3,4 thiadiazole (AMT) or 0.1 M KCl media containing 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDCA) by cyclic voltammetry technique. dsDNA was immobilized onto GCE/P(AMT) and GCE/P(PDCA) electrodes. The immobilization time and concentration of dsDNA were optimized. The determination of nitrofurantoin and gemcitabine was carried out using the developed GCE/P(AMT)/dsDNA and GCE/P(PDCA)/dsDNA electrodes. The interaction of nitrofurantoin with dsDNA exhibited a decrease in the oxidation signal of guanine. The GCE/P(AMT)/dsDNA electrode exhibited a linear working range, limit of detection and limit of quantification for nitrofurantoin 2.17–25.0 mg/L, 0.65 mg/L, 2.17 mg/L, respectively. It was determined the linear working ranges of GCE/P(PDCA)/dsDNA electrode to nitrofurantoin as 1.0–20.0 mg/L, limit of detection as 0.309 mg/L, and limit of quantification as 1.0 mg/L. The interaction of gemcitabine with dsDNA exhibited a decrease in the oxidation signal of guanine. The GCE/P(AMT)/dsDNA electrode exhibited a linear working range, limit of detection and limit of quantification for gemcitabine 2.5–30.0 mg/L, 0.69 mg/L, 2.29 mg/L, respectively. It was determined the linear working ranges of GCE/P(PDCA)/dsDNA electrode to gemcitabine as 1.0–30.0 mg/L, limit of detection as 0.276 mg/L and limit of quantification as 0.922 mg/L. In order to determine the interaction mode between dsDNA and drugs, spectroscopic and viscosity measurement methods were used. It can be concluded that nitrofurantoin can bind to dsDNA with intercalation and electrostatic binding mode and gemcitabine can bind to dsDNA via groove binding.

December 2015, 164 pages

Key Words: dsDNA, Biosensor, Nitrofurantoin, Gemcitabine, Polymer film

TEŞEKKÜR

Tez sürecimin her aşamasında bilimsel yönlendirme, rehberlik ve tartışmalarla beni yönlendiren ve her zaman destek olan saygıdeğer hocam ve değerli danışmanım Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya,

Tez çalışmalarım süresince bilgi, birikim ve önerileriyle beni yönlendiren saygıdeğer hocalarım ve Tez İzleme Komitesinin değerli üyeleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a ve Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Esmâ KILIÇ'a, Tez çalışmalarım sırasında bilgi birikimi ve deneyiminden yararlandığım değerli hocalarım, Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ZEYBEK'e ve Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK'e, Dr. Gülenem Günendi'ye ve laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma,

Her zaman sabrı ve anlayışı ile bana destek olan değerli eşim Sayın Baturay TİĞ'a, tüm yaşamım boyunca hem maddi hem de manevi olarak yanımda olan AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, “DNA-ilaç etkileşimlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin geliştirilmesi (12A4240003)” ve “İletken Polimer ve Nanoparçacık Modifiye Elektrotların Hazırlanması ve dsDNA-İlaç Etkileşiminin Elektrokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi (14L0430004)” konulu projeler tarafından desteklenmiştir.

Gözde AYDOĞDU TİĞ

Ankara, Aralık 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKLİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Biyosensörler	4
2.1.1 Biyosensörlerin bileşenleri ve fonksiyonu	5
2.1.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler	7
2.2 Elektrokimya ve Elektrokimyasal Hücre.....	9
2.2.1 Elektrokimyasal biyosensörler.....	14
2.2.2 Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan algılama sistemleri	14
2.3 Voltametri	15
2.3.1 Voltametrik tekniklerde kullanılan uyarma sinyalleri.....	19
2.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	23
2.5 Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri	25
2.6 Nükleik Asitler.....	27
2.6.1 Deoksiribonükleik asit	27
2.6.2 DNA bazlarının elektrokimyasal özellikleri	29
2.6.3 DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları.....	30
2.6.4 DNA veya Prob dizilerinin elektrot yüzeyine immobilizasyon yöntemleri.....	31
2.6.5 Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde dizi algılama yöntemleri	33
2.6.6 İlaç-DNA etkileşimlerinin elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması.....	37
2.6.7 İlaç-DNA etkileşimlerinin UV-Vis spektroskopisi ile incelenmesi	42
2.7 Nitrofurantoin İlacı ile İlgili Bilgiler	43
2.8 Gemsitabin İlacı ile İlgili Bilgiler.....	45
2.9 Kaynak Araştırması.....	48
2.9.1 Nitrofurantoin ile ilgili kaynak araştırması.....	48
2.9.2 Gemsitabin ile ilgili kaynak araştırması	49
2.9.3 AMT (5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadiazol) ile ilgili kaynak araştırması.....	49
2.9.4 PDCA (2,6-piridindikarboksilik asit) ile ilgili kaynak araştırması.....	52
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	55
3.1 Deneyde Kullanılan Araç ve Gereçler.....	55
3.1.1 Elektrokimyasal analiz cihazı	55
3.1.2 Hücre ve elektrotlar	55
3.1.3 Kullanılan diğer cihazlar	56
3.2 Deneyde Kullanılan Kimyasallar	56
3.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	58

3.4 Camı Karbon Elektrotların Temizlenmesi.....	59
3.5 Elektropolimerizasyon ile Modifiye Elektrotların Hazırlanması	60
3.5.1 Camı karbon elektrot yüzeyine poli-(5-amino-2-merkapt-1,3,4- tiyadiazol) (P(AMT)) kaplanması	60
3.5.2 Camı karbon elektrot yüzeyine poli-(2,6-piridindikarboksilik asit) (P(PDCA)) kaplanması.....	60
3.5.3 Dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) deneylerinin yapılışı.....	61
3.5.4 Biyosensör cevabına polimer film kalınlığının etkisi	62
3.6 Polimer Modifiye Elektrotlara dsDNA'nın İmmobilizasyonu İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi.....	62
3.6.1 dsDNA derişiminin etkisi.....	62
3.6.2 İmmobilizasyon süresinin etkisi.....	63
3.7 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi	64
3.7.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi.....	64
3.7.2 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde nitrofurantoin etkileşmesinin incelenmesi.....	64
3.7.3 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi.....	65
3.7.4 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde nitrofurantoin etkileşmesinin incelenmesi	65
3.7.5 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması	66
3.7.6 Nitrofurantoin için yapılan geri kazanım çalışmaları	66
3.7.7 Nitrofurantoin serum stok çözeltisi	67
3.8 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi.....	67
3.8.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in etkileşiminde etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi	67
3.8.2 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde gemsitabin'in etkileşmesinin incelenmesi	68
3.8.3 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in etkileşiminde etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi	68
3.8.4 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde gemsitabin'in etkileşmesinin incelenmesi	69
3.8.5 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltisine uygulanması	69
3.8.6 Gemsitabin için yapılan geri kazanım çalışmaları	69
3.8.7 Gemsitabin serum stok çözeltisi.....	70
3.9 GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA Elektrotlarının NFT/GEM ile Etkileşimlerine Çeşitli Türlerin Etkisinin İncelenmesi.....	70
3.10 UV-Vis Spektroskopisi ile İlgili Deneyler	71
3.11 Viskozite Ölçümleri.....	71
3.12 dsDNA-İlaç Etkileşimine NaCl Miktarının Etkisi	72
3.12.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in farklı derişimlerde NaCl içeren asetat tamponunda etkileşmesi	72
3.12.2 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in farklı derişimlerde NaCl içeren asetat tamponunda etkileşmesi	73

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	74
4.1 Polimer Film Kaplı Elektrotların Hazırlanması	74
4.1.1 P(AMT) kaplı camı karbon elektrotların hazırlanması.....	74
4.1.2 P(PDCA) kaplı camı karbon elektrotların hazırlanması	75
4.2 Polimer Film Kaplı Elektrotların Karakterizasyonları	77
4.2.1 IR spektrumları.....	77
4.2.2 SEM görüntüleri	79
4.2.3 Elektrokimyasal Karakterizasyonları.....	81
4.2.4 Polimer film kalınlıklarının optimizasyonu.....	89
4.3 dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile GCE/P(AMT)	
Elektrot Yüzeyinde Yükseltgenmesine İlişkin Bulgular	90
4.3.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum	
miktarının belirlenmesine ait bulgular	90
4.4 dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile GCE/P(PDCA)	
Elektrot Yüzeyinde Yükseltgenmesine Ait Bulgular	93
4.4.1 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum	
miktarının belirlenmesine ait bulgular	93
4.4.2 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum	
immobilizasyon süresinin belirlenmesi	95
4.5 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(AMT) Elektrot	
Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal	
Olarak İncelenmesine Ait Bulgular	96
4.5.1 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in	
optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular	96
4.5.3 GCE/P(AMT)/dsDNA–NFT etkileşimi için girişim etkisinin	
belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları	101
4.6 GCE/P(AMT)/dsDNA–NFT Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin	
Uygulamaları	103
4.6.1 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması ve geri kazanım	
çalışmaları	103
4.6.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda	
% geri kazanım çalışmaları	105
4.7 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(PDCA) Elektrot	
Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal	
Olarak İncelenmesine Ait Bulgular	106
4.7.1 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in	
optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular	106
4.7.2 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile etkileşen	
nitrofurantoin'in optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular	107
4.7.3 GCE/P(PDCA)/dsDNA–NFT etkileşimi için girişim etkisinin	
belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları	110
4.8 GCE/P(PDCA)/dsDNA–NFT Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin	
Uygulamaları.....	112
4.8.1 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması ve geri kazanım	
çalışmaları	112
4.8.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda	
% geri kazanım çalışmaları	114

4.9 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(AMT) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular	115
4.9.1 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular	115
4.9.2 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile etkileşen gemsitabin'in optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular	116
4.9.3 GCE/P(AMT)/dsDNA–GEM etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları.....	119
4.10 GCE/P(AMT)/dsDNA–GEM Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları.....	120
4.10.1 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltilerine uygulanması ve geri kazanım çalışmaları	120
4.10.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda %geri kazanım çalışmaları.....	122
4.11 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(PDCA) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular	123
4.11.1 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular	123
4.11.2 GCE/P(PDCA) elektroda adsorbe edilen dsDNA'nın gemsitabin ile derişime göre etkileşmesinin incelenmesine ait bulgular.....	124
4.11.3 GCE/P(PDCA)/dsDNA–GEM etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları	128
4.12 GCE/P(PDCA)/dsDNA–GEM Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları.....	129
4.12.1 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltilerine uygulanması ve geri kazanım çalışmaları	129
4.12.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda %geri kazanım çalışmaları	131
4.13 Spektroskopik Çalışmalar	132
4.13.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşiminin UV-Vis spektrofotometrisi ile incelenmesi	132
4.13.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşiminin UV-Vis spektrofotometrisi ile incelenmesi	134
4.14 Viskozite Ölçümü İle Yapılan Çalışmalar	135
4.14.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşiminin viskozluk ölçümü ile incelenmesi	135
4.14.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşiminin viskozluk ölçümü ile incelenmesi.....	137
4.15 NaCl Miktarının Etkisinin İncelenmesi	138
4.15.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşimine NaCl miktarının etkisinin incelenmesine ait bulgular	139
4.15.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşimine NaCl miktarının etkisinin incelenmesine ait bulgular	140
5. SONUÇ	141
KAYNAKLAR	146
ÖZGEÇMİŞ	161

SİMGELER DİZİNİ

dk	Dakika
M	molar
nM	nanomolar
mM	milimolar
sn	Saniye
pH	Hidrojen iyonu derişiminin eksi logaritması
Pt	Platin
R	Direnç
R_{et}	Yük transfer direnci
R_p	Polarizasyon direnci
R_s	Elektrolit çözelti direnci
W	W Warburg impedansı
Z	İmpedans
Z'	Gerçek impedans
Z''	Sanal impedans
η	Viskozite
μA	Mikroamper

Kısaltmalar

AMT	5-amino,2-merkapto-1,3,5 tiyadizaol
CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
dsDNA	Çift sarmal deoksiribonükleik asit
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FTIR	Fourier transform infrared
GCE	Camsı karbon elektrot
GEM	Gemsitabin
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
NFT	Nitrofurantoin
PDCA	2,6-piridindikarboksilik asit
P(AMT)	Poli-(5-amino,2-merkapto-1,3,5 tiyadizol)
P(PDCA)	Poli-(2,6-piridindikarboksilik asit)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV-Vis	Ultraviyole-görünür bölge

ŞEKLİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibi	5
Şekil 2.2	Biyosensörler ile tayin edilebilen analitler ve biyosensörlerde kullanılan biyobileşenler ve dönüştürücüler	6
Şekil 2.3	Biyosensörlerin biyoreseptör ya da dönüştürücü şekillerine göre sınıflandırılmaları	6
Şekil 2.4	Üçlü elektrot sistemi.....	10
Şekil 2.5	Voltametrde kullanılan çeşitli çalışma elektrotları	11
Şekil 2.6	(a) camısı karbon elektrot (b) camısı karbonun amorf yapısı.....	12
Şekil 2.7	Ag/AgCl elektrodun şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.8	Kütle taşınım yollarının şematik gösterimi	16
Şekil 2.9	Doğrusal taramalı voltamogram eğrisi.....	17
Şekil 2.10	Voltametrde kullanılan uyarma sinyalleri.....	19
Şekil 2.11	Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi	20
Şekil 2.12	Pt elektrot yüzeyinde ferro/ferrisiyanür redoks çiftinin dönüşümlü voltamogramı	20
Şekil 2.13	Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri	22
Şekil 2.14	Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu ve yöntem parametreleri.....	23
Şekil 2.15	Nyquist eğrisiyle gösterilen impedans spektrumu ve eşdeğer devre.....	24
Şekil 2.16	DNA yapısını oluşturan nükleotit birimi.....	27
Şekil 2.17	DNA'nın yapısındaki pürin ve pirimidin bazları	28
Şekil 2.18	DNA molekülünün şeker-fosfat omurgasını oluşturan fosfodiester bağları ...	28
Şekil 2.19	DNA sarmalı üzerinde oluşan oluklar	29
Şekil 2.20	Guanin bazının elektrokimyasal yükseltgenmesi (Wang vd. 2001).....	30
Şekil 2.21	Adenin bazının elektrokimyasal yükseltgenmesi (Wang vd. 2001).....	30
Şekil 2.22	DNA hibridizasyonu	31
Şekil 2.23	İnterkalatör madde ile DNA dizi algılanması	35
Şekil 2.24	Guanin bazıyla etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılanması	36
Şekil 2.25	İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi	37
Şekil 2.26	Distamisin ve netropsin'in molekül formülleri	38
Şekil 2.27	Distamisin'in DNA çift sarmalının küçük oluğuna bağlanması	39
Şekil 2.28	İnterkalasyon bağlanmasının gösterimi.....	40
Şekil 2.29	Nitrofuranton'in kimyasal yapısı	44
Şekil 2.30	Gemsitabin'in ve Sitidin'in kimyasal yapısı	46
Şekil 2.31	AMT'nin elektropolimerizasyonu için önerilen mekanizma	50
Şekil 3.1.a.	Ölçüm işlemlerinde kullanılan hücre standı ve b. üçlü elektrot sistemini içeren çalışma hücresi.	55
Şekil 3.2	Ubbelohde viskozimetresi	72
Şekil 4.1	AMT monomerinin kimyasal formülü	74

Şekil 4.2	1,0 mM AMT içeren 0,1 M H ₂ SO ₄ çözeltisinde (–0,2 V)–(+1,7 V) potansiyel aralığında, 50 mV s ^{–1} tarama hızında, 15 döngü ile elde edilen çok döngülü voltamogramı	75
Şekil 4.3	PDCA monomerinin kimyasal formülü	76
Şekil 4.4	1,0 mM PDC içeren 0,1 M KCl çözeltisinde (0,0 V)–(+2,0 V) potansiyel aralığında, 60 mV s ^{–1} tarama hızında, 18 döngü ile elde edilen çok döngülü voltamogramı	76
Şekil 4.5.a.	AMT monomeri ve b. P(AMT) filmin FTIR spektrumları	78
Şekil 4.6.a.	PDCA monomeri ve b. P(PDCA) filmin FTIR spektrumları.....	79
Şekil 4.7.a.	BGCE, ve b,c,d GCE/P(AMT) elektrotlarına ait SEM fotoğrafları	80
Şekil 4.8.a	BGCE ve b,c GCE/P(PDCA) elektrotlarına ait SEM fotoğrafları	81
Şekil 4.9	BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s ^{–1})	82
Şekil 4.10	(a) BGCE, (b) GCE/P(AMT) ve (c) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri.....	83
Şekil 4.11	(a) GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 6,8) dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s ^{–1})	84
Şekil 4.12	(a) GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 6,8) Nyquist eğrileri	85
Şekil 4.13.a.	GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve b. GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl + HCl çözeltisindeki (pH 4,8) dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s ^{–1}).....	86
Şekil 4.14	(a) GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl + HCl çözeltisindeki (pH 4,8) Nyquist eğrileri	86
Şekil 4.15.a.	BGCE, b. GCE/P(PDCA) ve c. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s ^{–1})	87
Şekil 4.16.a.	BGCE, b. GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve c. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3–/4–} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 4,8) Nyquist eğrileri	88
Şekil 4.17	Guanin yükseltgenme sinyaline P(AMT) film kalınlığının etkisi.....	89
Şekil 4.18	Guanin yükseltgenme sinyaline P(PDCA) dfilm kalınlığının etkisi	90
Şekil 4.19	pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri	91
Şekil 4.20	0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri...91	

Şekil 4.21	20,0 mg/L dsDNA'nın 3; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; dakika değişen sürelerde adsorbe edilmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	92
Şekil 4.22	pH 4,8 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri	94
Şekil 4.23	0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	94
Şekil 4.24	40,0 mg/L dsDNA'nın 3; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 40 dakika değişen sürelerde adsorbe edilmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	95
Şekil 4.25	20,0 mg/L dsDNA ile 25,0 mg/L nitrofurantoin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	96
Şekil 4.26	20,0 mg/L dsDNA ile; 0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 mg/L nitrofurantoin'in etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri.	98
Şekil 4.27	20,0 mg/L dsDNA ile 120 saniye boyunca nitrofurantoin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	99
Şekil 4.28	NFT derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge.....	99
Şekil 4.29	GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodunun 25,0 mg/L NFT için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları.....	102
Şekil 4.30	GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun depolama kararlılığı (0,5 M ABS pH 4,8)	103
Şekil 4.31	40,0 mg/L dsDNA ile 20,0 mg/L nitrofurantoin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri	106
Şekil 4.32	40,0 mg/L dsDNA ile nitrofurantoin'in farklı derişimlerde (sırası ile 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri.	108
Şekil 4.33	40,0 mg/L dsDNA ile 120 saniye boyunca nitrofurantoin'in 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	108
Şekil 4.34	NFT derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge	109
Şekil 4.35	GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun 20,0 mg/L NFT için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları.....	111
Şekil 4.36	GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun depolama kararlılığı (0,5 M ABS pH 4,8)	112

Şekil 4.37	20,0 mg/L dsDNA ile 30,0 mg/L gempitabin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	115
Şekil 4.38	20,0 mg/L dsDNA ile gempitabin'in farklı derişimlerde (sırası ile 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri.	117
Şekil 4.39	20,0 mg/L dsDNA ile 90 saniye boyunca gempitabin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	117
Şekil 4.40	GEM derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge	118
Şekil 4.41	GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodunun 30 mg/L GEM için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları.....	120
Şekil 4.42	40,0 mg/L dsDNA ile 30,0 mg/L gempitabin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	123
Şekil 4.43	40,0 mg/L dsDNA ile gempitabin'in (sırası ile 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerde) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri.	125
Şekil 4.44	40,0 mg/L dsDNA ile 90 saniye boyunca gempitabin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.	126
Şekil 4.45	Guanin pik akımı ile GEM derişiminin doğrusal olduğu bölge.....	126
Şekil 4.46	GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun 30,0 mg/L GEM için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz and (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları.....	129
Şekil 4.47	Nitrofurantoin'in (20 mg/L) dsDNA yokluğunda ve 5,0–40,0 mg/L derişimde dsDNA varlığındaki UV-Vis spektrumları.....	133
Şekil 4.48	Gempitabin'in (30,0 mg/L) dsDNA yokluğunda ve 5,0–40,0 mg/L derişimde dsDNA varlığındaki UV-Vis spektrumları.....	135
Şekil 4.49	dsDNA'nın bağıl viskozitesine 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L NFT derişiminin etkisi (25± 0,1°C, 0,5 M ABS pH 4.8 (20,0 mM NaCl)	136
Şekil 4.50	dsDNA'nın bağıl viskozitesine 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 ve 40,0 mg/L GEM derişiminin etkisi (25± 0,1 °C, 0,5 M ABS pH 4.8 (20,0 mM NaCl)).....	138
Şekil 4.51	NFT–dsDNA etkileşimine NaCl derişiminin (2,5–50,0 mM) etkisi (NFT=10,0 mg/L, dsDNA=20,0 mg/L).....	139
Şekil 4.52	GEM–dsDNA etkileşimine NaCl derişiminin (2,5–30,0 mM) etkisi (GEM=30,0 mg/L, dsDNA=40,0 mg/L).	140

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar	57
Çizelge 3.2 AMT için elektropolimerizasyon koşulları	60
Çizelge 3.3 PDCA için elektropolimerizasyon koşulları	61
Çizelge 4.1 BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 1,0 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mV s ⁻¹).	82
Çizelge 4.2 BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (Tarama hızı 50 mV s ⁻¹).	88
Çizelge 4.3 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotta DPV ile NFT'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler	
Çizelge 4.4 NFT içeren Pyelosepthyl [®] kapsüllerinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(AMT)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları.....	104
Çizelge 4.5 NFT içeren Pyelosepthyl [®] kapsüllerinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları ...	104
Çizelge 4.6 NFT içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları	105
Çizelge 4.7 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotta DPV ile NFT'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler	110
Çizelge 4.8 NFT içeren Pyelosepthyl [®] kapsüllerinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(PDCA)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları.....	113
Çizelge 4.9 NFT içeren Pyelosepthyl [®] kapsüllerinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları	113
Çizelge 4.10 NFT içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları	114
Çizelge 4.11 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotta DPV ile GEM'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler	119
Çizelge 4.12 GEM içeren Gemful [®] enjeksiyon çözeltisinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(AMT)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları.....	121
Çizelge 4.13 GEM içeren Gemful [®] enjeksiyon çözeltisinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları.....	121
Çizelge 4.14 GEM içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları	122
Çizelge 4.15 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotta DPV ile GEM'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler	127
Çizelge 4.16 GEM içeren Gemful [®] enjeksiyon çözeltisinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(PDCA)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları.....	130
Çizelge 4.17 GEM içeren Gemful [®] enjeksiyon çözeltisinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları.....	130

Çizelge 4.18 GEM içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları	131
--	-----

1. GİRİŞ

Yeni ilaçların keşfedilmesi ile ilgili olarak yapılan biyolojik çalışmalarda, DNA-ilac etkileşimlerinin oldukça önemli bir yeri vardır. Gen ekspresyonu ve ilaç-protein etkileşimlerini inceleyen araştırma laboratuvarlarında DNA-parmak izi, filter bağlama, jel hareketlilik geçişi ve floresans temelli birçok tayin yöntemi kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin hepsi indirekt ve kesikli sistemlerdir ve bunlarla çalışılırken çeşitli etiketleme stratejilerine gerek duyulmaktadır. Yeni ilaçlar bulunması ve bunların onaylanması amacıyla ilaç-protein ve DNA etkileşimlerinin analizleri için hızlı, sürekli, fazla veri sağlayabilen ve düşük maliyeti tekniklere gereksinim vardır.

Biyosensörler, biyokimyasal tepkimelerde hedef analitleri tayin etmek amacıyla kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Biri fizikokimyasal diğeri biyokimyasal olmak üzere iki sistemin biraraya gelmesiyle oluşurlar. Biyokimyasal kısım, analizi yapılacak maddeyle seçimli olarak etkileşerek tanıma olayını sağlarken, elektrokimyasal kısım bu tanıma olayını sayısal bir veriye dönüştürür. Biyosensör teknolojisi tıp, eczacılık, ziraat, gıda sektörü, çevresel kirlilik analizi gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır.

Biyolojik tanı materyali olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörü (genosensör) denir. Son yıllarda biyosensör tasarımında nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeylerinin kullanılması yaygınlaşmış ve çip teknolojisine yönelik genosensör tasarım çalışmaları oldukça hızlanmıştır. Kalıtsal veya bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaç etken maddelerinin DNA ile etkileşmesi ve bu etkileşmenin yeni yöntemlerle tayin edilmesi; bu hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik yeni ilaç tasarımlarında merkezi rol oynamaktadır. Bu çalışmalar daha etkili ilaçların dizayn edilmesinde ve daha az yan etki oluşturacak hedefe özel ilaçların geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir.

DNA biyosensörleri, bazı ilaç ya da maddelerin DNA'ya olan etkilerinin aydınlatılmasına, miktar tayinine, bu maddelerin etkileşim mekanizmalarının incelenerek belirlenmesine, nokta mutasyonların tayinine ya da genetik ve bulaşıcı

hastalıkların hızlı bir şekilde teşhis edilmesine yönelik olarak kullanılabilir (Erdem vd. 1999, Ozkan vd. 2002, Erdem ve Ozsoz 2002, Kara vd. 2007). Tayinler, DNA bazlarından birinin yükseltgenme sinyalindeki değişikliklerden yapılabileceği gibi, DNA bazlarından en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün ya da interkalatörünün yükseltgenme veya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden yola çıkılarak da yapılabilir (Kara vd. 2002a, Bo vd. 2011).

Çevresel kirlilik ajanları ve toksik moleküller gibi bazı maddelerin çift sarmal DNA ile interkalasyon, baza seçimli bağlanma gibi yollarla etkileşimi sonucu oluşan ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımları geliştirilmiştir. Bir kimyasal maddenin veya metabolitin DNA ile etkileşimi sonrasında DNA’da oluşabilecek yan ürünlerin kısa zamanda tayini kanser gibi hastalıkların araştırmaları için çok önemlidir. Bununla birlikte çeşitli kronik ve metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların DNA ile etkileşiminin incelenmesi kişiye özgü ilaç tasarımının önünü açmaktadır.

Elektrokimyasal tayin, ilaç etken maddesi-DNA etkileşimi sonucunda çalışmanın türüne göre elde edilen madde sinyali ya da DNA’daki bir bazın sinyalindeki artma veya azalmaya bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş karbon pasta elektrotlar (CPE), camı karbon elektrotlar (GCE), perde baskılı karbon elektrotlar (SPCE), altın elektrotlar (AuE), platin elektrotlar (Pt) ve kalem grafit elektrotlar (PGE) incelenen maddelerin çok düşük derişimlerinde bile doğru ve güvenilir ölçümleri sağlamaktadır.

Çalışma elektrotlarını modifiye etmek amacıyla kullanılan iletken polimerler, elektriksel, termal, çevresel, optik, kimyasal, biyolojik özellikleri, kolay hazırlanmaları ve geniş uygulama potansiyelleri nedeniyle, son yıllarda bilimsel ve teknolojik alanda çok fazla dikkat çekmektedir (Gerard vd. 2002).

Biyosensör yapımında elektrokimyasal olarak sentezlenen polimerler, hem biyosensörlerin hızını, duyarlılığını ve seçiciliğini geliştirirler hem de biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun matriks ortamı oluştururlar. Klinik, çevre, tarım ve biyoteknolojik açıdan önemli olan analitleri ölçmek için iletken polimer

temelli pek çok biyosensör geliştirilmiştir (Gerard vd. 2002, Vidal vd. 2003). Son yıllarda DNA biyosensörlerinde fonksiyonel uç gruba sahip ve elektrokimyasal olarak sentezlenmiş polimerlerin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Cha vd. 2003, Gu vd. 2005, Peng vd. 2007, Feng vd. 2011, Sui vd. 2013). Bu polimerlerin $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$ gibi fonksiyonel grupları DNA'nın bağlanması için uygun bir matriks ortamı sağladığı bildirilmiştir (Peng vd. 2009, Rahman vd. 2015).

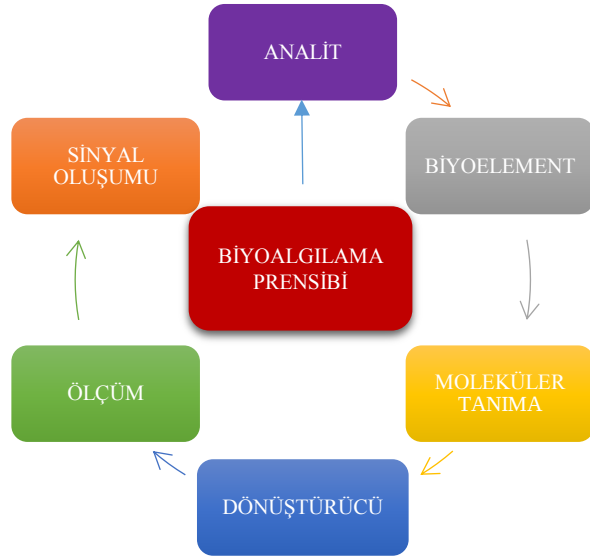
Bu tez çalışmasında, antibakteriyel ilaç olan nitrofurantoin ve antikanser ilaç olan gempitabin'in tayini için polimer film kaplı elektrotlar kullanılarak iki farklı DNA biyosensörü geliştirilmesi amaçlandı. Bunun için 5-amino-2-merkaptio-1,3,4 tiyadiazol (AMT) ve 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA) içeren monomer çözeltileri kullanılarak camsı karbon elektrotlar üzerine elektropolimerizasyon yolu ile polimer filmler kaplandı. Hazırlanan polimer modifiye camsı karbon elektrotlara dsDNA immobilize edildi. Polimer film kaplı elektrotların yüzeyinin yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve FTIR spektroskopik yöntemi ile aydınlatıldı. Daha sonra dsDNA immobilizasyonu için en uygun çalışma koşulları belirlendi. İlaç aktif maddelerin dsDNA ile etkileşiminde en uygun etkileşim süreleri ve doğrusal çalışma aralıkları elde edildi. İlaç aktif maddelerinin tayini için diferansiyel puls voltametrisi kullanılarak guanin yükseltgenme sinyalindeki değişiklikler incelendi. İlaç etken maddelerin dsDNA ile etkileşim türleri hakkında yorum yapmak amacıyla diferansiyel puls voltametrisinin yanında UV-Vis spektroskopisi ve viskozite ölçümü deneyleri yapıldı. Ayrıca ilaç-dsDNA etkileşimine ortamdaki NaCl derişimin etkisi de incelendi. Çalışmanın son kısmında ise nitrofurantoin ve gempitabin içeren ilaçların ticari preparatlarında ve serum ortamlarında tayinin yapıp yapılamayacağı araştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyosensörler

Biyosensörler biyolojik bir tanı molekülü (biyoelement) ile fizikokimyasal dönüştürücünün (transduser) bir araya gelmesiyle oluşan ve çeşitli analitlerin kantitatif tayinleri için kullanılan cihazlardır (Thévenot vd. 2001). Klinik analizler, eczacılık, tarım, gıda, çevresel ve endüstriyel kirliliğin analizi gibi değişik alanlarda kullanılan biyosensörlerde, biyoelement, genellikle analit derişimi ile ilgili bilgileri, tayin edilebilen bir duyarlılıkla, kimyasal ya da fiziksel sinyale çevirir. Biyosensörün diğer bir kısmı olan transduser ise tanıma sisteminden alınan bilgileri ölçülebilir bir sinyal haline dönüştürür. Biyosensörün transduser kısmı genellikle, dedektör, sensör ya da elektrot olarak adlandırılabilir (Thévenot vd. 2001). Biyosensörlerin temel hedefi, örnek içinde bulunan bir analitin derişimi ile doğru orantılı bir elektriksel sinyal elde etmektir (Thévenot vd. 2001, Chaubey ve Malhotra 2002, Luong vd. 2008)

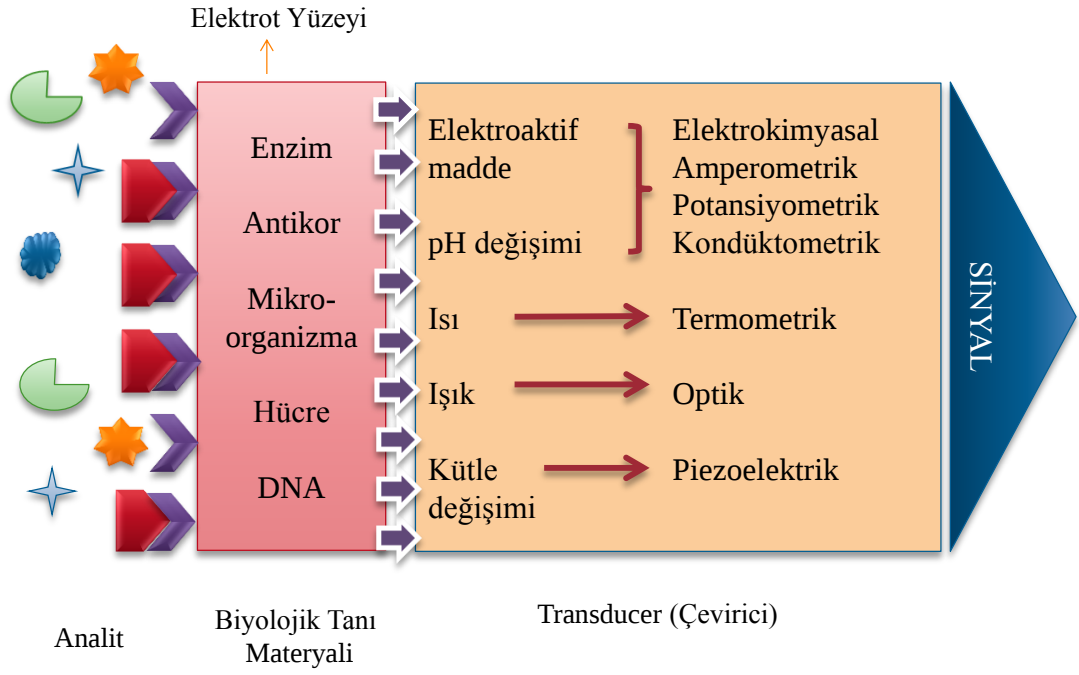
Bir biyosensörün çalışma prensibi kısaca şöyledir; algılama kısmından sorumlu olan biyoelementin (biyoreseptör) analit ile etkileşimi sonrası bir tanıma olayı gerçekleşir. Bu tanıma olayı transduser tarafından ölçülebilir bir elektronik sinyale çevrilir. Eğer biyoelement analite bağlanıyor fakat kimyasal bir dönüşüm olayı gerçekleşmiyorsa bu tip sensörler afinite sensörleri olarak adlandırılır. Etkileşim sonrası kimyasal bir değişim oluyorsa bu tip sensörler ise katalitik sensörler adını almaktadır. şekil 2.1’de bir biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibi gösterilmiştir (Karunakaran vd. 2015).



Şekil 2.1 Biyosensörün bileşenleri ve çalışma prensibi

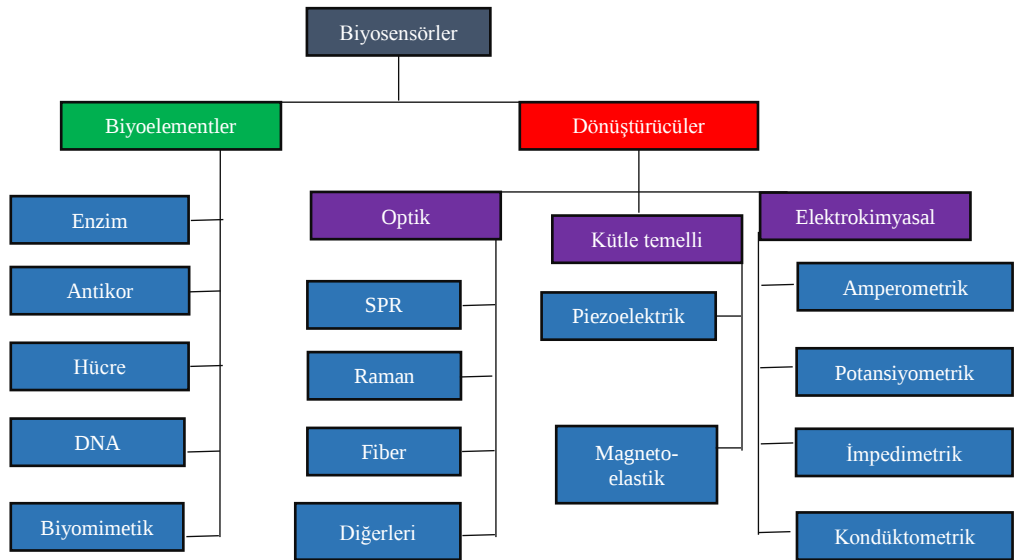
2.1.1 Biyosensörlerin bileşenleri ve fonksiyonu

Biyosensörler, biyolojik özgüllük mekanizmalarına ya da fizikokimyasal sinyal dönüşümüne göre sınıflandırılabilirler. Biyosensörlerin biyolojik bileşeni, katalitik ve katalitik olmayan olmak üzere iki ayrı gruba ayrılır. Katalitik grup enzimleri, mikroorganizmaları ve dokuları içerirken, katalitik olmayan biyolojik bileşenler antikoları, reseptörleri ve nükleik asitleri (DNA, RNA) içerir. Biyosensörler analitlerin tayini için kullanılan dönüştürücülere göre de genel olarak elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, kolorimetrik ve piezoelektrik esaslı dönüştürücüler olarak sınıflandırılabilirler (Sharma vd. 2003). Biyosensörlerle tayin edilebilen analit türleri, kullanılan biyobileşenler ve dönüştürücüler şekil 2.2’de özetlenmiştir:



Şekil 2.2 Biyosensörler ile tayin edilebilen analitler ve biyosensörlerde kullanılan biyobileşenler ve dönüştürücüler

Biyosensörler genellikle biyoelement ya da dönüştürücü türlerine göre sınıflandırılır. Biyosensörlerin biyoelement ya da dönüştürücü şekillerine göre sınıflandırılmaları şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Biyosensörlerin biyoreseptör ya da dönüştürücü şekillerine göre sınıflandırılmaları

Biyobileşenler ya da biyolojik tanıma elemanları biyosensör teknolojileri için en önemli bileşenlerden biridir (Eggins 2008). Biyoelement sensörün tanıma sisteminde yer alır ve hedef analite yönelir. Sensör yüzeyinde yer alarak analitin bağlanmasından sorumludur. Biyoelementler genellikle enzim, antikor/antijen, nükleik asit/DNA, hücre ve biyomimetik olmak üzere beş ana sınıfa ayrılırlar.

Dönüştürücüler biyotanıma sinyalini okunabilir elektrik sinyallerine çeviren biyosensör bileşenleridir. Bu tayin edilebilir sinyaller elektrokimyasal (potansiyometri, kondüktometri, impedimetri, amperometri, voltametri), optik (kolorimetri, florimetri, lüminesans, interferometri), kalorimetrik (termistör), kütle değişimi (piezoelektrik/akustik dalga) ya da manyetik olabilir (Grieshaber vd. 2008). Biyosensörlerde kullanılmak üzere pek çok yeni dönüştürücü geliştirilmesine rağmen, elektrokimyasal dönüştürücüler kullanım kolaylığı, taşınabilirliği, düşük maliyetli olmalarından dolayı hasta başı testlerinde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (Eggins 2008).

2.1.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

Seçicilik: Analizi yapılacak maddenin numunede girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. İdeal bir biyosensör, yalnızca hedef analitin derişimindeki değişikliklere cevap vermeli ve girişim yapabilecek türlerden etkilenmemelidir. Biyosensör çalışmalarında özellikle biyolojik ortamda bulunan türlerin girişim etkisini belirlemek amacıyla yapılır. Seçiciğin yüksek olması yöntemin doğruluğunun, kesinliğinin ve doğrusallığının da yüksek olduğunu gösterir.

Yüksek duyarlılık: Duyarlılık, biyosensör cevabının analit derişimindeki değişim ile doğrusal olması ile ifade edilir ve elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğiminden hesaplanır. İdeal bir biyosensörün duyarlılığı yüksek olması istenir.

Kararlılık: Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için en önemli unsurlardan birisidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına

bağlıdır. Kararlılığın yüksek olması aynı biyosensör ile çok sayıda analizin yapılabilmesi sağlanır ve böylece maliyet azaltılır.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensörde, elektrodun aynı şartlarda ve ardışık yapılan ölçümlerde alınan sonuçlarının kesinliğinin bir ifadesidir. Elde edilen ölçüm sonuçlarının % bağıl standart sapması (BSS) olarak hesaplanır. Bir biyosensör için yapılan tekrarlanabilirlik çalışması doğru ve güvenilir bir analiz için gereken en önemli parametrelerden birisidir.

Tekrar üretilebilirlik: Optimum koşullarda aynı şekilde hazırlanan farklı elektrotların birbiri arasındaki uyumu gösterir ve ölçüm sonuçlarının kesinliğinin bir ölçüsüdür. Tekrar üretilebilirliğin analiz sonuçları % BSS olarak verilir.

Kullanım ömrü: Hazırlanan biyosensörün çalışma periyodu boyunca, performansını korunması yeteneğidir. Yapılan ölçüm sayısının fazla olması ve ölçümlerin sık yapılması ömrü kısaltan etkenlerdendir. Biyosensörler biyomolekülün aktivitesinin korunması için buzdolabında saklanmalıdırlar.

Hızlı yanıt süresi: Cevap süresi kararlı hal akımlarının %90-95'ine ulaşması için geçen süre olarak tanımlanabilir. İdeal bir biyosensörün analite hızlı cevap vermesi istenir.

Doğrusal çalışma aralığı: Biyosensör uygulamalarında çalışma aralığı olarak adlandırılan bölge analit derişimine karşı çizilen akım değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile elde edilen eğrinin doğrusal olduğu derişim aralığıdır. İdeal bir biyosensörde geniş doğrusal çalışma aralığının olması beklenir.

Teşhis sınırı (TS, LOD) ve tayin alt sınırı (TAS, LOQ):

Substrat derişimine karşı akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon eğrisi elde edilir ve bu eğriden doğrusal derişim aralığı belirlenir. Teşhis sınırı analizi yapılan örneğin gözleendiği fakat nicel sınırlara girmeyen en alt derişimdir. Cevabın standart

sapması ve kalibrasyon eğrisinin eğimi kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır:

$$TS(LOD) = 3,3 \times s / m$$

Standart sapma (s) değeri kör çözeltilerde en az 5 kez ölçülen değerlerin standart sapması, m değeri ise çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

Tayin alt sınırı analitin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru bir şekilde miktarının tayin edilebildiği kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişimdir. Hesaplama yolu ile yapılan deneylerde aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$TAS(LOQ) = 10 \times s / m$$

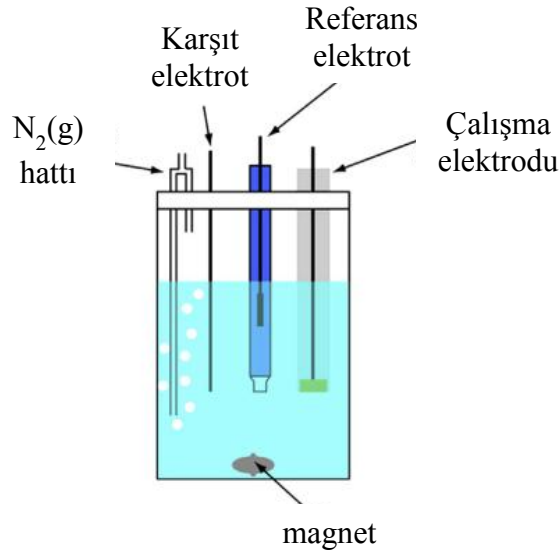
Standart sapma (s) değeri kör çözeltilerde en az 5 kez ölçülen değerlerin standart sapması, m değeri ise çizilen kalibrasyon doğrusunun eğimidir (Buerk 1995, Thévenot vd. 2001).

2.2 Elektrokimya ve Elektrokimyasal Hücre

Elektrokimya, maddenin elektriksel özelliklerini, elektrik enerjisi ve kimyasal tepkime arasındaki ilişkiyi inceleyen bilimdalıdır. Elektrokimya, elektrik ve kimya arasındaki karşılıklı etkileşimlerle ilgilenir ve genel olarak ölçümler; akım, potansiyel ya da yük gibi elektriksel parametreleri verir. Elektrokimyasal ölçümlerin analitik amaçla kullanımı, daha çok çevresel analizlerde, kalite kontrolünde ve biyomedikal uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır (Wang 2006a).

Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir genel olarak bir türden diğerine elektronların aktarıldığı reaksiyonlardır. Pek çok kimyasal ölçümün tersine, elektrokimyasal tepkimeler elektrot-çözelti arayüzeyinde *elektrokimyasal hücre* adı verilen sistemlerde gerçekleşir. Elektrokimyasal ölçümlerin iki temel tipi potansiyometrik ve potansiyostatik ölçümlerdir. Her ikisi de en az iki tane *elektrot* (iletken) ve *elektrolit* olarak adlandırılan ve iletişimi sağlayan bir çözeltinin kullanımını gerektirir. Bunlar elektrokimyasal hücreyi teşkil ederler. İki elektrottan biri hedef analit

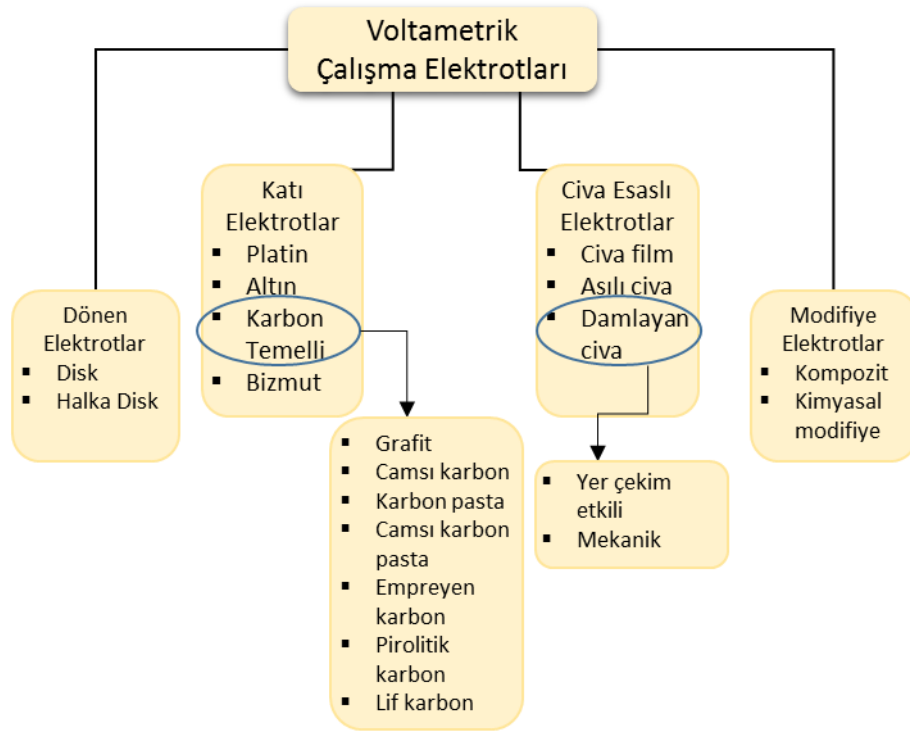
ya da analitlere cevap verir ve çoğu zaman indikatör ya da *çalışma elektrodu* olarak adlandırılır. Diğer elektrot ise *referans elektrot* olarak adlandırılır ve çözeltinin özelliklerinden bağımsız olarak sabit potansiyele sahiptir. Potansiyometrik ölçümlerde hücreden herhangi bir akım geçmez, bu sebepten, iki elektrotlu sistemin kullanımı yeterlidir. Ancak voltametrik ölçümlerde hücreye dış potansiyel uygulanır ve akım ölçülür. Bu uygulanan potansiyelin kontrolü gerekir ancak, çözelti direncinden kaynaklanan hücre boyunca potansiyelin düşmesine bağlı olarak bu iki elektrotlu sistemde mümkün değildir. Akımın ölçüldüğü devrelerde bunu tamamlamak için bir karşıt elektrodun polarizasyonuna ihtiyaç vardır. Daha iyi bir potansiyel kontrolü üç elektrotlu sistem kullanılarak sağlanabilir. Bu sistemde çalışma elektrodunun potansiyeli referans elektroda göre kontrol edilir ve akım, çalışma elektrodu ve üçüncü elektrot olan *yardımcı (karşıt) elektrot* arasından geçmektedir (Skoog 2004). Şekil 2.4'te geleneksel bir elektrokimyasal hücre gösterilmiştir.



Şekil 2.4 Üçlü elektrot sistemi

Çalışma elektrodu ilgili reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Elektrokimyasal sistemdeki çalışma elektrodu reaksiyon türüne göre katodik ya da anodik olabileceği gibi indirgenme veya yükseltgenme olarak da ifade edilebilir. Voltametrik ölçümlerin performansı çalışma elektrodu materyalinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Çalışma elektrodu yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonda tekrarlanabilir cevap ve yüksek

sinyal/gürültü sağlamak en önemli esastır. Bu yüzden seçimlilik temelde iki faktöre bağlıdır; hedef analitin redoks davranışı ve ölçüm için gerekli olan potansiyel bölgesi üzerindeki artık akım. Diğer göz önünde bulundurulması gereken faktörler ise potansiyel aralığı, elektriksel iletkenlik, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, maliyet ve toksisitedir. En sık kullanılan çalışma elektrotları; camsı karbon elektrot, platin elektrot, altın elektrot, civa elektrot, perde baskılı elektrot, gümüş elektrot, indiyum kalay oksit kaplı cam elektrot ve karbon pasta elektrottur. Yarı iletkenler diğer metaller gibi daha özel uygulamalarda kullanılmaktadır (Zhou vd. 2010b). Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları şekil 2.5’te görülmektedir.

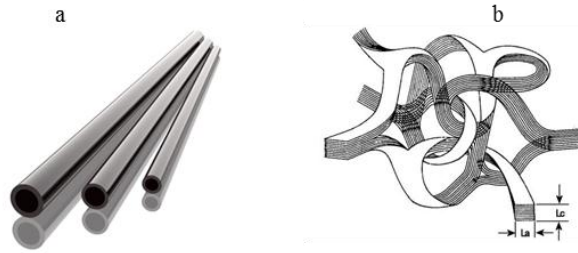


Şekil 2.5 Voltametrizde kullanılan çeşitli çalışma elektrotları

Çalışma elektrodu olarak camsı karbon

Karbon yapılı elektrotlar arasında en yaygın kullanılanı camsı karbon elektrotlardır. Grafit tozu partiküllerinin mikro boyuta getirilerek, sert ve yapıştırıcı madde ile inert yapıdaki elektrot gövdesine sıkıştırılmasıyla oluşturulur. Bu elektrodun yüzeyi tekrarlanabilir sonuçların alınmasını ve oldukça geniş bir potansiyel aralığında

alışılmasını sağlar. Fiziksel dayanımı fazladır ve kimyasallarla tepkimeye girmez. Camsı karbon elektrodun yapısı, özellikleri ve elektroanalitik yöntemlerde kullanımı Van der Linden ve Dieker tarafından açıklanmıştır (Van der Linden ve Dieker 1980). 1962 yılında İlk kez Yamada ve Sato tarafından, inert bir gaz içerisinde fenol formaldehit reçinesinin yaklaşık 300–1200°C’de ısıtılmasıyla elde edilmiştir (Yamada ve Sato 1962). Ayrıca, poliakrilonitrilin 1000–3000°C’de basınç altında karbonizasyona uğratılması ile de hazırlanabilir (Kotlensky ve Martens 1965). Camsı karbonun yapısının, rastgele yerleşmiş ve karışık aromatik moleküllerinden oluştuğu belirlenmiştir. Diğer katı elektrotlarda olduğu gibi camsı karbon elektrotla yüzey aktivasyonunu sağlamak ve tekrar edilebilir sonuçları elde edebilmek için çeşitli ön işlemler geliştirilmiştir. Bu işlemler parlatma (Rusling 1984, Thornton vd. 1985), kimyasal ve elektrokimyasal radyofrekans (Taylor ve Humffray 1975, Wang ve Hutchins 1985), düşük basınç altında sıcaklık uygulaması (Stutts vd. 1983), vakum-sıcaklık uygulaması (Fagan vd. 1985) ve metal oksit filmlerinin elektrot yüzeyinde kaplanması (Cox vd. 1988) olarak sınıflandırılabilir. Elektron transferi açısından aktivasyon işleminin amacı, yüzey kirliliklerinin uzaklaştırılması, yüzeyde fonksiyonel grupların oluşturulması ve yüzey alanının büyütülmesini sağlamaktır. şekil 2.6’da camsı karbon elektrot (a) ve camsı karbonun amorf yapısı (b) grlmektedir.

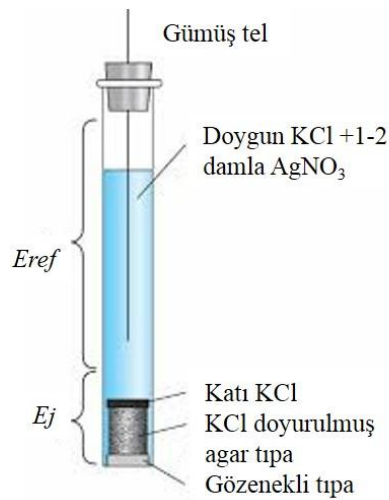


şekil 2.6 (a) camsı karbon elektrot (b) camsı karbonun amorf yapısı

Referans elektrot

Referans elektrot elektrokimyasal hücrede sabit bir potansiyele sahip olan elektrottur (Inzelt vd. 2013). Elektrik direnci çok büyük olduğundan üzerinden neredeyse akım geçmez. En iyi bilinen referans elektrot standart hidrojen elektrottur. Referans elektrot

Referans elektrot olarak gümüş–gümüş klorür

$$AgCl + e^{-} \leftrightarrow Ag(k) + Cl^{-}$$


Şekil 2.7 Ag/AgCl elektrodun şematik gösterimi

Karşıt elektrot

13

üzerinden geçmesini sağlar ve elektrokimyasal reaksiyonda yer almaz. Çalışma elektrodundan daha geniş bir yüzey alanına sahiptir (Thomas ve Henze 2001).

2.2.1 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal dönüştürücüye sahip olan biyosensörlerdir. Bu biyosensörlerde bir elektrot dönüştürücü elemanı olarak kullanılır. IUPAC (1999)'a göre bir elektrokimyasal biyosensör elektrokimyasal bir dönüştürücü elementi ile doğrudan temas içerisinde olan ve üç boyutlu yapısını koruyan biyolojik tanıma elemanının bir araya gelmesiyle oluşan, kantitatif/yarı kantitatif analitik bilgi sağlayan analitik cihazlardır (Thévenot vd. 2001). Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik bir olayın elektriksel bir sinyale dönüşümünde görev alırlar. Böylece hedef analitin ya da biyolojik örnekteki içeriğin analizi gerçekleşir. Elektrokimyasal biyosensörler bir elektriksel özelliğin (rezistans, akım, potansiyel, kapasitans, impedans) ölçümü esasına dayanır. Bu amaçla potansiyometri, konduktometri, amperometri ya da voltametri gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kondüktometrik biyosensörler, biyolojik tür ile analitin reaksiyonu sonucunda metal elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişimini ölçer. Potansiyometrik biyosensörler, çalışma elektrodundaki potansiyelleri referans elektroda karşı ölçümünü sağlar. Amperometrik biyosensörler ise sabit potansiyelde elektrokimyasal türlerin kimyasal reaksiyonunda oluşan ve analit derişimi ile ilişkili olan akımı ölçer.

2.2.2 Elektrokimyasal biyosensörlerde kullanılan algılama sistemleri

Amperometrik dönüştürücüler

Amperometrik dönüştürücüler çalışma elektroduna uygulanan sabit potansiyel altında indirgenen veya yükseltgenen türün oluşturduğu akım değerinin ya da akım yoğunluğunun ölçümü esasına dayanır. Akım yoğunluğu, platin, altın ve karbon gibi bir çalışma elektrodu yüzeyinde indirgenen ya da yükseltgenen elektrokimyasal olarak aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur (Dzyadevych vd. 2008). Elde edilen akım

elektron aktarım reaksiyonunun hızının doğrudan ölçümüdür ve aynı zamanda analit derişimi ile doğru orantılıdır (Karunakaran vd. 2015).

Potansiyometrik dönüştürücüler

Potansiyometrik biyosensörlerde biyolojik tanıma reaksiyonu redoks potansiyelinin değişimine neden olur. Çalışma ve karşıt elektrot arasındaki potansiyel farkının ya da iki karşıt elektrot arasına yerleştirilen bir geçirgen membranda oluşan potansiyel farkının ölçümü esasına dayanır. Genellikle geçirgen membranda hedef türe karşı seçici olan biyoaktif materyaller bulunur. Bu amaçla en sık enzimler kullanılır. İyon seçici elektrotlar en fazla kullanılan potansiyometrik sensörlerdir ve enzim katalizli reaksiyon sonucunda oluşan veya tüketilen türün ölçümünü esas alır (Bard ve Faulkner 1980).

Kondüktometrik dönüştürücüler

Biyotanıma olayı ile iyonik derişim değişir ve bu değişiklik kondüktometrik biyosensörler ile izlenebilir. Kondüktometrik biyosensörler, metal elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişimini ölçer. Bu elektrotlar birbirine belli mesafededir ve bir AC potansiyeli uygulandığında karşı elektrotta akım akışına neden olur (Mikkelsen ve Rechnitz 1989). Kondüktometrik ölçümler diğer elektrokimyasal tekniklere göre daha az hassastır ve oluşan cevap tampon kapasitesine önemli ölçüde bağlıdır.

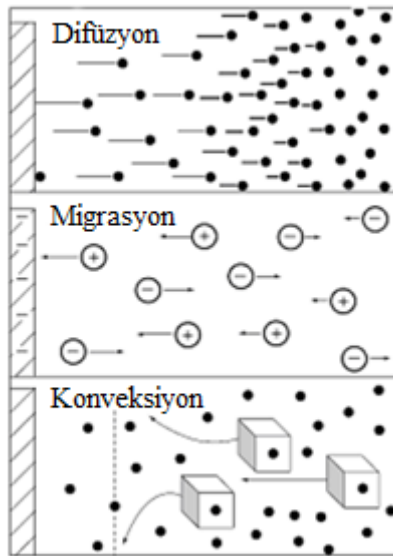
2.3 Voltametri

Voltametri elektrokimyasal analizlerde en sık kullanılan yöntemdir. Voltametrik tekniklerde hem akım hem de potansiyel ölçülür. Pik potansiyeli analizlenen maddeye özgüdür, pik akım yoğunluğu ise ilgili türlerin derişimi ile orantılıdır. Voltametrimin diğer yöntemlere göre en önemli üstünlüğü düşük gürültüye sahip olmasıdır, bu da biyosensör uygulamalarında yüksek hassasiyeti sağlar (Bard ve Faulkner 2000). Ayrıca voltametri tekniğinde farklı pik potansiyeline sahip olan maddelerin çoklu analizi aynı anda yapılabilir. Çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucu oluşan akıma sırasıyla katodik ve anodik akım denir. Uygulanan

potansiyele karşı ölçülen akım grafiği voltamogram olarak adlandırılır. Bir voltamogramdaki üç temel unsur; artık akım, sınır akımı ve yarı dalga potansiyelidir. Potansiyel uygulandıktan bir süre sonra akımın değişmediği bir plato bölgesine ulaşılır. Bu akıma sınır akımı (i_s) adı verilir ve elektroaktif türün derişiminin sıfıra indiği andaki akım değeridir. Sınır akımı, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analizlenecek maddenin derişimi ile doğru orantılıdır ve potansiyelden hemen hemen bağımsızdır.

$$i_s = k C_A$$

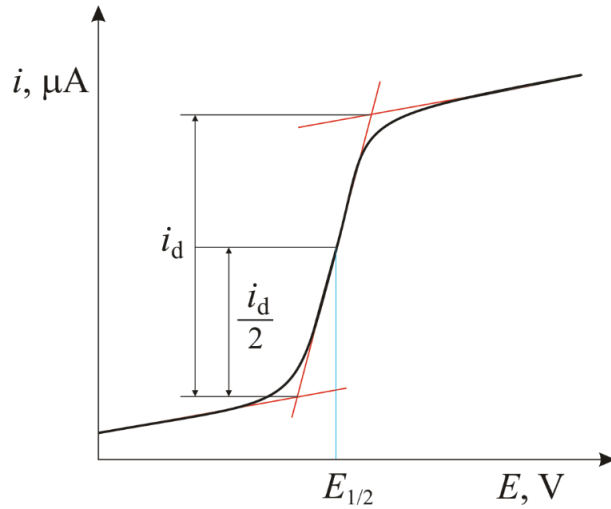
Burada, C_A analit derişimi, k ise bir sabiti ifade etmektedir. Bu akımın büyüklüğü analitin derişimine ve elektrot yüzeyine kütle taşınım hızına bağlıdır. Kütle taşınımı migrasyon (göç), difüzyon ve konveksiyon olayları ile gerçekleşir. Kütle taşınım hızına adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları gibi elektrot tepkimesine eşlik eden kimyasal tepkime hızları da etki etmektedir. Bu olayların tümü meydana geliyorsa sınır akımda her birinin katkısı olacaktır. Bir elektrolit çözeltisindeki maddenin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için bir kuvvet uygulanması gerekir. Bu kuvvet elektriksel veya mekanik olabilir. Derişim farkının neden olduğu taşınmaya “difüzyon”, elektriksel kuvvetten kaynaklanan taşınmaya ise “migrasyon”, karıştırma ya da elektrodun dönmesi gibi mekanik bir kuvvet sonucu gerçekleşen taşınmaya ise “konveksiyon” adı verilir. Bu taşınma gösterimleri şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8 Kütle taşınım yollarının şematik gösterimi

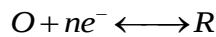
Çözelti ortamına, uygulama potansiyelinde elektroaktif olmayan ve derişimi analit derişiminin 50–100 katı olacak şekilde bir elektrolit eklendiğinde kütle taşınımını bu elektrolit üstleneceğinden analitin migrasyon akımı en aza indirgenir. Bu görevi yapan elektrolitlere “destek elektroliti” adı verilir. Destek elektrolitler hem göç akımı oluştururlar hem de elektriksel iletkenlik sağlarlar.

Elektrot yüzeyinde herhangi bir tepkime gerçekleşmediğinde küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akım “artık akım” olarak adlandırılır. Bu akım giderildiğinde veya en aza indirildiğinde yöntemin duyarlılığı artar. Sınır akım ile artık akım arasındaki yüksekliğe difüzyon akımı (i_d) denir ve elektroaktif analit derişimi ile doğru orantılıdır. Yarı dalga potansiyeli difüzyon akımının yarısına karşılık gelen potansiyel değeridir ve $E_{1/2}$ olarak gösterilir. Bu değer elektroaktif maddenin türüne ve çözelti ortamına bağlı olmakla birlikte analit derişiminden bağımsızdır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Doğrusal taramalı voltamogram eğrisi

Çözelti ve elektrot yüzeyi arasından akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme olayı gerçekleşirken, diğerinde indirgenme tepkimesi meydana gelir. Bu reaksiyonlarda O ve R sırasıyla redoks çiftinin yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir.



Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişimin $[C_O(0,t)$ ve $C_R(0,t)]$, Nernst eşitliğine göre belirlenmesinde kullanılabilir.

$$E = E^0 + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_O}{C_R}$$

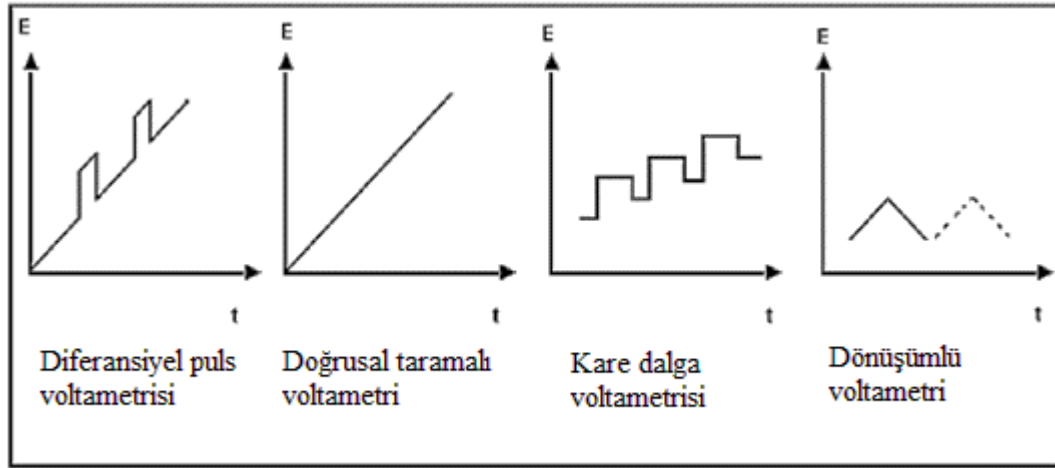
Bu eşitlikte E^0 redoks tepkimesi için standart potansiyeli, R gaz sabitini ($8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T sıcaklığı ($^{\circ}\text{K}$), F faraday sabitini (96485 C) ve n ise tepkimede aktarılan elektron sayısını ifade etmektedir.

Çözelti ile elektrot ara yüzeyinden iki şekilde akım geçer. Birincisinde elektrotlardan birinde yükseltgenme diğesinde indirgenme olayın meydana gelir. Bu sırada elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tür işlemlere, bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle Faradayik işlemler geçen akımlara ise *Faradayik akımlar* adı verilir. Özetle elektrokimyasal hücrede çözelti ile elektrot ara yüzeyindeki yükseltgenme/indirgenme tepkimesiyle taşınan akımdır. Bu akım analizi yapılacak elektroaktif maddeden kaynaklanır.

Faradayik olmayan akım (kapasitif akım, i_c) ise elektrot yüzeyi ile çözelti arasındaki yüklü bir çift tabakada oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrodun elektrolit içine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi ile çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru hareket eder. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeye birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Bu çift tabaka bir kapasitör gibi davranır ve kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek ve indirgenecek tür olmasa bile bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir ve *kapasitif akım* olarak adlandırılır. Kapasitif akım ne kadar düşük olursa o kadar doğru ölçüm gerçekleşir.

2.3.1 Voltametrik tekniklerde kullanılan uyarma sinyalleri

Çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyellerde uyarma sinyalleri uygulanırsa, bu uyarma sinyallerinin çeşidine göre farklı akım cevapları oluşur. En çok kullanılan uyarma sinyalleri; diferansiyel puls, doğrusal taramalı, kare dalga ve üçgen dalgadır (Skoog vd. 2000) (Şekil 2.10) .

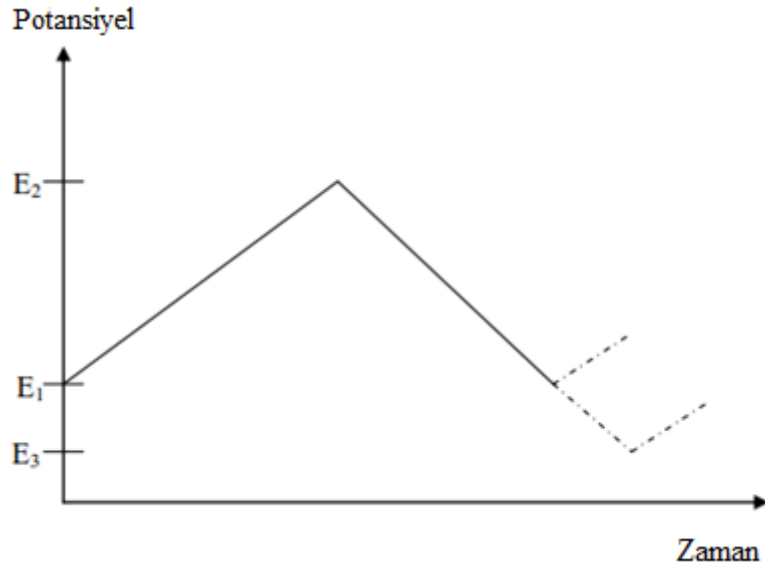


Şekil 2.10 Voltametride kullanılan uyarma sinyalleri

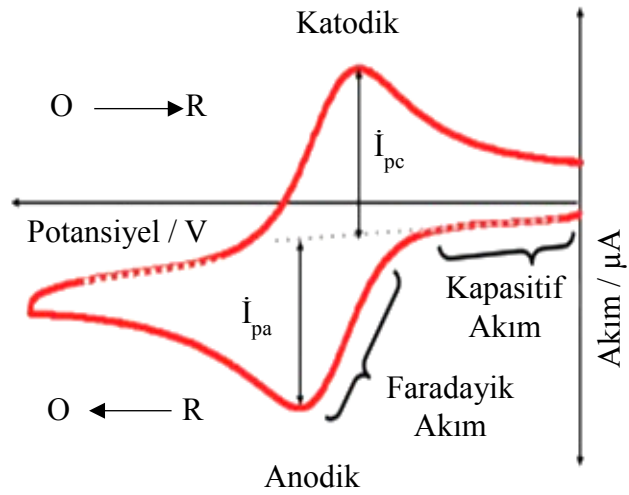
Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV) tekniği elektrokimyasal teknikler içinde en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Çoğunlukla elektrokimyasal analizde maddelerin elektriksel davranışlarını incelemek amacıyla kullanılır. Kantitatif tayinlere dayalı analizlerde pek tercih edilmezler çünkü bu yöntemde duyarlılık $10 \mu\text{M}$ ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri elektrokimyasal analizlerde yüzey modifikasyonunda, elektrotların karakterizasyonlarında, tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında, elektrot yüzeyinin kararlılığının araştırılmasında ve indirgenme-yükseltgenme tepkimelerinde ortamın etkisinin incelenmesinde oldukça geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (Çolak 2014). Bu teknikte potansiyelin zamanla değişmesi tarama hızı olarak adlandırılır. Potansiyel bir E_1 başlangıç potansiyeli ile E_2 potansiyeli arasında yapılırsa metot doğrusal taramalı voltametri adını alır. Eğer E_2 potansiyeline ulaşıldıktan

sonra aynı tarama hızında ilk tarama yönüne göre ters yönde bir tarama yapılırsa bu metodun adı dönüşümlü voltametri olur. Ters taramada potansiyel E_1 'de kalabileceği gibi başka bir E_3 potansiyeline de geri dönebilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Doğrusal taramalı ve dönüşümlü voltametri tekniklerinde potansiyel taramasının zamanla değişimi



Şekil 2.12 Pt elektrot yüzeyinde ferro/ferrisiyanür redoks çiftinin dönüşümlü voltamogramı

Belirli bir potansiyel aralığında ölçülen akımların grafiğe geçirilmesi ile dönüşümlü voltamogramlar elde edilir. Şekil 2.12'de görüldüğü üzere başlangıçta sadece yükseltgenmiş halde bulunan "O" negatif potansiyele doğru ilerledikçe indirgenmeye

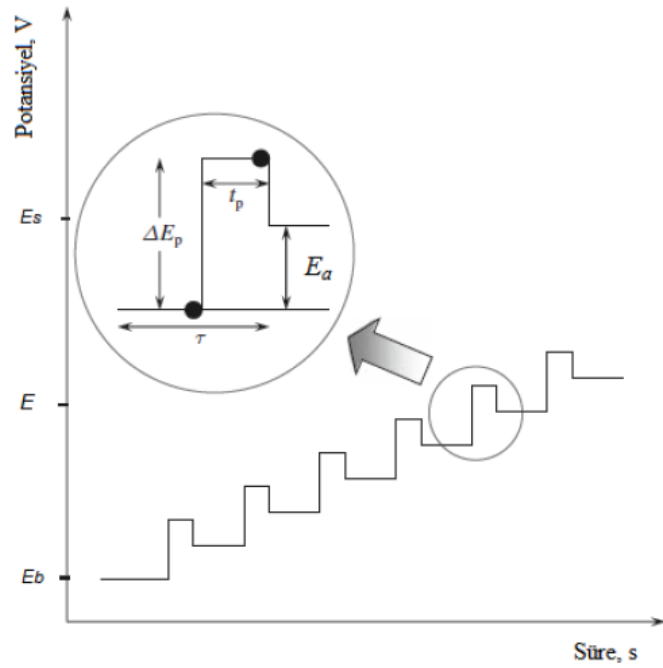
başlar ve “R” türü oluşur, katodik akım artar. Potansiyelin yönü tersine döndüğünde bu kez “R” molekülleri tekrar “O” moleküllerine yükseltgenir ve anodik pikte bir artış gözlenir. Tersinir bir tepkime için derişim ile pik akımının ilişkisi Randles-Sevcik eşitliği ile verilir.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A_E C^0 D^{1/2} \nu^{1/2}$$

I_p amper cinsinden pik akımını, n aktarılan elektron sayısını, A_E elektrodun yüzey alanını (cm^2), C^0 derişimi (M), D difüzyon katsayısını ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ve ν tarama hızını ($\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$) belirtmektedir. Bu eşitlikten anlaşılacağı üzere maddenin pik akımı tarama hızının karekökü ve elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılıdır (Bard ve Faulkner 2000).

Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Bu yöntemde uyarma sinyalleri doğrusal bir tarama sırasında periyodik pulsların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemle yarı dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,05 V'luk bir fark olan maddelerin bile pik akımları elde edilebilmektedir. Duyarlılık sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M'dir. Bu yöntemde duyarlılığın yüksek olmasının temel nedeni faradayik akımın yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu anda ölçümün yapılmasıdır. DPV yönteminde, doğrusal bir tarama sırasında çalışma elektroduna periyodik pulslar uygulanır (Şekil 2.13). Puls uygulanmadan önce ve sonra iki kez akım ölçülür. Puls başına elde edilen akımdaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen voltamogramın yüksekliği analizi gerçekleşen maddelerin derişimi ile doğrusal olan akım piklerinden oluşmaktadır (Bond 1980, Pletcher ve Group 2001).

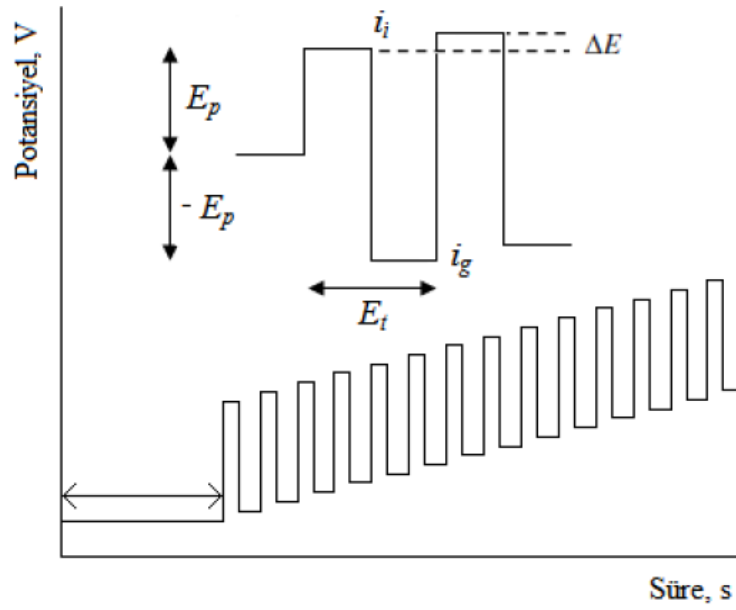


Şekil 2.13 Diferansiyel puls voltametrisinde uygulanan potansiyel dalgasının şekli ve yöntem parametreleri

(Eb: başlama potansiyeli, E: pik potansiyeli, Es: bitiş potansiyeli, ΔE_p : puls genliği, t_p : puls süresi, Ea: basamaklı adım yüksekliği, T : puls periyodu, ●:akım ölçümü)

Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi son derece hızlı ve duyarlı bir tekniktir. İlk kez Barker tarafından geliştirilmiştir. Voltamogramın tamamı 1 saniyeden daha kısa bir sürede yapılabilir. Kare dalga voltametrisinin potansiyel-zaman dalga şekli simetrik kare dalgalardan oluşur ve şekil 2.14’te görülmektedir. Bir kare dalganın tamamlanma süresi olan periyot T ile gösterilir. Birbirini izleyen kare dalgalar arasındaki yükseklik farkına basamaklı adım yüksekliği denir ve ΔE_s ile gösterilir. Bu teknikte pulsun pozitif (1) ve negatif (2) kısmının sonuna doğru iki kez ölçülmekte ve bunların farkı alınmaktadır. İleri puls bir katodik akımı (i_1), geri puls da bir anodik akımı (i_2) oluşturur. Δi farkı potansiyele karşı grafiğe geçirildiğinde voltamogram tek pik şeklinde elde edilir. Bu yöntemde tayin sınırları 10^{-7} – 10^{-8} M arasındadır (Osteryoung ve Osteryoung 1985, Hart 1990, Skoog vd. 2000).



Şekil 2.14 Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu ve yöntem parametreleri

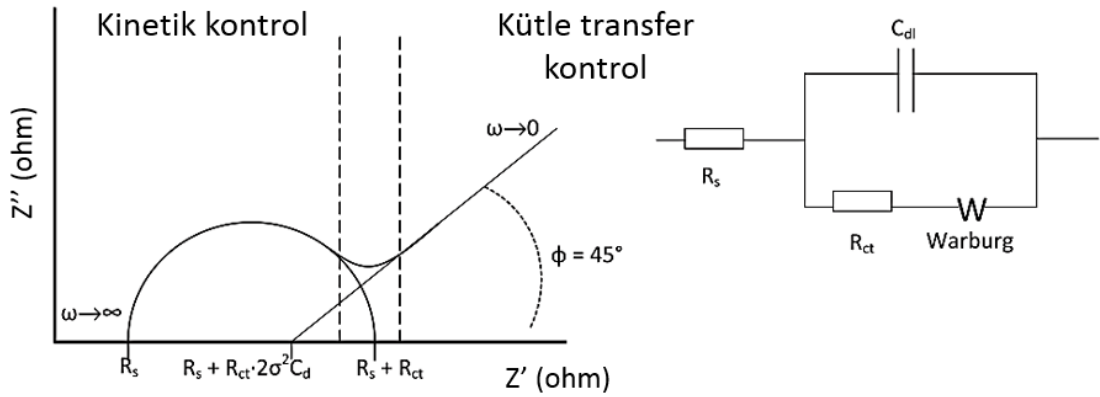
(i_f : ileri yönlü akım, i_g : geri yönlü akım, ΔE : basamaklı adım yüksekliği, E_p : ileri yönlü puls genliği, $-E_p$: geri yönlü puls genliği, E_t ($1/f$): puls periyodu, f : frekans)

2.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

İmpedans, dirençler, kapasitörler veya indüktörlerin birleşiminden oluşan bir devre boyunca bir akım geçtiğinde toplam kompleks dirence karşılık gelir. Elektrot-çözelti arayüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal dönüşümler deneysel impedans spektrumuna karşılık gelen elektronik eşdeğer devrenin bileşenleriyle modellenebilir. Özellikle Randles ve Ershler elektronik eşdeğer devre modeli, arayüzey olgusunu modellemek için yararlıdır. Bu model, çift tabaka kapasitansını (C_{dl}), elektrolit çözeltisinin ohmik direncini (R_s), elektron veya yük transfer direncini (R_p veya R_{ct}) ve iyonların bulk çözeltiden elektrot yüzeyine difüzyonuyla oluşan Warburg empedansını (W) içerir. Arayüzeyin impedansı, Ohm yasasının uygulamasından türetilir ve bir gerçek (Z') ve bir sanal (Z'') olmak üzere aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi iki bileşenden oluşur (Wang 2006a).

$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_p}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_{dl}^2)} - \frac{j\omega R_p^2 C_{dl}}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_{dl}^2)} = Z' + jZ'' \quad j = \sqrt{-1}$$

İmpedans spektroskopisi, elektrokimyasal hücreye küçük genlikli salınım yapan bir sinüzoidal voltaj sinyali (ω frekansta) uygulamasını ve akım cevabını ölçmeyi içerir. Nyquist eğrisi olarak bilinen Faradayik impedans spektrumu, gerçekte sayılar üzerindeki sanal sayılara bağlıdır ve arayüzey ve elektron transfer reaksiyonlarıyla ilgili bilgi verir. Nyquist eğrileri, genellikle düz bir çizgiyi takip eden eksen üzerinde uzanan bir yarı döngü bölgeyi içerir (Şekil 2.15) (Wang 2006a). Daha yüksek frekanslarda gözlenen yarı döngü kısmı elektron-transfer-sınırlı olaylara karşılık gelirken, düşük frekans aralığındaki düz çizgi difüzyon-sınırlı olayları gösterir (Zeybek 2010). Böyle bir spektrum elektron transfer kinetiklerini ve difüzyonla ilgili özellikleri açıklamak için kullanılabilir. Çok yavaş elektron transfer işlemi olduğunda impedans spektrumu büyük yarı döngü bölgeyle karakterize edilirken, çok hızlı elektron transfer işlemi olduğunda yalnızca doğrusal kısım içerir. Yarı döngünün çapı, elektron transfer direncine (R_p) eşittir. Yüksek frekansta yarı döngünün Z' eksenine kesim noktası R_s 'ye karşılık gelir (Wang 2006a).



Şekil 2.15 Nyquist eğrisiyle gösterilen impedans spektrumu ve eşdeğer devre

2.5 Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri

Tanıma elemanı olarak kullanılan DNA molekülünün elektrokimyasal dönüştürücülerle birleştirilmesi ile oluşturulan biyosensörlerdir. (Mikkelsen 1996, Paleček vd. 1998, McGown vd. 1995, Mascini vd. 2001). DNA biyosensörleri dizisi belli olan hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Mikkelsen 1996, Wang vd. 1996a) ve DNA ile etkileşime girebilecek maddelerin analizlerinde (Wang vd. 1998b, Brett vd. 1998) kullanılmaktadır.

DNA biyosensörü hazırlanmasında; hedef dizi ile eşleşecek prob dizi çevirici yüzeyine immobilize edilir, hedef dizi ile tanıma olayı gerçekleşir. Burada amaç hibridizasyon ile hedef dizinin tayinidir (Drummond vd. 2003). DNA ve küçük moleküller arasında meydana gelen etkileşim; DNA transkripsiyonu ve replikasyonu, gen mutasyonları ve DNA'ya özgü tasarlanmış ilaç moleküllerinin mekanizmaları, genetik hastalıkların tayini gibi çalışmalarda önemli bir yer bulmaktadır. Son 10 yıldaki çalışmalarda elektrokimyasal DNA biyosensörleri bu anlamda ümit verici konulardan biri haline gelmiştir (Dogan-Topal vd. 2009, Ebrahimi vd. 2015). Nükleik asitlerin tanıma elemanı olarak kullanıldığı biyosensörler, antikor ve enzim kullanılan biyosensörlerden daha kararlı, kolay hazırlanabilir ve tekrar kullanabilirliği daha yüksektir (Brett vd. 1997, Ozsoz vd. 2003). DNA'nın dört azotlu bazı arasında elektron yoğunluğu en yüksek ve yükseltgenme gerilimi en düşük olması nedeniyle DNA ile yapılan çalışmalar genellikle guanin bazının yükseltgenmesine dayanmaktadır (Steenken ve Jovanovic 1997). Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde çalışma elektrodu olarak altın, camsı karbon, karbon, platin, perde baskılı ve tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar oldukça sık kullanılmaktadır (Steel vd. 1998, Lucarelli vd. 2004, Dogan-Topal ve Ozkan 2011b). Son zamanlarda elektrot performansını arttırmak ve DNA immobilizasyonu için uygun bir matriks ortamı sağlamak amacıyla, elektrot yüzeylerini çeşitli polimer filmlerle kaplamak ilgi çekici bir alan oluşturmaktadır (Yang vd. 2008, Feng vd. 2011, Sui vd. 2013, Mai vd. 2014, Ouyang vd. 2014, Koyuncu Zeybek vd. 2015).

Brabec vd. (1981) tarafından karbon elektrotlar kullanarak doğal ve sentetik nükleik asitlerin elektrokimyasal yükseltgenme davranışları araştırılmıştır. dsDNA yapısındaki

adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftlerinin yükseltgenme pikleri diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak belirlenmiştir (Brabec 1981).

Paleček (1988) tarafından yapılan bir diğer çalışmada nükleik asitlerin nanomolar derişimlerinin katodik sıyırma voltametrisi tekniği ile tayin edilebileceğini belirlemiştir. Çalışma elektrodu olarak civa elektrot kullanılmış ve tayin akümülyasyon ve immobilizasyon basamaklarını içeren adsorptif sıyırma voltametri tekniği ile yapılmıştır. Bunun sonucunda DNA ile etkileşime giren maddelerin tayinlerinde yeni bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir (Paleček 1988).

Wang ve arkadaşları (1999) tarafından, DNA'nın elektrokimyasal yöntemlerle doğrudan tayin edilmesinin, DNA hasarının belirlenmesinde, elektroforetik ayrımlarda, çeşitli hibridizasyon çiplerinin geliştirilmesinde oldukça önemli olduğunu belirtilmiştir. Elektrokimyasal analiz cihazında zemin düzeltilmesi yapılarak, adsorptif sıyırma voltametri tekniğinin DNA ve RNA'nın düşük miktarında tayinlerini sağladığı, ayrıca geleneksel katı elektrot voltametrisinin olumsuz yönlerini yok ettiği gösterilmiştir (Wang vd. 1999).

Oliveria-Brett vd. (2004) tarafından geniş pH aralığında DNA'nın monofosfat nükleotitlerinin camı karbon elektrotta diferansiyel puls voltametri yöntemi ile elektrokimyasal yükseltgenmesini çalışılmıştır. Elektrot çapı, destek elektroliti ve pH gibi deneysel parametreler optimize edilerek en iyi pik akımı ayrımının görüldüğü koşullar belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin fizyolojik pH'de DNA'da bulunan dört bazın eşzamanlı ve iyi ayırım sağlayarak nanomolar düzeyde teşhis sınırı elde edildiği belirtilmiştir (Oliveira-Brett vd. 2004).

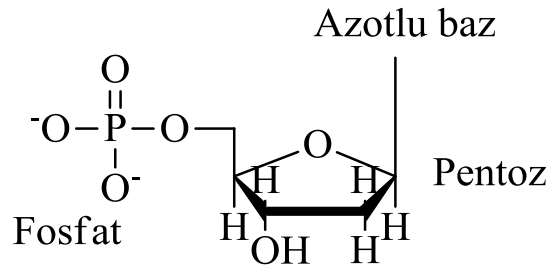
Karsinojenik maddeler ve onların metabolitleri tarafından oluşan DNA yükseltgenme ürünleri tümör oluşumu ile doğrudan ilgilidir. Bu yüzden DNA ile çeşitli maddelerin etkileşim türlerinin incelenmesi DNA hasar mekanizmalarının aydınlatılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir (Wogan vd. 2004, Baird vd. 2005). Bu etkileşim çevre ve gıda güvenliğini tehdit eden bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinlerinde kullanılabilir (Mascini 2002, Ohe vd. 2004, Jakubowski ve Trzcinka-Ochocka 2005).

2.6 Nükleik Asitler

Nükleik asitler genetik bilgiyi depolayan ve nesilden nesile aktarılmasını sağlayan canlı organizmanın yapısında bulunan (bazı virüsler hariç) nükleotit birimlerinden oluşmuş polimerik moleküllerdir (Lehninger vd. 2005). En bilinen nükleik asitler deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asittir (RNA). Ayrıca peptit nükleik asit (PNA), locked nükleik asit (LNA), glükol nükleik asit (GNA) ve treoz nükleik asit gibi yapay nükleik asitler de bulunmaktadır. Bu nükleik asitleri doğal DNA ve RNA'dan ayıran tek fark molekül omurgalarındaki bazı değişikliklerdir (Dönmez 2014).

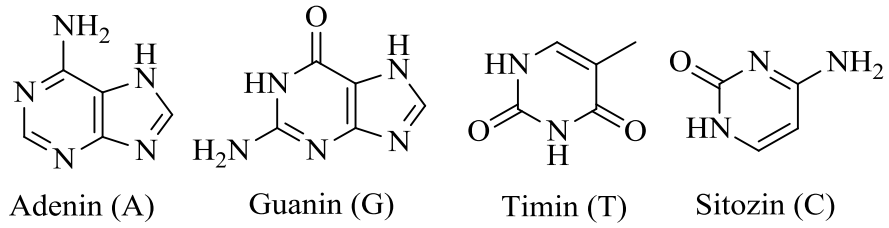
2.6.1 Deoksiribonükleik asit

DNA molekülünün yapısı Watson ve Crick tarafından aydınlatılmıştır. DNA canlı hücrelerde bulunan ve canlı organizmada genetik bilginin nesilden nesile aktarımını sağlayan kimyasal bir polimerdir. DNA molekülü nükleotit adı verilen birimlerden oluşur (Bostick vd. 2007). Her bir nükleotit birimi; deoksiriboz şekeri, fosfat grubu ve azotlu bir bazdan oluşur (Saenger 1984) (Şekil 2.16).



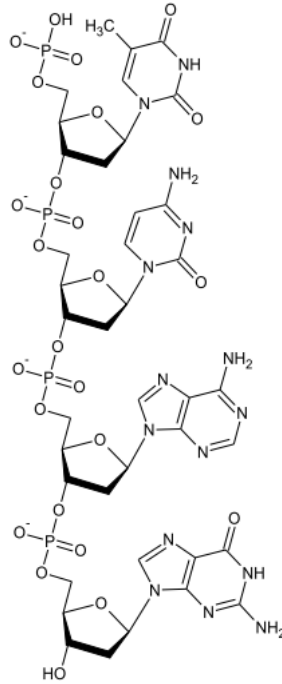
Şekil 2.16 DNA yapısını oluşturan nükleotit birimi

DNA'da adenin (A) ve guanin (G) pürin bazları, sitozin (C) ve timin (T) pirimidin bazları bulunur (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 DNA'nın yapısındaki pürin ve pirimidin bazları

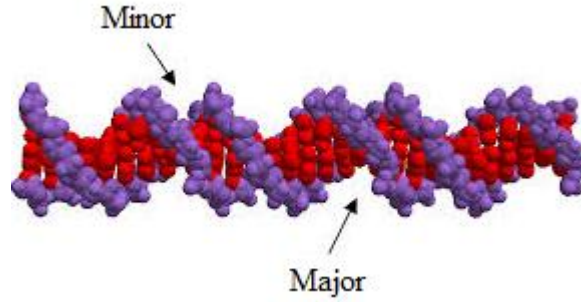
Bağlanmayı sağlayan fosfat köprüleri, ardışık nükleotitlerin şekerlerinden birinin 5'-fosfat grubu ile diğerinin 3'-hidroksil grubu arasında kurulur (Şekil 2.18). Fosfat grubuyla pentoz şekeri arasında oluşan bu kovalent omurgaya bağlanan azotlu bazlar birbirine düzenli bağlanmış yan grup görünümündedir (Lehninger vd. 2005).



Şekil 2.18 DNA molekülünün şeker-fosfat omurgasını oluşturan fosfodiester bağları

Watson ve Crick (1953) yılında DNA'nın üç boyutlu yapısı için önerdikleri modele göre DNA tek bir eksen üzerinde sağa dönen birbirine sarılmış iki iplikçikten oluşmuştur. Deoksiriboz ve fosfat gruplarından oluşan omurga hidrofilik yapıda olup su ile etkileşim içindedir. Azotlu organik bazlar ise iç kısma gömülü, birbirlerine çok yakın ve eksene dik konumdadır. DNA'yı oluşturan iki iplikteki bu azotlu bazlar birbiriyle hidrojen bağları yaparak zincirlerin birbiriyle karşılıklı eşleşmesini sağlar. Oluşan sarmal yapı

üzerinde büyük oluk (major groove) ve küçük oluk (minor groove) yapıları meydana gelir (Şekil 2.19). Bu modele göre guanin ile sitozin arasında üçlü, adenin ile timin arasında ise ikili hidrojen bağı kurulur. G-C/A-T oranı yükseldikçe DNA sarmalındaki zincirler birbirinden daha zor ayrılır (Lehninger vd. 2005).

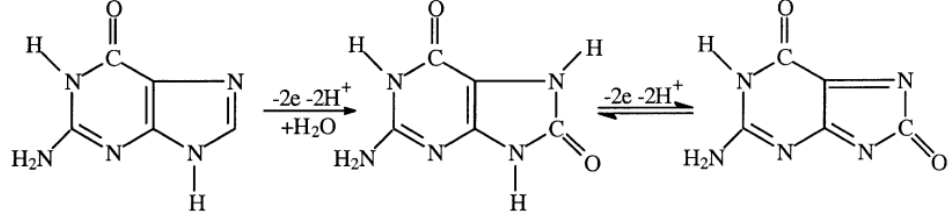


Şekil 2.19 DNA sarmalı üzerinde oluşan oluklar

2.6.2 DNA bazlarının elektrokimyasal özellikleri

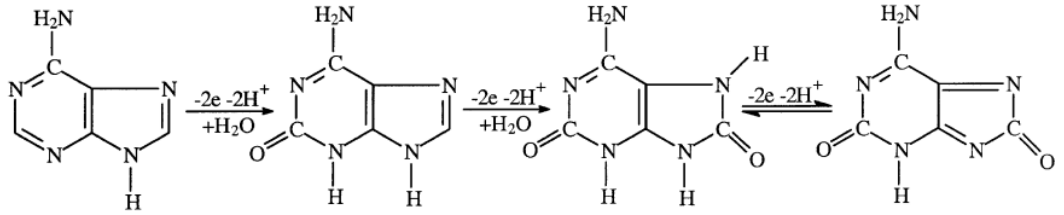
DNA'nın elektroaktifliği ilk kez 1950 yılında E. Paleček tarafından öne sürülmüştür. DNA'nın elektroaktifliği şeker veya fosfat grubuyla değil azotlu bazlar ile açıklanmıştır (Paleček 1996). Tek sarmal DNA'da adenin, sitozin ve guanin bazlarının elektrokimyasal olarak indirgenmesi damlayan cıva elektrot kullanılarak araştırılmıştır. Dönüşümlü voltametri tekniğinde, adenin ve sitozinin indirgenmesi tersinmezdir ve katodik pik oldukça negatif potansiyelde görülmektedir. Guanin indirgenmesi ise oldukça negatif potansiyelde ortaya çıkmaktadır ki bu potansiyel hidrojen çıkışına yakındır (Paleček vd. 2007). Guanin, adenin, sitozin ve timin bazları uygun pH'lerde yükseltgenebilirler (Oliveira Brett ve Matysik 1997b, Oliveira Brett ve Matysik 1997a, Oliveira-Brett vd. 2004). Pürinlerin (adenin ve guanin) yükseltgenmeleri için daha düşük potansiyeller gerekirken, pirimidinler (sitozin ve timin) için çok daha yüksek potansiyeller gerekir. Bu potansiyellerin de oksijenin çıkış potansiyeline yakın olmasından ötürü bu bazların tayinini güçleştirmektedir. Bu sebeple DNA'nın oksidatif değişikliklerinin pürin bazları üzerinden analizi daha uygun hale gelmiştir (Oliveira-Brett vd. 2004). Guaninin yükseltgenmesi ile ilgili reaksiyon şekil 2.20'de verilmiştir. Bu yükseltgenmenin iki basamakta gerçekleştiği belirtilmiştir. Birinci basamakta $2 e^-$ ve

2 H^+ kaybedilerek 8-oksoguanin oluşur. İkinci basamakta ise geri dönüşümlü olarak tekrar 2 e^- ve 2 H^+ verir (Li vd. 2010).



Şekil 2.20 Guanin bazının elektrokimyasal yükseltgenmesi (Wang vd. 2001)

Adenin bazının katı elektrot yüzeyinde yükseltgenmesinin toplamda 6 e^- ve 6 H^+ kaybederek üç basamakta meydana geldiği bildirilmiştir (Şekil 2.21) (Wang vd. 2001).



Şekil 2.21 Adenin bazının elektrokimyasal yükseltgenmesi (Wang vd. 2001)

2.6.3 DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları

DNA biyosensörlerinde kullanılan bazı terimlerin kısa açıklamaları aşağıda sunulmuştur (Dervan 1988, Sinden 1994).

Oligonükleotit: Birden fazla nükleotitin bir araya gelerek oluşturduğu yapıdır.

Baz çifti: Birbirinin eşleniği olan iki baz ifade eder, bazların arasına nokta konularak gösterilir; A.T ve G.C gibi.

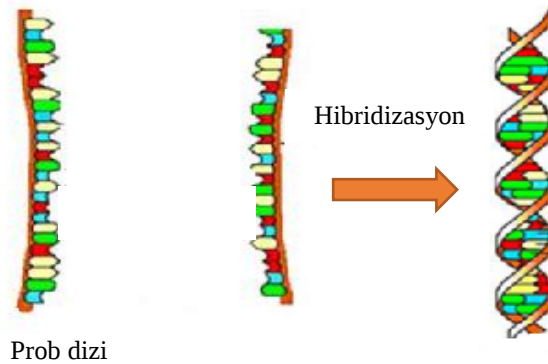
Prob: Baz dizilimi bilinen oligonükleotittir.

Hedef dizi (Target): Prob dizinin karşılığını içeren oligonükleotit dizisidir.

Yanlış eşleşen dizi (mismatch): Bir veya daha fazla bazı hedef diziden farklı olan ve yanlış eşleşmeye neden olan oligonükleotit dizisidir.

Rastgele dizi (non-complementary): Bütün bazıları hedef diziden farklı olan oligonükleotit dizisidir.

Hibridizasyon: Prob dizi ile analizi yapılacak hedef dizinin karşılıklı dsDNA'yı oluşturması işlemidir (Şekil 2.22). DNA'da guanin ile sitozin ve adenin ile timin birbirinin tamamlayıcısıdır. İki dizilim arasında tek bir baz bile farklı olsa, bu bağlanmayı zorlaştırır (Dangler 1996).



Şekil 2.22 DNA hibridizasyonu

2.6.4 DNA veya Prob dizilerinin elektrot yüzeyine immobilizasyon yöntemleri

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımında en önemli aşama DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonudur. Prob dizinin yüzeye bağlanması kolay ve sağlam bir şekilde gerçekleştiğinde hedef dizi ile etkileşim daha kolay olur ve oluşan hibritin dış etkenlerle yüzeyden ayrılması gibi olumsuz etkiler de ortadan kalkar. Immobilizasyon yöntemleri; adsorpsiyon, tutuklama, kovalent bağlama ve biyotin-avidin etkileşimi olarak sıralanabilir:

Adsorpsiyon

Elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonundaki en kolay yöntemdir. Herhangi bir kimyasal veya DNA dizi modifikasyonu gerektirmez. Bu yöntemde DNA problemleri elektrot yüzeyine rastgele bölgelerden ve çok noktadan bağlanır (Pivodori vd. 2000).

(I) Fiziksel adsorpsiyon

DNA biyosensörü, elektrodun DNA içeren çözeltiye daldırılması ve belirli bir süre bekletilmesi ile oluşturulur. Bu tür immobilizasyon genellikle karbon elektrotlara, iletken polimerlere, altın elektrotlara ve civa elektrotlara uygulanmıştır (Pivodori vd. 2000)

(II) Elektrokimyasal Adsorpsiyon

Elektrot yüzeyine pozitif bir potansiyel uygulanması ile yüzeyde oluşan pozitifliğe, negatif yüklü DNA'nın elektrostatik olarak bağlanması ile yüzeye paralel bir tutunma sağlanır.

Tutuklama

Prob dizi ile monomer aynı hücre içine alınarak dönüşümlü voltametri yöntemi ile polimerleşme devam ederken prob DNA polimerik matriks içine tutuklanır (Velusamy vd. 2011).

Kovalent bağlama

Kovalent bağlamada problemler elektrot yüzeyine kovalent bağlarla bağlanır. Bu yüzden problemlerin yüzeyden ayrılması diğer yöntemlere göre daha güçtür. Genellikle altın ve karbon elektrotlar için kullanılır. Altın elektrotların kullanılması durumunda öncelikle yüzey 3-merkaptopropiyonik asit veya L-sistein ile modifiye edilerek yüzeyde tiyol

gruplarının oluşması sağlanır. Daha sonra *N*-hidroksisüksinimit (NHS) ve etil karbodimit (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak NH₂ fonksiyonel gruplu probun yüzeye güçlü bir şekilde bağlanması sağlanır. Elektrodun karbon olması durumunda 3-merkaptopropiyonik asit gibi bir reaktife ihtiyaç duyulmamaktadır (Erdem ve Ozsoz 2001, Kara vd. 2007).

Avidin-biyotin etkileşimi ile prob immobilizasyonu

Avidin ya da streptavidin ile biyotin kompleksleri DNA biyosensörlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Avidin ve streptavidin tetramerik bir proteindir. Biyotin küçük yapılı ve avidin/streptavidin bağlanma afinitesi yüksek olan küçük bir moleküldür. Uç pH ve sıcaklık değerlerinden, organik çözücülerden fazla etkilenmemektedir (Pividori vd. 2000). Bu işlemde önce elektrot yüzeyine avidin damlatılır. Sonra biyotin işaretli prob çözeltisine daldırılarak immobilizasyon gerçekleştirilir. Bu yöntemin dezavantajı elektrot yüzeyinde olabilecek spesifik olmayan bağlanmaları arttırabilmesidir.

2.6.5 Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde dizi algılama yöntemleri

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile dizi algılanması temel olarak tek zincirli DNA'nın (ssDNA) veya dsDNA'nın işaretli ya da işaretsiz teknikler kullanılarak elektrokimyasal davranışlarındaki farklılıklar incelenerek yapılmaktadır. Diziye özgün DNA biyosensörleri, bir dönüştürücü ve prop diziden oluşmaktadır (Wang vd. 1998c). Hibridizasyonun algılanmasında antikanser ilaçlar, organik boyalar, metal kompleksler, enzimler veya metal nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır. Hibridizasyonun belirlenmesinde aşağıdaki dört temel yaklaşımdan yararlanılır;

- ssDNA veya dsDNA'lara seçici bir şekilde bağlanan işaretleyicinin indirgenme/yükseltgenme pik akımındaki artış ya da azalışın incelenmesi,
- Elektroaktif bazlar olan guanin veya adeninin yükseltgenme/indirgenme sinyallerindeki artış ya da azalışın incelenmesi,
- Enzim etiketli prolarla hibridizasyon sonrası substratın elektrokimyasal sinyalinin takip edilmesi,

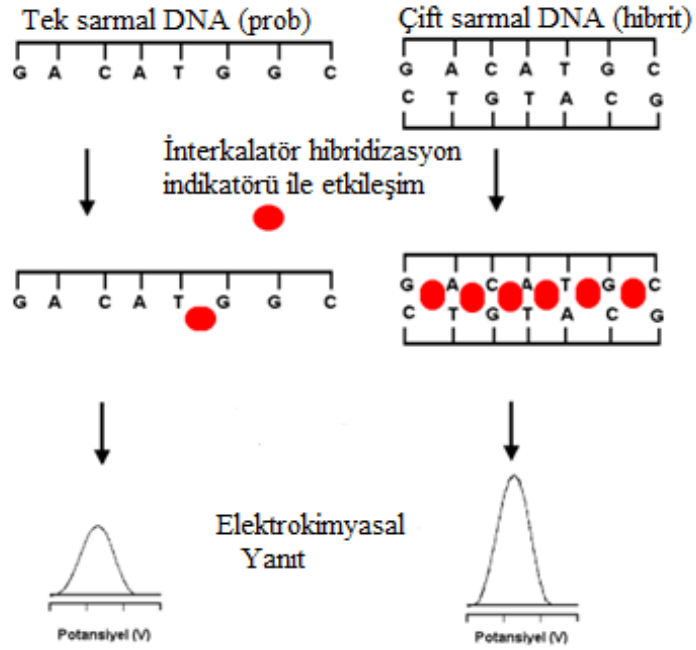
- Hedef dizi ile hibridizasyon sonrası nanopartikül işaretli problemlerin elektrokimyasal sinyallerinin izlenmesi (Kerman vd. 2004).

İndikatöre dayalı DNA dizi algılama yöntemleri

Bu yöntemde ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksler, ilaçlar) (Barton vd. 1986, Carter ve Bard 1987, Carter vd. 1989, Millan ve Mikkelsen 1993, Kolakowski vd. 1996) ya da DNA'daki bazlarla etkileşebilen elektroaktif maddeler (Takenaka vd. 1990, Erdem vd. 1999) kullanılır. Prob ile hedef dizinin hibridizasyonu sonucu oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün artan ya da azalan sinyali elektrokimyasal cevap olarak kullanılır (Millan vd. 1994, Mikkelsen 1996). İndikatör olarak Ru(II) (Johnston ve Thorp 1996), Co(III) (Takenaka vd. 1990, Cai vd. 1997), Os(II), Os(IV)'ün (Maruyama vd. 2002, Flechsig ve Reske 2007) 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin kelatları sık kullanılmaktadır.

(I) İnterkalatör madde ile DNA dizi algılanması

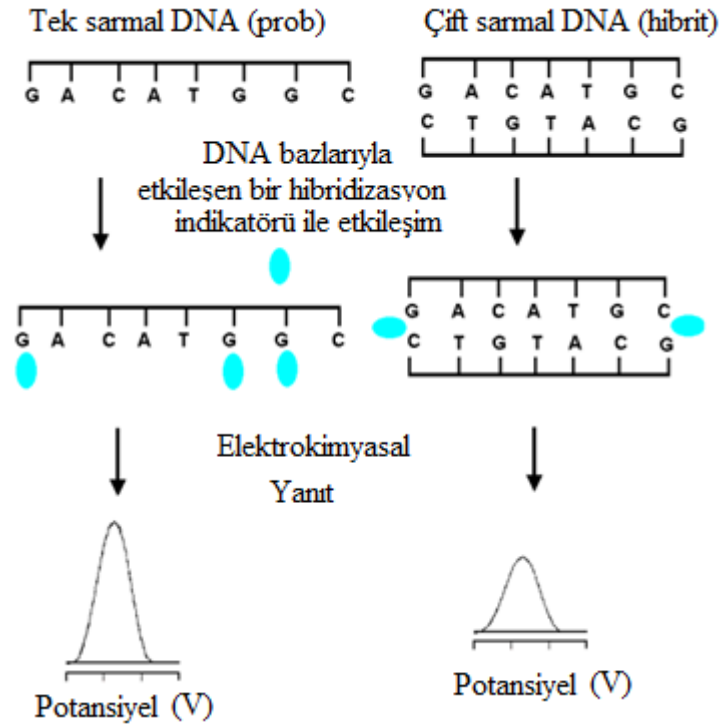
Bir maddenin çift sarmal DNA'nın arasına girerek birikmesine interkalasyon denir. Böyle bir durumda madde ile dsDNA'nın etkileşiminden sonraki sinyal tek sarmal DNA'ya göre yüksektir (Şekil 2.23) (Barton vd. 1986, Carter ve Bard 1987, Cai vd. 1997).



Şekil 2.23 İnterkalatör madde ile DNA dizi algılanması

(II) DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile algılama yöntemi

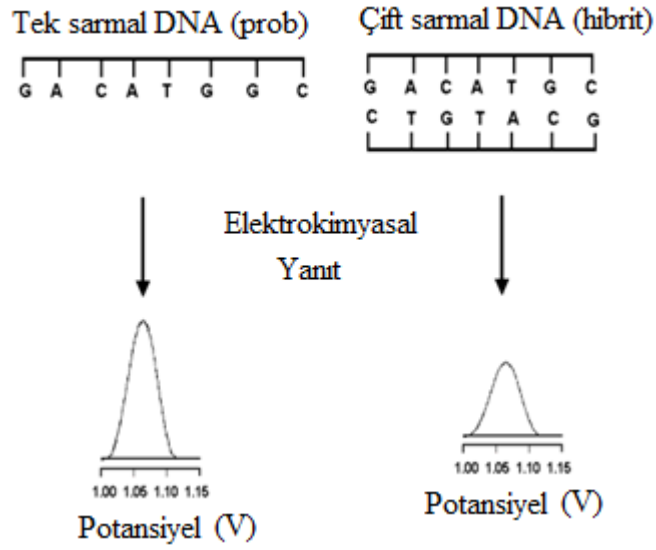
İndikatör olarak kullanılan madde DNA'nın guanin bazıyla etkileşiyorsa bu durumda Şekil 2.24'teki gibi tek sarmal DNA'da guanin bazıyla etkileşimi daha serbest olacağından sinyal çift sarmal DNA ile etkileşimine göre daha yüksektir (Millan ve Mikkelsen 1993).



Şekil 2.24 Guanin bazıyla etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılanması

İndikatör kullanılmadan yapılan DNA dizi algılama yöntemleri

Elektrot yüzeyine immobilize edilen tek sarmal prob dizisine ait guanin sinyalleri hedef dizi ile hibridizasyon sonrası azalır, bu azalma hibridizasyon tayinine yönelik sinyal olarak kullanılır (Şekil 2.25) (Wang vd. 1998a, Wang vd. 1998c, Erdem vd. 2004).



Şekil 2.25 İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

2.6.6 İlaç-DNA etkileşimlerinin elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması

Yeni sentezlenen maddelerin, ilaç etken maddelerinin DNA ile etkileşim mekanizmalarının hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi amacıyla tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörler geliştirilmektedir. Analizi yapılacak maddelerin DNA ile etkileşimleri üç yolla gerçekleşir;

- Nükleik asitin negatif yüklü şeker-fosfat omurgasına maddenin elektrostatik olarak bağlanması,
- dsDNA yapısındaki büyük (major) ve küçük (minor) oluklara bağlanması,
- dsDNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak bağlanması.

Nükleik asitler hücre bölünmesi (DNA replikasyonu) ve protein sentezi (transkripsiyon ve translasyon) gibi hücresel süreçlerde önemli bir role sahiptirler. Bu süreç sağlıklı hücrelerde olduğu gibi antikanser ilaçlar için hedef olan kanser hücrelerinde de meydana gelir. DNA ile etkileşen küçük moleküller etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar. DNA ile etkileşen moleküller temel olarak dört gruba ayrılır;

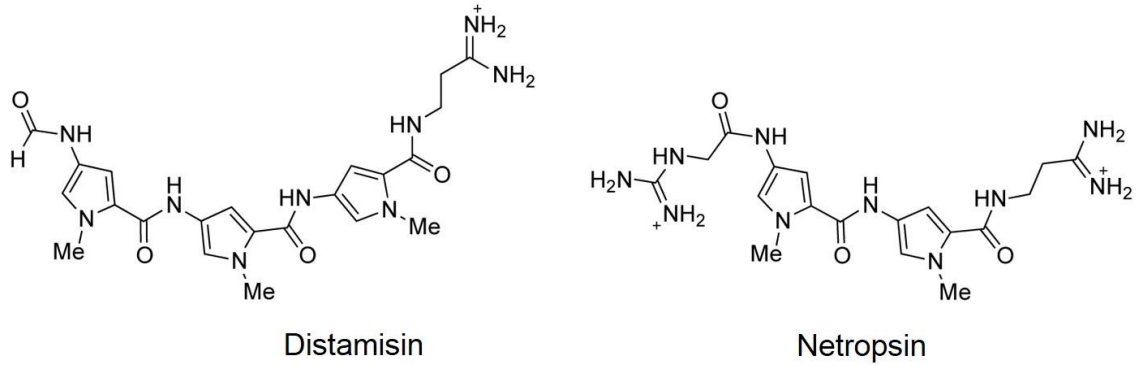
- DNA'daki küçük oluklara yerleşen oluk bağlayıcılar,
- Baz çiftleri arasına tutunan interkalatörler,

- DNA ile doğrudan kimyasal olarak etkileşen ve DNA'nın alkillenmesine neden olan alkilleyici ajanlar,
- DNA zincirini kırarak parçalanmasına neden olan ajanlar.

Bu sınıflardan her biri farklı bir yapıya sahiptir ve DNA ile farklı şekilde etkileşirler.

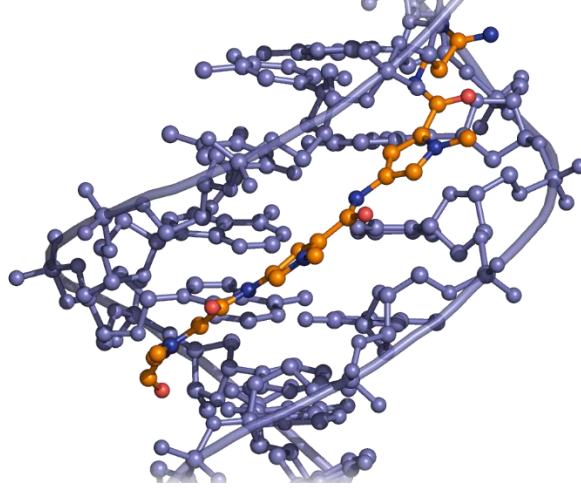
Oluk bağlayıcılar

Küçük oluk bağlayıcı moleküller bir seri heterosiklik ya da aromatik hidrokarbon halkalarının bir araya gelmesiyle oluşur. Bu yapılar rotasyonel serbest dönüşe sahip olduğundan molekülün DNA çevresindeki su molekülleriyle yer değiştirerek küçük oluğa bağlanması sağlanır. Bu tip bağlanmayı gösteren ilaçlara yapıları Şekil 2.26'da gösterilen distamisin ve netropsin örnekleri verilebilir.



Şekil 2.26 Distamisin ve netropsin'in molekül formülleri

Distamisin ve netropsin DNA'nın küçük oluğunda bulunan A-T bazlarının yoğun olduğu bölgelerde adenin bazının 3 numaralı azotu (N3) ve timin bazının 2 numaralı oksijeni (O2) ile hidrojen bağı yapar ve Van der Waals kuvvetleriyle etkileşir (Şekil 2.27).

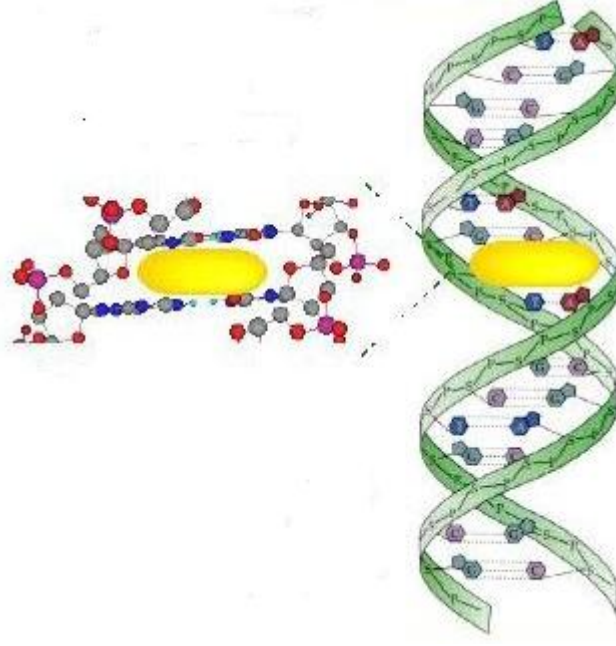


Şekil 2.27 Distamisin'in DNA çift sarmalının küçük oluğuna bağlanması

DNA'nın negatif yüklü şeker-fosfat omurgası molekülün amidin gruplarıyla etkileşebilecek şekildedir. Fakat ilaç molekülü, guaninin 2 numaralı karbona bağlı amino grubunun neden olduğu sterik engelden dolayı DNA'nın küçük oluğundaki G-C baz çiftlerine yaklaşamaz (<http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions#Introduction>).

İnterkalatörler

Düzlemsel halka sistemine sahip bazı maddeler, DNA baz çiftleri arasına yerleşerek kuvvetli bir şekilde DNA'ya bağlanırlar. Bu olaya “interkalasyon” denir (Şekil 2.28). Etkileşime giren maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim tersinir veya tersinmez olabilir (Wakelin ve Waring 1976, Wang vd. 1996b). İnterkalasyon DNA zincirinin kırılmasına neden olarak DNA'ya bağımlı RNA sentezini de engellemektedir. İnterkalasyon ile DNA'ya bağlanan bazı ilaçların etki mekanizmaları bu şekilde açıklanmaktadır (Frederick vd. 1990).



Şekil 2.28 İnterkalasyon bağlanmasının gösterimi

DNA–ilaç etkileşimleri DNA biyosensörleri kullanılarak hızlı ve kolay bir şekilde algılanabilmektedir. Bu algılama DNA’nın yapısındaki elektroaktif bazlar olan guanin ya da adenin yükseltgenme sinyali kullanılarak veya etkileşime giren maddenin elektrokimyasal yükseltgenme/indirgenme sinyali üzerinden gerçekleşebilir. Bu sinyallerdeki değişikliğe göre DNA–ilaç etkileşimleri hakkında yorum yapılabilir (Erdem ve Ozsoz 2002). Genellikle pik guanin bazının yükseltgenme pik potansiyelindeki pozitif kaymanın interkalasyona, negatif yöne kaymanın ise elektrostatik bağlanmayı gösterdiği bildirilmiştir (Carter vd. 1989).

DNA-ilaç etkileşimleri X-ışınları kristalografisi, UV–Vis spektroskopisi, dairesel dikroizm, florimetri, viskozluk ölçümü, erime noktası tayini gibi farklı teknikler kullanılarak incelenmektedir (Müller ve Crothers 1975, Friedmann ve Brown 1978, Levison vd. 1998, Gibson 2002, Sirajuddin vd. 2013). Elektrokimyasal yöntemler, DNA-ilaç etkileşimlerinin incelenmesinde kolay kullanım, düşük maliyet, hızlı ve güvenilir sonuç vermelerinden dolayı son yıllarda oldukça sık kullanılmaktadır (Erdem ve Ozsoz 2002).

Plambeck ve Lown (1984) tarafından yapılan bir çalışmada antikanser ilacı doksorubisin ile dsDNA arasındaki etkileşim asılı civa damla elektrot kullanılarak adsorptif sıyırma voltametrisi tekniği ile incelenmiştir. Etkileşim sonrası doksorubisin sinyalindeki azalma gözlenmiştir. Bu azalmanın ilacın dsDNA'ya interkalasyon ile bağlanmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Plambeck ve Lown 1984).

Wang vd. (1998b) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise antikanser ilacı daunomisin ile dsDNA arasındaki etkileşim perde baskılı karbon, karbon pasta ve dönen disk elektrot yardımıyla incelenmiş ve ilacın dsDNA'ya interkalasyon ile etki ettiği bildirilmiştir (Wang vd. 1998b).

Zhou ve arkadaşları tarafından antitümör, antistres ve antiviral etkinliğe sahip bir ilaç olan magnololün elektrokimyasının aydınlatılması ve DNA ile etkileşiminin açıklanması için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada maglölünün DNA ile etkileşimi hem elektrokimyasal hem de spektroskopik olarak belirlenmiş ve sonuçlar bu maddenin elektrokimyasal yükseltgenmesinin tersinmez bir şekilde bir elektron ve bir proton aktarımıyla gerçekleştiğini göstermiştir. DNA ile ilacın etkileşim türünün elektrostatik olduğu bildirilmiştir (Zhou vd. 2010a).

Banitaba ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada salmon spermi dsDNA ile riboflavin (vitamin B2) arasındaki etkileşim kalem grafit elektrot kullanılarak adenin ve guanin bazlarının elektrokimyasal yükseltgenme akımlarındaki azalma diferansiyel puls voltametri tekniği ile araştırılmıştır. Optimum koşullarda riboflavinin doğrusal çalışma aralığı 0,5–70 µg/ml, teşhis sınırı ise 0,34 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Riboflavinin farmasötik doz formlarında ve idrarda tayini yapılmış, biyosensörün tekrar üretilebilirliği ve uygulanabilirliği de incelenmiştir (Banitaba vd. 2011).

Guo ve çalışma arkadaşları tarafından anti-tümör ilaç olarak kullanılan tamoxifen ile sığır timüs dsDNA'sı ile ilişkisi ilaç ve DNA'nın elektrokimyasal yükseltgenme pikleri çakıştığı için, sıfır akım potansiyometrisi tekniği kullanılmıştır. dsDNA, karbon pasta elektrot üzerine immobilize edilmiş ve ilacın teşhis sınırı $1,1 \times 10^{-7}$ M olarak belirlenmiştir (Guo vd. 2011).

Doğan-Topal ve Özkan (2011) tarafından antikanser bir ilaç olan fulvestrant'ın dsDNA ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot kullanılarak elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve farmasotik formülasyonda tayin yapılmıştır. Çalışmada, diferansiyel puls voltametri tekniği ile ilaç-DNA ilişkisi, guaninin yükseltgenme sinyalindeki azalma izlenerek incelenmiştir. Fulvestrant ilacı için 1,0–20,0 µg/mL aralığı içinde guanin yükseltgenme sinyaline bağlı bir doğrusal aralık elde edilmiştir (Dogan-Topal ve Ozkan 2011a).

Doğan-Topal ve Özkan (2011) tarafından kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç olan löprolidin dsDNA ile etkileşimi incelenmiştir. Bu amaçla ilaç, aktive edilmiş kalem grafit elektroda immobilize edilmiş ve etkileşim sonrası guanin yükseltgenme pikindeki azalma izlenerek ilaç tayin edilmeye çalışmıştır. Çalışmalarda 0,2–6,0 µg/mL arasında bir doğrusal çalışma aralığı elde edilmiş ve teşhis sınırı ise 0,06 µg/mL olarak belirlenmiştir (Dogan-Topal ve Ozkan 2011b).

Abbar ve arkadaşları (2012) hemorolojik ilaç pentoksifilin çok duvarlı karbon nanotüp modifiye karbon pasta elektrotta dönüşümlü ve diferansiyel puls voltametrisi ile elektrokimyasal yükseltgenmesini incelemişlerdir. Çalışmada yükseltgenme prosesinin tersinmez olduğu ve adsorpsiyon kontrollü davranış gösterdiğini belirtmişlerdir. Optimum koşullarda pentoksifilin çalışma aralığını $3,0 \times 10^{-5}$ – $2,0 \times 10^{-4}$ M, tayin alt sınırını $1,69 \times 10^{-7}$ M ve biriktirme süresini ise 180 s olarak rapor etmişler ve farmasötik formülasyonda ve idrar örneklerinde pentoksifilin tayinini yapmışlardır (Abbar vd. 2012).

2.6.7 İlaç-DNA etkileşimlerinin UV-Vis spektroskopisi ile incelenmesi

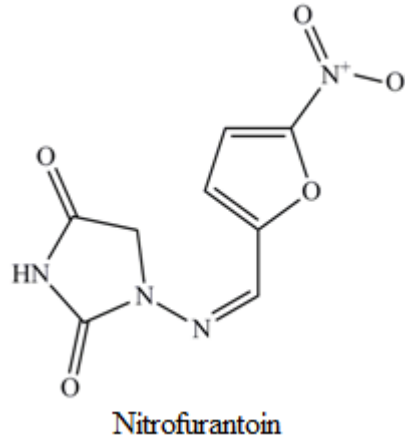
UV–Vis spektroskopisi, DNA ile küçük moleküllerin etkileşiminin incelenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde DNA'nın ya da DNA ile etkileşime giren molekülün UV–Vis absorpsiyon bandlarındaki değişiklikler izlenir. Bu değişiklikler hipokromik, hiperkromik, batokromik veya hipsokromik etkilerden olarak sıralanabilir. DNA'ya bağlanan molekül interkalasyon yapıyorsa absorpsiyon bandlarında hipokromizm ve batokromizm etkisi gözlenir çünkü interkalasyon DNA'nın baz çiftleri

ile küçük molekülün kromafor grubu arasındaki bir tür istiflenme etkileşimidir. DNA baz çiftinin π orbitali küçük moleküllerin π^* orbitalleriyle bir çift oluşturarak $\pi-\pi^*$ konjugasyonu oluşturur, böylece $\pi-\pi^*$ geçiş enerjisindeki fark azalır ve absorpsiyon bandında batokromik bir kayma görülür. Ayrıca küçük bir molekül DNA'ya interkale olduğunda molekülün kromafor grubu ile DNA'nın baz çifti arasındaki uzaklığın azalması absorpsiyon bandında hipokromisme neden olur (Xu vd. 2009, Sirajuddin vd. 2013). DNA ile küçük moleküller arasında elektrostatik bir etkileşim olduğu durumda molekülün DNA'nın yapısını ve konformasyonunu değişmesi nedeniyle hiperkromik etki gözlenir (Sirajuddin vd. 2013).

Küçük moleküller DNA'ya oluk bağlanması ile etkileştiğinde ise absorpsiyon bandında önemli ölçüde bir kayma gözlenmez bu durum DNA'nın oluklarındaki azotlu bazlarla kompleksin kromafor grubunun elektronik halinin çakışmasıyla ilişkilidir (Fukuda vd. 1990, Tanious vd. 1992, Shah vd. 2013).

2.7 Nitrofurantoin İlacı ile İlgili Bilgiler

Nitrofurantoin (NFT, (N-(5-nitro-2-furildin)-1-aminohidantoin), Şekil 2.29), nitrofuran türevi üriner patojenlerin çoğuna karşı etkili, geniş spektrumlu antibakteriyel etkili bir ilaçtır. Düşük derişimlerde bakteristatik, bunun üstündeki derişimlerde ise bakterisid (bakteri öldürücü) etki gösterir. DNA ve RNA sentezinde, karbohidrat metabolizması ve diğer metabolik yollarda görev yapan bakteriyel enzimleri inhibe eder. Nitrofurantoin'in birçok yol üzerine etki etmesi, bakteriye karşı direnç gelişimini güçleştirir. Oral alımdan kısa süre sonra glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla yüksek seviyede idrara geçmesi nedeniyle alt üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılır. Üropatojenleri de kapsayan geniş gram pozitif ve gram negatif etkinliği vardır. *P. mirabilis* ve *Pseudomonas* türlerine etkinliği düşüktür. Gram negatif ve *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* ve *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif bakterilere etkinliği yüksektir. Nitrofurantoin genellikle idrar yolları enfeksiyonlarında ve mesane kanseri gibi kanser türlerinde de kullanılmaktadır (Hammam 2002, Kamat ve Lamm 2004).



Şekil 2.29 Nitrofuranton'ın kimyasal yapısı

Farmakokinetik özellikler

Nitrofurantoin makrokristalleri özel olarak formüle edilmektedir. Emilim hızını kontrol ederek bulantı sıklığını azaltmak için kristal boyutu kontrollü bir şekilde belirlenmektedir. Klinik ve prelinik çalışmalar makrokristalize nitrofurantoin'in hastalarda bulantı görülme sıklığını azalttığını göstermektedir. Oral yolla alınan makrokristalize nitrofurantoin üst gastrointestinal sistemden kolaylıkla, ancak mikrokristalize formuna göre daha yavaş ve daha az absorbe olur.

Dağılım

Nitrofurantoin birçok vücut doku ve sıvılarına dağılır, safraya, süte, beyin omurilik sıvısına, plasenta yoluyla fetusa geçer. Dağılımı esnasında biyolojik zarlardan geçişi pasif difüzyonla olmaktadır. Ancak böbrek tübülleri, safra ve meme bezleri epitelinden aktif taşınma ile salgılanır.

Biyotransformasyon

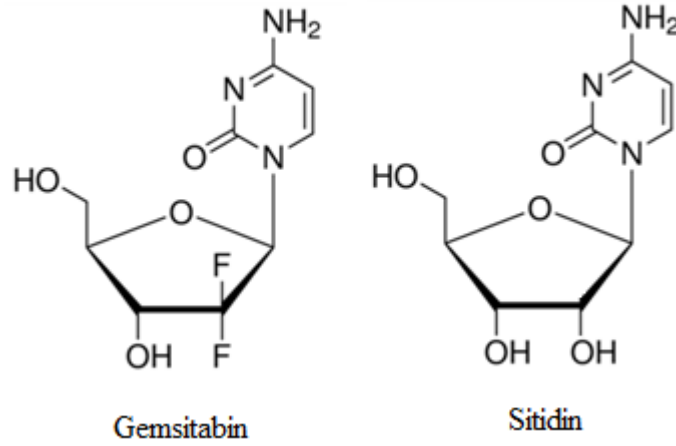
Alınan tek oral dozdan sonra nitrofurantoin'in %20–44'ü 24 saat içinde değişmemiş molekül olarak, %1'i ise aminofurantoin metaboliti olarak metabolize olur. Kalanı ise vücut dokularında ve karaciğerde metabolize veya inaktive olur.

Eliminasyon

Makrokristalize nitrofurantoin'in alınmasından genellikle 4–5 saat sonra maksimum idrar atılımı gerçekleşmektedir. Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 30 dakika veya daha kısadır. İlacın idrardan geri kazanımı yaklaşık %25–30 oranındadır (<http://www.ilacrehberi.com/>).

2.8 Gemsitabin İlacı ile İlgili Bilgiler

Nükleobazların nükleozit analogları sitotoksik, immün sistemi baskılayıcı ve antiviral özellikleriyle farmasötik sınıfta bulunan bileşiklerdir ve pirimidin nükleozit analogları kanser tedavisinde etkili olan türevlerdir. Gemsitabin (GEM, (2,2-diflorodeoksisitidin) (dFdC), Şekil 2.30), sitidinin nükleozit analogudur. Tek başına veya platin türevi ilaçlarla birlikte kullanımı ileri evre mesane ve meme kanseri tedavisinde kullanılır (Carmichael ve Walling 1997, Galmarini vd. 2002, Shelley vd. 2011, Walter vd. 2013). Doksorubisin ile beraber kullanımında karaciğer (Lombardi vd. 2011), lokal ileri evre veya metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde sisplatin ile birlikte ilk basamakta endikedir. Sisplatin'in kontrendike olduğu hastalarda tek başına ya da sitostatik ilaçlarla birlikte kullanılabilir (Xiong vd. 2004, Frampton ve Wagstaff, 2006). Gemsitabin ayrıca sisplatin ya da taksan ilaçlarına direnç gösteren over kanseri tedavisinde de kullanılır. Gemsitabin lipofilik karakteri nedeniyle nükleozit membran taşıyıcıları ile hücre içine kolaylıkla girer. Burada fosforillenerek DNA sentezinde sitidin türevleri ile yarışır. Gemsitabin trifosfatın yüksek derişimi sitidin trifosfat (CTP) sentetazı inhibe eder, sitidin monofosfat (CMP) deaminaz ise CTP'nin düşük derişimde kalmasını sağlar (Galmarini vd. 2002). Böylece GEM trifosfat etkinliği artar. GEM biyolojik aktivitesini iki şekilde gösterir. Birinci yolda DNA tamir mekanizmasının tetiklenmesine katılması söz konusudur. Burada restriksiyon enzimleri bazların kesilip çıkarılmasından sorumludur, gemsitabini yapıdan çıkaramadığı için replikasyon durur (Galmarini vd. 2002). İkinci yolda ise ribonükleotit redüktaz inhibe ederek DNA sentezi bloke olur, böylece ve yeni sarmalın sentezi engellenir.



Şekil 2.30 Gemsitabin'in ve Sitidin'in kimyasal yapısı

Gemsitabin, kanser tedavisinde kullanılan diğer ilaçlarla kıyaslandığında tek kullanımında ve kombine edilmiş kemoterapilerde kabul edilebilir yan etkileri ve toksisitesiyle hastalarda iyi tolere edilir (Lombardi vd. 2001, Xiong vd. 2004, Frampton ve Wagstaff, 2006, Maraveyas vd. 2012).

Farmakodinamik özellikler

Solid tümörlerin çoğuna karşı etkili olan gemsitabin insan tümör hücrelerini içeren çeşitli kültür ortamlarında sitotoksik etki göstermiştir. Gemsitabin'in etki mekanizması faz spesifiktir ve DNA sentez döneminde (s-fazı) olan hücreleri öldürür ve belirli koşullarda hücre döngüsünde G1/S fazı geçişini bloke eder. Yapılan çalışmalarda gemsitabin'in *in vitro* sitotoksik etkisinin derişime ve zamana bağımlı olduğu belirlenmiştir.

Etki mekanizması

Gemsitabin (dFdC) bir pirimidin antimetabolitidir ve hücre içerisinde nükleozit kinazlar ile aktif difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) nükleotitlerine metabolize olur. Gemsitabin'in sitotoksik etkisi, dFdCDP ve dFdCTP'ye bağılı iki ayrı mekanizma ile

DNA sentezini inhibisyonu sonucu oluşur. İlk önce, DNA sentezi için deoksisitidin trifosfat (dCTP) oluşturan reaksiyonları katalizleyen ribonükleotit redüktaz dFdCDP tarafından inhibe edilir. Bu enzimin dFdCDP ile inhibisyonu sonucu dCTP de azalma meydana gelir. İkinci olarak, dFdCTP DNA'nın yapısına girmek için dCTP ile yarış içine girer.

Farmakokinetik özellikler

Dağılım

Merkezi kompartmana dağılım hacmi, kadınlar için 12,4 L/m² , erkekler için 17,5 L/m². Periferik kompartmana ise dağılım hacmi, 47,4 L/m²'dir. Periferik kompartman hacmi, cinsiyete bağlı değildir. Dağılım hacmi, infüzyon süresinin uzamasıyla artar. 70 dakikadan daha az süre uygulanan infüzyon sonucunda dağılım 50 L/m²'dir. Uzun süreli infüzyonda bu miktar 370 L/m²'dir. Gempitabin'in plazma proteinlerine bağlanma oranı ihmal edilebilir düzeydedir.

Biyotransformasyon

Gempitabin karaciğer, böbrekler, kan ve diğer dokularda sitidin aminaz tarafından hızla metabolize edilir. Gempitabin, hücre içerisinde nükleozit kinazlar ile aktif difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) nükleozitlere ve aktif olmayan dFdU'ya metabolize olur. Görünürdeki dFdU oluşumu gempitabin klerensinin %91-98'i arasında değişir. Ana metaboliti olan dFdU aktif değildir ve idrarda saptanır. İdrarla atılım %10'dan daha azı, değişmemiş ilaç olarak atılır. Renal klirens, 2-7 L/saat/m²'dir. Haftalık uygulanan dozun %99'u dFdU şeklinde idrarla ve %1'i de feçesle atılır (<http://www.ilacrehberi.com/>).

2.9 Kaynak Araştırması

2.9.1 Nitrofurantoin ile ilgili kaynak araştırması

Fogg ve Ghawji (1988) tarafından yapılan bir çalışmada, akış enjeksiyon amperometri yöntemi ile nitrofurantoin ve asetazolamit tayini asılı cıva damla elektrodu kullanılarak yapılmıştır. Nitrofurantoin için doğrusal çalışma aralığı $-0,70$ V'da doygun kalomel elektroda karşı Britton Robinson (BR) tamponunda (pH 7,5) $1-50$ mg/L olarak bulunmuştur. Asetazolamit için ise $-0,85$ V'da $0,1$ M HCl içerisinde $10-70$ mg/L olarak elde edilmiştir. İlaçların tablet formülasyonlarında tayinleri başarılı bir şekilde yapılmıştır (Fogg ve Ghawji 1988).

Antibakteriyel etkili madde nitrofurantoin tayini asılı cıva damla elektrodu kullanılarak pH 2–11 arasında incelenmiş ve nitro grubunu amino grubuna dönüşümünden kaynaklanan bir indirgenme piki gözlenmiştir. Kare dalga voltametrisi kullanılarak çözelti fazında, farmasötik formülasyonlarda, insan serumu ve idrarında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde hassas ve tekrarlanabilir değerler bulunmuştur. Nitrofurantoin için geri kazanım değeri $100,68 \pm 0,17$ (n=5) ve teşhis sınırı $1,32 \times 10^{-10}$ M olarak elde edilmiştir (Hammam 2002).

Yola ve Özaltın (2011) tarafından yapılan bir çalışmada antibakteriyel etki gösteren nitrofurantoin'in (NFT) dsDNA ile etkileşimi asılı cıva damla elektrot (HMDE) kullanılarak incelenmiştir. Nitrofurantoin pH 7,1 BR tamponunda, $-1,192$ V potansiyelde tersinmez bir indirgenme piki vermiştir. Dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve UV/Vis spektroskopisi yöntemleri nitrofurantoin ile buzağı timus DNA arasındaki etkileşimi aydınlatmak için kullanılmıştır. İlaç ile DNA arasındaki bağlanma sabiti $8,22(\pm 0,05) \times 10^6$ M⁻¹ ve ilacın DNA'ya bağlanma oranı 1:3 olarak bulunmuştur. Kronokulometri ile yapılan çalışmaların sonucunda ise nitrofurantoin ve nitrofurantoin–DNA için hesaplanan difüzyon katsayıları sırasıyla $1,10 (\pm 0,03) \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹ ve $3,67 (\pm 0,03) \times 10^{-8}$ cm² s⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elektrokimyasal ve spektroskopik sonuçlara göre nitrofurantoin'in DNA'ya interkalasyon ile bağlandığı rapor edilmiştir (Yola ve Özaltın 2011).

2.9.2 Gemsitabin ile ilgili kaynak araştırması

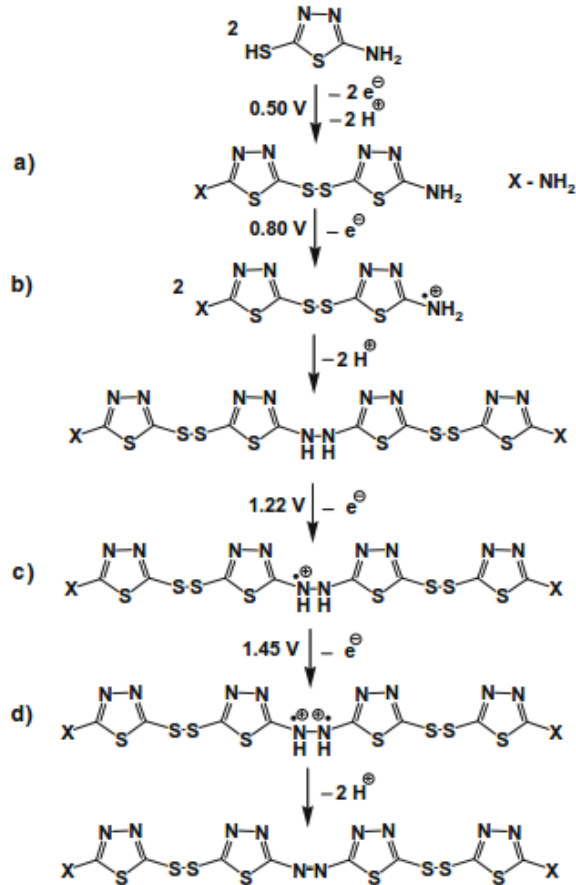
Kalanur vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada antikanser ilaç gemsitabin hidroklorür'ün camısı karbon elektrotta elektrokimyasal yükseltgenmesi voltametrik teknikler kullanılarak çalışılmıştır. GEM +0,927 V'da geri dönüşümsüz bir yükseltgenme piki göstermiştir (pH 7,4 fosfat tamponu). GEM'in elektrokimyasal davranışına tarama hızı, pH, sıcaklık ve elektrolit türünün etkisi incelenmiştir. GEM ve DNA arasındaki etkileşim DPV ve spektroskopik teknikler ile araştırılmıştır. DNA ile ilaç arasındaki bağlanma sabiti ve bağlanma oranı sırasıyla $2,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ve 1:2 olarak bulunmuştur. GEM için doğrusal çalışma aralığı $5,0 \times 10^{-6}$ – $7,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ve teşhis sınırı $1,06 \times 10^{-6} \text{ M}$ olarak hesaplanmıştır (Kalanur vd. 2009).

Buoro vd. (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, sitosin nükleozit analogu ve antikanser ilaç olan GEM'in elektrokimyasal davranışı camısı karbon elektrot ile dönüşümlü, diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Farklı pH'lerde hazırlanan destek elektrolitleri içerisinde ilaca ait herhangi bir redoks davranışı gözlenmemiştir. DNA ile GEM arasındaki etkileşim inkübasyon çözeltilerinde ve elektrokimyasal DNA biyosensörü kullanılarak değerlendirilmiştir. DNA'nın yapısal modifikasyonları ve hasarı guanozin ve adenozin yükseltgenme piklerindeki değişiklikler izlenerek belirlenmiştir. DNA-GEM etkileşim mekanizmasının iki ayrı adımda gerçekleştiği bildirilmiştir. Birincisi DNA sekansından bağımsız ilerleyen ve DNA zincirlerinin kondenzasyon/agregasyonuna neden olan adım, ikincisi ise G-C baz çiftine katılan guaninin hidrojen atomlarının GEM'in riboz kısmındaki flor atomları ile etkileşimi olduğu rapor edilmiştir (Buoro vd. 2014).

2.9.3 AMT (5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadiazol) ile ilgili kaynak araştırması

Kalimithu ve John (2009) AMT'nin 0,1 M H_2SO_4 içeren ortamda dönüşümlü voltametri tekniği ile elektropolimerizasyonunu rapor etmişler ve elde edilen polimer film kaplı GCE'yi fizyolojik pH'de L-sistein tayini için kullanmışlar ve elektropolimerizasyon için önerilen mekanizmayı rapor etmişlerdir (Şekil 2.31). +0,5 V'daki yükseltgenme pikinin tiyol grubunun disülfite (Şekil 2.31.a) ve +0,8 V'daki pikin ise amino grubunun

yükseltgenerek radikal katyona dönüşmesine (Şekil 2.31.b) işaret ettiği bildirilmiştir. Ardından iki katyon radikali hidrazo bağıyla bir dimer oluşturmuştur. Dimer yapıdaki iki –NH grubunun yükseltgenmesi iki basamakta meydana gelmiştir. İlk basamakta –NH gruplarından biri +1,22 V’da radikal katyon oluşturmuştur (Şekil 2.31.c), ikinci basamakta ise diğer –NH grubu +1,45 V’da radikal katyon oluşturmuştur (Şekil 2.31.d.). Elektropolimerize film dönüşümlü voltametri, atomik güç mikroskopi (AFM) ve X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile karakterize edilmiştir. AFM görüntüsü P(AMT)’nin 15 döngü ile biriktirilmesi sonucu 25 nm kalınlıkta küresel yapı içeren homojen bir film şeklinde kaydedilmiştir. XPS’deki 163,5, 400,2 ve 398,8 eV’daki bağlanma enerjileri S–S, HN–NH ve N–N grupları ile ilişkilendirilmiştir. P(AMT) filmin sistein ve askorbik asitin voltametrik sinyallerini 480 mV’luk bir farkla ayırdığı görülmüştür (Kalimuthu ve John 2009c).



Şekil 2.31 AMT’nin elektropolimerizasyonu için önerilen mekanizma (Kalimuthu ve John 2009)

Kalimuthu ve John (2009) tarafından yapılan bir çalışmada P(AMT) modifiye camı karbon elektrot kullanılarak askorbik asit ve ürik asit varlığında folik asit tayini yapılmıştır. Yalın GCE elektrotta askorbik asit ve ürik asitin yükseltgenme ürünlerinin elektrot yüzeyinde birikmesinden dolayı folik asit tayini sağlanamazken P(AMT) modifiye GCE’de her bir türe ait voltametrik sinyallerin ayrı ayrı tayin edildiği ve yükseltgenme sinyallerinin arttığı görülmüştür. P(AMT) film modifiye elektrot 200 kat askorbik asit ve 100 kat ürik asit miktarlarında bile folik asit tayini için çok iyi seçicilik göstermiştir. Amperometrik tayinde folik asit için doğrusal aralık $1,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-4}$ M arasında ve teşhis sınırı $2,3 \times 10^{-10}$ M (S/N=3). Hazırlanan modifiye elektrotla insan kan serum örneklerinde folik asit tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Kalimuthu ve John 2009d).

Kalimuthu ve John (2009) askorbik asit, dopamin ve ürik asitin eş zamanlı tayinini P(AMT) film kaplı camı karbon elektrot kullanarak gerçekleştirmiştir. Yalın GCE türlerin voltametrik sinyallerini ayıramazken, P(AMT) modifiye GC elektrot hem pikleri ayırmış hem de yükseltgenme sinyallerini arttırmıştır. Askorbik asit, ürik asit ve dopaminin artan yükseltgenme sinyallerinin polimer film ile türler arasındaki elektrostatik etkileşimden kaynaklandığı bildirilmiştir. Amperometrik yöntem kullanılarak askorbik asit, dopamin ve ürik asit için teşhis sınırları sırasıyla 0,92 nM, 0,07 nM ve 0,57 nM olarak bulunmuştur (S/N= 3) (Kalimuthu ve John 2009a).

Kannan ve John (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise altın-AMT çekirdek-kabuk yapılı nanopartikül kompozit (p-GAMCS) modifiye GC elektrot ile seçici, duyarlı ve kararlı bir şekilde L-sistein tayini yapılmıştır. Bu film camı karbon elektrot yüzeyinde p-GAMCS’nin potansiyodinamik metot ile biriktirilmesiyle elde edilmiştir. Oluşturulan bu yapı dönüşümlü voltametri ve AFM teknikleriyle karakterize edilmiştir. p-GAMCS nanopartikül filmin AFM görüntüsünde yaklaşık 10 nm çapında küresel şekilli altın nanopartiküllerin homojen bir şekilde yer aldığı belirlenmiştir. Fizyolojik pH’de sistein için yalın elektrotta herhangi bir cevap alınamazken p-GAMCS nanopartikül film modifiye GC elektrotta 0,51 V’da sisteine ait yükseltgenme piki gözlenmiştir. Geliştirilen elektrot askorbik asit ve sisteinin eş zamanlı tayininde kullanılmış ve bu türler arasında 500 mV’luk bir pik ayrımı sağlanmıştır. L-sistein için

doğrusal çalışma aralığı 10 nM–140 nM arasında elde edilmiş ve teşhis sınırı 3 pM (S/N = 3) olarak hesaplanmıştır. L-sistein için yapılan insan kan serumu ve idrarında yapılan analizlerde oldukça yüksek geri kazanımlar elde edilmiştir (Kannan ve John 2011).

Muti vd. (2013) P(AMT) modifiye tek kullanımlık grafit elektrotlar hazırlayarak bir bisflavanoid olan quercetin tayinini gerçekleştirmiştir. P(AMT) yüzeyi SEM ve EIS ile karakterize edilmiştir. Elektropolimerizasyon koşulları dönüşümlü voltametri tekniği ile optimize edilmiştir. Geliştirilen elektrotların elektrokimyasal davranışları DPV ve EIS yöntemleriyle incelenmiştir. Yalın elektroda göre P(AMT) kaplı elektrotta quersetin sinyalinin yaklaşık altı kat arttığı rapor edilmiştir (Muti vd. 2013).

2.9.4 PDCA (2,6-piridindikarboksilik asit) ile ilgili kaynak araştırması

Li ve Ling (2013), P(PDCA) ve kimyasal olarak indirgenmiş grafen modifiye cam elektrot kullanarak guanin ve adeninin eş zamanlı tayinini gerçekleştirtir. P(PDCA) cam elektrot yüzeyi dönüşümlü voltametri tekniği ile 10 döngü ile +0,1–+1,7 V arasında, 20 mV/s tarama hızında, taze hazırlanmış 2 mM PDCA içeren 0,2 M KCl içerisinde kaplanmıştır. Geliştirilen elektrot SEM ve Raman spektroskopisi ile karakterize edilmiş ve guanin ve adenin için elde edilen voltametrik cevap önemli ölçüde artmıştır. Guanin ve adenin için doğrusal çalışma aralığı sırasıyla 0,05–4,5 μ M ve 0,1–6,0 μ M olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem buzağı timusu DNA'sı ile de ölçülmüştür ve iyi sonuçlar elde edilmiştir (Li vd. 2013).

Deng vd. (2011) tarafından P(PDCA) ve MWCNT modifiye camsı karbon elektrot kullanılarak guanin ve adeninin eş zamanlı tayini gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrodun performansı CV ile karakterize edilmiştir. DPV tekniği ile guanin ve adeninin doğrusal çalışma aralıkları belirlenmiş, teşhis sınırları sırasıyla 0,045 M ve 0,05 M olarak hesaplanmıştır (Deng vd. 2011).

Yang vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada PAT gen parçasının tayini için P(PDCA) ve nanoaltın modifiye camsı karbon elektrot hazırlanmıştır. PDCA'nın polimerleştirilmesi dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 18 döngü ile 60 mV/s

tarama hızıyla 0,0 ile +2,0 V arasında 1 mM PDCA içeren 0,1 M KCl içinde yapılmıştır. DNA probu hazırlanan yüzeye immobilize edilmiş, ardından hedef diziyile hibridizasyon sağlanmıştır. Çalışmada DPV, CV ve EIS kullanılmıştır. Hedef dizinin tayini, hibridizasyon sonrası elektron transfer direncindeki (R_{et}) artış üzerinden yapılmıştır. PAT gen parçası için $1,0 \times 10^{-10}$ M ile $1,0 \times 10^{-5}$ M arasında doğrusal bir çalışma aralığı elde edilmiş ve teşhis sınırı $2,4 \times 10^{-11}$ M olarak bulunmuştur (Yang vd. 2007).

Yang ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada GCE yüzeyinde karboksil fonksiyonlu SWCNT varlığında P(PDCA) filmi oluşturulmuştur. Elektropolimerizasyon dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 16 döngü ile 60 mv/s tarama hızıyla -0,6 ile +2,0 V arasında 1 mM PDCA içeren 0,1 M KCl içerisinde yapılmıştır. Ardından poli(diallilmetil amonyum klorür), hazırlanan negatif yüklü elektrot yüzeyine adsorbe edilmiştir. 5' uçlu DNA probu bu elektrot yüzeyine immobilize edilerek PAT gene parçasını tespit etmek için bir DNA biyosensörü hazırlanmıştır. PAT hedef dizi için $1,0 \times 10^{-11}$ M ile $1,0 \times 10^{-6}$ M arasında doğrusal çalışma aralığı elde edilmiş ve teşhis sınırı $2,06 \times 10^{-12}$ M olarak bulunmuştur (Yang vd. 2008).

Raof vd. (2009) camı karbon elektrot yüzeyinde P(PDCA) filmi hazırlamıştır. Elektropolimerizasyon dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 8 döngü ile 50 mv/s tarama hızıyla 0,0 ile +2,0 V arasında 1 mM PDCA içeren 0,1 M KCl içerisinde yapılmıştır. Ardından yüzey altın nanopartikül ve 1,2-naftokinon-4-sülfonik asit ile modifiye edilerek nanokompozit hazırlanmıştır. Naftokinon türevi, *N*-asetil sisteinin elektrokimyasal yükseltgenmesini katalizlemek için kullanılmış ve potansiyelin 600 mV'a düşmesi sağlanmıştır. *N*-asetil sistein için doğrusal çalışma aralığı $4,0 \times 10^{-6}$ M ile $1,3 \times 10^{-4}$ M arasında ve teşhis sınırı $8,0 \times 10^{-7}$ M olarak elde edilmiştir (Raof vd. 2009).

Nikotinamid adenin dinükleotitin (NADH) elektrokimyasal tayini için magnetik Fe_3O_4 nanopartikül ve P(PDCA) modifiye camı karbon elektrot hazırlanmıştır. Elektropolimerleşme dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 16 döngü ile 60 mv/s tarama hızıyla -0,6 ile 2,0 V arasında 1 mM PDCA içeren 0,1 M KCl içinde

yapılmıştır. Fe_3O_4 polimer kaplı elektrot yüzeyine damlatılarak $\text{P}(\text{PDCA})/\text{Fe}_3\text{O}_4$ kompoziti hazırlanmıştır. Geliştirilen bu modifiye elektrodun NADH tayini için geniş bir yüzey alanı sağladığı, doğrusal çalışma aralığının $5,0 \times 10^{-8}$ M ile $2,5 \times 10^{-5}$ M arasında ve teşhis sınırının $1,0 \times 10^{-8}$ M olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, NADH sensörü bitki ekstratlarında antioksidant kapasitenin belirlenmesi için kullanılmıştır (Cui vd. 2011b).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

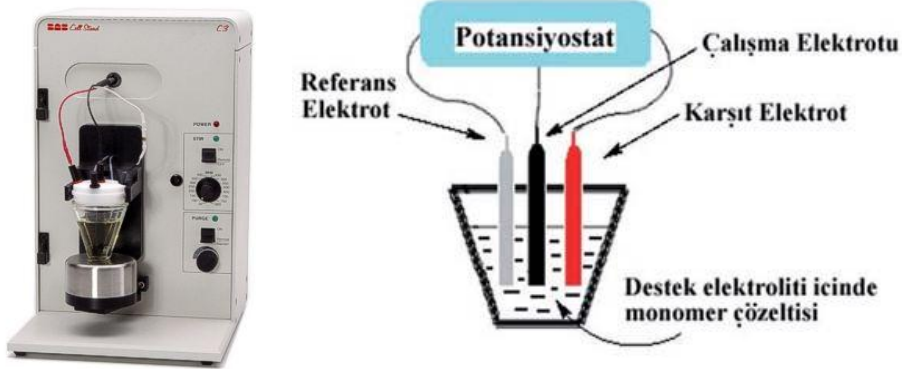
3.1 Deneyde Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1 Elektrokimyasal analiz cihazı

Tez kapsamında voltametrik ve impedimetrik ölçüm işlemlerinde FRA modüle sahip Autolab PGSTAT 302N (Eco Chemie, Hollanda) potansiyostat/galvanostat cihazı bilgisayar bağlantılı olarak ve NOVA 11.1 yazılımı ile birlikte kullanıldı. Elektrokimyasal analiz cihazı ara birim olarak üçlü elektrot sistemine sahip elektrokimyasal hücre içermektedir.

3.1.2 Hücre ve elektrotlar

Elektrokimyasal ölçüm işlemlerinde şekil 3.1.a'da gösterilen BASi C3 hücre standı ve şekil 3.1.b'de gösterilen üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot (BASi MF-2070), referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrodu (BASi MF-2021), karşıt elektrot olarak platin tel elektrot (BASi MW-1032) kullanıldı.



Şekil 3.1.a. Ölçüm işlemlerinde kullanılan hücre standı ve b. üçlü elektrot sistemini içeren çalışma hücresi

3.1.3 Kullanılan diğer cihazlar

a) UV-Vis spektrofotometre	: Shimadzu UV 1700 (PharmaSpec)
b) Viskozimetre	: SI Analytics GmbH
c) pH metre	: Thermo ORION 720 A
d) Vorteks	: Isolab
e) Ultrasonik Banyo	: Bandelin Sonorex
f) Otomatik mikropipetler	: Eppendorf Research Plus
g) Hassas terazi	: Kern
h) Manyetik karıştırıcı	: Thermolyne Cimarec 2
i) Ultra saf su cihazı	: Elga Purelab Option-Q
j) Santrifüj	: Jouan B4

Fourier transform infrared (FTIR) spektrumları alınacak polimer kaplamalar, elektrot yüzeyinden doğrudan Bruker Alpha spektrometresinin ATR bağlantısına yerleştirildi ve spektrumları kaydedildi.

Hazırlanan polimer kaplamaların yüzey fotoğrafları FEI Quanta 400F alan emisyon taramalı elektron mikroskobu ile alındı.

3.2 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin adları ve temin edilen firmalar aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma
Çift sarmal DNA (dsDNA)	Serva Company
2,6-piridindikarboksilik asit	Aldrich
5-amino-2-merkapto-1,3,4-tiyadiazol	Aldrich
Sodyum hidroksit	Sigma
Hidroklorik asit	Sigma
Asetik asit	Sigma
Sodyum klorür	Sigma
Sodyum asetat trihidrat	Sigma
Sülfirik asit	Riedel de Haën
mono-Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Riedel de Haën
di-Sodyum dihidrojenfosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Riedel de Haën
Potasyum klorür	Sigma
Gemsitabin.HCl	Sigma
Nitrofurantoin	Sigma
Gemful [®]	Actavis
Piyeloseptyl [®]	Biofarma
Askorbik asit	Sigma
Ürik asit	Fluka
L-sistein	Fluka
D-glukoz	Fluka
Etanol	Sigma
N,N-dimetilformamit	Sigma

3.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 4,8)

0,2722 g sodyum asetat trihidrat ve 0,1154 ml asetik asit karıştırılarak ultra saf su ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Ayrıca çözeltiye derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklendi. Çözeltinin pH'ı 0,1 M NaOH/HCl kullanılarak ayarlandı. Tüm tampon çözeltilerin hazırlanmasında 18,2 mega ohm'luk ultra saf su kullanıldı. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.3.2 0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 7,4)

Toplam fosfat derişimi 0,05 M olacak şekilde sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve disodyum monohidrojenfosfat heptahidrat'tan ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) uygun miktarlar tartıldı ve saf suda çözüldü. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 0,1 M NaOH veya 0,1 M H_3PO_4 çözeltileri kullanılarak ayarlandı.

3.3.3 dsDNA çözeltisinin hazırlanması

Derişimi 1000 mg/L olan stok dsDNA çözeltisi, uygun miktarda katının saf su ile çözülmesi ile hazırlandı. Hazırlanan çözelti 1500 μL 'lik hacimlerde tüplere paylaştırılarak -20°C'de saklandı.

3.3.4 Elektropolimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması

Polimer film kaplı elektrotların hazırlanması amacıyla, 1,0 mM 5-amino-2-merkaptotriyadiazol içeren 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi hazırlandı. Elektropolimerizasyon öncesi çözeltide çözünmüş olarak bulunan oksijeni uzaklaştırmak amacıyla sistemden 15 dk boyunca inert gaz olarak kullanılan yüksek saflıktaki (%99,99) N_2 gazı geçirildi.

1,0 mM 2,6-piridindikarboksilik asit içeren 0,1 M KCl çözeltisi hazırlandı. Elektropolimerizasyon öncesi çözeltide çözünmüş olarak bulunan oksijeni

uzaklaştırmak amacıyla sistemden 15 dk boyunca inert gaz olarak kullanılan yüksek saflıktaki (%99,99) N₂ gazı geçirildi.

3.3.5 İlaç stok çözeltileri

Derişimi 1000 mg/L olan nitrofurantoin stok çözeltisi uygun miktarda katının *N,N*-dimetilformamit ile çözülmesi ile hazırlandı ve çözelti kullanılmadığı zaman +4°C’de buzdolabında muhafaza edildi.

Derişimi 1000 mg/L olan Gempitabin.HCl stok çözeltisi uygun miktarda katının saf su ile çözülmesi ile hazırlandı ve çözelti kullanılmadığı zaman +4°C’de buzdolabında tutuldu.

3.3.6 Girişim çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

L-Askorbik asit, D-glukoz ve L-sistein stok çözeltileri her birinin derişimleri $0,1 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde hazırlandı.

Derişimi $0,1 \times 10^{-2}$ M olan ürik asit çözeltisi, ilgili katının gerekli miktarlarda tartılıp, % 0,45 (k/h) lik Li₂CO₃ çözeltisinde çözülmesiyle hazırlandı.

3.4 Camsı Karbon Elektrotların Temizlenmesi

Camsı karbon elektrotların temizlenmesi, BAS firmasından temin edilen, temizleme kiti (MF 2060) ve üç farklı boyutta alumina tozundan hazırlanmış yüzey temizleme süspansiyonları (CF 1050 ve MF 2054) kullanılarak yapıldı (Zambonin ve Losito 1997). Bu şekilde temizlenen elektrotlar, sırasıyla etanole ve saf suya daldırılarak ultrasonik banyoda tutuldu ve oda sıcaklığında kurutuldu.

3.5 Elektropolimerizasyon ile Modifiye Elektrotların Hazırlanması

3.5.1 Camı karbon elektrot yüzeyine poli-(5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadiazol) (P(AMT)) kaplanması

Çift sarmal DNA (dsDNA) adsorpsiyonunda uygun matriks ortamının sağlanması amacıyla yüzeyleri temizlenmiş camı karbon (GC) elektrodun yüzeyi 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiyadiazol'ün elektropolimerizasyonu ile kaplandı. Elektropolimerizasyon dönüşümlü voltametri yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla, Bölüm 3.3.4'te belirtildiği gibi 1,0 mM AMT içeren 0,1 M H₂SO₄ elektrokimyasal hücreye konuldu, içine camı karbon elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel elektrotlar daldırıldı. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak çizelge 3.2'de belirtilen koşullarda elektropolimerizasyon sağlandı ve poli AMT (P(AMT)) modifiye GCE (GCE/P(AMT)) elde edildi (Kalimuthu ve John 2009c). Polimer film kaplanmış elektrotlar, kaplamadan sonra, saf suya daldırıldı ve polimerin yapısına katılmayan türler (monomer, bazı oligomer, elektrolitler) uzaklaştırıldı.

Çizelge 3.2 AMT için elektropolimerizasyon koşulları

Kullanılan Teknik	Dönüşümlü voltametri
Potansiyel aralığı	-0,2 V ile +1,7 V
Tarama Hızı	50 mV/s
Döngü Sayısı	15
Kullanılan Çözeltiler	1,0 mM AMT içeren 0,1 M H ₂ SO ₄

3.5.2 Camı karbon elektrot yüzeyine poli-(2,6-piridindikarboksilik asit) (P(PDCA)) kaplanması

dsDNA adsorpsiyonunda uygun matriks ortamının sağlanması için, yüzeyleri temizlenmiş camı karbon elektrotlar 2,6-piridindikarboksilik asit'in (PDCA) elektropolimerizasyon yolu ile kaplandı. Elektropolimerizasyon dönüşümlü voltametri

yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.3.4’te belirtildiği gibi 1,0 mM PDCA içeren 0,1 M KCl elektrokimyasal hücreye konuldu, içine camı karbon elektrot, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel elektrotlar daldırıldı. Dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak Çizelge 3.3’te belirtilen koşullarda elektropolimerizasyon sağlandı ve Poli PDCA (P(PDCA)) modifiye GCE (GCE/P(PDCA)) elde edildi (Yang vd. 2007, Cui vd. 2011b). Polimer film kaplanmış elektrotlar, kaplamadan sonra, saf suya daldırıldı ve polimerin yapısına katılmayan türler (monomer, bazı oligomer, elektrolitler) uzaklaştırıldı. dsDNA’nın yüzeye adsorpsiyonu çalışmalarında P(PDCA) yüzeyinde pozitif yük oluşturmak amacıyla GCE/P(PDCA) yüzeyine aktivasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla GCE/P(PDCA) yüzeyi, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içinde +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV’luk puls genliğinde 10 ardışık diferansiyel puls voltamogramı alınarak aktive edildi.

Çizelge 3.3 PDCA için elektropolimerizasyon koşulları

Kullanılan Teknik	Dönüşümlü voltametri
Potansiyel aralığı	0,0 V ile +2,0 V
Tarama Hızı	60 mV/s
Döngü Sayısı	18
Kullanılan Çözeltiler	1,0 mM PDCA içeren 0,1 M KCl

3.5.3 Dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) deneylerinin yapılışı

Yalın, polimer kaplı ve dsDNA adsorbe edilmiş polimer kaplı camı karbon elektrotların CV ölçümleri 5,0 mM demir (II) hekzasiyanoferrat ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) ve 5,0 mM demir (III) hekzasiyanoferrat ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) türlerini içeren $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-/4-}$ 0,1 M KCl’de 50 mV/s tarama hızında, -0,3 V ile +0,6 V potansiyel aralığında gerçekleştirildi. Elektrotların elektrokatalitik özelliklerini karşılaştırmak için anodik ve katodik pik akımları (sırasıyla I_{pa} ve I_{pk}) ve pik potansiyelleri (sırasıyla E_{pa} ve E_{pk}) Nova 1.11 yazılımı yardımıyla belirlendi. Pik ayırım potansiyelleri (ΔE_p) değerleri hesaplandı.

Yalın, polimer kaplı ve dsDNA adsorbe edilmiş polimer kaplı camı karbon elektrotların EIS ölçümleri, 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl'de açık devre potansiyelinde 5 mV genlikle, 10^{-5} ile 10^{-1} Hz frekans aralığında gerçekleştirildi.

3.5.4 Biyosensör cevabına polimer film kalınlığının etkisi

GCE yüzeyinde P(AMT) ve P(PDCA) oluşumu Bölüm 3.5.1 ve 3.5.2'de belirtildiği şekilde yapıldı. Biyosensör cevabına P(AMT) ve P(PDCA) kalınlığının etkisini incelemek amacıyla farklı döngü sayılarında P(AMT) ve P(PDCA) oluşumu gerçekleştirildi. Bu döngü sayıları P(AMT) için 5, 10, 15, 20, 30 ve P(PDCA) için ise 5, 10, 18, 25, 30 olarak kullanıldı. Belirtilen döngü sayılarında elde edilen polimer kaplı elektrotlara dsDNA immobilizasyonu Bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde yapıldı ve guanin yükseltgenme sinyalleri ölçülerek karşılaştırıldı.

3.6 Polimer Modifiye Elektrotlara dsDNA'nın İmmobilizasyonu İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi

3.6.1 dsDNA derişiminin etkisi

GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotlara dsDNA'nın immobilizasyonu pasif adsorpsiyon yöntemi ile yapıldı.

GCE/P(AMT) elektrodu asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 0,5–40,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 15 dakika süreyle potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA, elektrot yüzeyine adsorbe edildi.

GCE/P(PDCA) elektroduna dsDNA'nın immobilizasyonu için asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 0,5–50,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 30 dakika süreyle potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA, elektrot yüzeyine adsorbe edildi. Daha sonra yüzeye

bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.6.2 İmmobilizasyon süresinin etkisi

GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotlara dsDNA'nın immobilizasyonunda optimum adsorpsiyon süresinin belirlenmesi amaçlandı.

GCE/P(AMT) elektrodu asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 20,0 mg/L derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 3–30 dakika aralığında değişen sürelerde potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA, elektrot yüzeyine adsorbe edildi.

GCE/P(PDCA) elektrodu asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 40,0 mg/L derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 3–40 dakika aralığında değişen sürelerde potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA, elektrot yüzeyine adsorbe edildi. Daha sonra yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,80) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.7 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi

3.7.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi

GCE/P(AMT) elektroduna 20,0 mg/L derişimde dsDNA 15 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 s bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(AMT), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 25,0 mg/L derişimde hazırlanan nitrofurantoin ile 30–210 saniye arasında değişen sürelerde karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,30 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponunda (pH 4,8) gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.7.2 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde nitrofurantoin etkileşmesinin incelenmesi

GCE/P(AMT) elektroduna 20,0 mg/L derişimde dsDNA 15 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(AMT), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 1,0–40,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde hazırlanan nitrofurantoin ile 120 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.7.3 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi

GCE/P(PDCA) elektroduna 40,0 mg/L derişimde dsDNA 30 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(PDCA), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 20,0 mg/L derişimde hazırlanan nitrofurantoin ile 30–210 saniye arasında değişen sürelerde karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.7.4 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde nitrofurantoin etkileşmesinin incelenmesi

GCE/P(PDCA) elektroduna 40,0 mg/L derişimde dsDNA 30 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(PDCA), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 0,5–50,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde hazırlanan nitrofurantoin ile 150 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.7.5 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması

10 adet Pyeloseptyl[®] kapsül hassas bir şekilde tartıldı. Ardından bu kapsüllerin içeriği bir kaba alınarak boş kapsüller tartıldı. Dolu kapsüller ile içeriği alınmış boş kapsüller arasındaki fark hesaplandı. Toplanan kapsül içerikleri agat havanda ince toz haline getirildi. Bu tozdan 1 mg/mL'ye eşdeğer miktarda tartıldı ve plastik tüpte *N,N*-dimetilformamit ile hacim tamamlandı. Bu karışım ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi. Elde edilen berrak çözeltiden uygun miktarda alındı ve 0,5 M asetat tamponu ile 5 mL'ye tamamlandı. Ardından hazırlanan bu çözelti GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları ile ayrı ayrı etkileştirilerek daha önce NFT tayini için yapılan aşamalar uygulandı ve voltamogramlar kaydedildi.

3.7.6 Nitrofurantoin için yapılan geri kazanım çalışmaları

Kapsül içeriğindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmayacağını belirlemek amacıyla kapsül içeriklerinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla ince toz haline getirilmiş belirli miktarda kapsül içeriği ve belirli miktarda saf etken madde karışımı uygun hacimde *N,N*-dimetilformamit ile çözüldü. Bu çözeltiden NFT için elde edilen kalibrasyon grafiğindeki üç farklı derişime karşılık gelecek şekilde seçilen NFT çözeltileri ile GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları etkileştirildi. Ardından kapsül içeriklerine uygulanan aynı aşamalar GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları için bu çözeltilere de uygulandı. Buradan hazırlanan modifiye elektrotlar kullanılarak saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebileceği araştırıldı.

3.7.7 Nitrofurantoin serum stok çözeltisi

Sağlıklı kişilerden onayları alınarak temin edilen insan serumları 1:10 oranında 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltilti. Hazırlanan serum çözeltisinin içine derişimi 1,0 mg/mL olacak şekilde saf etken NFT çözeltisi ilave edildi. Bu karışımın homojen hale getirilmesi için 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Elde edilen berrak çözelti NFT'in serum stok çözeltisi olarak kullanıldı. Ardından GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları kullanılarak aynı şekilde voltamogramlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlardan % geri kazanım değerleri hesaplandı.

3.8 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi

1000 mg/L gemsitabin stok çözeltisi ultra saf su ile hazırlandı. 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) çalışma ortamı olarak kullanıldı.

3.8.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in etkileşiminde etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi

GCE/P(AMT) elektroduna 20,0 mg/L derişimde dsDNA 15 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(AMT), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 30,0 mg/L derişimde hazırlanan gemsitabin ile 30–180 saniye arasında değişen sürelerde karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.8.2 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde gemitabin'in etkileşmesinin incelenmesi

GCE/P(AMT) elektroduna 20,0 mg/L derişimde dsDNA 15 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(AMT), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 1,0–50,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde hazırlanan nitrofurantoin ile 90 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.8.3 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemitabin'in etkileşiminde etkileşiminde süresinin etkisinin incelenmesi

GCE/P(PDCA) elektroduna 40,0 mg/L derişimde dsDNA 30 dakika süresince adsorbe edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(PDCA), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 30,0 mg/L derişimde hazırlanan gemitabin ile 30–210 saniye arasında değişen sürelerde karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.8.4 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile farklı derişimlerde gemitabin'in etkileşmesinin incelenmesi

GCE/P(PDCA) elektroduna 40,0 mg/L derişimde dsDNA 30 dakika süresince immobilize edildi. Yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması için elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek yıkandı.

dsDNA adsorbe edilmiş GCE/P(PDCA), potansiyel uygulanmadan asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 0,5–50,0 mg/L aralığında değişen derişimlerde hazırlanan gemitabin ile 150 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

3.8.5 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltisine uygulanması

Gemful[®] hazır farmasötik preparatından 1,0 mg/mL'ye eşdeğer miktarda alıp 10 mL'lik plastik tüpte saf su ile tamamlandı. Ultrasonik banyoda 30 dakika karıştırıldı. Elde edilen berrak çözeltiden uygun miktarlarda alınarak 0,5 M asetat tamponu ile tüpte gerekli hacime tamamlandı. Ardından hazırlanan bu çözelti GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları ile ayrı ayrı etkileştirilerek voltamogramlar kaydedildi.

3.8.6 Gemitabin için yapılan geri kazanım çalışmaları

Enjeksiyon çözeltisi içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmayacağını belirlemek amacıyla enjeksiyon preparatından geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla belirli miktarda enjeksiyon çözeltisi ve belirli miktarda saf etken madde karışımı uygun hacimde saf su ile çözöldü. Bu çözeltiden GEM için elde edilen kalibrasyon grafiğindeki üç farklı derişime karşılık gelecek şekilde seçilen GEM çözeltileri ile

GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları etkileştirildi. Ardından enjeksiyon çözeltisine uygulanan aynı aşamalar GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotları için bu çözeltilere de uygulandı. Buradan hazırlanan modifiye elektrotlar kullanılarak saf madde miktarının ne kadarının tayin edilebileceği araştırıldı.

3.8.7 Gemitabin serum stok çözeltisi

Sağlıklı kişilerden onayları alınarak temin edilen insan serumları 1:10 oranında 0,05 M pH 7,4 fosfat tamponu ile seyreltildi. Hazırlanan serum çözeltisinin içine derişimi 1,0 mg/mL olacak şekilde gemitabin çözeltisi ilave edildi. Bu karışımın homojen hale getirilmesi için 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Elde edilen berrak çözelti gemitabin'in serum stok çözeltisi olarak kullanıldı. Ardından GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları ayrı ayrı kullanılarak standart çözeltilerle yapılan aşamalar uygulandı ve voltamogramlar kaydedildi. Elde edilen sonuçlarda gemitabin'i geri kazanmak için % geri kazanım değerleri hesaplandı.

3.9 GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA Elektrotlarının NFT/GEM ile Etkileşimlerine Çeşitli Türlerin Etkisinin İncelenmesi

Geliştirilen GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotları kullanılarak incelenen dsDNA-NFT/GEM etkileşimleri için kan serumunda bulunabilecek ve girişim yapabilecek bazı maddelerin etkisi araştırıldı. Bu amaçla, Bölüm 3.3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan stok L-askorbik asit, ürik asit, glukoz ve L-sistein çözeltileri kullanıldı. Bu bileşiklerin stok çözeltilerinden, derişimleri 0,1 mM olacak şekilde, optimize edilen miktarlarda NFT/GEM içeren elektrokimyasal hücreye ilave edildi. dsDNA ile etkileşim sonrası +0,4 V ile +1,3 V arasında voltamogramlar kaydedildi ve guanin yükseltgenme pik akımları (I_x) hesaplandı. Bu akım değeri, I_0 olarak adlandırılan ve hücre ortamında girişim yapan türler bulunmadığı zaman elde edilen akım ile karşılaştırıldı. Girişim yüzdesi aşağıda verilen eşitliğe göre her bir tür için ayrı ayrı hesaplandı:

$$\%girişim = \frac{I_x - I_0}{I_0} \times 100$$

3.10 UV-Vis Spektroskopisi ile İlgili Deneyler

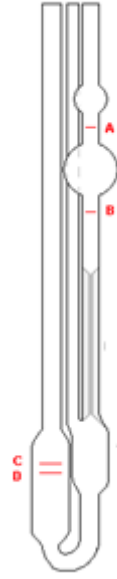
dsDNA ile ilaç etken maddelerinin etkileşim türlerini belirlemek amacıyla Shimadzu PharmaSpec UV 1700 spektrofotometresi kullanıldı.

Nitrofurantoin'in dsDNA ile etkileşiminde 20,0 mg/L NFT ile 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 mg/L derişimlerinde dsDNA etkileştirildi ve 200–800 nm dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedildi.

Gemsitabin'in dsDNA ile etkileşiminde 30,0 mg/L GEM ile 0,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 mg/L derişimlerinde dsDNA etkileşimi sonrası 200–500 nm dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedildi.

3.11 Viskozite Ölçümleri

Bir sıvının viskozitesi (η) o sıvının akmaya karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanır. Aynı koşullarda viskozitesi büyük olan sıvılar, küçük olan sıvılara göre daha yavaş akarlar. dsDNA ile ilaç aktif maddelerinin etkileşim türlerini belirlemek amacıyla viskozite ölçümü yöntemi kullanıldı. Viskozite deneyleri termostatik su banyosu kullanılarak $25\pm0,1^\circ\text{C}$ 'ye getirilen Ubbelohde viskozimetresi kullanılarak yapıldı. Viskozimetrenin geniş kolundan pipet yardımıyla sırasıyla 10 mL asetat tamponu, dsDNA çözeltisi ve sabit miktarda dsDNA içeren farklı miktarlardaki ilaç çözeltileri eklenerek 60 dakika termal dengenin kurulması için beklendi. Daha sonra viskozimetrenin dar koluna puar takılarak çözelti seviyesi A çizgisinin üstüne çıkacak şekilde emme işlemi yapıldı (Şekil 3.2). Puar çekilerek çözeltinin kılcal borudan kendi halinde akmasına izin verildi; bu arada çözücünün üst seviyesi A ile B çizgileri arasında yol alırken geçen süre dijital bir kronometre aracılığıyla ölçüldü. Akış süresi 3 kez belirlenerek ortalama akış süresi bulundu. Termostatik banyo her bir çözelti için dengeye getirdi ve sırasıyla aynı işlemler uygulandı.



Şekil 3.2 Ubbelohde viskozimetresi

Bağıl viskozite; çözelti viskozitesinin (η) çözücü viskozitesine (η_0) oranıdır. dsDNA'nın bağıl viskozitesi ilaç aktif maddelerin yokluğunda ve varlığında aşağıda verilen eşitlikten hesaplandı (Grueso vd. 2012). Bu eşitlikte t_0 ve t_{dsDNA} sırasıyla dsDNA içermeyen ve dsDNA içeren asetat tamponunun, t ise NFT ya da GEM ve dsDNA karışımının akış süresini göstermektedir. η_0 ve η ise sırasıyla dsDNA'nın ve dsDNA-ilac aktif madde karışımının bağıl viskozitesini göstermektedir. Sonuçlar $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ değerlerinin ilaç/dsDNA oranına karşı grafiğe geçirilmesiyle verildi.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{\text{dsDNA}} - t_0)}$$

3.12 dsDNA-İlaç Etkileşimine NaCl Miktarının Etkisi

3.12.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in farklı derişimlerde NaCl içeren asetat tamponunda etkileşmesi

GCE/P(AMT) elektrodu asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 20,0 mg/L derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 15 dakika süreyle potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yüzeye

bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek gerçekleştirildi.

dsDNA immobilize edilmiş GCE/P(AMT) farklı derişimlerde NaCl (2,5–30,0 mM) içeren asetat tamponunda (pH 4,8) 25,0 mg/L derişimde hazırlanan nitrofurantoin ile 120 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değışim incelendi.

3.12.2 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile gemitabin'in farklı derişimlerde NaCl içeren asetat tamponunda etkileşmesi

GCE/P(PDCA) elektrodu asetat tamponu (pH 4,8) içinde hazırlanmış olan 40,0 mg/L derişimde dsDNA çözeltisine daldırıldı. 30 dakika süreyle potansiyel uygulanmaksızın karışmayan ortamda bekletilerek dsDNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Daha sonra yüzeye bağlanmayan dsDNA'ların uzaklaştırılması amacıyla yıkama işlemi 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içerisinde 3 saniye bekletilerek gerçekleştirildi.

dsDNA immobilize edilmiş GCE/P(PDCA) farklı derişimlerde NaCl (2,5–30,0 mM) içeren asetat tamponunda (pH 4,8) 30,0 mg/L derişimde hazırlanan gemitabin ile 150 saniye süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH 4,8) ile gerçekleştirildi.

Ölçüm +0,4 V ile +1,3 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ortamında gerçekleştirildi. +0,8 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değışim incelendi.

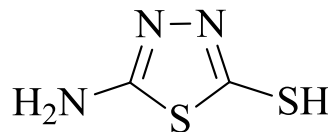
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotları kullanılarak DNA biyosensörleri hazırlandı. Hazırlanan DNA biyosensörleri nitrofurantoin ve gempisitin tayini için kullanıldı. Bu amaçla öncelikle polimer film temelli camı karbon elektrotlar hazırlandı. Bunun için, 5-amino-2-merkapto-1,3,4-tiyadiazol (AMT) veya 2,6-piridindikarboksilik asit (PDCA) içeren çözeltiler kullanılarak elektropolimerizasyon yolu ile hazırlanan polimer film kaplı elektrotlara çift sarmal DNA (dsDNA) ayrı ayrı immobilize edildi. Hazırlanan elektrotlar için en uygun dsDNA miktarı ve adsorpsiyon süresi belirlendi. Geliştirilen dsDNA modifiye elektrotlar, antibakteriyel ilaç olan nitrofurantoin ve antikanser ilacı olan gempisitin'in tayini için kullanıldı. Çalışmada dsDNA ile ilaç etkileşim türünü belirlemek amacıyla, UV-Vis ve viskozluk ölçümü yöntemlerinden yararlanıldı ve NaCl kullanılarak ortamın iyonik gücünün etkisi incelendi. Son olarak hazırlanan DNA biyosensörleri ile ilaçların ticari formülasyonları ile serumda tayin edilip edilemeyeceği araştırıldı. Elde edilen araştırma bulguları ve yorumlar aşağıda sunuldu.

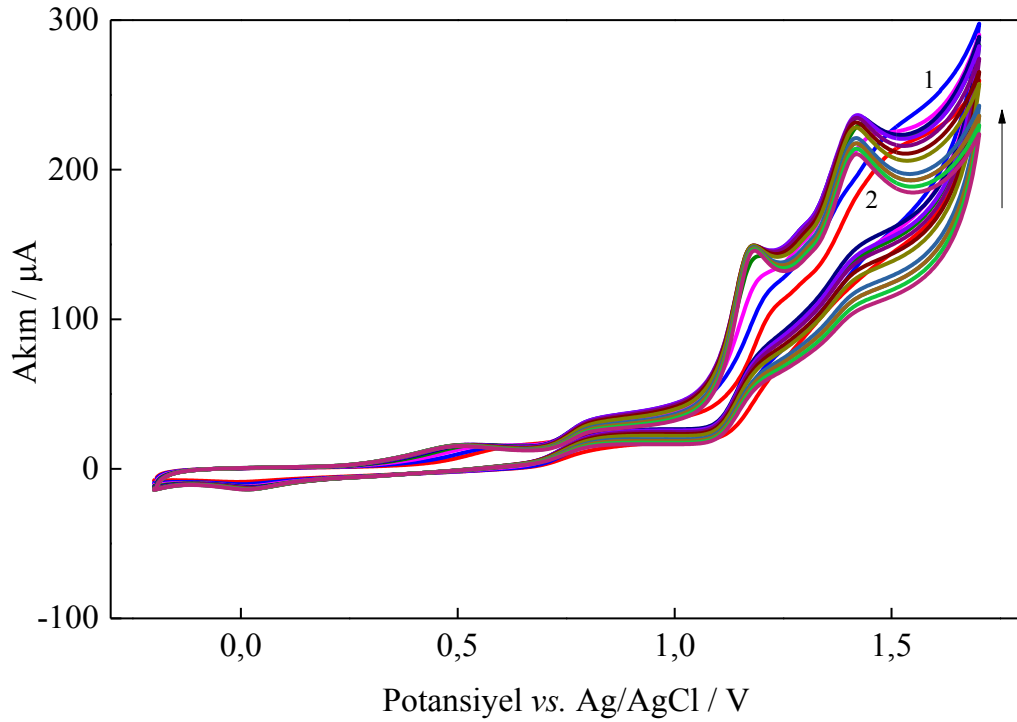
4.1 Polimer Film Kaplı Elektrotların Hazırlanması

4.1.1 P(AMT) kaplı camı karbon elektrotların hazırlanması

Bu çalışmada dsDNA'nın adsorpsiyonuna uygun matriks ortamı sağlamak amacıyla öncelikle AMT (Şekil 4.1) elektropolimerizasyon yoluyla camı karbon elektrot yüzeyine Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde kaplandı. Elektropolimerizasyon dönüşümlü voltametri tekniği ile 50 mV s⁻¹ tarama hızıyla, (-0,2 V)–(+1,7 V) potansiyel aralığında 15 döngüyle yapıldı (Kalimuthu ve John 2009c). Kaplama işleminden sonra elektrot yüzeyi saf su ile yıkandı. Elde edilen voltamogramlar şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.1 AMT monomerinin kimyasal formülü



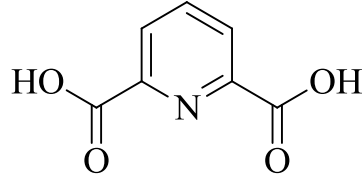
Şekil 4.2 1,0 mM AMT içeren 0,1 M H₂SO₄ çözeltisinde (-0,2 V)–(+1,7 V) potansiyel aralığında, 50 mV s⁻¹ tarama hızında, 15 döngü ile elde edilen çok döngülü voltamogramı

Şekil 4.2 incelendiğinde AMT'nin +0,5 V, +0,8 V, +1,22 V ve +1,45 V olmak üzere dört yükseltgenme piki bulunmaktadır. İkinci döngüde +1,45 V'daki yükseltgenme akımında önemli bir azalma ve pik potansiyelinde kayma görüldü. Üçüncü döngüden itibaren +1,42 V ve +1,20 V'deki yükseltgenme pikleri artış gösterdiğinden yeni bir monomerin oluştuğu ve uygulanan potansiyel ile yükseltgenen monomerin GCE yüzeyinde biriktiğini söylenebilir. Bununla birlikte, AMT'nin elektropolimerizasyonu ile ilgili yükseltgenme sinyallerinin 15. döngüden sonra azaldığı görüldü bu da ortamda oluşan elektrokimyasal olarak inaktif türlerin oluşumuyla açıklanabilir (Kalimuthu ve John 2009c).

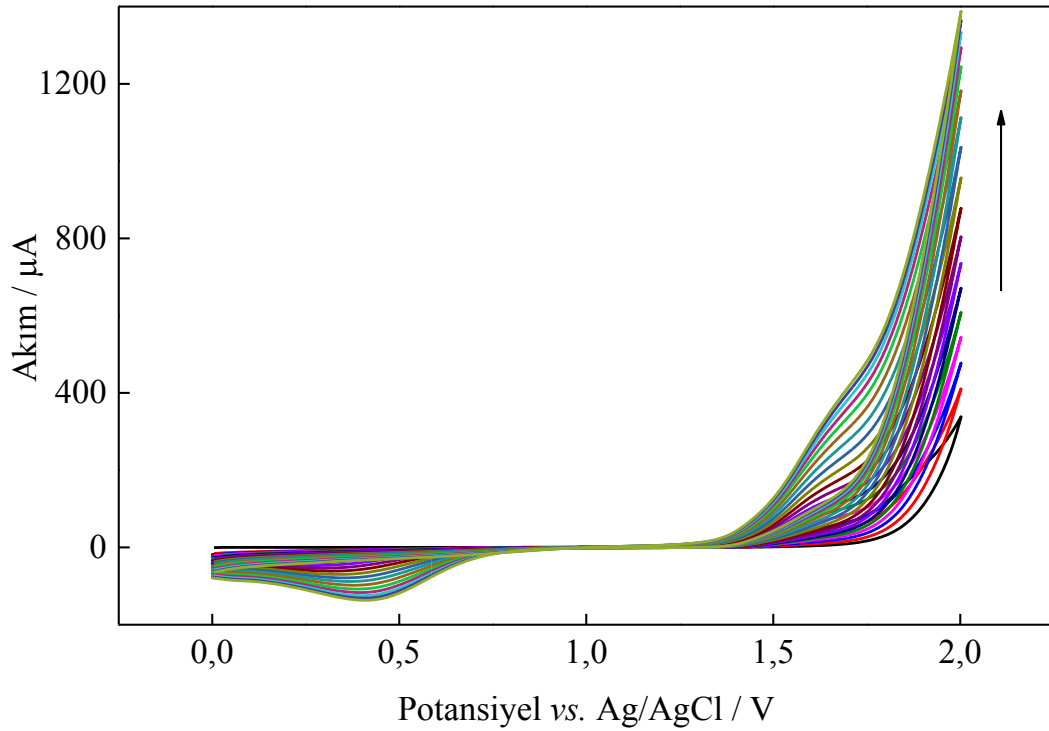
4.1.2 P(PDCA) kaplı camı karbon elektrotların hazırlanması

Çalışmada camı karbon elektrotların PDCA (Şekil 4.3) kullanarak elektropolimerizasyon yolu ile modifiye edilmesi de planlandı. Bu amaçla, Bölüm 3.3.4'te belirtilen çözelti kullanılarak ve Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı gibi modifiye elektrotlar hazırlandı. Elektropolimerizasyon, (0,0 V)–(+2,0 V) potansiyel aralığında 60

mV s^{-1} tarama hızında, 18 ardışık döngüyle gerçekleştirildi (Yang vd. 2007, Cui vd. 2011b). Bu monomerin polimerleştirilmesi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.3 PDCA monomerinin kimyasal formülü



Şekil 4.4 1,0 mM PDC içeren 0,1 M KCl çözeltisinde (0,0 V)–(+2,0 V) potansiyel aralığında, 60 mV s^{-1} tarama hızında, 18 döngü ile elde edilen çok döngülü voltamogramı

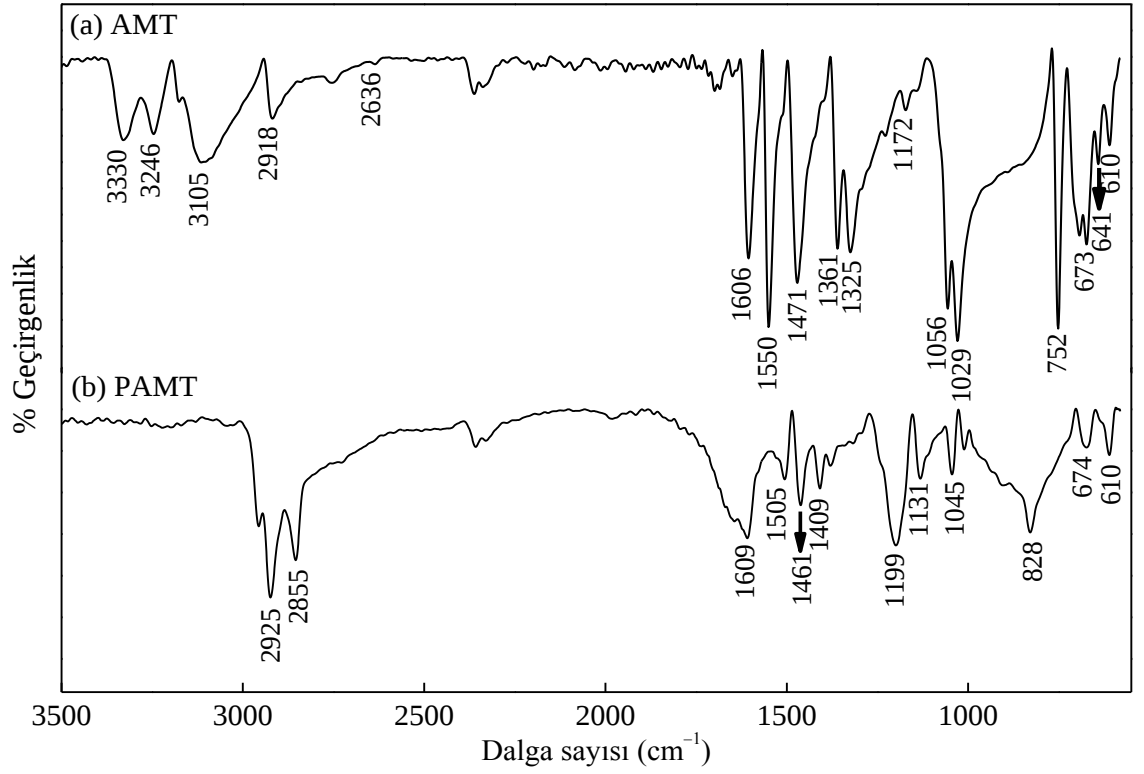
Şekil 4.4 incelendiğinde PDCA’nın +1,60 V civarında yükseltgenmeye başladığı, yükseltgenme pikinin tamamen tersinmez olduğu ve son döngülerde yükseltgenme pik akım değerlerinin önemli ölçüde değişmediği görülmektedir. Bu davranış elektrot yüzeyinde polimerik filmin oluştuğu ve yüzeye monomerlerin ulaşmasının engellendiği şeklinde yorumlanabilir (Malitesta vd. 1990).

4.2 Polimer Film Kaplı Elektrotların Karakterizasyonları

Dönüşümlü voltametri tekniğiyle ile hazırlanan GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotlar FTIR spektroskopisi ve SEM ile karakterize edildi. Hazırlanan elektrotların elektrokimyasal özellikleri ise $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probunda CV ve EIS teknikleri ile incelendi ve elde edilen bulgular aşağıda verildi.

4.2.1 IR spektrumları

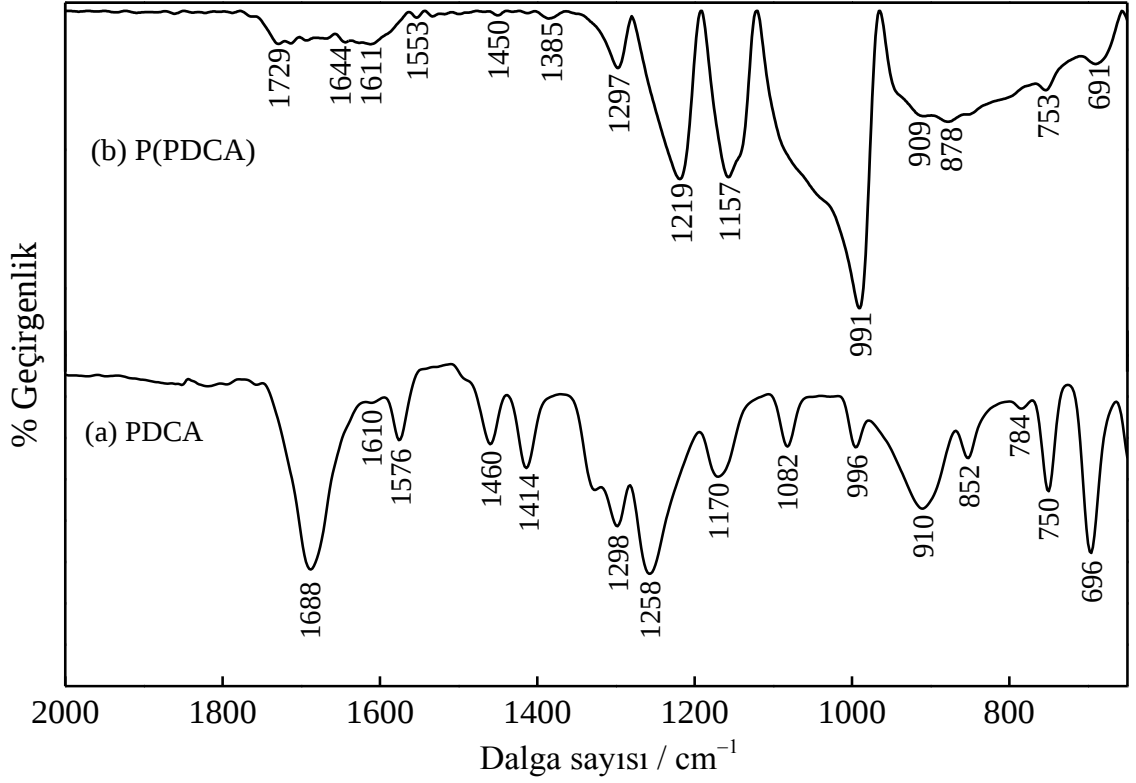
Camsı karbon çalışma elektrodu üzerinde biriktirilen P(AMT) polimer filmin ve AMT monomerinin FTIR spektrumları alındı (Şekil 4.5). P(AMT) filmin 1409 ve 1131 cm^{-1} 'de yeni bantlar gösterdiği görüldü. 1409 cm^{-1} civarındaki band N=N gerilme titreşimine karşılık gelir. 1131 cm^{-1} 'deki band ise S=O grubuna aittir ve sülfat anyonlarının dopant olarak polimerizasyonda rol aldığını gösterir (Kalimuthu ve John 2009b, Andreoli vd. 2011). Katı AMT'nin spektrumunda gözlenen 3330 ve 3246 cm^{-1} 'deki bantlar ise NH_2 grubuna aittir ve bu bantlar P(AMT) filmde görülmemektedir, buradan NH_2 gruplarının elektropolimerizasyonda yer aldığı sonucuna varılabilir. Ayrıca katı AMT için 2636 cm^{-1} 'de gözlenen zayıf band, SH gruplarının simetrik gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Bu band P(AMT) filmde görülmemektedir bu da elektropolimerizasyonun $-\text{S}-\text{S}-$ bağlarıyla oluştuğunu göstermektedir (Ying vd. 2003).



Şekil 4.5.a. AMT monomeri ve b. P(AMT) filmin FTIR spektrumları

PDCA monomeri ve GCE yüzeyinde biriktirilen P(PDCA) filmin FTIR spektrumu Şekil 4.6'da görülmektedir. GCE ve GCE/P(PDCA) elektrotlarına ait FTIR spektrumları karşılaştırıldığında aralarında önemli farkların olduğu görüldü. GCE/P(PDCA)'ya ait IR spektrumunda (Şekil 4.6 (b)) 1728 cm^{-1} 'de görülen bandın C=O grubunun gerilme titreşiminden kaynaklandığı söylenebilir (Wang vd. 2014). 1611 cm^{-1} 'de gözlenen band ise piridin halkasının C=C/C-C ve C-N/C=N gerilmelerine karşılık gelmektedir (Ay vd. 2015, Karabacak vd. 2015). 1553 cm^{-1} 'de gözlenen band ise PDCA birimindeki C=C, C=N ve asimetrik COO^- gerilme titreşimlerine ait olabileceği söylenebilir (Etaiw ve El-bendary 2015). 1450 cm^{-1} 'de gözlenen O-H bandın PDCA biriminin düzlemsel eğilmesine (Wasylina vd. 1999) ve/veya simetrik COO^- gerilmesine karşılık gelebileceği sonucuna varılabilir (Wang vd. 2014). 1385 cm^{-1} 'de görülen bandın PDCA biriminde simetrik COO^- gerilme titreşimlerine ve O-H düzlemsel eğilme titreşimlerine ait olduğu düşünülebilir (Etaiw ve El-bendary 2015, Karabacak vd. 2015). 1297 ve 1219 cm^{-1} 'deki bantlar C-O ve C-N gerilme titreşimleri olabilir. O-H ve C-H düzlemsel eğilme titreşimleri ve piridin halkasının gerilme titreşimleri 1157 cm^{-1} 'de

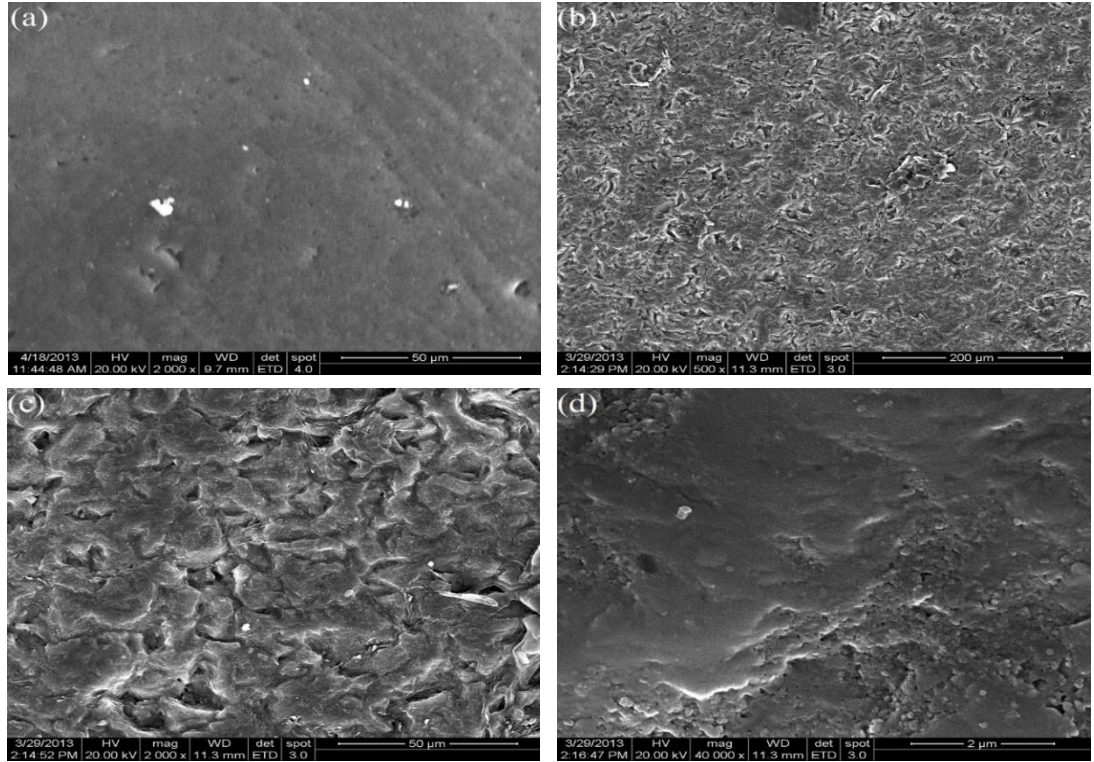
gözlenmektedir. 991, 901, 878 ve 753 cm^{-1} civarındaki bantların düzlem dışı eğilme titreşimleriyle ilgili olduğu söylenebilir (Karabacak vd. 2015, Wang vd. 2004, Wasylyna vd. 1999). (O–C–O)’nin düzlemsel eğilme titreşimleri yaklaşık 691 cm^{-1} ’de görülmektedir (Nataraj vd. 2012) (Şekil 4.6.a).



Şekil 4.6.a. PDCA monomeri ve b. P(PDCA) filmin FTIR spektrumları

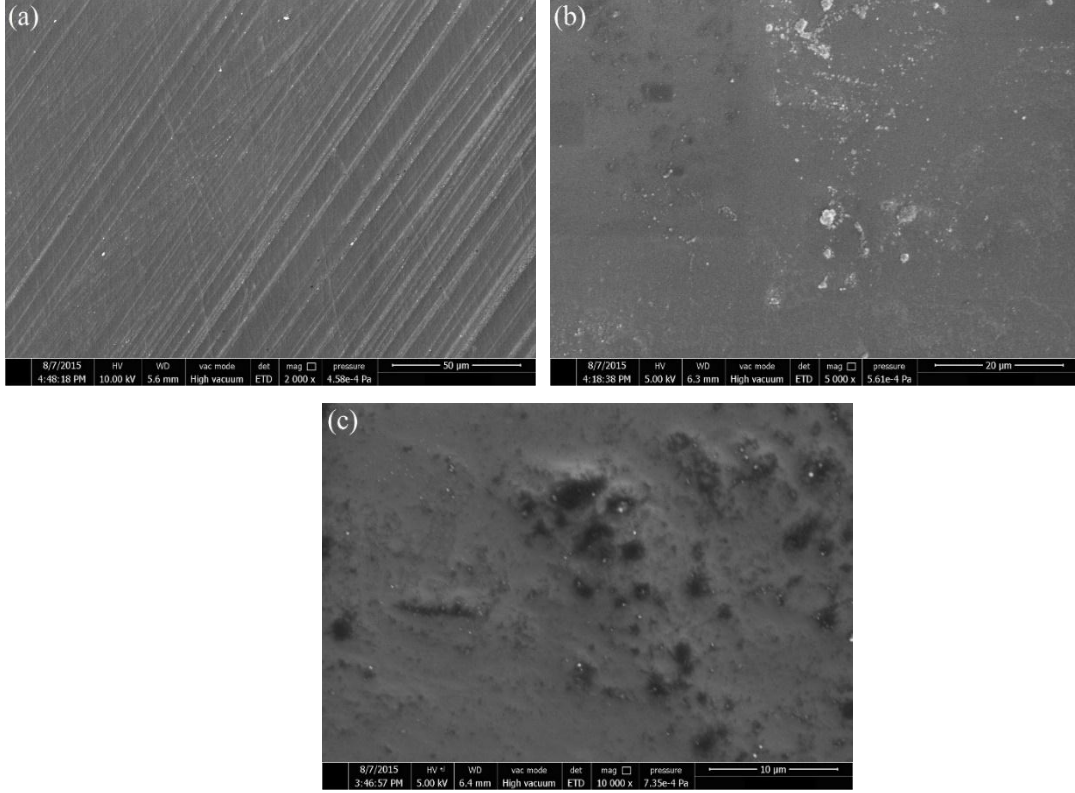
4.2.2 SEM görüntüleri

Hazırlanan elektrotların yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile incelendi (Şekil 4.7 ve 4.8). Polimer kaplı elektrotların yüzey görüntülerinin, yalın GC elektrodun (BGCE) yüzey görüntüsünden farklı olması elektrot yüzeyinde P(AMT) ve P(PDCA) polimerlerinin varlığını gösterir. Şekil 4.7 b,c,d’de görüldüğü üzere BGCE yüzeyinde herhangi bir katman görülmezken, elektropolimerizasyon sonunda camı karbon yüzeyinde tabaka oluşması P(AMT)’nin kaplandığını gösterir.



Şekil 4.7.a. BGCE, ve b,c,d GCE/P(AMT) elektrotlarına ait SEM fotoğrafları

P(PDCA) film kaplı elektrodun SEM fotoğrafları Şekil 4.8’de görülmektedir. Yalın camsı karbon elektrotla karşılaştırıldığında P(PDCA) filmin GCE yüzeyine ince bir film şeklinde ve homojen olarak kaplandığı görülmektedir. Buradan hazırlanan GCE/P(PDCA) elektrodunun dsDNA için uygun bir matriks ortamı sağlayacağı sonucuna varılabilir.

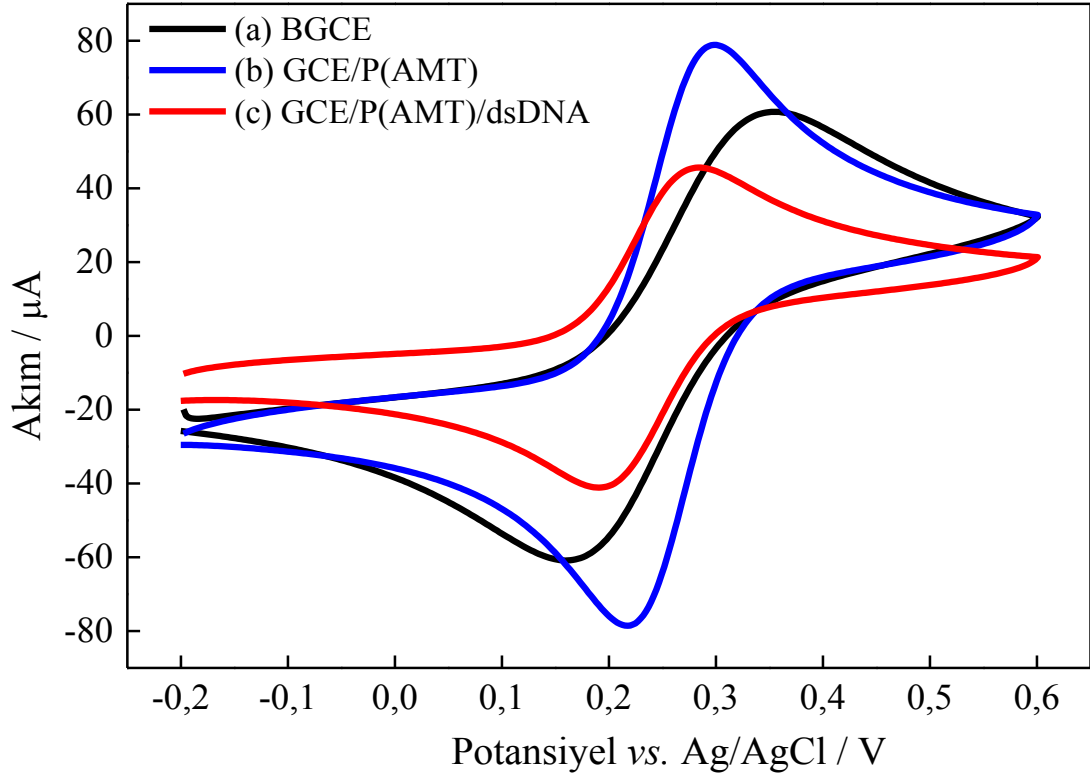


Şekil 4.8.a BGCE ve b,c GCE/P(PDCA) elektrotlarına ait SEM fotoğrafları

4.2.3 Elektrokimyasal Karakterizasyonları

BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının elektrokimyasal davranışlarını incelemek için 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1) türlerini içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanıldı. Modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerini incelemek için $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ çözeltisi kullanılmaktadır (Li vd. 2005). Döngülü voltamogramlar ($-0,2$ V) – ($+0,6$ V) potansiyel aralığında ve 50 mV s^{-1} tarama hızında alındı. Şekil 4.9’da BGCE (a), GCE/P(AMT) (b) ve GCE/P(AMT)/dsDNA (c) elektrotlarına ait döngülü voltamogramlar görülmektedir. Voltamogramlar incelendiğinde, GCE yüzeyi P(AMT) ile kaplandığında, BGCE ile elde edilen sonuçlara göre ΔE_p ’nin azaldığı, anodik ve katodik pik akımlarının ise arttığı görülebilir. Bütün elektrotlar için alınan ölçümlerin sonucu $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ türüne ait redoks pikleri 0,0 ve 0,4 V arasında görülmektedir. BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotları için ΔE_p sırasıyla 171 mV, 76 mV ve 83 mV olarak hesaplandı (Çizelge 4.1). Buradan P(AMT) filmin redoks reaksiyonunu önemli ölçüde geliştirdiği ve polimer filmin elektroaktif yüzey alanını arttırdığı sonucuna varılabilir (He vd. 2010). GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodunda ise

elektrot yüzeyi dsDNA'nın negatif yüküyle kaplandığı için ΔE_p değeri bir miktar artış gösterdi ve 85 mV olarak hesaplandı. Buradan dsDNA'nın GCE/P(AMT) yüzeyine adsorbe olduğu söylenebilir (Wang 2006b).

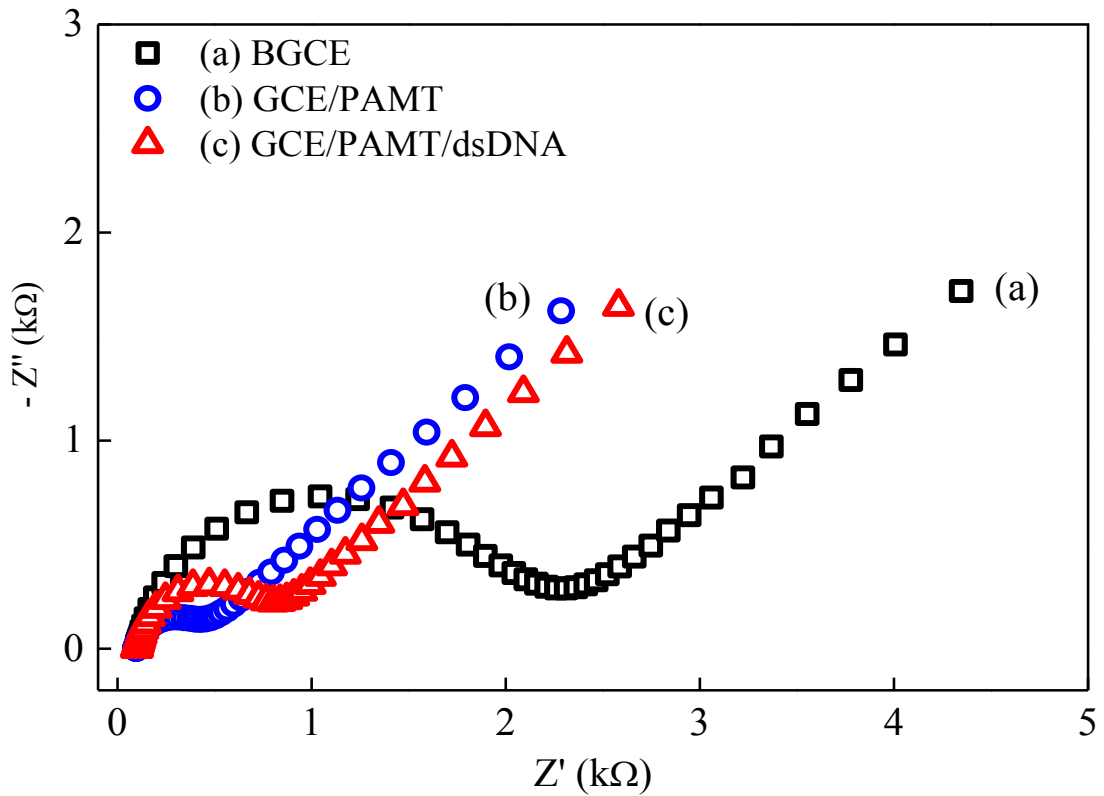


Şekil 4.9 BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s^{-1})

Çizelge 4.1 BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 1,0 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mV s^{-1})

Elektrot	E_{pa} / V	E_{pk} / V	$\Delta E_p / \text{V}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pk} / \mu\text{A}$
BGCE	0,340	0,169	0,171	51,82	60,08
GCE/P(AMT)	0,296	0,220	0,076	75,11	79,89
GCE/P(AMT)/dsDNA	0,279	0,196	0,083	39,81	41,79

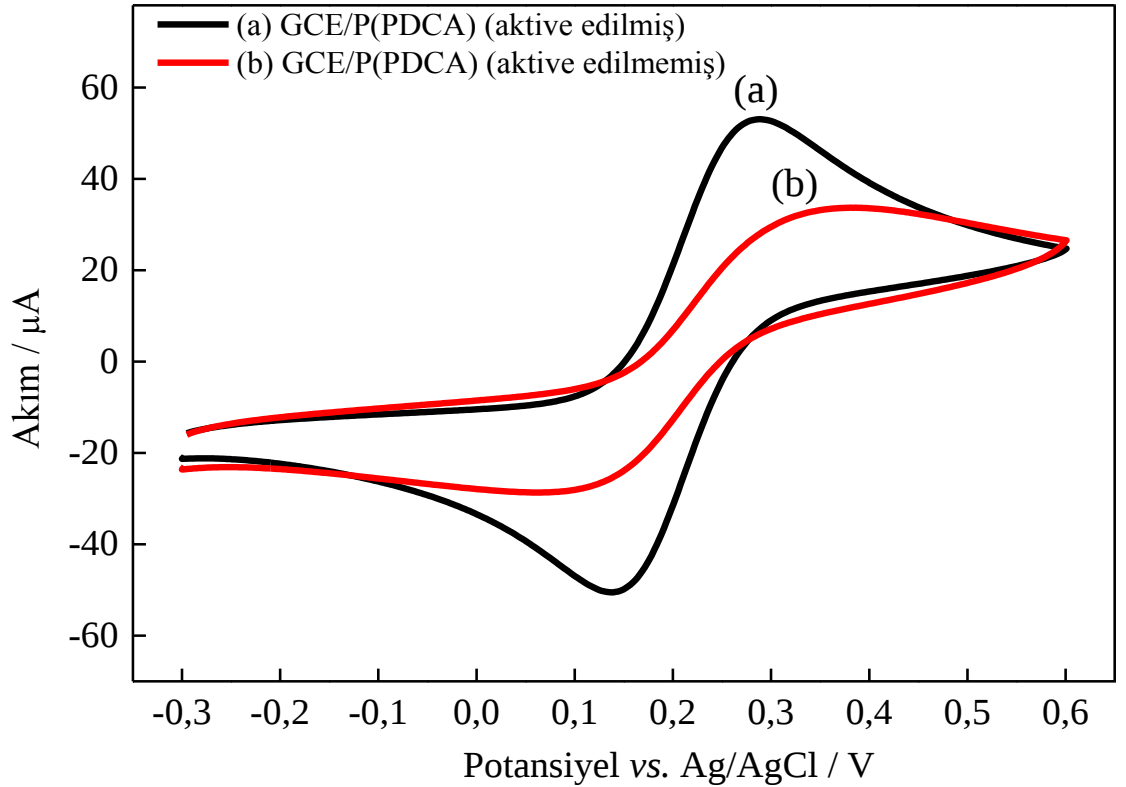
BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotların elektron transfer özellikleri elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi ile de incelendi ve elde edilen Nyquist eğrileri şekil 4.10'da verildi. Nyquist eğrisi olarak gösterilen bir EIS spektrumunda yüksek frekanslar yarım daire kısmını, düşük frekanslar ise doğrusal kısmı ifade etmektedir. Bu eğride yarım daire kısmı elektron transferi sınırlı bir olayı, doğrusal kısım ise difüzyon olayını göstermektedir. Yarım dairenin çapı elektron veya yük transfer direncine (R_{et}) eşittir.



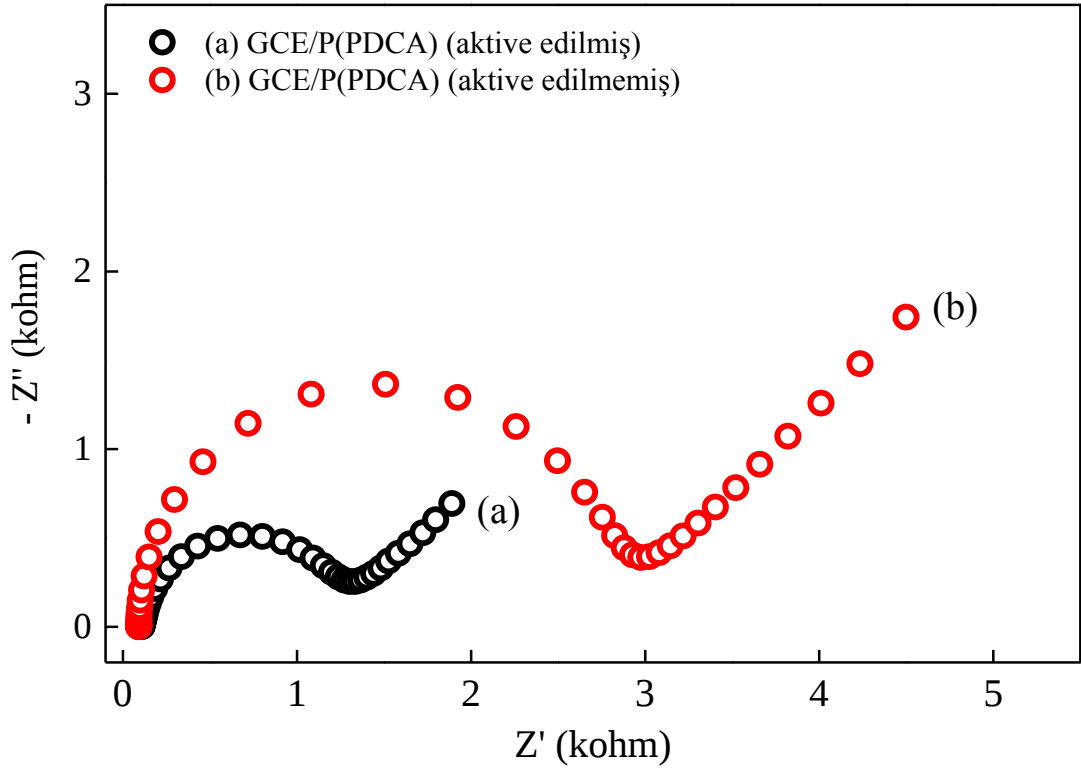
Şekil 4.10 (a) BGCE, (b) GCE/P(AMT) ve (c) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri

Elde edilen Nyquist eğrilerinde yararlanarak, BGCE, GCE/P(AMT) ve GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotlarının R_{et} değerleri sırasıyla 2097, 358,1, ve 684,4 ohm olarak bulunmuştur. GCE/P(AMT) elektrotta daha düşük R_{et} değerinin elde edilmesi çözelti/elektrot ara yüzeyindeki elektron transfer hızının arttığını göstermektedir. GCE/P(AMT) elektroduna dsDNA adsorpsiyonu sonucu R_{et} değeri bir miktar artmıştır. Bu artış da negatif yüklü dsDNA'nın GCE/P(AMT) yüzeyine adsorbe olduğunu göstermektedir.

GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) ve GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) elektrotlarının elektrokimyasal davranışlarını incelemek için 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1:1) türlerini içeren 0,1 M KCl çözeltisi kullanıldı. Şekil 4.11’de görülebileceği gibi, aktif edilmiş GCE/P(PDCA) elektrotta redoks pikine ait anodik ve katodik pik akımlarının aktif edilmemiş olan elektroda göre daha yüksek olduğu görüldü. GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) ve GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) elektrotlarının elektrokimyasal davranışları EIS ile de incelendi. İki elektrot için çizilen Nyquist eğrileri şekil 4.12’de gösterildi. Elektron transfer direncini (R_{et}) gösteren yarım daire çapları karşılaştırıldığında, aktif edilmiş GCE/P(PDCA) elektrodunun aktif edilmemiş elektroda göre daha küçük olduğu belirlendi. Buradan aktivasyon işleminin $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ türünün redoks reaksiyonu için elektron transferini önemli ölçüde artırdığını ve aktif edilmiş elektrodun aktif edilmemiş elektroda göre daha fazla pozitif yüke sahip olduğunu gösterir.

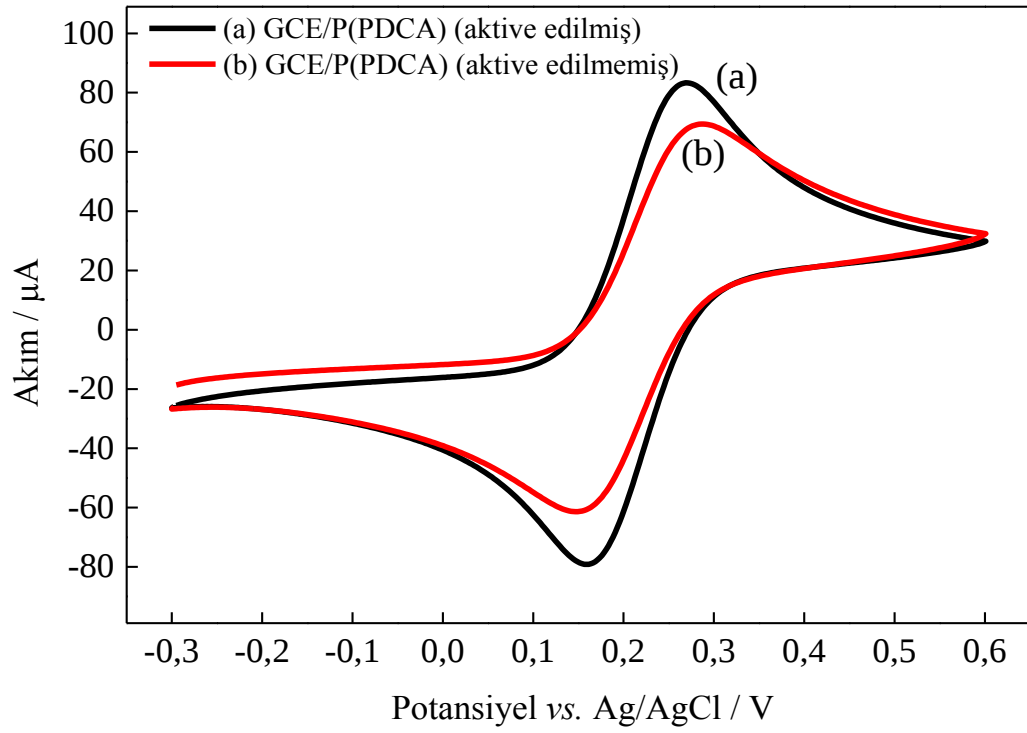


Şekil 4.11 (a) GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 6,8) dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s⁻¹)

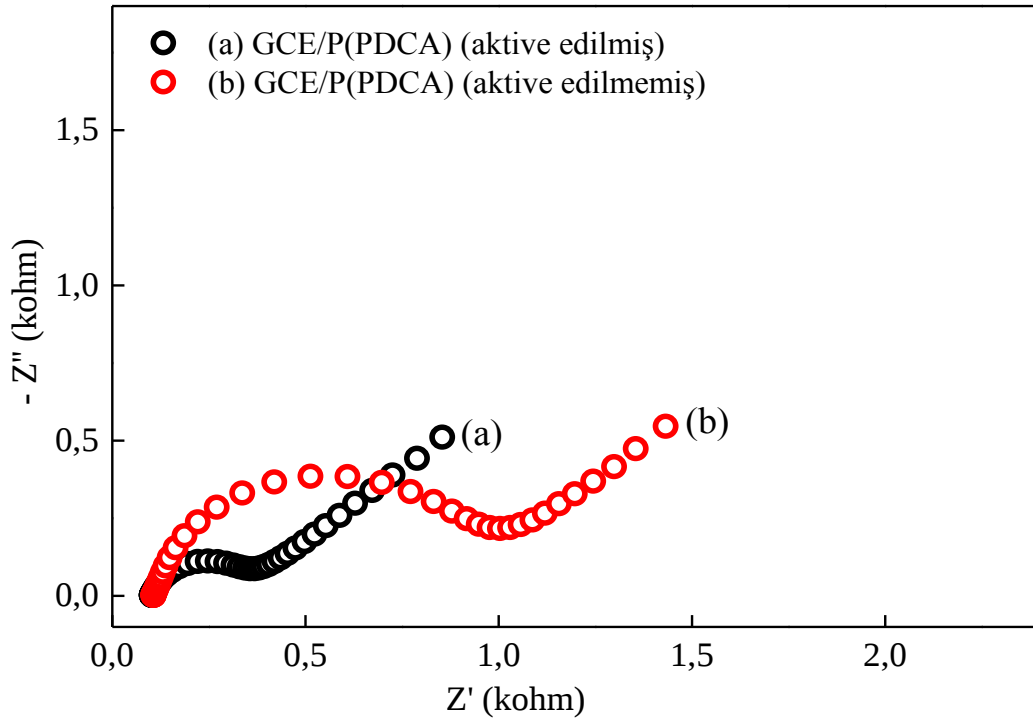


Şekil 4.12 (a) GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktif edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 6,8) Nyquist eğrileri

dsDNA'nın elektrot yüzeyine adsorpsiyonunda ve dsDNA-ilaç etkileşim çalışmalarında destek elektroliti olarak 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) kullanılmaktadır. Bu amaçla redoks türünün elektrokimyasal davranışı asidik ortamda (pH 4,8) da incelendi. Şekil 4.13-14 sırasıyla şekil 4.11-12 ile karşılaştırıldığında asidik ortamda pik akımlarında artış ve R_{et} değerlerindeki azalış gözlemlendi. Buradan asidik ortamda polimerin sahip olduğu pozitif yük yoğunluğunun nötral ortama göre daha fazla olduğu sonucuna varılabilir.

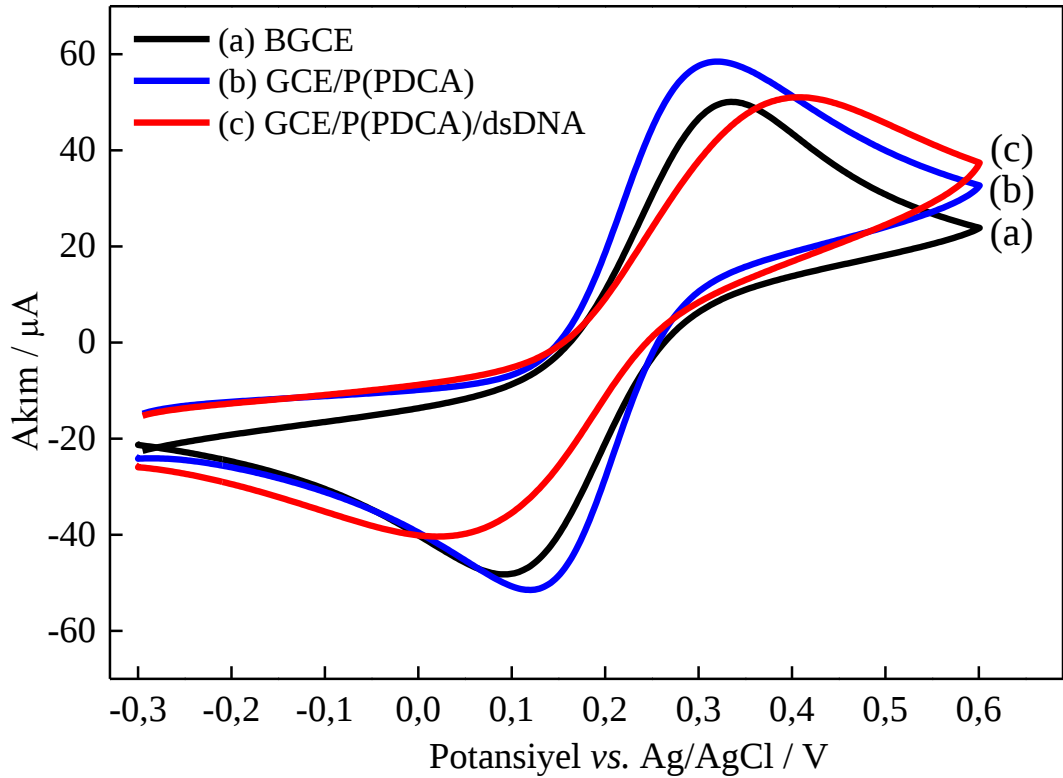


Şekil 4.13.a. GCE/P(PDCA) (aktive edilmiş) ve b. GCE/P(PDCA) (aktive edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl + HCl çözeltisindeki (pH 4,8) dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s^{-1})



Şekil 4.14 (a) GCE/P(PDCA) (aktive edilmiş) ve (b) GCE/P(PDCA) (aktive edilmemiş) elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl + HCl çözeltisindeki (pH 4,8) Nyquist eğrileri

dsDNA'nın polimer film kaplı GCE yüzeyine kaplanıp kaplanmadığını incelemek amacıyla BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının dönüşümlü voltamogramları 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl'de alındı. Şekil 4.15 yalın ve modifiye elektrotların 50 mV s^{-1} 'de dönüşümlü voltamogramlarını göstermektedir. GCE yüzeyi P(PDCA) film ile kaplandığında ΔE_p değerinde azalış ve anodik ve katodik pik akımlarında ise bir miktar artış görüldü. Bu durum aktivasyon sonucu pozitif yük yoğunluğu artmış olan P(PDCA)'nın $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ iyonlarına olan ilgisiyle açıklanabilir. P(PDCA) kaplı GCE yüzeyi dsDNA ile kaplandığında ise GCE/P(PDCA) elektroduna göre pik akımlarında azalış ve ΔE_p değerinde artış gözlemlendi. BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarına ait ΔE_p değerleri çizelge 4.3'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlar dsDNA'nın GCE/P(PDCA) yüzeyine adsorbe olduğunu ve $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ iyonlarının elektrot yüzeyine ulaşmasını engellediğini göstermektedir (Ensafi vd. 2013).

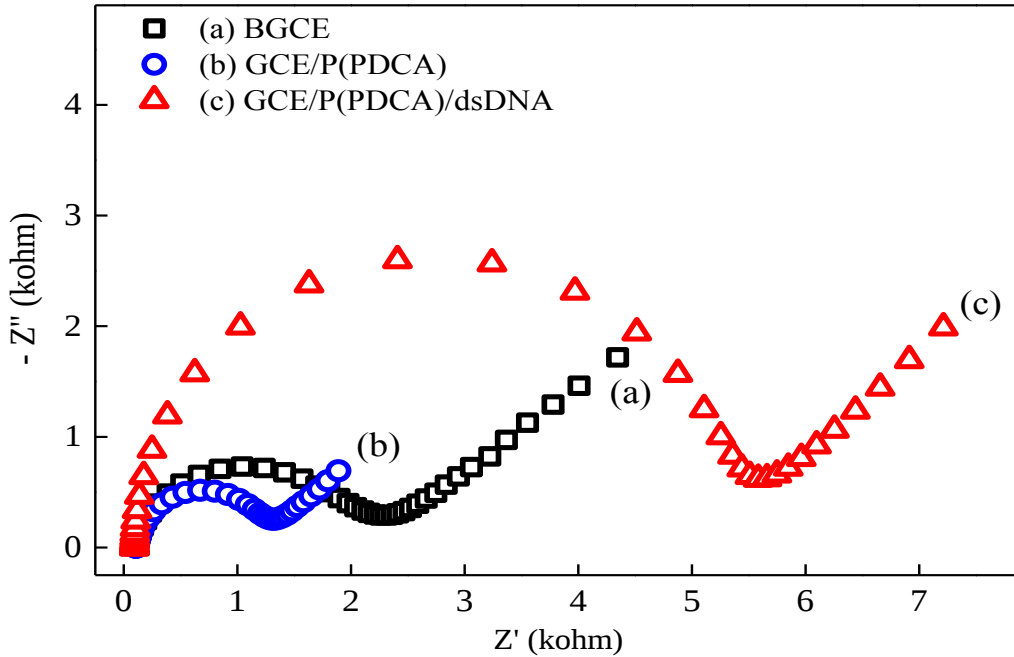


Şekil 4.15.a. BGCE, b. GCE/P(PDCA) ve c. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s^{-1})

Çizelge 4.2 BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (Tarama hızı 50 mV s^{-1}).

Elektrot	E_{pa} / V	E_{pk} / V	$\Delta E_p / \text{V}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pk} / \mu\text{A}$
BGCE	0,329	0,103	0,226	43,96	46,92
GCE/P(PDCA)	0,303	0,112	0,191	46,62	50,84
GCE/P(PDCA)/dsDNA	0,369	0,061	0,308	31,95	35,66

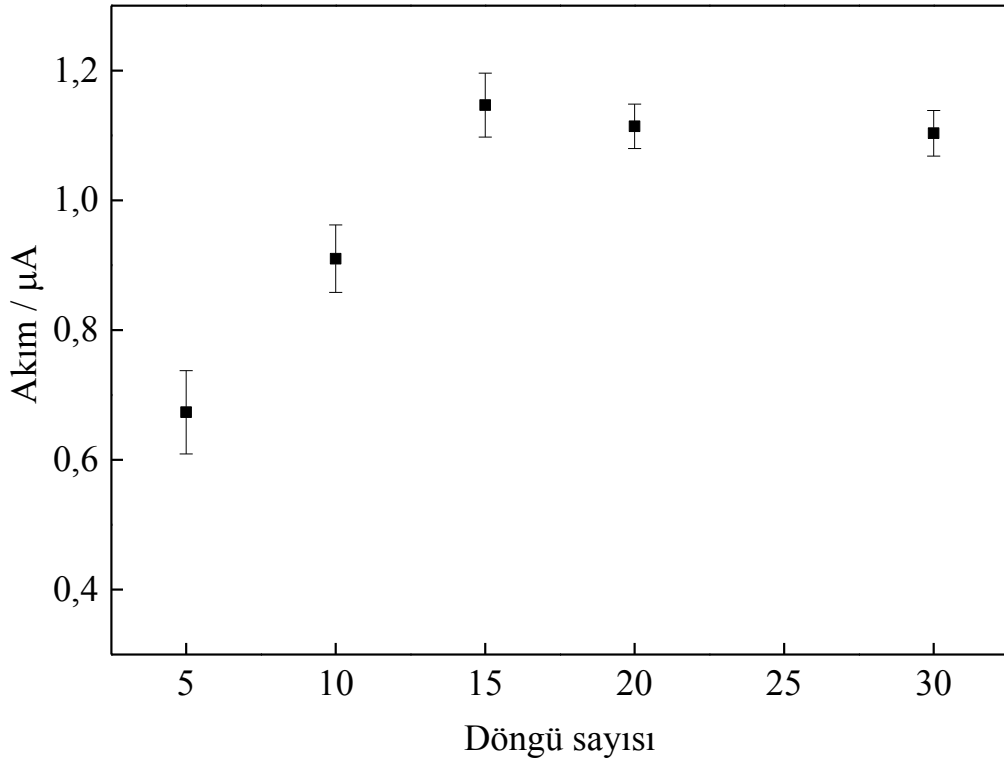
BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının Nyquist eğrileri Şekil 4.16'da verildi. BGCE, GCE/P(PDCA) ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının R_{et} değerleri sırasıyla 2097, 1030, ve 5794 ohm olarak bulundu. GCE/P(PDCA) elektrotta daha düşük R_{et} değerinin elde edilmesi çözelti/elektrot ara yüzeyindeki elektron transfer hızının arttığını göstermektedir. GCE/P(PDCA) elektroduna dsDNA adsorpsiyonu sonucu R_{et} değeri bir miktar artmıştır. Bu artış da negatif yüklü dsDNA'nın GCE/P(PDCA) yüzeyine adsorbe olduğunu göstermektedir. Elde edilen impedans sonuçlarının dönüşümlü voltametri de elde edilen bulgularla uyumlu olduğu sonucuna varıldı.



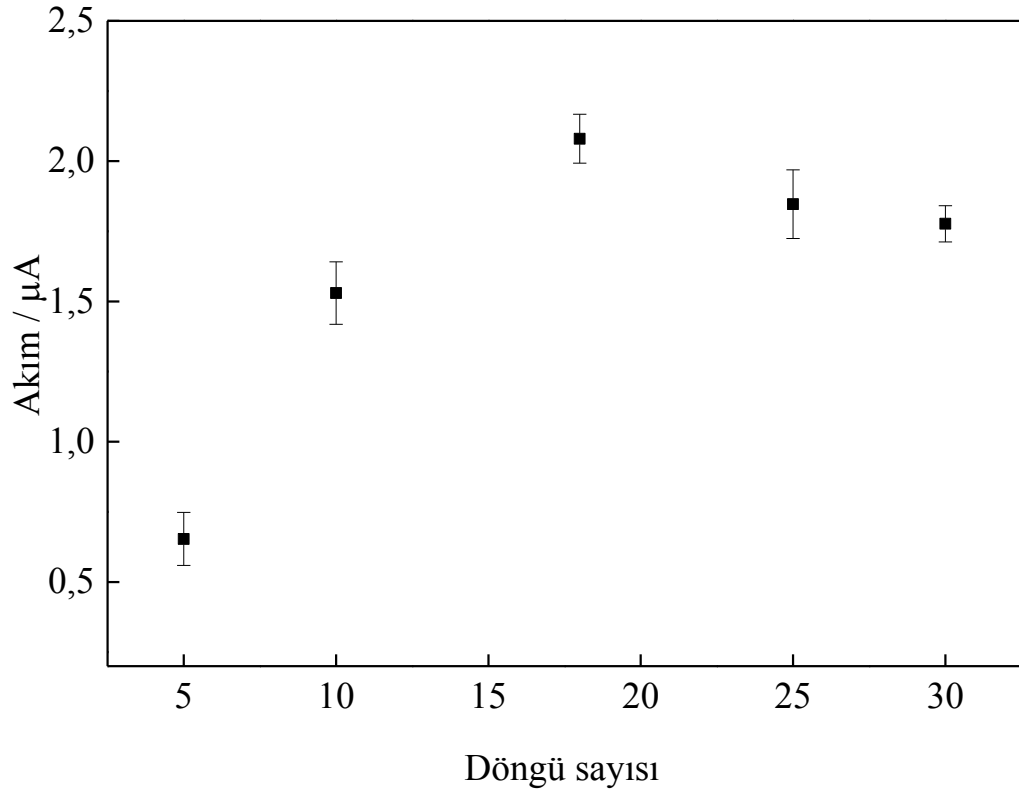
Şekil 4.16.a. BGCE, b. GCE/P(PDCA) (aktif edilmiş) ve c. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarının 5,0 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki (pH 4,8) Nyquist eğrileri

4.2.4 Polimer film kalınlıklarının optimizasyonu

Biyosensör cevabına P(AMT) ve P(PDCA) film kalınlıklarının etkisi, Bölüm 3.5.4'te anlatıldığı şekilde, elektropolimerizasyondaki döngü sayısı değiştirilerek incelendi. Bu amaçla farklı döngü sayılarında kaplamalar yapıldı ve guanin yükseltgenme sinyalindeki değişimler incelendi. Her iki polimer için de belirli bir döngü sayısına kadar guanin yükseltgenme sinyallerinin arttığı görüldü (Şekil 4.17 ve 4.18). Bunun sebebi döngü sayısı arttıkça elektrot yüzeyinde biriken polimer filmin artması olabilir. Bunun sonucunda aktif uç grupların sayısı da artabileceğinden yüzeye bağlanan dsDNA miktarı da artar. Bunun sonucu olarak guanin yükseltgenme pik akımlarında artış elde edildi. P(AMT) için 15 döngü sonrasında ve P(PDCA) için ise 18 döngü ile kaplama sonrasında bir miktar azalma görüldü. Literatürde bu azalmanın, döngü sayısının artmasıyla elektrokimyasal olarak aktif olmayan film oluşumunun gerçekleşebileceği ve bunun da yüzey direncini arttırabileceği bildirilmiştir (Kalimuthu ve John 2009c).



Şekil 4.17 Guanin yükseltgenme sinyaline P(AMT) film kalınlığının etkisi

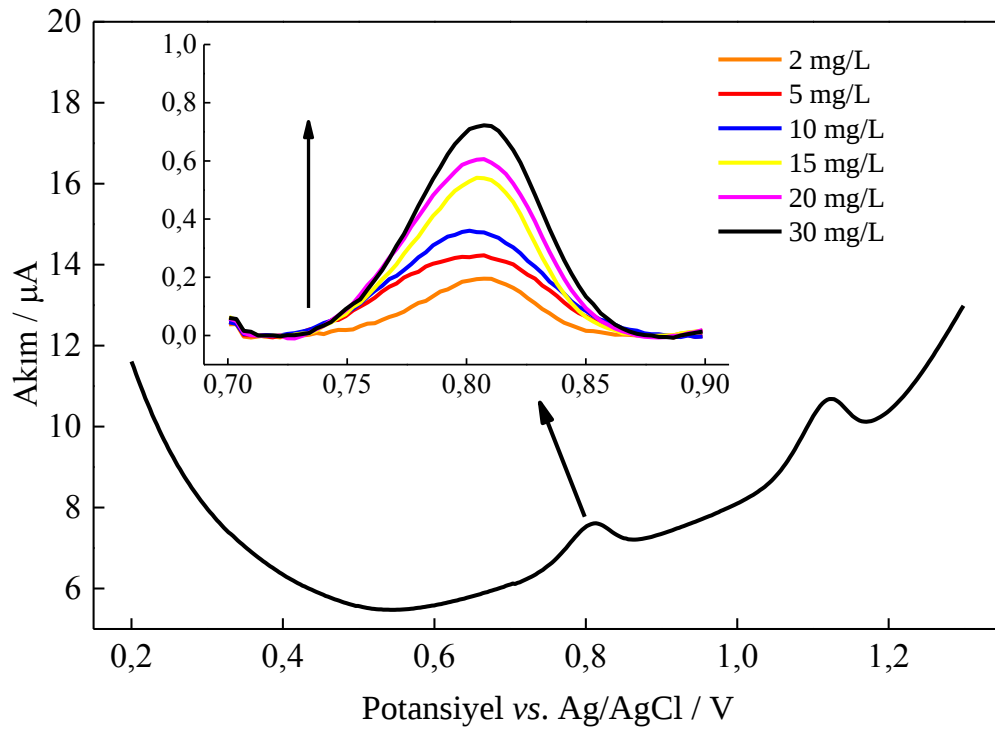


Şekil 4.18 Guanin yükseltgenme sinyaline P(PDCA) dfilm kalınlığının etkisi

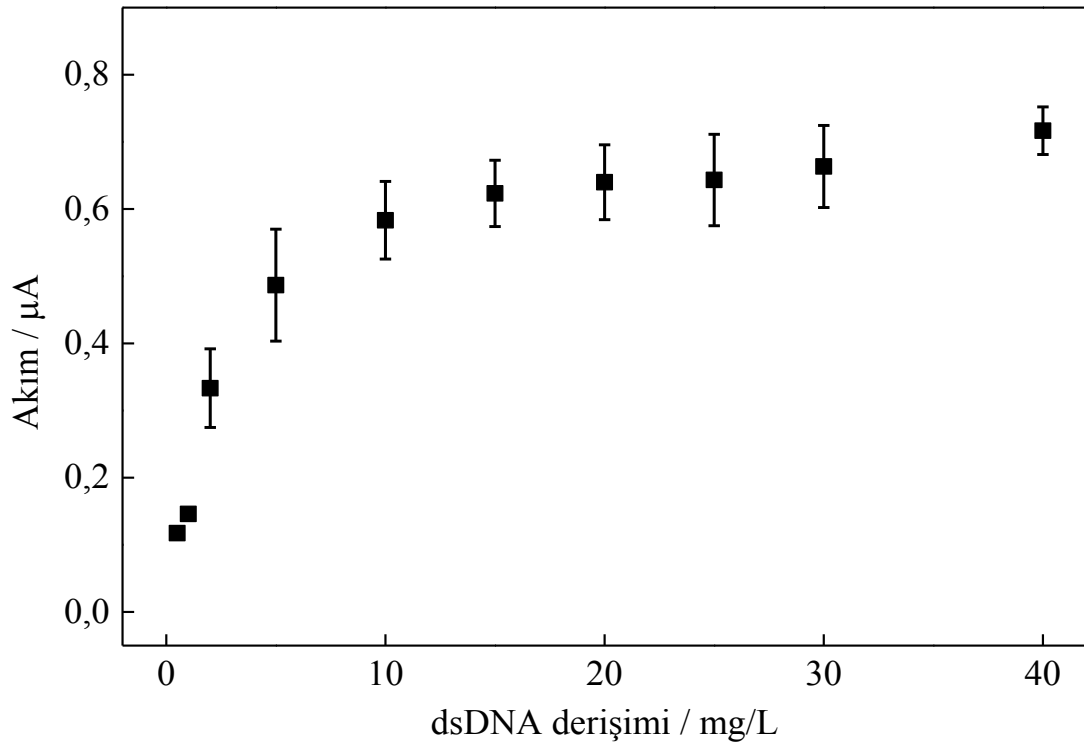
4.3 dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile GCE/P(AMT) Elektrot Yüzeyinde Yükseltgenmesine İlişkin Bulgular

4.3.1 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.6.1'de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, P(AMT) modifiye camı karbon elektrotta, 0,5–40,0 mg/L derişim aralığındaki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametriyi yöntemi ile guanin sinyali üzerinden elektrokimyasal tayini gerçekleştirildi. Her bir derişim için ardışık üçer ölçüm alındı. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil 4.19'da ve dağılım grafiği şekil 4.20'de gösterilmektedir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görölmektedir.



Şekil 4.19 pH 4,80 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri

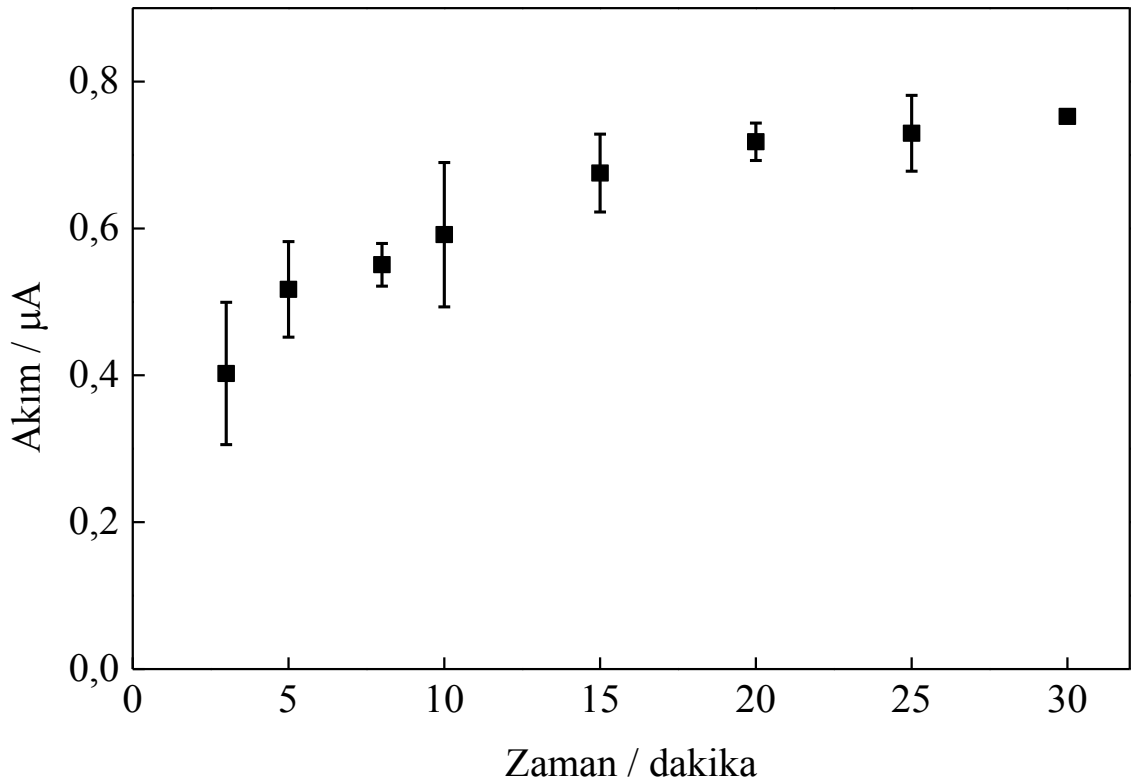


Şekil 4.20 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

0,5–40,0 mg/L derişim aralığında optimum çalışma derişimi sinyalin yüksek olduğu, 20,0 mg/L olarak belirlendi. 20,0 mg/L derişimdeki dsDNA'nın ortalaması 0,61 μ A ve bağıl standart sapması (BSS) % 2,83 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edildi.

4.3.2 GCE/P(AMT) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.6.2'de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, P(AMT) modifiye camsı karbon elektrotta, 20,0 mg/L derişimdeki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri tekniği ile adsorpsiyon süresi 3–30 dk arasında çalışıldı. Her bir adsorpsiyon süresi için ardışık üçer ölçüm alındı. Diferansiyel puls voltamogramlarından elde edilen dağılım grafiği şekil 4.21'te gösterilmektedir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görölmektedir.



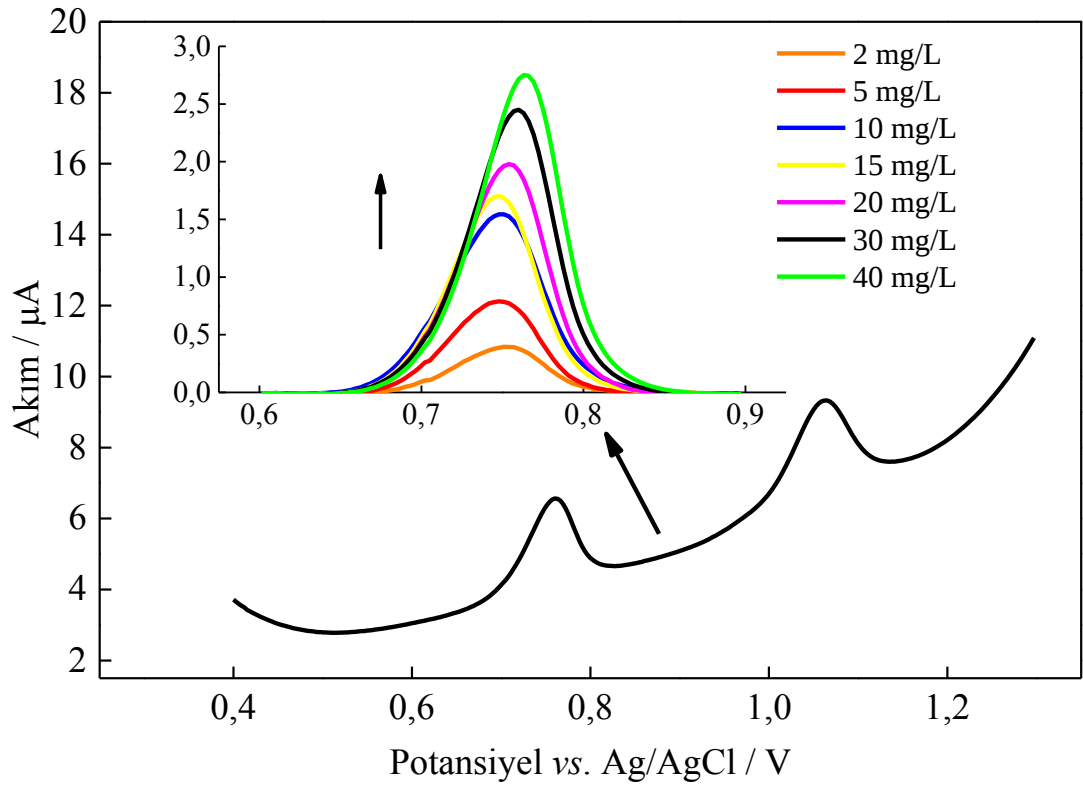
şekil 4.21 20,0 mg/L dsDNA'nın 3; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; dakika değişen sürelerde adsorbe edilmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

3–30 dakika değişen zaman aralığında optimum çalışma suresi 15 dakika olarak belirlendi. 20,0 mg/L derişimde dsDNA'nın 15 dakika adsorpsiyon suresinde elde edilen akımların ortalaması 0,67 μ A ve bağlı standart sapması (BSS) % 6,15 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edildi.

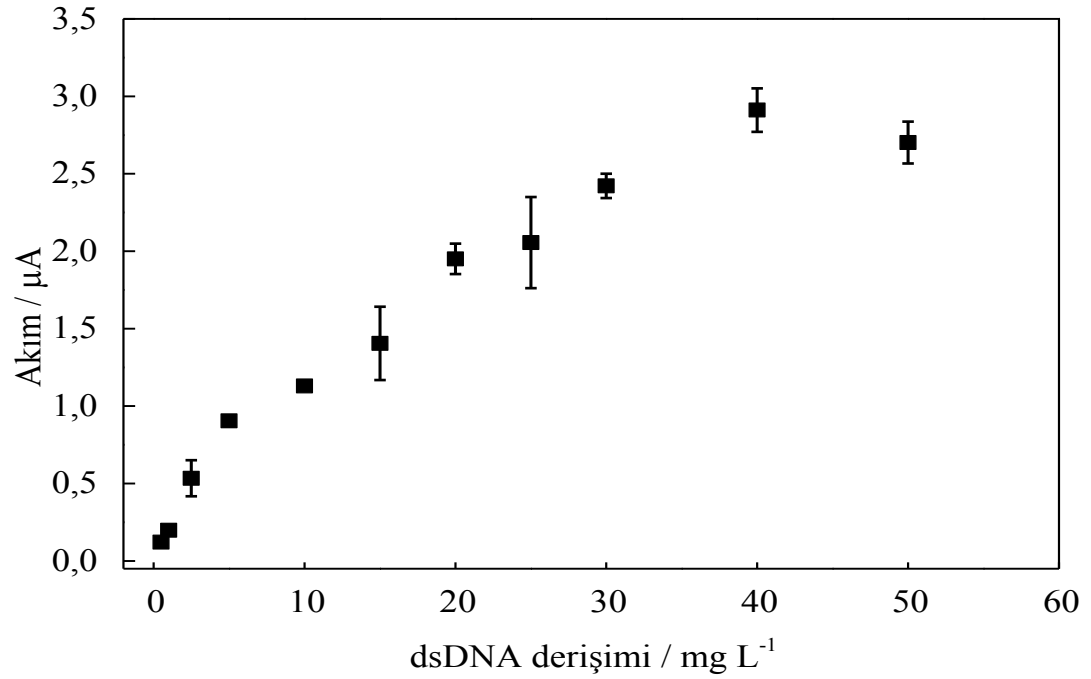
4.4 dsDNA'nın Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile GCE/P(PDCA) Elektrot Yüzeyinde Yükseltgenmesine Ait Bulgular

4.4.1 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.6.1'de anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, P(PDCA) modifiye camısı karbon elektrotta, 0,5–50,0 mg/L derişim aralığındaki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri yöntemi ile guanin sinyali üzerinden elektrokimyasal tayini gerçekleştirildi. Her bir derişim için ardışık üçer ölçüm alındı. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramları şekil 4.22'de ve dağılım grafiği şekil 4.23'te gösterilmektedir. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görlmektedir.



Şekil 4.22 pH 4,8 asetat tamponu içerisinde dsDNA'nın bazı derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri

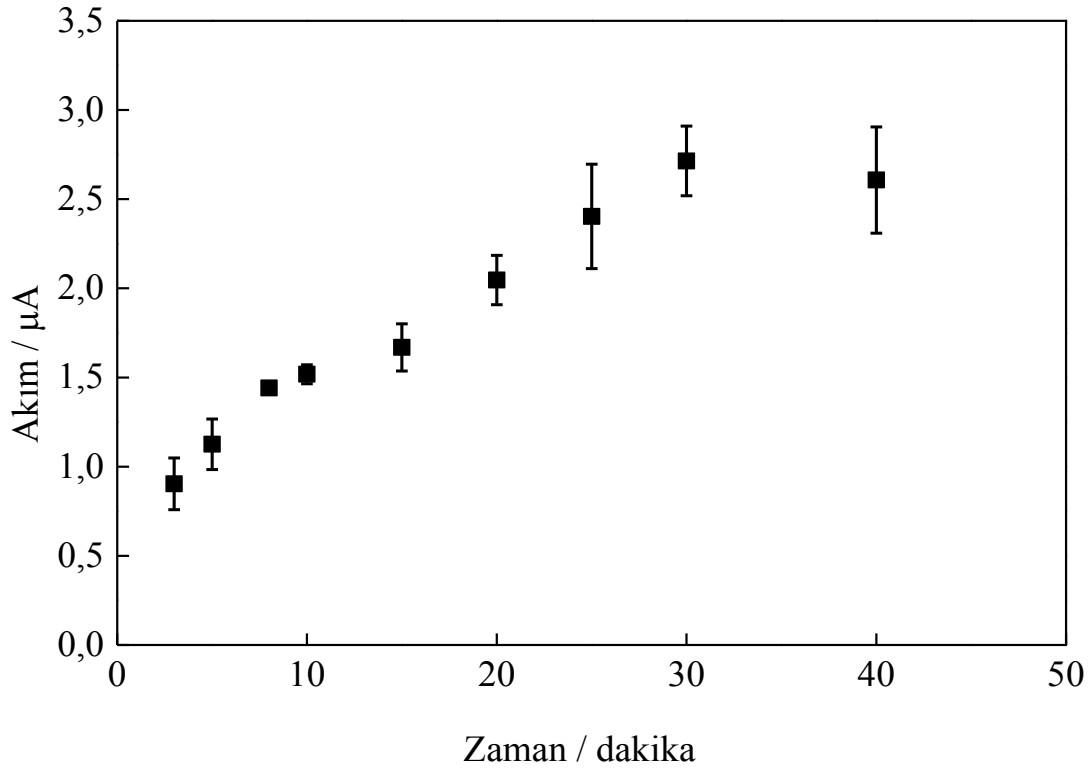


Şekil 4.23 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerdeki dsDNA'ya ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

0,5–50,0 mg/L derişim aralığında optimum çalışma derişimi sinyalin yüksek olduğu, 40,0 mg/L olarak belirlendi. 40,0 mg/L derişimdeki dsDNA'nın ortalaması 2,91 μ A ve bağıl standart sapması (BSS) % 4,83 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edildi.

4.4.2 GCE/P(PDCA) yüzeyine immobilize edilen dsDNA'nın optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi

Bölüm 3.6.4'te anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada, P(PDCA) modifiye camısı karbon elektrotta, 40,0 mg/L derişimdeki dsDNA'nın, diferansiyel puls voltametri tekniği ile adsorpsiyon süresi 3–40 dk arasında çalışıldı. Her bir adsorpsiyon süresi için ardışık üçer ölçüm alındı. Diferansiyel puls voltamogramlarından elde edilen dağılım grafiği şekil 4.24'te gösterildi. Ölçümlerin standart hataları dağılım grafiği üzerinde görölmektedir.



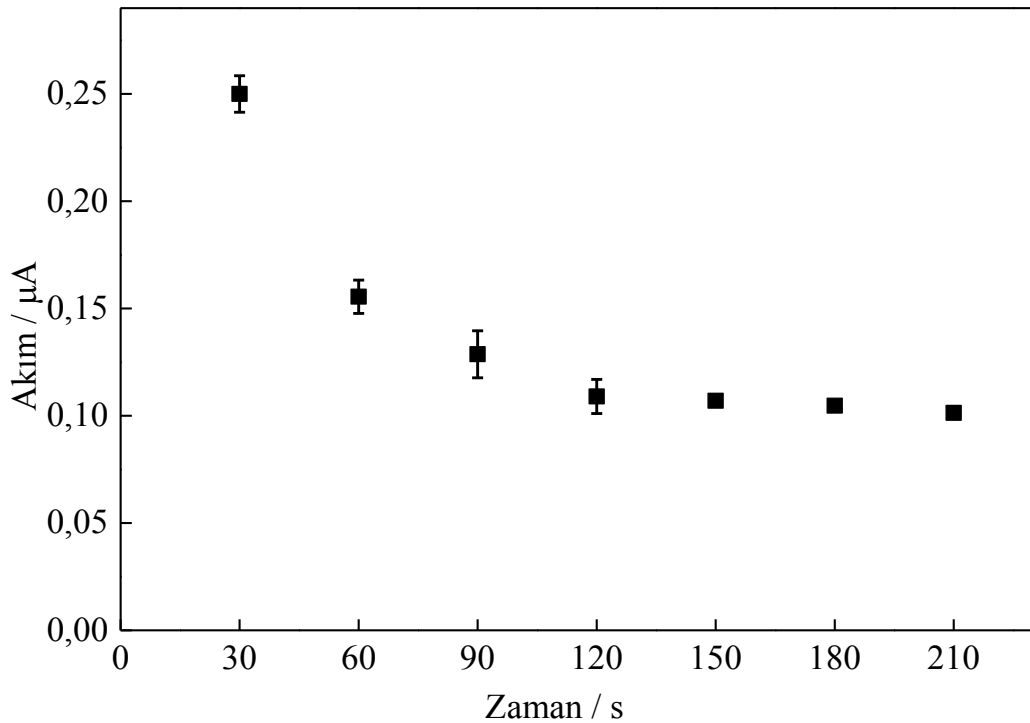
şekil 4.24 40,0 mg/L dsDNA'nın 3; 5; 7,5; 10; 15; 20; 25; 30; 40 dakika değişen sürelerde adsorbe edilmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

3–40 dakika değişen zaman aralığında optimum çalışma suresi 30 dakika olarak belirlendi. 40,0 mg/L derişimde dsDNA'nın 30 dakika adsorpsiyon suresinde elde edilen akımların ortalaması 2,714 μA ve bağlı standart sapması (BSS) %7,20 (n=3) olan anlamlı bir sinyal elde edidi.

4.5 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(AMT) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

4.5.1 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in optimum etkileşim suresinin belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.7.1'de anlatılan yol izlenerek, Bölüm 4.3'ten elde edilen veriler doğrultusunda 25,0 mg/L nitrofurantoin'in 20,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde surenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim suresi 30–210 saniye arasında değiştirildi ve elde edilen sonuçlardan şekil 4.25'teki grafik çizildi.

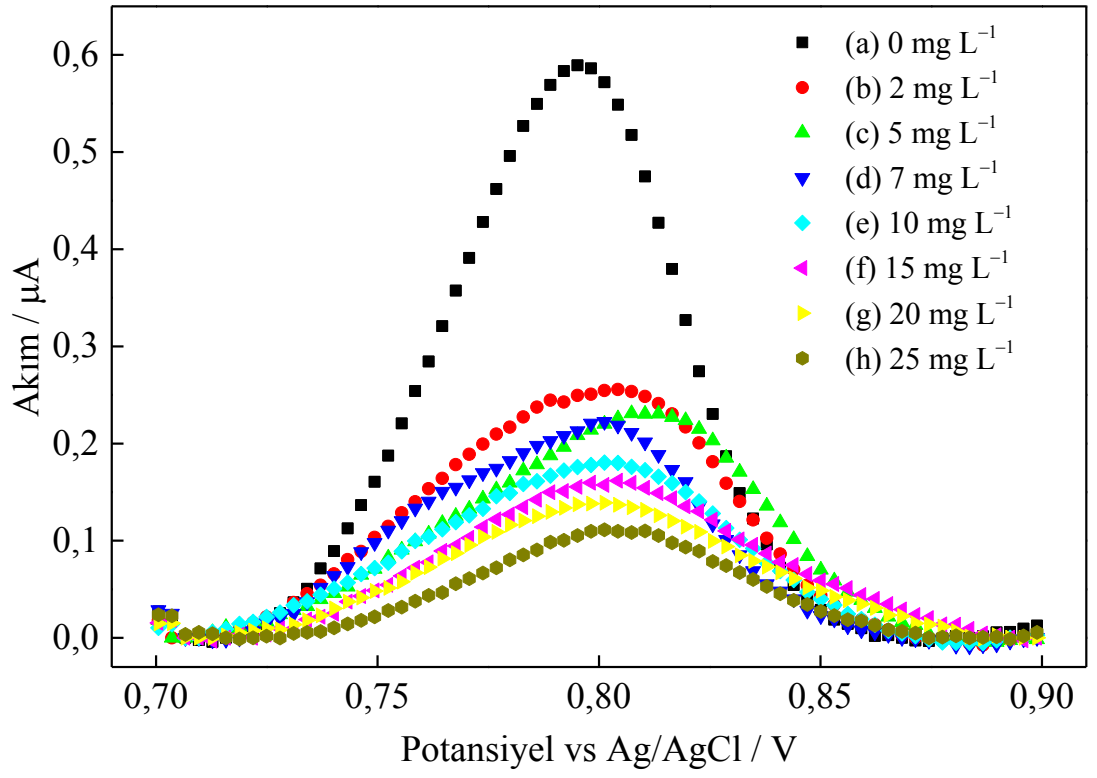


şekil 4.25 20,0 mg/L dsDNA ile 25,0 mg/L nitrofurantoin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye suresince etkileşmesine ait guanin yukseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

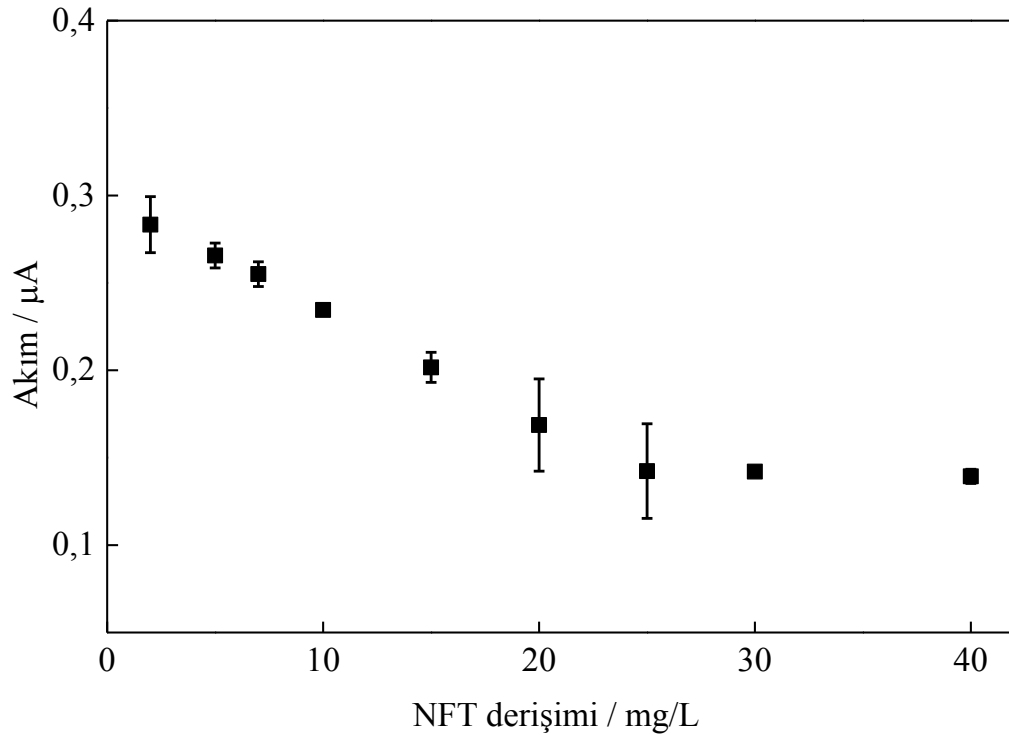
Guanin yükseltgenme sinyalinde etkileşim süresi arttırıldıkça bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın 120. saniyeden sonra sabit kalması nedeniyle optimum etkileşim süresi 120 saniye olarak belirlendi.

4.5.2 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile etkileşen nitrofurantoin'in optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular

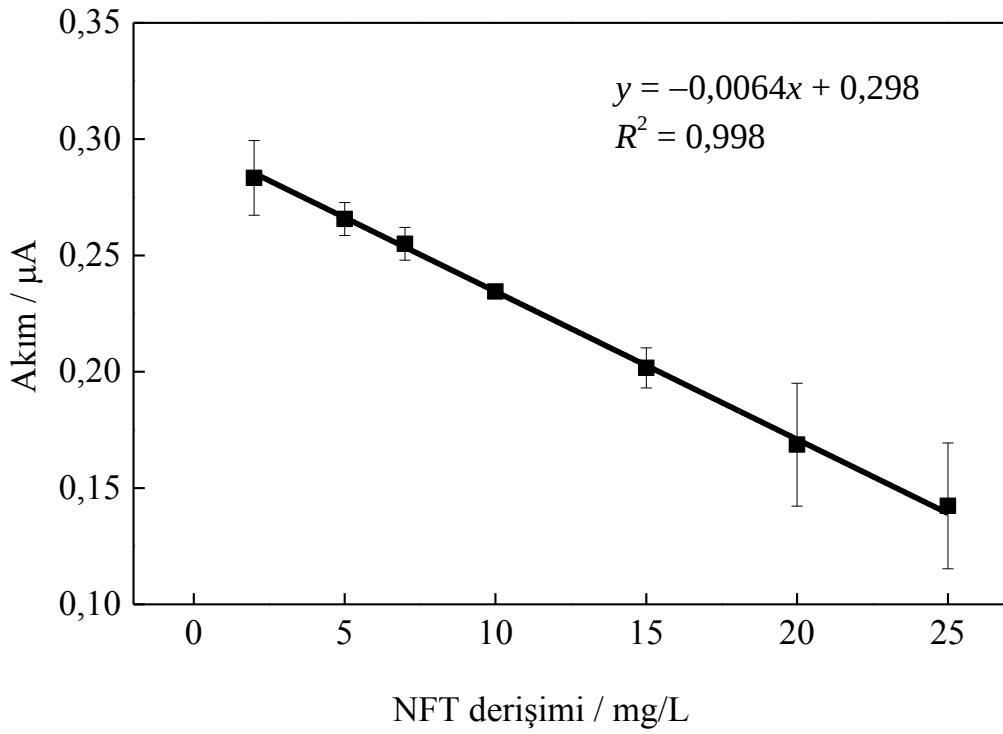
Bölüm 3.7.2'de anlatılan yol izlenerek ve Bölüm 4.3'te elde edilen veriler doğrultusunda nitrofurantoin'in 20,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde derişimin etkisini inceleyebilmek için ilaç miktarı 1,0–40,0 mg/L arasında değiştirildi. Elde edilen sonuçlardan bazı NFT derişimleri için şekil 4.26'daki diferansiyel puls voltamogramı ve şekil 4.27'deki guanin yükseltgenme sinyalinin ortalama büyüklükleri gösteren grafik çizildi. NFT miktarı arttıkça guanin yükseltgenme pik akımının azaldığı belirlendi. Bu azalmanın DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yapısındaki yükseltgenebilecek grupların kısmen hasar görmesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir (Erdem vd. 2005, Dogan-Topal vd. 2009) Guanin yükseltgenme akımındaki azalmanın 25,0 mg/L NFT'den sonra sabitlendiği görüldü. 2,17–25,0 mg/L arasında doğrusal çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.28). Elde edilen sonuçlara göre en uygun nitrofurantoin derişimi 25,0 mg/L olarak belirlendi.



Şekil 4.26 20,0 mg/L dsDNA ile; 0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 mg/L nitrofurantoin'in etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri



şekil 4.27 20,0 mg/L dsDNA ile 120 saniye boyunca nitrofurantoin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yukseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri



şekil 4.28 NFT derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge

NFT tayini için elde edilen parametreler çizelge 4.3'te verilmiştir. NFT için teşhis sınırı (TS) 0,65 mg/L, tayin alt sınırı (TAS) ise 2,17 mg/L olarak elde edildi. Yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı elektrot kullanılarak ardışık ölçümler alındı. Bu amaçla 20 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(AMT) elektrot 25,0 mg/L NFT ile etkileştirildi. Bunun sonucunda DPV ile elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları için % bağıl standart sapma (BSS) 1,15 olarak hesaplandı. Önerilen metodun kesinliği farklı elektrotlarla yapılan tekrar üretilebilirlik ölçümleri ile elde edildi. 25,0 mg/L NFT ile etkileşim sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme pik akımlarındaki değişiklikten hesaplanan % BSS 3,32 olarak bulundu. Çalışmadan elde edilen analitik parametreler çizelge 4.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.3 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotta DPV ile NFT'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler

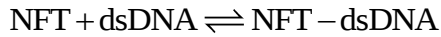
Parametreler	GCE/P(AMT)/dsDNA elektrot
Ölçüm potansiyeli (V)	0,80
Doğrusal aralık (mg/L)	2,17-25,0
Eğim ($\mu\text{A L/mg}$)	-0,0064
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9982
Kesişim noktası(μA)	0,2981
TS (mg/L)	0,65
TAS (mg/L)	2,17
Tekrar üretilebilirlik* (%)	3,32
Tekrarlanabilirlik* (%)	1,15

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla yapılan tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışmalarından oldukça iyi sonuçların elde edilmesi nitrofurantoin içeren ticari formülasyonlardan miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

DPV tekniği ilaç ile dsDNA arasındaki etkileşim türünün aydınlatılmasında kullanılmaktadır (Arias vd. 2009). Guanin yükseltgenme pik potansiyelindeki pozitif yöne kaymaya interkalatif etkileşimlerin neden olduğu bildirilmiştir (Carter vd. 1989).

Şekil 4.26’da görüldüğü üzere NFT varlığında guanin bazına ait yükseltgenme pik potansiyelinin yavaşça daha pozitif potansiyellere kaydığı görülmektedir. Buradan NFT’in dsDNA heliks yapısına kısmi interkalasyon ile bağlanabileceği söylenebilir. NFT derişimi arttıkça dsDNA’daki guanin yükseltgenme pik akımlarındaki azalmanın nedeni serbest dsDNA’nın denge derişimindeki azalmadan kaynaklandığı düşünölebilir. NFT ile dsDNA arasında aşğıdaki denkleme göre NFT-dsDNA kompleksi oluşur (Yola ve Özaltın 2011);



bu kompleksin elektrokimyasal olarak dsDNA’dan daha az aktif olduğu düşünölebilir.

NFT ile dsDNA etkileşiminde tek bir kompleks oluştuğı varsayıldığında, NFT ile dsDNA arasındaki etkileşim aşğıdaki eşitlik kullanılarak belirlenebilir;

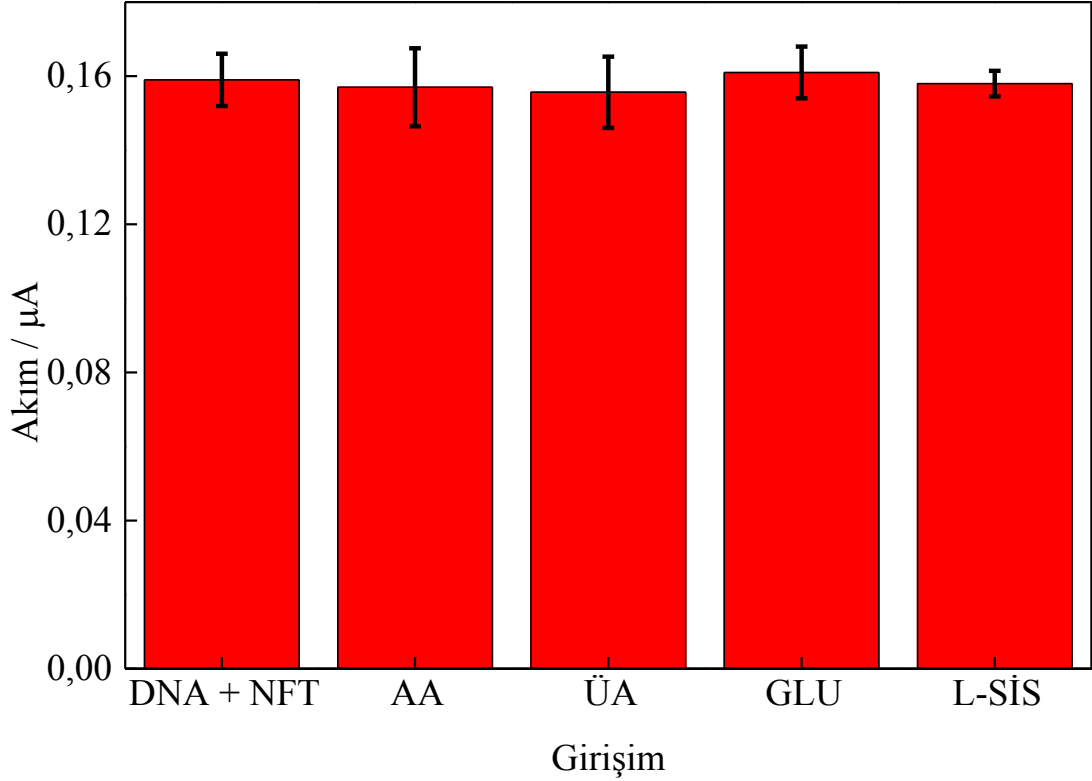
$$\log\left(\frac{1}{\text{NFT}}\right) = \log K + \log\left(\frac{I_{\text{NFT-dsDNA}}}{I_{\text{dsDNA}} - I_{\text{NFT-dsDNA}}}\right)$$

Bu eşitlikte K bağlanma sabiti, I_{dsDNA} guanin yükseltgenme pik akımları ve $I_{\text{NFT-dsDNA}}$ NFT ile dsDNA’nın etkileşimi sonrası ölçölen guanin yükseltgenme pik akımıdır. Bu kompleksin bağlanma sabiti K , $\log(1/[\text{NFT}])$ ’ye karşı $\log(I_{\text{NFT-dsDNA}}/I_{\text{DNA}} - I_{\text{NFT-dsDNA}})$ değerlerinin grafiğı geçirilmesiyle elde edilen eğrinin y eksenini kestiğı noktadaki değerden hesaplandı. NFT ile dsDNA arasındaki K sabiti $1,3 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ olarak bulundu (Aydoğıdu vd. 2014).

4.5.3 GCE/P(AMT)/dsDNA–NFT etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları

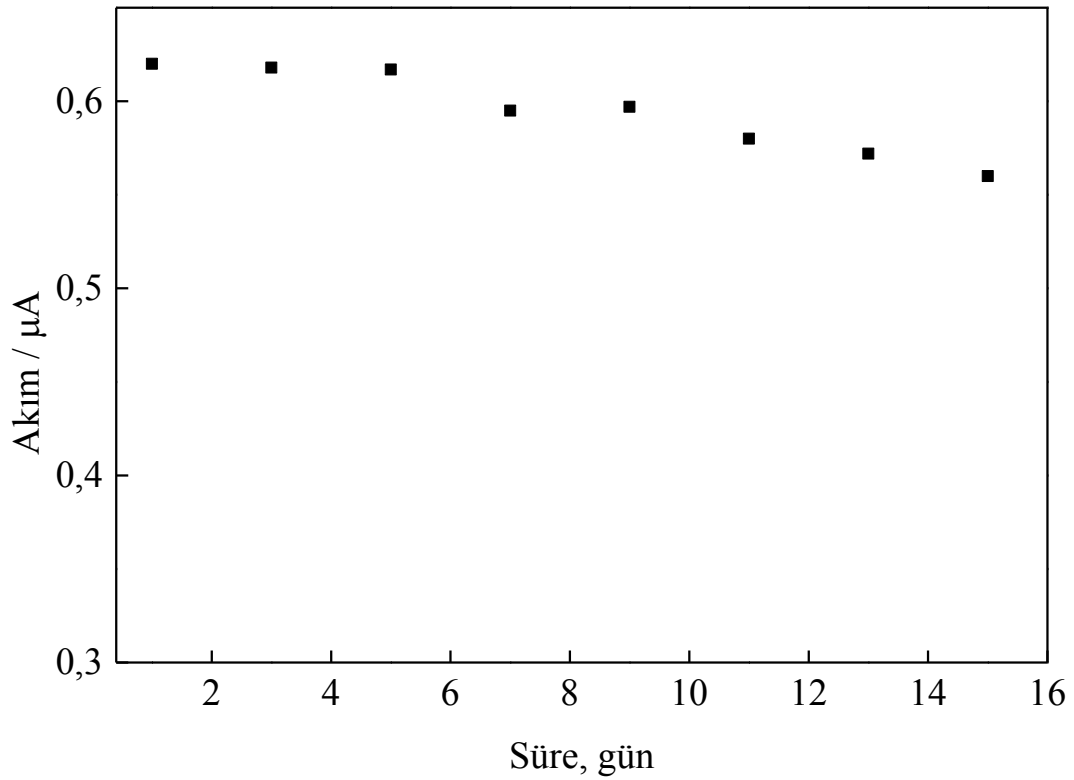
Geliştirilen biyosensörün seçiciliğı GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun 25,0 mg/L NFT çözeltisiyle (pH 4,8) etkileşim öncesi ve sonrasında 0,1 mM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA), D-glukoz (GLU) ve L-sistein (L-SİS) içeren çözelti ortamında Bölüm 3.9’da

anlatıldığı şekilde belirlendi. Şekil 4.29’da görüldüğü gibi askorbik asit, ürik asit ve L-sisteinin guanin yükseltgenme sinyaline önemli ölçüde bir girişim etkisi olmamıştır. Glukozun ise %1,26 gibi oldukça düşük bir girişim etkisi görüldü. Buradan elde edilen biyosensörün seçiciliğinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.29 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodunun 25,0 mg/L NFT için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları

GCE/P(AMT) elektrodunun kararlılığı da ayrıca test edilmiştir. GCE/P(AMT)/dsDNA elektroduna ait guanin yükseltgenme akım sinyalleri ilk üç günde değişmezken, 15 gün sonunda ilk cevabın %10,4’ünü kaybettiği görüldü (Şekil 4.30). Buradan hazırlanan GCE/P(AMT) elektrodunun iyi kararlılık gösterdiği söylenebilir.



Şekil 4.30 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun depolama kararlılığı (0,5 M ABS pH 4,8)

4.6 GCE/P(AMT)/dsDNA–NFT Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları

4.6.1 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması ve geri kazanım çalışmaları

NFT içeren kapsül içeriklerinden miktar tayini yapmak amacıyla Bölüm 3.7.5'te anlatıldığı şekilde numuneler hazırlandı. GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla NFT içeren numunelerin etkileşimi sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinden okunan pik akımı değerleri şekil 4.28'de verilen kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak kapsül içeriklerindeki etken madde miktarları hesaplandı. Geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.4'te verildi.

Çizelge 4.4 NFT içeren Pyelosepthyl® kapsüllerinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(AMT)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları

Yöntem/ Elektrot	Kapsül içeriği değeri, mg/kapsül	Bulunan değerler, mg/kapsül	Ortalama*, mg/kapsül	BSS, %	Bias %
DPV/ GCE/P(AMT) /dsDNA	50,0	47,18; 47,22; 50,14; 53,41; 55,09	50,86	7,05	1,72

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Kapsül içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla Bölüm 3.7.6’da anlatıldığı şekilde kapsül içeriğinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla belirli miktarda toz haline getirilmiş kapsül içeriği ve saf etken madde karışımı belli bir hacimde DMF içinde çözüldükten sonra çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan üç derişime karşılık gelen hacimlerde çözeltiler alındı ve asetat tamponu ile seyreltilip voltamogramları kaydedildi. Buradan da voltametrik deney sonucunda kapsül içeriğindeki NFT miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplandı. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri ve BSS değerleri ile birlikte Çizelge 4.5’te gösterildi.

Çizelge 4.5 NFT içeren Pyelosepthyl® kapsüllerinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları

Yöntem /Elektrot	Eklene, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama*, mg/L	Geri kazanım, %	BSS**, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(AMT)/dsDNA	2,0	1,82; 2,14; 2,23; 2,26; 2,34	2,16	108,0	9,36	8,0
	5,0	4,88; 4,95; 5,12; 5,21; 5,36	5,10	102,0	3,81	2,0
	10,0	9,56; 10,12; 10,23; 10,35; 10,86	10,22	102,20	4,57	2,2

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Çizelge 4.5'te kapsül analizi için verilen veriler incelendiğinde, üç farklı derişime ait BSS değerlerinin %10'dan küçük, geri kazanımların %102,0–%108,0 aralığında olduğu görülmektedir. Bu da geliştirilen voltametrik yöntemlerin ilaçlarda NFT tayini için uygulanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.6.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda % geri kazanım çalışmaları

Nitrofurantoin tayininin biyolojik örneklerle uygulanıp uygulanmayacağını anlaşılmaması için Bölüm 3.7.7'de anlatıldığı şekilde insan serum örnekleriyle çalışmalar yapılmıştır. 0,5 M asetat tamponuyla seyreltilmiş üç farklı nitrofurantoin derişimi için bulunan madde miktarları, bağıl standart sapmalar ve % geri kazanım değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 NFT içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları

Yöntem /Elektrot	Seruma eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama *, mg/L	Geri kazanım, %	BSS **, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(AMT)/dsDNA	5,0	4,73; 4,75; 4,84; 4,97; 5,02	4,86	97,20	2,66	-2,8
	10,0	9,62; 9,67; 9,74; 9,86; 10,04	9,79	97,90	10,76	-2,1
	15,0	14,42; 14,57; 14,62; 14,75; 15,0	14,67	97,80	1,49	-2,2

* Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

** Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Serumda NFT tayini ile ilgili çizelge 4.6'da elde edilen veriler, hazırlanan dsDNA modifiye elektrotların serumda bir girişim etkisi olmadan ve bir önderiştirme gerektirmeden yüksek doğruluk ile NFT'nin tayin edilebileceğinin göstergesidir.

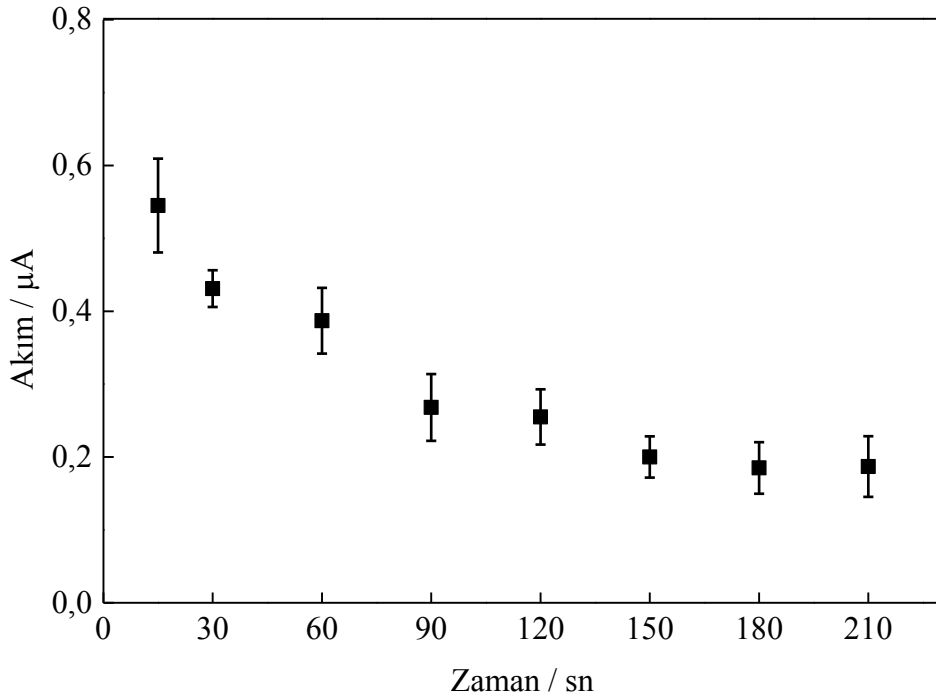
Bu sonuçlara göre, geliştirilen GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun;

- kalite ve içerik kontrolü amacı ile tablet, kapsül ve şurup gibi farmasötik numunelere,
- farklı tıbbi ve kimyasal/biyokimyasal amaçlar için idrar, serum ve kan gibi biyolojik numunelere,
- farmakolojik, farmakinetik ve toksikolojik amaçlar için doku ve organlardan hazırlanan numunelere güvenle uygulanabileceği söylenebilir.

4.7 Nitrofurantoin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(PDCA) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

4.7.1 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile nitrofurantoin'in optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.7.3'de anlatılan yol izlenerek, Bölüm 4.4'den elde edilen veriler doğrultusunda 20,0 mg/L nitrofurantoin'in 40,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–210 saniye arasında değiştirilmiş ve elde edilen sonuçlardan şekil 4.31'deki grafik çizilmiştir.

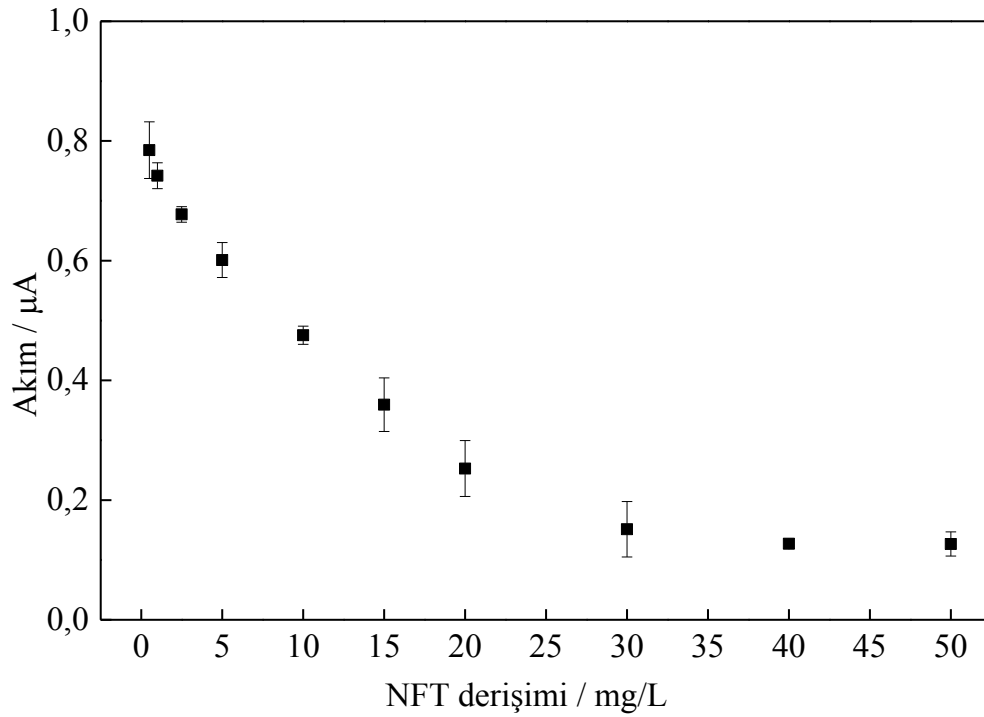
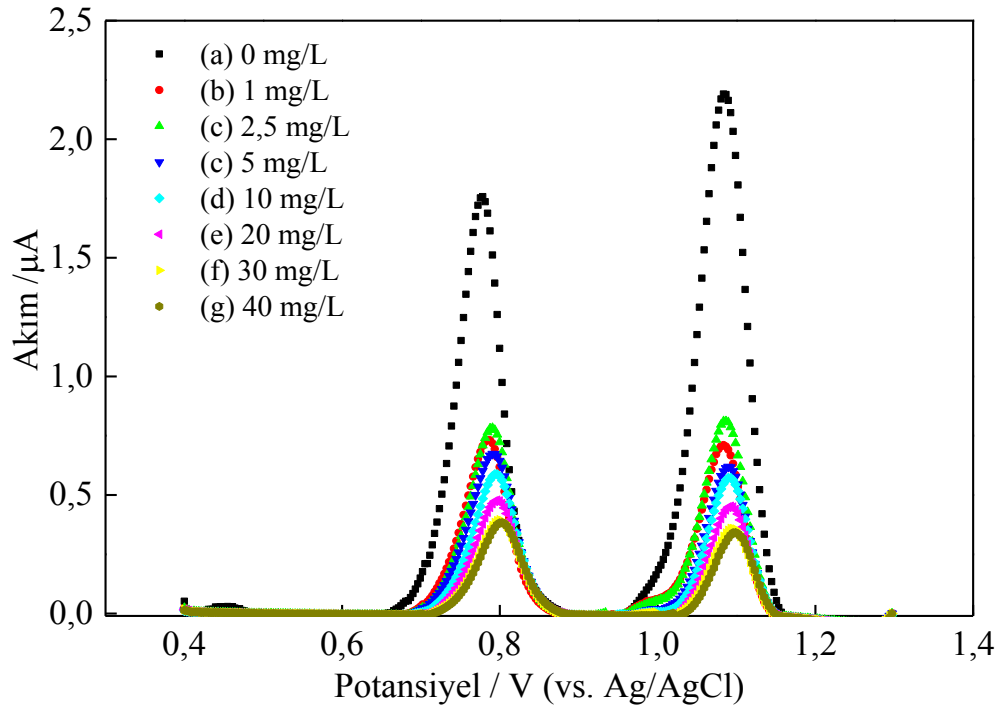


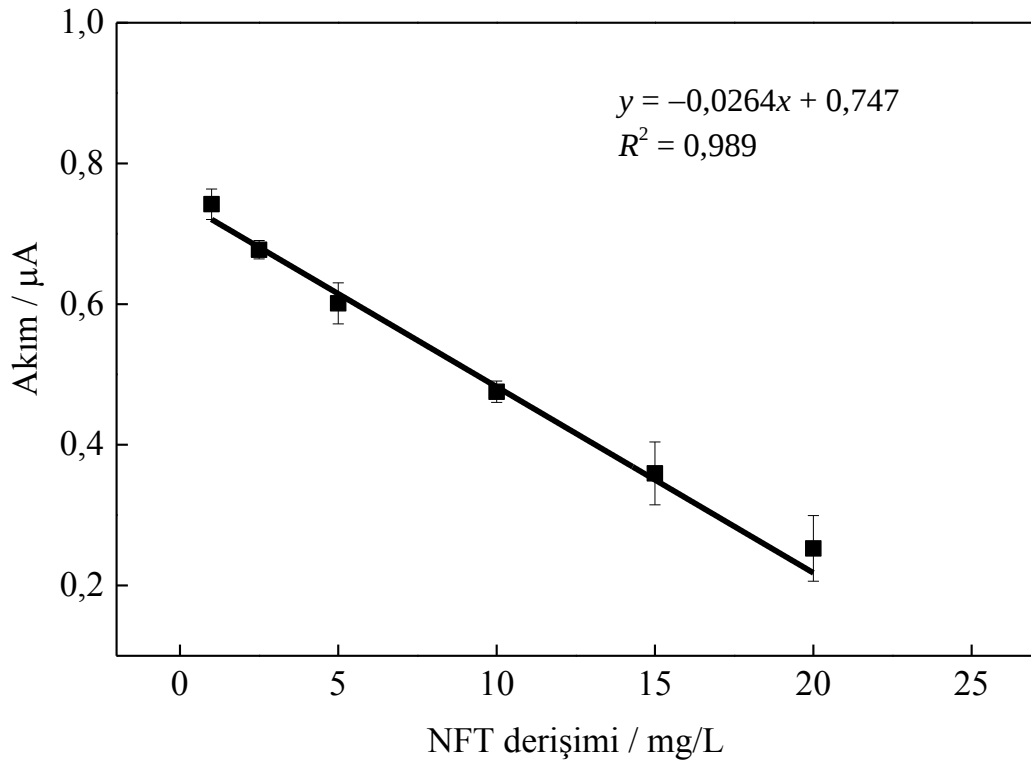
Şekil 4.31 40,0 mg/L dsDNA ile 20,0 mg/L nitrofurantoin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri

Guanin yükseltgenme akımında etkileşim süresi arttırıldıkça bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın 150. saniyeden sonra sabitlenmesi nedeniyle optimum etkileşim süresi 150 saniye olarak belirlendi.

4.7.2 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile etkileşen nitrofurantoin'in optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.7.4'te anlatılan yol izlenerek Bölüm 4.4'ten elde edilen veriler doğrultusunda NFT'in 40,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde derişimin etkisini inceleyebilmek için NFT miktarı 0,5–50,0 mg/L arasında değıştirildi. Elde edilen sonuçlardan bazı NFT derişimleri için şekil 4.32'deki diferansiyel puls voltamogramı ve şekil 4.33'teki guanin yükseltgenme sinyalinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik çizildi. NFT miktarı arttıkça guanin yükseltgenme pik akımının azaldığı belirlendi. Bu azalmanın DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yapısındaki yükseltgenebilecek grupların kısmen hasar görmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Erdem vd. 2005, Dogan-Topal vd. 2009). Bu azalma 30,0 mg/L NFT'den sonra sabitlendi. 1,0–20,0 mg/L arasında doğrusal çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.34). Elde edilen sonuçlara göre en uygun NFT derişimi 30,0 mg/L olarak belirlendi.





Şekil 4.34 NFT derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge

NFT için teşhis sınırı (TS) $0,309 \text{ mg L}^{-1}$, tayin alt sınırı (TAS) ise $1,0 \text{ mg/L}$ olarak elde edildi. Yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı elektrot kullanılarak ardışık ölçümler alındı. Bu amaçla 40 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(PDCA) elektrot $20,0 \text{ mg/L}$ NFT ile etkileştirildi. DPV ile elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları için % BSS değeri 3,79 olarak hesaplandı. Önerilen metodun kesinliğı farklı günlerde yapılan tekrar üretilebilirlik ölçümleri ile elde edildi. $20,0 \text{ mg/L}$ NFT ile etkileşimde elde edilen guanin yükseltgenme pik akımlarındaki değışiklikten hesaplanan tekrar üretilebilirliğin % BSS değeri 4,62 olarak bulundu. Çalışmadan elde edilen analitik parametreler çizelge 4.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.7 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotta DPV ile NFT'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler

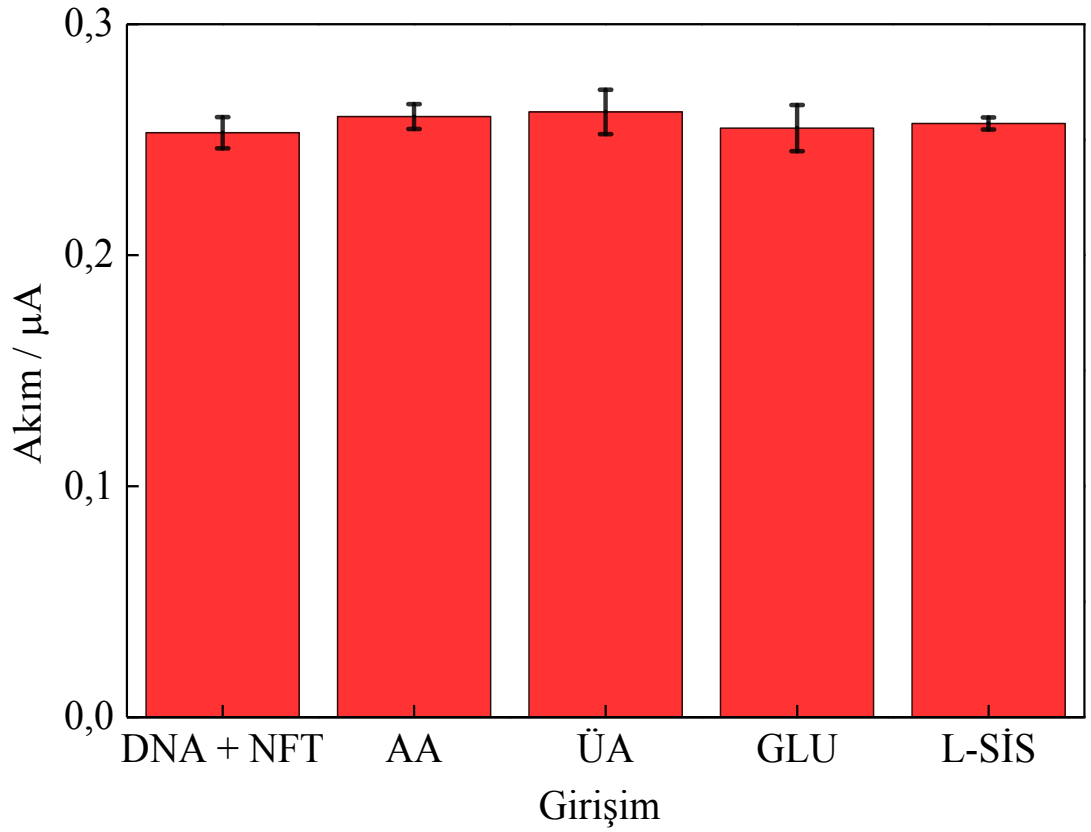
Parametreler	GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrot
Ölçüm potansiyeli (V)	0,80
Doğrusal aralık (mg/L)	1,0-20,0
Eğim ($\mu\text{A L/mg}$)	0,0264
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,989
Kesişim noktası (μA)	0,747
TS (mg/L)	0,309
TAS (mg/L)	1,0
Tekrar üretilebilirlik* (%)	4,62
Tekrarlanabilirlik* (%)	3,79

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla yapılan tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışmalarından oldukça iyi sonuçların elde edilmesi nitrofurantoin içeren ticari formülasyonlardan miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

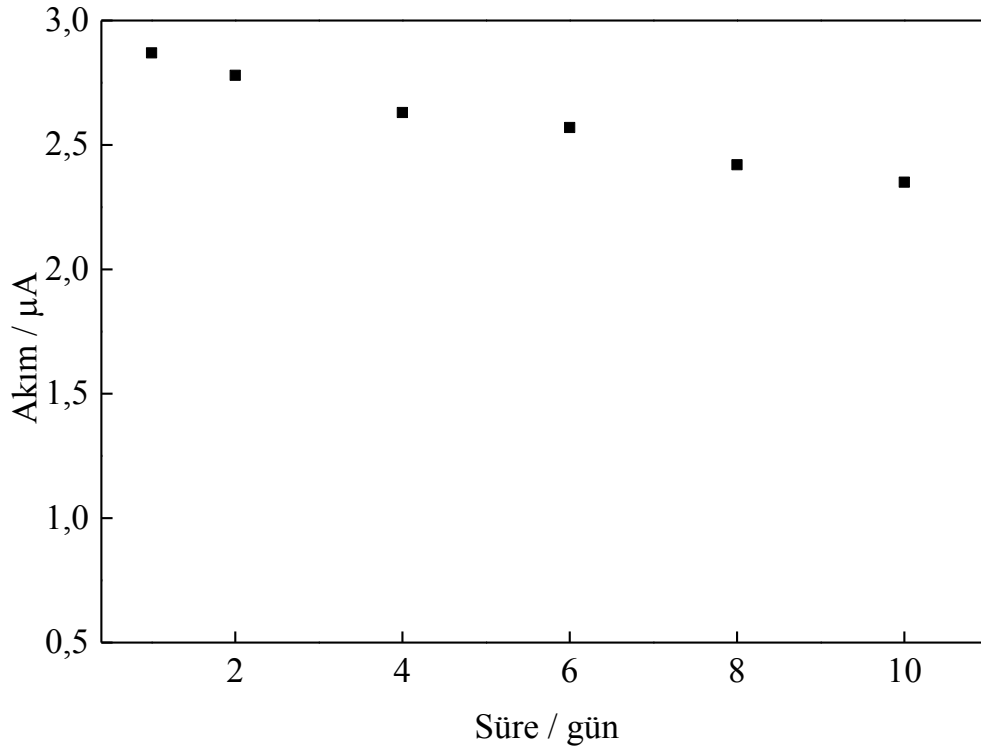
4.7.3 GCE/P(PDCA)/dsDNA–NFT etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları

Geliştirilen GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun seçiciliği 20,0 mg/L NFT çözeltisiyle (pH 4,8) etkileşim öncesi ve sonrasında 0,1 mM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA), D-glukoz (GLU) ve L-sistein (L-SİS) içeren çözelti ortamında Bölüm 3.9'da anlatıldığı şekilde belirlendi. Şekil 4.35'te görüldüğü gibi glukozun ve L-sisteinin guanin yükseltgenme sinyaline önemli ölçüde bir girişim etkisi olmadığı görüldü. Askorbik asit için %2,77 ve ürik asit için ise %3,56 gibi oldukça düşük girişim değerleri hesaplandı. Buradan elde edilen biyosensörün seçiciliğinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.35 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun 20,0 mg/L NFT için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları

GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun kararlılığı da ayrıca test edilmiştir. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektroduna ait guanin yükseltgenme akım sinyalleri incelendiğinde 10 gün sonunda ilk cevabın %18,4'ünü kaybettiği görüldü (Şekil 4.36). Buradan hazırlanan GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun iyi kararlılığa sahip olduğu söylenebilir.



Şekil 4.36 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun depolama kararlılığı (0,5 M ABS pH 4,8)

4.8 GCE/P(PDCA)/dsDNA–NFT Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları

4.8.1 Geliştirilen yöntemin kapsüllere uygulanması ve geri kazanım çalışmaları

NFT içeren kapsül içeriklerinden miktar tayini yapmak amacıyla Bölüm 3.7.5’te anlatıldığı şekilde numuneler hazırlandı. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla NFT içeren numunelerin etkileşimi sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinden okunan pik akımı değerleri Şekil 4.34’te verilen kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak kapsül içeriklerindeki etken madde miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 NFT içeren Pyelosepthyl® kapsüllerinde pH 4,8 asetat tampon içersinde GCE/P(PDCA)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları

Yöntem/Elektrot	Kapsül içeriği değeri, mg	Bulunan değerler, mg	Ortalama*, mg	BSS, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA) /dsDNA	50,0	42,75; 45,03; 47,12; 50,17; 52,38	47,49	8,14	-5,02

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Kapsül içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla Bölüm 3.7.6'da anlatıldığı şekilde kapsül içeriğinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla belirli miktarda toz haline getirilmiş kapsül içeriği ve saf etken madde karışımı belli bir hacimde DMF içinde çözüldükten sonra çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan üç derişime karşılık gelen hacimlerde çözeltiler alındı ve asetat tamponu ile seyreltilip voltamogramları kaydedildi. Buradan da voltametrik deney sonucunda kapsül içeriğindeki NFT miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplandı. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri % BSS değerleri ile birlikte çizelge 4.9'da gösterildi.

Çizelge 4.9 NFT içeren Pyelosepthyl® kapsüllerinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları

Yöntem /Elektrot	Eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama*, mg/L	Geri kazanım, %	BSS**, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA)/dsDNA	1,0	0,92; 0,95; 1,08; 1,12; 1,15	1,04	104,0	9,88	4,0
	2,5	2,36; 2,41; 2,46; 2,56; 2,62	2,48	99,20	4,31	-0,8
	5,0	4,72; 4,86; 4,93; 5,16; 5,22	4,98	99,60	4,20	-0,4

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Çizelge 4.9’da kapsül analizi için verilen veriler incelendiğinde, üç farklı derişime ait BSS değerlerinin %10’dan küçük, geri kazanımların %99,20–%104,0 aralığında olduğu görülmektedir. Bu da geliştirilen voltametrik yöntemlerin ilaçlarda NFT tayini için uygulanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.8.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda % geri kazanım çalışmaları

Nitrofurantoin tayininin biyolojik örneklerle uygulanıp uygulanmayacağını anlaşılmaması için Bölüm 3.7.7’de anlatıldığı şekilde insan serum örnekleriyle çalışmalar yapılmıştır. 0,5 M asetat tamponuyla seyreltilmiş üç farklı nitrofurantoin derişimi için bulunan madde miktarları, % BSS ve % geri kazanım değerleri çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10 NFT içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları

Yöntem /Elektrot	Seruma eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama* , mg/L	Geri kazanım, %	BSS** , %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA)/dsDNA	2,5	2,12; 2,37; 2,54; 2,61; 2,73	2,47	98,80	9,58	-1,2
	5,0	4,43; 4,49; 4,91; 5,28; 5,69	4,96	99,20	10,76	-0,8
	7,5	7,15; 7,18; 7,57; 7,72; 7,96	7,52	100,27	4,65	0,27

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Serumda NFT tayini ile ilgili çizelge 4.10’da elde edilen veriler, hazırlanan dsDNA modifiye elektrotların serumda bir girişim etkisi olmadan ve bir önderiştirme gerektirmeden yüksek doğruluk ile NFT’nin tayin edilebileceğinin göstergesidir.

Bu sonuçlara göre, GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun;

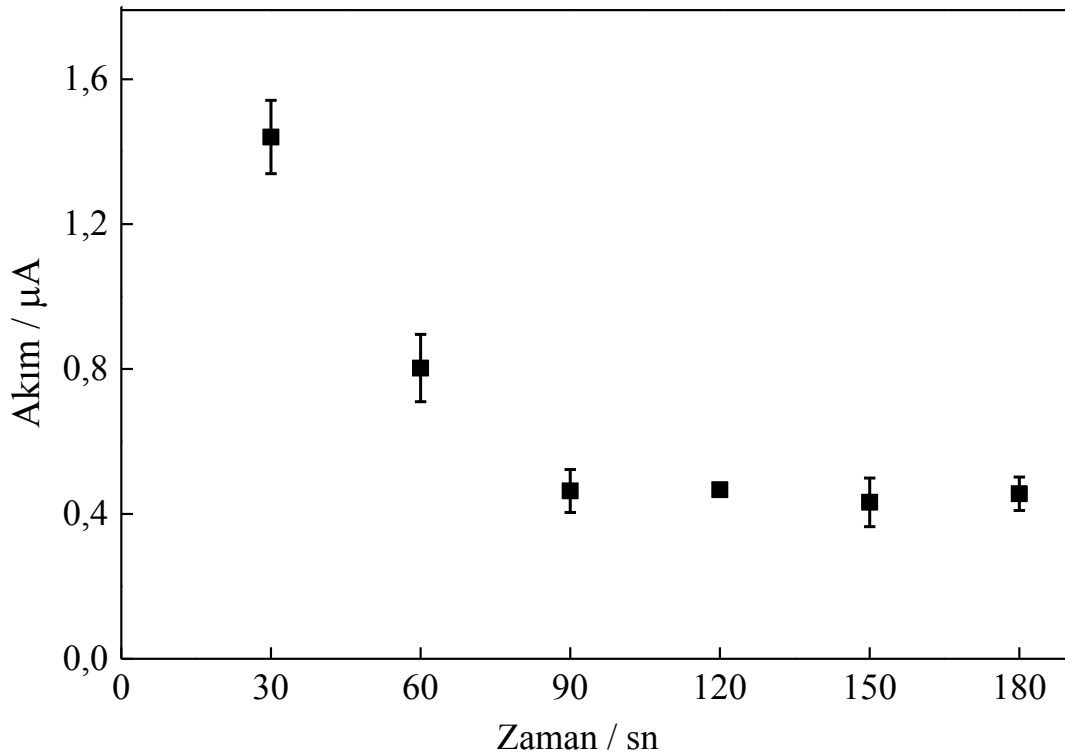
- kalite ve içerik kontrolü amacı ile tablet, kapsül ve şurup gibi farmasötik numunelere,

- farklı tıbbi ve kimyasal/biyokimyasal amaçlar için idrar, serum ve kan gibi biyolojik numunelere,
- farmakolojik, farmakinetik ve toksikolojik amaçlar için doku ve organlardan hazırlanan numunelere güvenle uygulanabileceği söylenebilir.

4.9 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(AMT) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

4.9.1 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.8.1'de anlatılan yol izlenerek ve Bölüm 4.3'te elde edilen veriler doğrultusunda 30,0 mg/L gemsitabin'in 20,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–180 saniye arasında değiştirildi ve elde edilen sonuçlardan şekil 4.37'deki grafik çizildi.

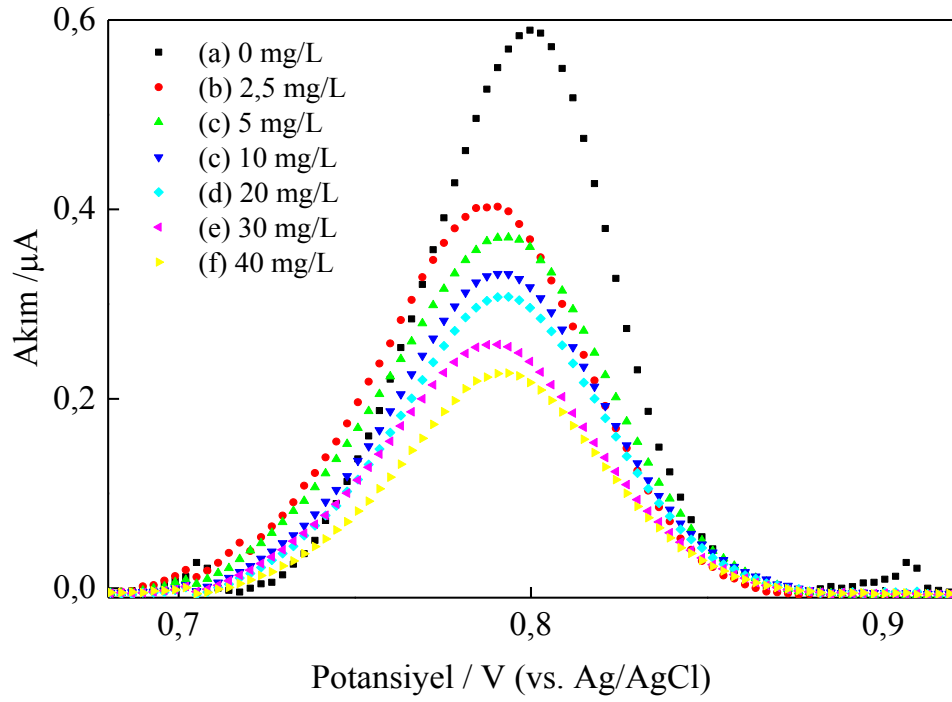


Şekil 4.37 20,0 mg/L dsDNA ile 30,0 mg/L gemsitabin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

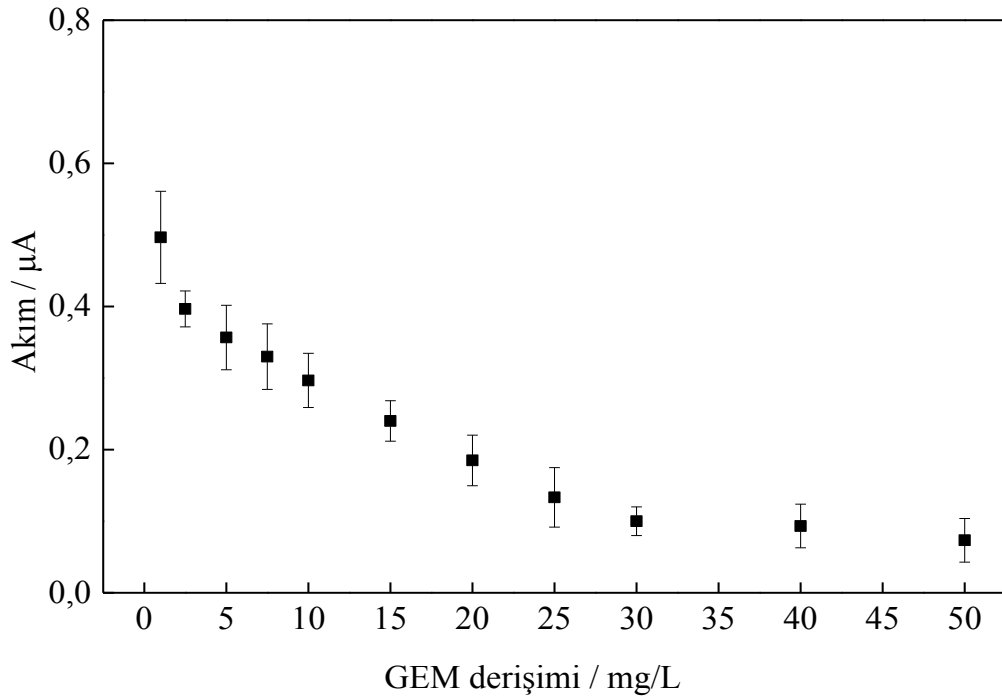
Guanin yükseltgenme akımında etkileşim süresi arttırıldıkça bir azalma gözlemlendi. Bu azalma 90. saniyeden sonra sabit kalması nedeniyle optimum etkileşim süresi 90 saniye olarak belirlendi.

4.9.2 GCE/P(AMT) elektroda immobilize edilen dsDNA ile etkileşen gempitabin'in optimum miktarının belirlenmesine ait bulgular

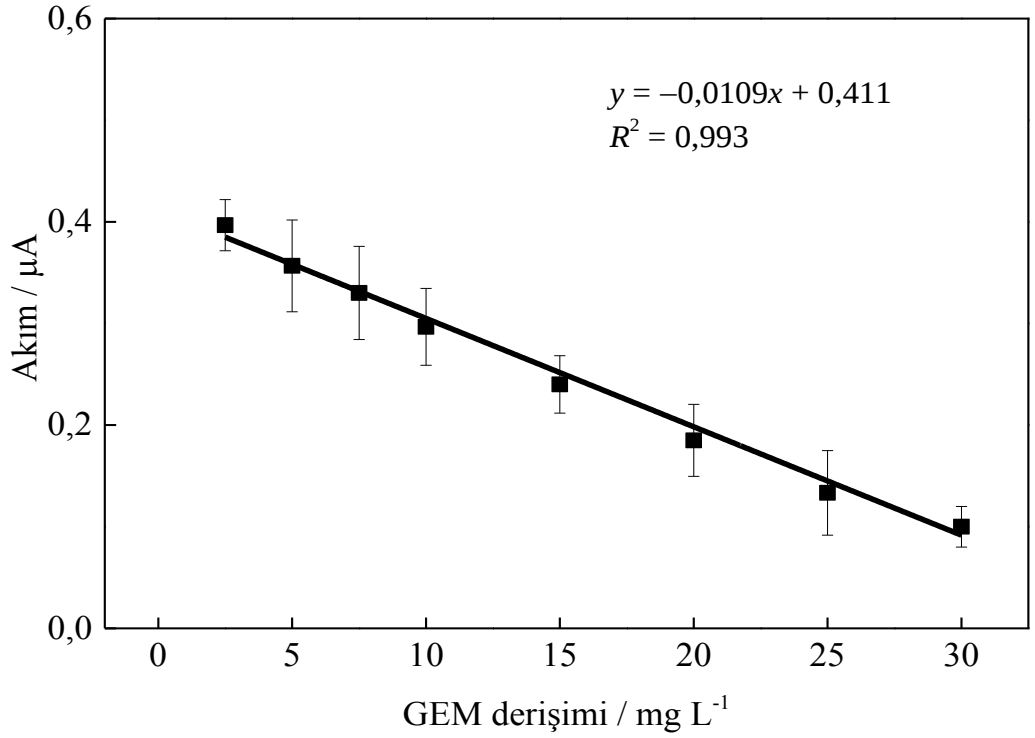
Bölüm 3.8.2'de anlatılan yol izlenerek ve Bölüm 4.3'te elde edilen veriler doğrultusunda GEM'in 20,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde derişimin etkisini inceleyebilmek için ilaç miktarı 1,0–50,0 mg/L arasında değiştirildi. Elde edilen sonuçlardan bazı GEM derişimleri için şekil 4.38'deki diferansiyel puls voltamogramı ve şekil 4.39'daki guanin yükseltgenme sinyalinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik çizildi. GEM miktarı arttıkça guanin yükseltgenme pik akımının doğrusal olarak azaldığı belirlendi. Bu azalmanın DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yapısındaki yükseltgenebilecek grupların kısmen hasar görmesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir (Erdem vd. 2005, Dogan-Topal vd. 2009). Guanin yükseltgenme akımındaki azalmanın 30,0 mg/L GEM'den sonra sabit kaldığı görüldü. 2,5–30,0 mg/L arasında doğrusal çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.40). Elde edilen sonuçlara göre en uygun GEM derişimi 30,0 mg/L olarak seçildi.



Şekil 4.38 20,0 mg/L dsDNA ile gemitabin'in farklı derişimlerde (sırası ile 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri



Şekil 4.39 20,0 mg/L dsDNA ile 90 saniye boyunca gemitabin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri



Şekil 4.40 GEM derişiminin dsDNA'nın guanin sinyali ile doğrusal olduğu bölge

GEM tayini GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodu kullanılarak ve DPV tekniğiyle yapıldı. Gempitabin için teşhis sınırı (TS) 0,69 mg L⁻¹, tayin alt sınırı (TAS) 2,29 mg/L olarak elde edildi. Yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı elektrot kullanılarak ardışık ölçümler alındı. Bu amaçla 20,0 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(AMT) elektrot 30,0 mg/L GEM ile etkileştirildi. DPV ile elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları için % BSS 2,43 olarak hesaplandı. Önerilen metodun kesinliği farklı günlerde yapılan tekrar üretilebilirlik ölçümleri ile elde edildi. 30,0 mg/L GEM ile etkileşim sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme pik akımlarındaki değişiklikten hesaplanan % BSS 4,68 olarak bulundu. Çalışmadan elde edilen analitik parametreler çizelge 4.11'de özetlendi.

Çizelge 4.11 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotta DPV ile GEM'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler

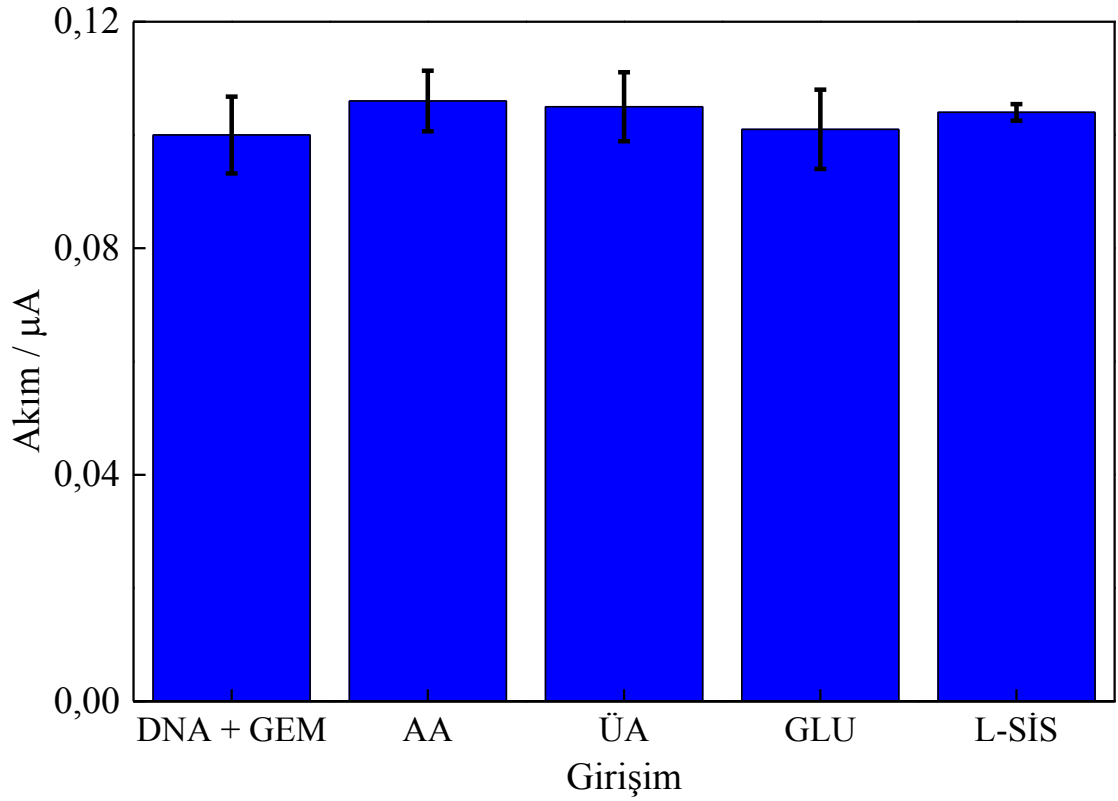
Parametreler	GCE/P(AMT)/dsDNA elektrot
Ölçüm potansiyeli (V)	0,80
Doğrusal aralık (mg/L)	2,5-30,0
Eğim ($\mu\text{A L/mg}$)	-0,0109
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,993
Kesişim noktası(μA)	0,411
TS (mg/L)	0,69
TAS (mg/L)	2,29
Tekrar üretilebilirlik* (%)	4,68
Tekrarlanabilirlik* (%)	2,43

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla yapılan tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışmalarından oldukça iyi sonuçların elde edilmesi gemitabin içeren ticari formülasyonlardan miktar tayini çalışmaları için kullanılabileceğini göstermektedir.

4.9.3 GCE/P(AMT)/dsDNA–GEM etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları

Geliştirilen biyosensörün seçiciliği GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun 30,0 mg/L GEM çözeltisiyle (pH 4,8) etkileşim öncesi ve sonrasında 0,1 mM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA), D-glukoz (GLU) ve L-sistein (L-SİS) içeren çözelti ortamında Bölüm 3.9'da anlatıldığı şekilde belirlendi. Şekil 4.41'de görüldüğü gibi guanin yükseltgenme sinyaline glukozun önemli ölçüde bir girişim etkisi olmamıştır. Askorbik asit için %6,0, ürik asit için %4,96 ve L-sistein için %4,1 değerlerinde girişim hesaplandı. Bu girişim değerleri %10'un altında olduğundan elde edilen biyosensörün seçiciliğinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.41 GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodunun 30 mg/L GEM için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz ve (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları

4.10 GCE/P(AMT)/dsDNA–GEM Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları

4.10.1 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltilerine uygulanması ve geri kazanım çalışmaları

GEM içeren enjeksiyon çözeltisinden miktar tayini yapmak amacıyla Bölüm 3.8.5’de anlatıldığı şekilde numuneler hazırlandı. GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla GEM içeren numunelerin etkileşimi sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinden okunan pik akımı değerleri şekil 4.40’da verilen kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyon çözeltisinde bulunan etken madde miktarları hesaplandı. Elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.12’de verildi.

Çizelge 4.12 GEM içeren Gemful® enjeksiyon çözeltisinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(AMT)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları

Yöntem/Elektrot	Enjeksiyon çözeltisi, mg/L	Bulunan değerler, mg/L	Ortalama*, mg/L	BSS, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(AMT) /dsDNA	20,00	17,02 18,64; 20,18; 21,07; 21,13	19,61	8,98	-1,95

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Enjeksiyon çözeltisi içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla Bölüm 3.13’de anlatıldığı şekilde enjeksiyon çözeltisi içeriğinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla belirli miktarda enjeksiyon çözeltisi ve saf etken madde uygun hacimde saf su içinde çözöldükten sonra çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan üç derişime karşılık gelen hacimlerde çözelti alını ve asetat tamponu ile seyreltilip voltamogramları kaydedildi. Buradan da voltametrik deney sonucunda enjeksiyon çözeltisindeki GEM miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplandı. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri ve BSS değerleri ile birlikte çizelge 4.13’te gösterildi.

Çizelge 4.13 GEM içeren Gemful® enjeksiyon çözeltisinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları

Yöntem / Elektrot	Eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama*, mg/L	Geri kazanım, %	BSS**, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(AMT)/dsDNA	2,5	2,12; 2,28; 2,43; 2,64; 2,71	2,44	97,60	10,07	-2,4
	5,0	4,56; 4,62; 4,8; 5,12; 5,23	4,87	97,40	6,13	-2,6
	10,0	9,23; 9,44; 9,57; 10,42; 10,66	9,86	98,60	6,43	-1,4

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Çizelge 4.13'te enjeksiyon çözeltisi içeriği analizi için verilen veriler incelendiğinde, üç farklı derişime ait BSS değerlerinin küçük ve geri kazanımların %97,40–%98,60 aralığında olduğu görülmektedir. Bu da geliştirilen voltametrik yöntemlerin ilaçlarda GEM tayini için uygulanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.10.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda %geri kazanım çalışmaları

Gemsitabin tayininin biyolojik örneklerle uygulanıp uygulanmayacağını belirlenmesi için Bölüm 3.8.7'de anlatıldığı şekilde insan serum örnekleriyle çalışıldı. 0,5 M asetat tamponuyla seyreltilmiş üç farklı gemsitabin derişimi için bulunan madde miktarları, bağıl standart sapmalar ve % geri kazanım değerleri çizelge 4.14'de verildi.

Çizelge 4.14 GEM içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları

Yöntem /Elektrot	Seruma eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama [*] , mg/L	Geri kazanım, %	BSS ^{**} , %	Bias, %
DPV/ GCE/P(AMT)/dsDNA	2,5	2,32; 2,38; 2,45; 2,77; 2,91	2,57	102,80	10,10	2,8
	5,0	4,72; 4,88; 4,96; 5,17; 5,20	4,98	99,60	4,04	-0,4
	7,5	7,14; 7,42; 7,56; 7,81; 7,92	7,57	100,93	4,11	0,93

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Serumda GEM tayini ile ilgili çizelge 4.14'de elde edilen veriler, serumda bir girişim etkisi olmadan ve bir önderiştirme gerektirmeden yüksek doğruluk ile GEM'in tayin edilebileceğini göstermektedir.

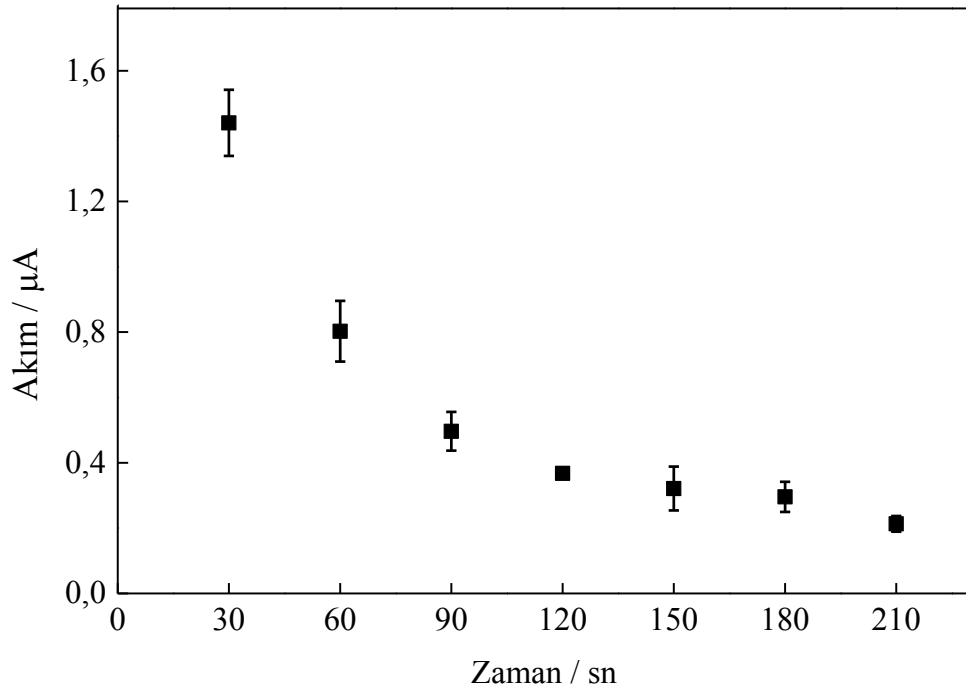
Bu sonuçlara göre, GCE/P(AMT)/dsDNA elektrodun;

- kalite ve içerik kontrolü amacı ile tablet, kapsül ve şurup gibi farmasötik numunelere,
- farklı tıbbi ve kimyasal/biyokimyasal amaçlar için idrar, serum ve kan gibi biyolojik numunelere,
- farmakolojik, farmakinetik ve toksikolojik amaçlar için doku ve organlardan hazırlanan numunelere güvenle uygulanabileceği söylenebilir.

4.11 Gemsitabin ile dsDNA Etkileşiminin GCE/P(PDCA) Elektrot Kullanılarak Diferansiyel Puls Voltametri Tekniği ile Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

4.11.1 GCE/P(PDCA) elektroda immobilize edilen dsDNA ile gemsitabin'in optimum etkileşim süresinin belirlenmesine ait bulgular

Bölüm 3.8.3'te anlatılan yol izlenerek ve Bölüm 4.4'te elde edilen veriler doğrultusunda 30,0 mg/L GEM'in 40,0 mg/L dsDNA ile etkileşiminde sürenin etkisini inceleyebilmek için etkileşim süresi 30–210 saniye arasında değiştirildi ve elde edilen sonuçlardan şekil 4.42'deki grafik çizildi.

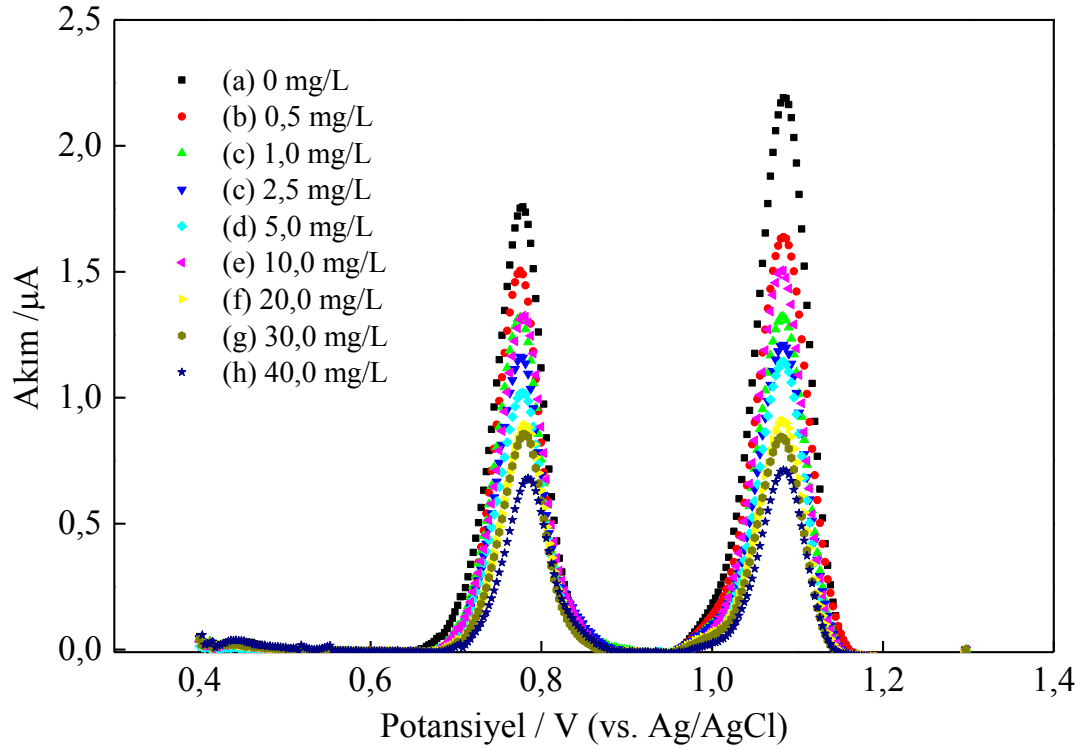


Şekil 4.42 40,0 mg/L dsDNA ile 30,0 mg/L gemsitabin'in 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210 saniye süresince etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri.

Guanin yükseltgenme sinyalinde etkileşim süresi arttırıldıkça bir azalma gözlemlendi. Bu azalmanın 150. saniyeden sonra sabit kalması nedeniyle optimum etkileşim süresi 150 saniye olarak belirlendi.

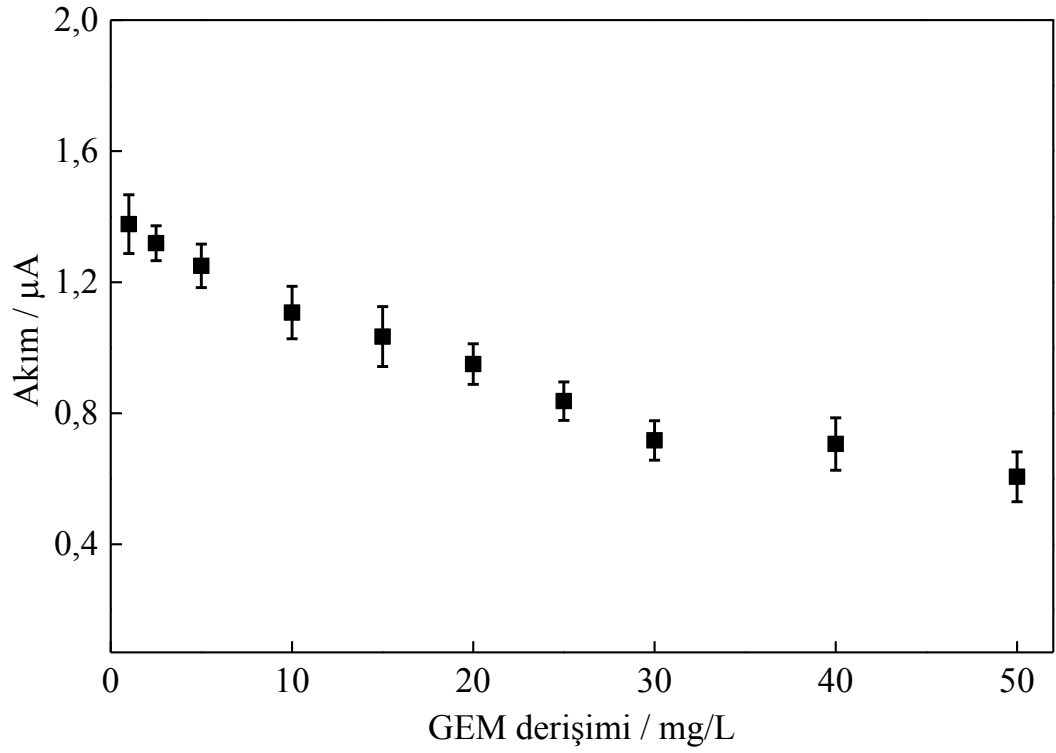
4.11.2 GCE/P(PDCA) elektroda adsorbe edilen dsDNA'nın gempitabin ile derişime göre etkileşmesinin incelenmesine ait bulgular

Bölüm 3.11.4'de anlatılan yol izlenerek, Bölüm 4.4'ten elde edilen veriler doğrultusunda 40,0 mg/L dsDNA ile gempitabin'in etkileşiminde gempitabin miktarının etkisini inceleyebilmek için GEM miktarı 0,5–50,0 mg/L arasında değiştirildi. Elde edilen sonuçlardan bazı GEM derişimleri için şekil 4.43'teki diferansiyel puls voltamogramı ve şekil 4.44'teki guanin yükseltgenme sinyalinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafik çizildi. GEM miktarı arttıkça guanin yükseltgenme pik akımının azaldığı görüldü. Guaninin yükseltgenme sinyali yanıtında görülen bu azalmanın DNA'nın elektroaktif bazı guaninin yapısında bulunan yükseltgenebilecek grupların kısmen hasar görmesinden kaynaklandığı düşünülebilir (Erdem vd. 2005, Dogan-Topal vd. 2009). Guanin yükseltgenme akımlarındaki azalmanın 30,0 mg/L GEM'den sonra sabitlendiği görüldü. 1,0–30,0 mg/L arasında doğrusal çalışma aralığı elde edildi (Şekil 4.45).

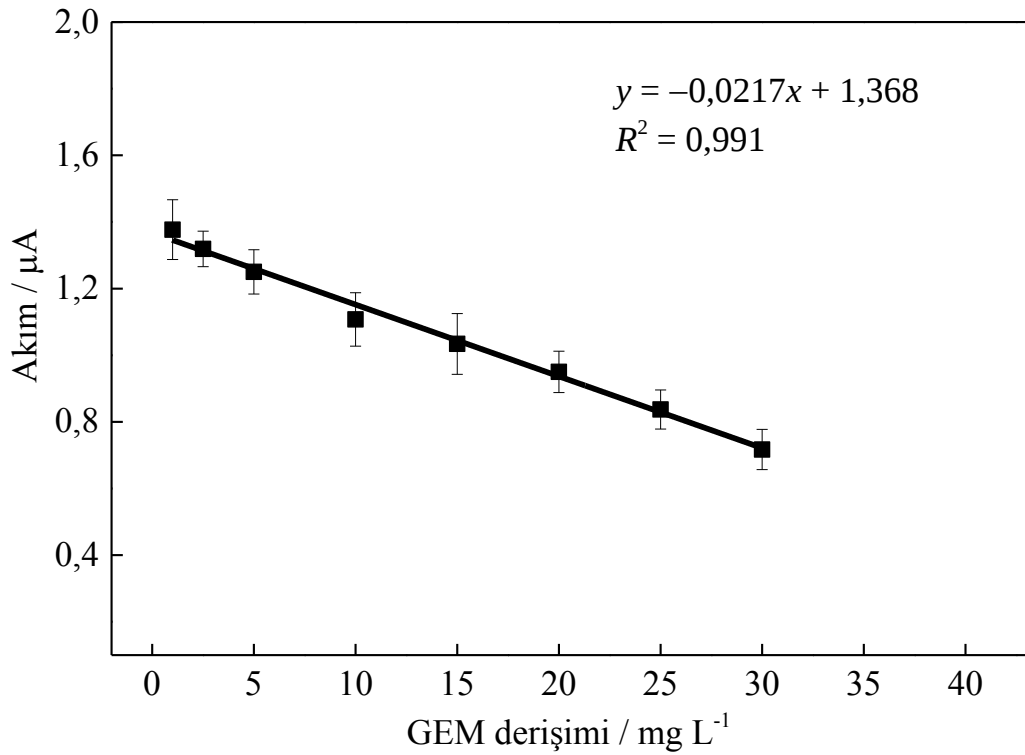


Şekil 4.43 40,0 mg/L dsDNA ile gemitabin'in (sırası ile 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 mg/L derişimlerde) etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin DPV eğrileri.

Elde edilen sonuçlara göre en uygun GEM derişimi 30,0 mg/L olarak belirlendi. Teşhis sınırı (TS) $0,276 \text{ mg L}^{-1}$, tayin alt sınırı (TAS) 0,922 mg/L olarak elde edildi. Yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı elektrot kullanılarak ardışık ölçümler alındı. Bu amaçla, 40,0 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(PDCA) 30 mg/L GEM ile etkileşirildi. DPV ile elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları için % BSS 2,02 olarak hesaplandı. Önerilen metodun kesinliği farklı elektrotlarla yapılan tekrar üretilebilirlik ölçümleri ile elde edildi. 30,0 mg/L GEM ile etkileşim sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme pik akımlarındaki değişiklikten hesaplanan % BSS 3,51 olarak bulundu. Çalışmadan elde edilen analitik parametreler çizelge 4.15'te özetlenmiştir.



Şekil 4.44 40,0 mg/L dsDNA ile 90 saniye boyunca gemitabin'in 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 mg/L derişimlerde etkileşmesine ait guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklükleri



Şekil 4.45 Guanin pik akımı ile GEM derişiminin doğrusal olduğu bölge

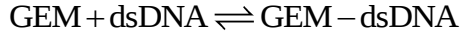
Çizelge 4.15 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotta DPV ile GEM'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametreler

Parametreler	GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrot
Ölçüm potansiyeli (V)	0,80
Doğrusal aralık (mg/L)	1,0-30,0
Eğim ($\mu\text{A L/mg}$)	-0,0217
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,991
Kesişim noktası(μA)	1,368
TS (mg/L)	0,276
TAS (mg/L)	0,922
Tekrar üretilebilirlik* (%)	3,51
Tekrarlanabilirlik* (%)	2,02

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla yapılan tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik çalışmalarından oldukça iyi sonuçların elde edilmesi nitrofurantoin içeren ticari formülasyonlardan miktar tayini çalışmaları yapılabileceğini göstermiştir.

DPV tekniğini ilaç ile dsDNA etkileşim türünün aydınlatılmasında kullanılmaktadır (Arias vd. 2009). Guanin yükseltgenme pik potansiyelindeki pozitif kaymalara interkalasyon ile bağlanmaya, negatif yöne kaymanın ise elektrostatik etkileşimlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Carter vd. 1989). Şekil 4.43'te görüldüğü üzere GEM varlığında guanin bazına ait yükseltgenme pik potansiyelinde herhangi bir kayma görülmemektedir. Buradan GEM'in dsDNA'ya interkalatif ya da elektrostatik olarak etki etmediği söylenebilir. GEM derişimi arttıkça dsDNA'daki guanin yükseltgenme pik akımlarındaki azalmanın nedeni serbest dsDNA'nın denge derişimindeki azalmadan kaynaklandığı düşünülebilir. GEM ile dsDNA arasında aşağıdaki denkleme göre GEM-dsDNA kompleksi oluşur (Yola ve Özaltın 2011).



bu kompleksin elektrokimyasal olarak dsDNA'dan daha az aktif olduğu düşünülebilir.

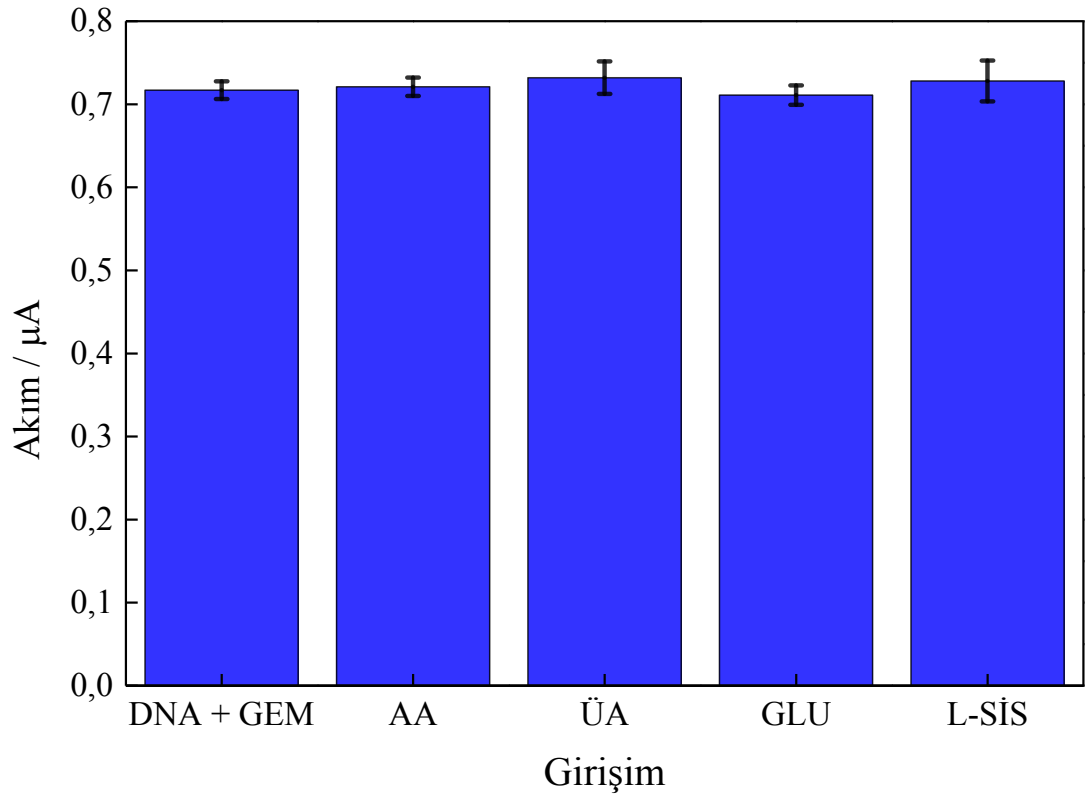
GEM ile dsDNA etkileşiminde tek bir kompleks oluştuğu varsayıldığında, GEM ile dsDNA arasındaki etkileşim aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenebilir;

$$\log\left(\frac{1}{[\text{GEM}]}\right) = \log K + \log\left(\frac{I_{\text{GEM-dsDNA}}}{I_{\text{dsDNA}} - I_{\text{GEM-dsDNA}}}\right)$$

Bu eşitlikte K bağlanma sabiti, I_{dsDNA} guanin yükseltgenme pik akımları ve $I_{\text{GEM-dsDNA}}$ GEM ile dsDNA'nın etkileşimi sonrası ölçülen guanin yükseltgenme pik akımıdır. Bu kompleksin bağlanma sabiti K , $\log(1/[\text{GEM}])$ 'ye karşı $\log(I_{\text{GEM-dsDNA}}/I_{\text{dsDNA}} - I_{\text{GEM-dsDNA}})$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen eğrinin y eksenini kestiği değerden hesaplandı. GEM ile dsDNA arasındaki K sabiti $4.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ olarak bulundu.

4.11.3 GCE/P(PDCA)/dsDNA–GEM etkileşimi için girişim etkisinin belirlenmesi ve kararlılık çalışmaları

Geliştirilen GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun seçiciliği 30,0 mg/L GEM çözeltisiyle (pH 4,8) etkileşim öncesi ve sonrasında 0,1 mM askorbik asit (AA), ürik asit (ÜA), D-glukoz (GLU) ve L-sistein (L-SİS) içeren çözelti ortamında Bölüm 3.9'da anlatıldığı şekilde belirlendi. Şekil 4.46'da görüldüğü gibi askorbik asit ve glukozun guanin yükseltgenme sinyaline önemli ölçüde bir girişim etkisi olmadığı görüldü. Ürik asit için %2,09 ve L-sistein için %1,53 değerinde girişim etkisi hesaplandı. Bu değerlerin oldukça düşük olması hazırlanan biyosensörün seçiciliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.46 GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodunun 30,0 mg/L GEM için 0,1 mM (AA) askorbik asit, (ÜA) ürik asit, (GLU) D-glukoz and (L-SİS) L-sistein ilavelerinden sonra elde edilen guanin yükseltgenme pik akımları

4.12 GCE/P(PDCA)/dsDNA–GEM Etkileşimi İçin Geliştirilen Yöntemin Uygulamaları

4.12.1 Geliştirilen yöntemin enjeksiyon çözeltilerine uygulanması ve geri kazanım çalışmaları

GEM içeren enjeksiyon çözeltisinden miktar tayini yapmak amacıyla Bölüm 3.8.5'te anlatıldığı şekilde numuneler hazırlandı. GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla GEM içeren numunelerin etkileşimi sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinden okunan pik akımı değerleri şekil 4.45'te verilen kalibrasyon eşitliğinde yerine konularak enjeksiyon çözeltisinde bulunan etken madde miktarları hesaplandı. Elde edilen analiz sonuçları çizelge 4.16'da verildi.

Çizelge 4.16 GEM içeren Gemful® enjeksiyon çözeltisinde pH 4,8 asetat tampon içerisinde GCE/P(PDCA)/dsDNA ile elde edilen analiz bulguları

Yöntem/ Elektrot	Enjeksiyon çözeltisi, mg/L	Bulunan değerler, mg/L	Ortalama*, mg/L	BSS, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA)/ dsDNA	20,00	19,12; 19,90; 20,44; 20,72; 22,01	20,72	6,37	3,60

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Enjeksiyon çözeltisi içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını anlamak amacıyla Bölüm 3.13’de anlatıldığı şekilde enjeksiyon çözeltisi içeriğinden geri kazanım çalışmaları yapıldı. Bu amaçla belirli miktarda enjeksiyon çözeltisi ve saf etken madde uygun hacimde saf su içinde çözüldükten sonra çözeltiden kalibrasyon grafiği içerisinde yer alan üç derişime karşılık gelen hacimlerde çözeltiler alındı ve asetat tamponu ile seyreltilip voltamogramları kaydedildi. Buradan da voltametrik deney sonucunda enjeksiyon çözeltisi içeriğindeki GEM miktarının ne kadarının tayin edilebildiği hesaplandı. Elde edilen sonuçlar % geri kazanım değerleri BSS değerleri ile birlikte çizelge 4.17’de gösterildi.

Çizelge 4.17 GEM içeren Gemful® enjeksiyon çözeltisinden pH 4,8 asetat tamponunda GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla elde edilen % geri kazanım sonuçları

Yöntem /Elektrot	Eklene, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama*, mg/L	Geri kazanım, %	BSS**, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA)/dsDNA	1,0	0,94; 0,96; 0,95; 1,02; 1,04	0,98	98,00	4,58	-2,0
	5,0	4,85; 4,92; 4,99; 5,01; 5,14	4,98	99,60	2,18	-0,4
	10,0	9,41; 9,56; 9,82; 9,91; 10,18	9,78	97,80	3,08	-2,2

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağlı standart sapma

Çizelge 4.17’de enjeksiyon çözeltisi içeriği analizi için verilen veriler incelendiğinde, üç farklı derişima ait BSS değerlerinin %10’dan küçük ve geri kazanımların %97,76–%99,64 aralığında olduğu görölmektedir. Bu da geliştirilen voltametrik yöntemlerin ilaçlarda GEM tayini için uygulanabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.12.2 Geliştirilen yöntemin insan serumuna uygulanması ve serumda %geri kazanım çalışmaları

Gemsitabin tayininin biyolojik örneklerle uygulanıp uygulanmayacağını anlaşılmaması için Bölüm 3.8.7’de anlatıldığı şekilde insan serum örnekleriyle çalışıldı. 0,5 M asetat tamponuyla seyreltilmiş üç farklı gemsitabin derişimi için bulunan madde miktarları, BSS ve % geri kazanım değerleri çizelge 4.18’de verildi.

Çizelge 4.18 GEM içeren insan serumunda (pH 4,8) GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla DPV yöntemiyle elde edilen analiz bulguları

Yöntem /Elektrot	Seruma eklenen, mg/L	Hesaplanan, mg/L	Ortalama *, mg/L	Geri kazanım, %	BSS **, %	Bias, %
DPV/ GCE/P(PDCA)/dsDNA	1,0	0,88; 0,92; 1,02; 1,09; 1,10	1,002	100,20	9,89	0,20
	10,0	9,41; 9,88; 10,12; 10,36; 10,62	10,08	100,80	4,60	0,80
	20,0	19,22; 20,32; 20,86; 21,16; 21,44	20,60	103,00	4,25	3,00

*Sonuçlar beş ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

**Hesaplanan geri kazanım değerleri için bağıl standart sapma

Serumda GEM tayini ile ilgili çizelge 4.18’de elde edilen veriler, serumda bir girişim etkisi olmadan ve bir önderiştirme gerektirmeden hazırlanan dsDNA modifiye elektrotlarla uygulanması durumunda yüksek doğruluk ile GEM’in tayin edilebileceğini göstermektedir.

Bu sonuçlara göre, GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrodun;

- kalite ve içerik kontrolü amacı ile tablet, kapsül ve şurup gibi farmasötik numunelere,
- farklı tıbbi ve kimyasal/biyokimyasal amaçlar için idrar, serum ve kan gibi biyolojik numunelere,
- farmakolojik, farmakinetik ve toksikolojik amaçlar için doku ve organlardan hazırlanan numunelere güvenle uygulanabileceği söylenebilir.

4.13 Spektroskopik Çalışmalar

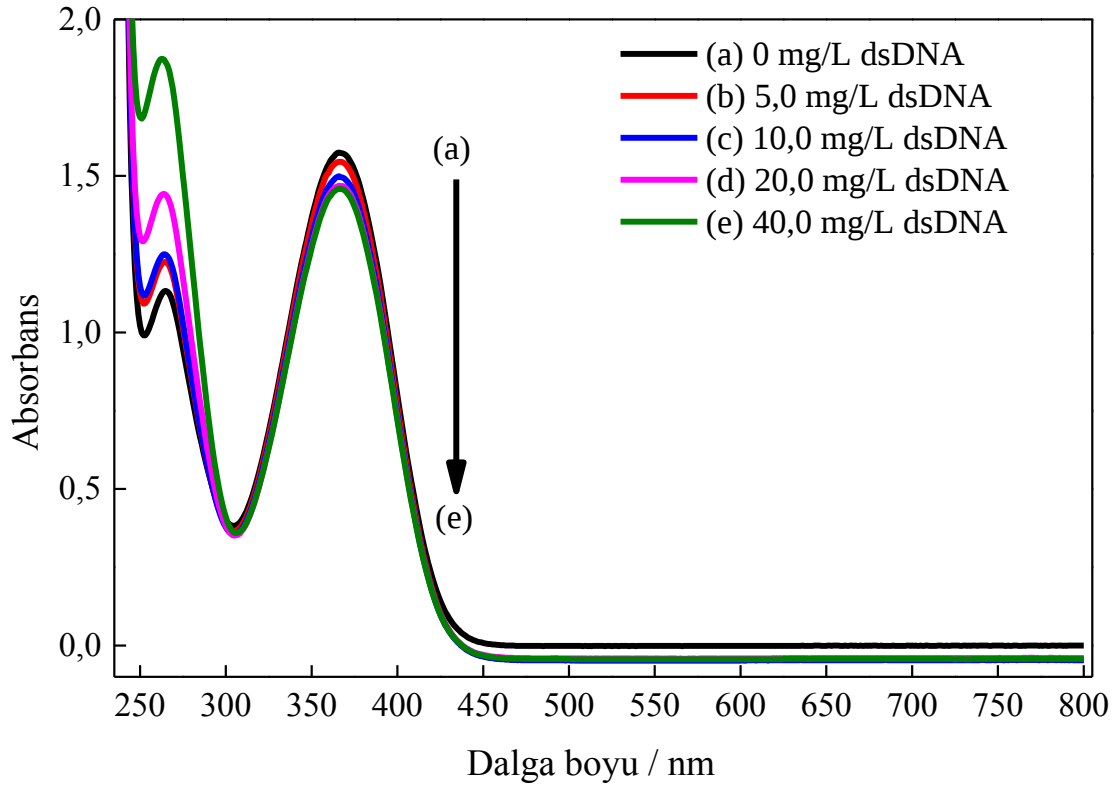
UV-Vis spektrofotometrisi tekniği, DNA kararlılığı ve DNA ile küçük ligandların etkileşim türünü belirlemek için en çok kullanılan ve en basit yöntemlerden birisidir. Bu amaçla DNA ile etkileşimleri elektrokimyasal olarak çalışılan ilaçların etkileşim türleri hakkında yorum yapmak amacıyla nitrofurantoin ve gempitabin'in dsDNA olan ortamda ayrı ayrı UV-Vis spektrumları alındı. Deney sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunuldu.

4.13.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşiminin UV-Vis spektrofotometrisi ile incelenmesi

Nitrofurantoin'in dsDNA ile etkileşimi UV-Vis spektroskopisi tekniği ile Bölüm 3.10'da belirtildiği şekilde incelendi. Bu amaçla dsDNA etkileşiminde optimum derişim olarak bulunan 20,0 mg/L NFT ile 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 mg/L derişimlerinde dsDNA etkileştirildi ve 200–800 nm dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedildi. NFT'nin 265 ve 366 nm'de iki absorpsiyon piki verdiği görüldü. Şekil 4.47 incelendiğinde sabit NFT içeren ortamda dsDNA miktarı arttıkça, NFT'in 366 nm'deki pikinin önemli ölçüde azaldığı görüldü (hipokromik etki). Ayrıca dsDNA miktarı artışıyla NFT pikinde yaklaşık 1–2 nm daha uzun dalga boyuna kayma gözlemlendi (batokromik etki). Literatürde hipokromik etkiyle birlikte görülen önemli ölçüdeki batokromik kaymanın (8–15 nm) maddenin dsDNA'ya interkalasyon ile bağlandığını gösterdiği bildirilmiştir (Cui vd. 2011a, Kashanian ve Zeidali 2011). Buradan NFT'in dsDNA'nın baz çiftlerine kısmi interkalasyon ile bağlanabileceği sonucuna varılabilir (Aydoğdu vd. 2014). Elde edilen sonuçlardan faydalanılarak, NFT ile dsDNA arasındaki bağlanma sabiti (K) Benesi-Hildebrand eşitliğinden hesaplanılabilir;

$$\frac{A_0}{A-A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \times \frac{1}{K[\text{DNA}]}$$

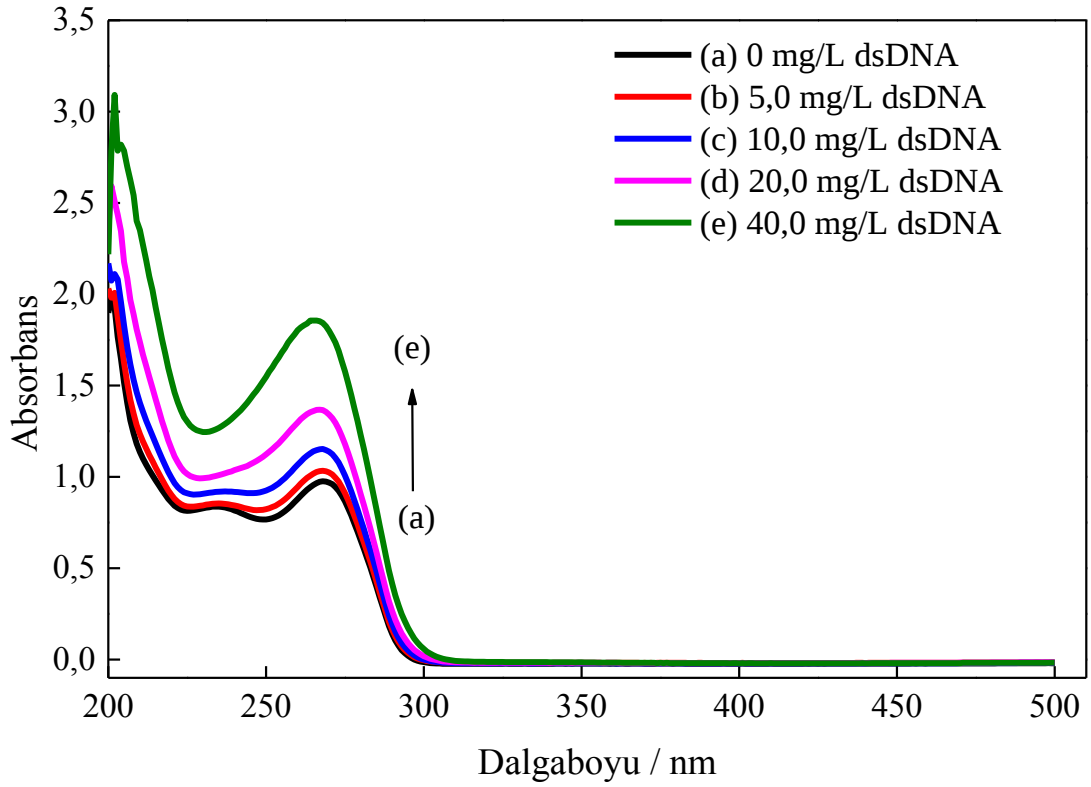
K bağlanma sabiti, A_0 ve A sırasıyla ilacın ve ilaç-dsDNA kompleksinin absorbanans değerleridir. ε_G ve ε_{H-G} ise sırasıyla ilacın ve NFT-dsDNA kompleksinin absorbsiyon katsayılarıdır. Bağlanma sabiti, K , $A_0/(A-A_0)$ 'ye karşı $1/[\text{dsDNA}]$ çizilen grafiğin kesişiminin eğime oranından hesaplanmıştır. Bu eşitlikten NFT-dsDNA etkileşimi için hesaplanan K değeri $1,6 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değer voltametrik deney sonucunda elde edilen sonuca oldukça yakındır ($1,3 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$). Ayrıca elde edilen sonuçlar, literatürde klasik bir interkalatör madde olan etidyum bromürün dsDNA'yla etkileşiminde elde edilen K değerine ($1,23 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$) oldukça yakındır (Dimitrakopoulou vd. 2008).



Şekil 4.47 Nitrofurantoin'in (20 mg/L) dsDNA yokluğunda ve 5,0–40,0 mg/L derişimde dsDNA varlığındaki UV-Vis spektrumları

4.13.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşiminin UV-Vis spektrofotometrisi ile incelenmesi

Gemsitabin'in dsDNA ile etkileşimi UV-Vis spektrofotometrisi tekniği ile Bölüm 3.10'da anlatıldığı şekilde incelendi. Bu amaçla dsDNA etkileşiminde optimum derişim olarak bulunan 30,0 mg/L GEM ile 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 mg/L derişimlerinde dsDNA etkileştirildi ve 200–800 nm dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedildi. GEM'in 237 ve 269 nm'de iki absorbsiyon piki verdiği görüldü. Şekil 4.48 incelendiğinde sabit GEM içeren ortamda dsDNA miktarı arttıkça, gemsitabin'in 269 nm'deki pikinin önemli ölçüde arttığı görüldü (hiperkromik etki). Ayrıca dsDNA miktarı artışıyla GEM'in 237'deki pikinin kaybolduğu gözlemlendi. Literatürde hiperkromik etki ve buna eşlik eden çok az bir batokromik kaymanın veya dalga boyunda herhangi bir kayma görülmemesinin genellikle minör oluk bağlanması (minor groove binding) ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir (Sirajuddin vd. 2013). Buradan GEM'in dsDNA çift sarmalındaki minör oluklara bağlanabileceği sonucuna varılabilir (Kalanur vd. 2009). Elde edilen sonuçlardan faydalanılarak, GEM ile dsDNA arasındaki bağlanma sabiti (K) Benesi-Hildebrand eşitliğinden hesaplandı ve $3,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$ olarak bulundu. Bu değer voltametrik deney sonucunda elde edilen sonuca oldukça yakındır ($4,6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$). Ayrıca elde edilen sonuçlar, literatürde minör oluk bağlanması ile dsDNA'yla etkileşen ilaçların K değerlerine oldukça yakındır (Shahabadi ve Bagheri 2015, Subastri vd. 2015).



Şekil 4.48 Gemcitabin'in (30,0 mg/L) dsDNA yokluğunda ve 5,0–40,0 mg/L derişimde dsDNA varlığındaki UV-Vis spektrumları

4.14 Viskozite Ölçümü İle Yapılan Çalışmalar

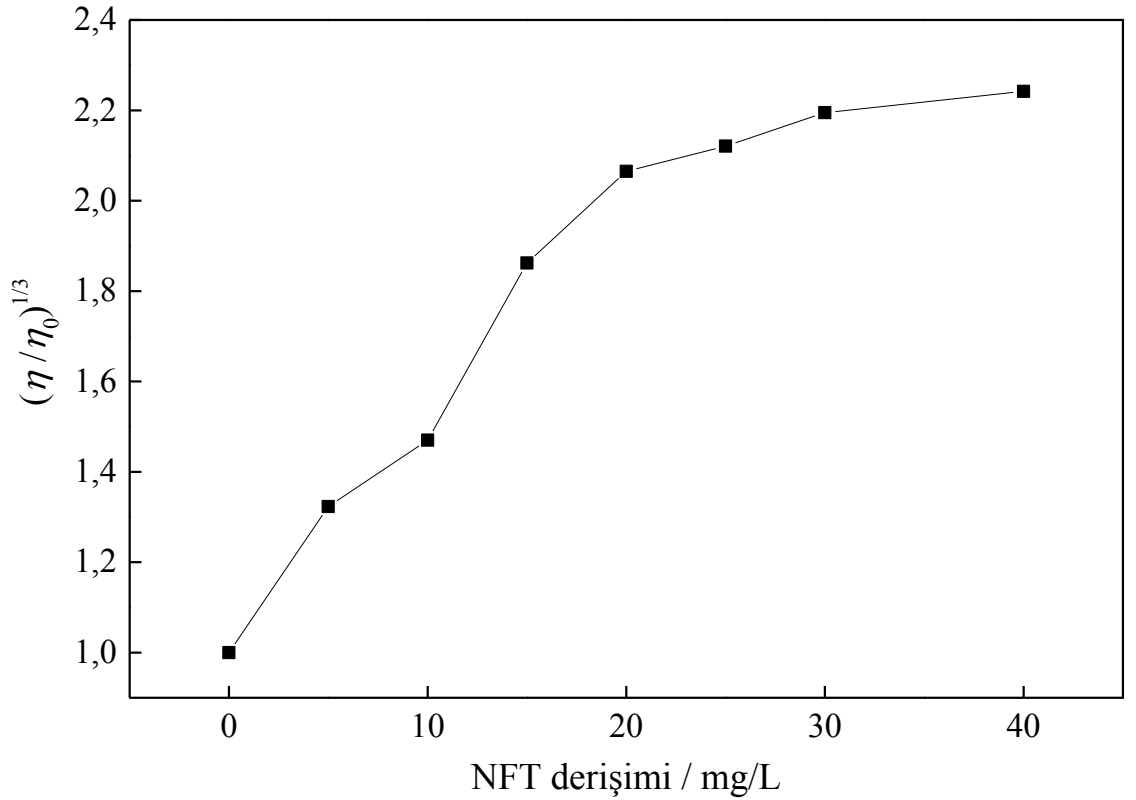
Viskozite ölçümü DNA ile küçük moleküller arasındaki bağlanma türünü belirlemek için kullanılan etkin ve doğru yöntemlerden birisidir (Shi vd. 2015). Bu amaçla DNA ile etkileşimleri diferansiyel puls voltametrisi ve UV-Vis spektrofotometrisi yöntemleriyle çalışılan ilaçların etkileşim türleri hakkında yorum yapmak amacıyla nitrofurantoin ve gemcitabin'in dsDNA ile etkileştirilmesi sağlandı. Bölüm 3.11'te anlatıldığı şekilde öncelikle dsDNA'nın daha sonra da dsDNA-ilac komplekslerinin bağıl viskoziteleri hesaplandı. Deney sonucunda elde edilen veriler aşağıda sunuldu.

4.14.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşiminin viskozluk ölçümü ile incelenmesi

NFT ile dsDNA arasındaki etkileşim Ubbelohde viskozimetresi ile incelendi. Bu amaçla öncelikle 20,0 mg/L dsDNA'nın asetat tamponuna göre bağıl viskozitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{\text{dsDNA}} - t_0)}$$

Daha sonra 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 ve 40,0 mg/L nitrofurantoin derişimleri için NFT-dsDNA kompleksinin bağıl viskozitesi hesaplandı ve NFT derişimine karşı $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 4.47’de NFT derişimi arttıkça dsDNA’nın bağıl viskozitesinin arttığı görüldü. Literatürde klasik interkalasyonda maddenin DNA’nın istiflenmiş baz çiftleri arasındaki boşluğa yerleşerek DNA çift sarmalının uzamasına yol açtığı ve böylece DNA’nın bağıl viskozitesinin arttığı rapor edilmiştir (Mahadevan ve Palaniandavar 1998, Xie vd. 2015, Koyuncu Zeybek vd. 2015). Buradan NFT’nin dsDNA’ya interkalasyon ile bağlanmış olabileceği düşünölebilir.



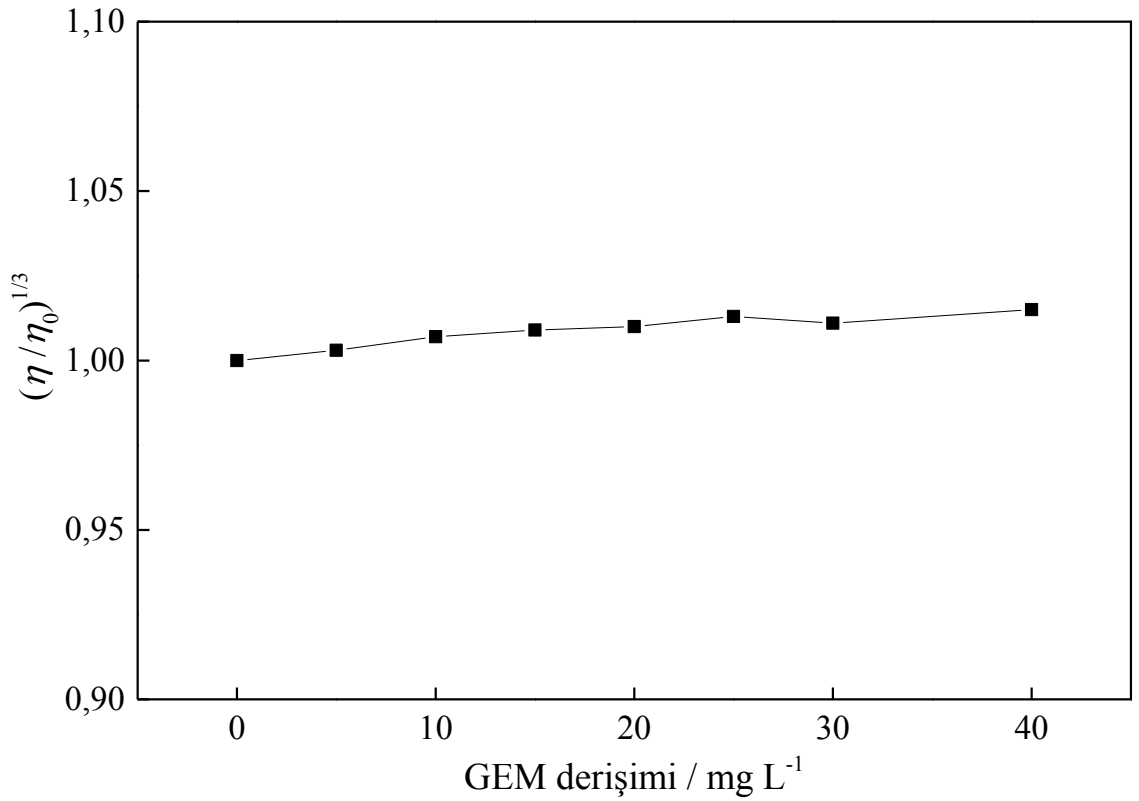
Şekil 4.49 dsDNA’nın bağıl viskozitesine 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 mg/L NFT derişiminin etkisi (25± 0,1°C, 0,5 M ABS pH 4,8 (20,0 mM NaCl))

4.14.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşiminin viskozluk ölçümü ile incelenmesi

Gemsitabin ile dsDNA arasındaki etkileşim Ubbelohde viskozimetresi ile incelendi. Bu amaçla öncelikle 40 mg/L dsDNA'nın asetat tamponuna göre bağlı viskozitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{(t - t_0)}{(t_{\text{dsDNA}} - t_0)}$$

Daha sonra 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 ve 40,0 mg/L gemsitabin derişimleri için GEM-dsDNA kompleksinin bağlı viskozitesi hesaplandı ve GEM derişimine karşı $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 4.48'de GEM derişimi arttıkça dsDNA'nın bağlı viskozitesinin önemli ölçüde değişmediği görülmektedir. Klasik interkalatörlerden farklı olarak DNA ile elektrostatik ve oluk bağlanması ile etkileşen maddelerin DNA'nın bağlı viskozitesini önemli ölçüde değiştirmedeği literatürde bildirilmiştir (Shi vd. 2015). Bunun sonucu olarak gemsitabin'in dsDNA ile etkileşiminin elektrostatik olarak ya da oluk bağlanması ile olabileceği düşünülmektedir.



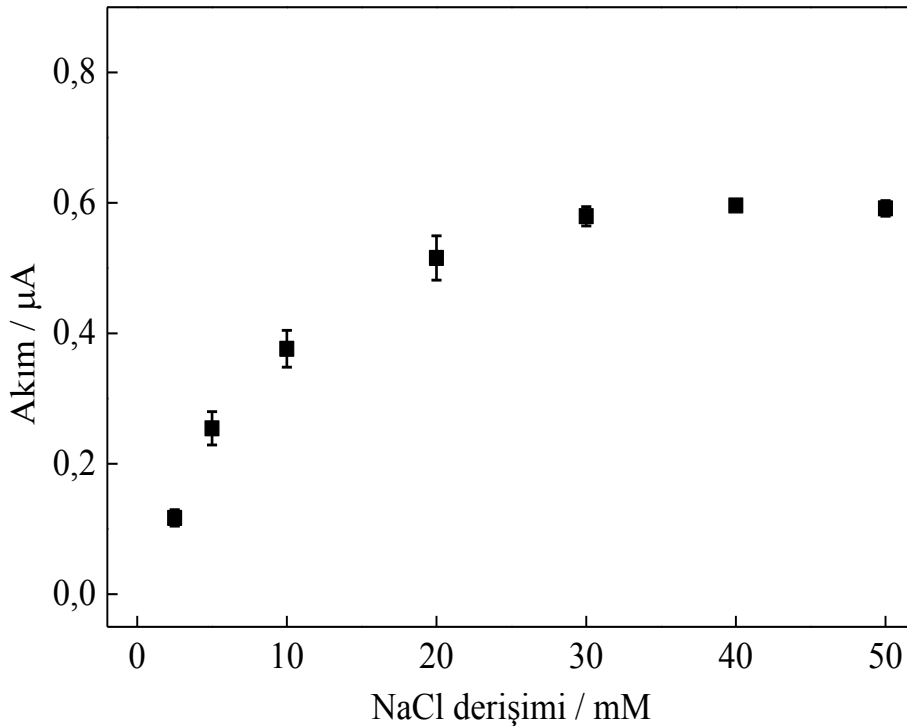
şekil 4.50 dsDNA'nın bağıl viskozitesine 0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 ve 40,0 mg/L GEM derişiminin etkisi (25± 0,1 °C, 0,5 M ABS pH 4.8 (20,0 mM NaCl))

4.15 NaCl Miktarının Etkisinin İncelenmesi

İlaç-DNA etkileşim türünün belirlenmesinde incelenen önemli bir parametre de ortamdaki NaCl miktarının etkisinin incelenmesidir. Genel olarak DNA ile elektrostatik olarak etkileşen ilaçlar ortamdaki NaCl miktarından büyük ölçüde etkilenirler. Çift sarmal DNA fosfat gruplarından dolayı polianyonik yapıdadır. Ortamın tuz derişimi arttıkça dsDNA'nın çevresi tuzun yapısındaki katyonlar ile çevrelenir. Böylece pozitif yüklü ilaçların dsDNA'ya yaklaşması zorlaşır ve ilaç ile dsDNA'nın etkileşimi de azalır. Nitrofurantoin ve gempitabin'in dsDNA ile etkileşimlerinde ortamın tuz derişiminin etkisi incelendi ve elde edilen bulgular aşağıda verildi.

4.15.1 Nitrofurantoin-dsDNA etkileşimine NaCl miktarının etkisinin incelenmesine ait bulgular

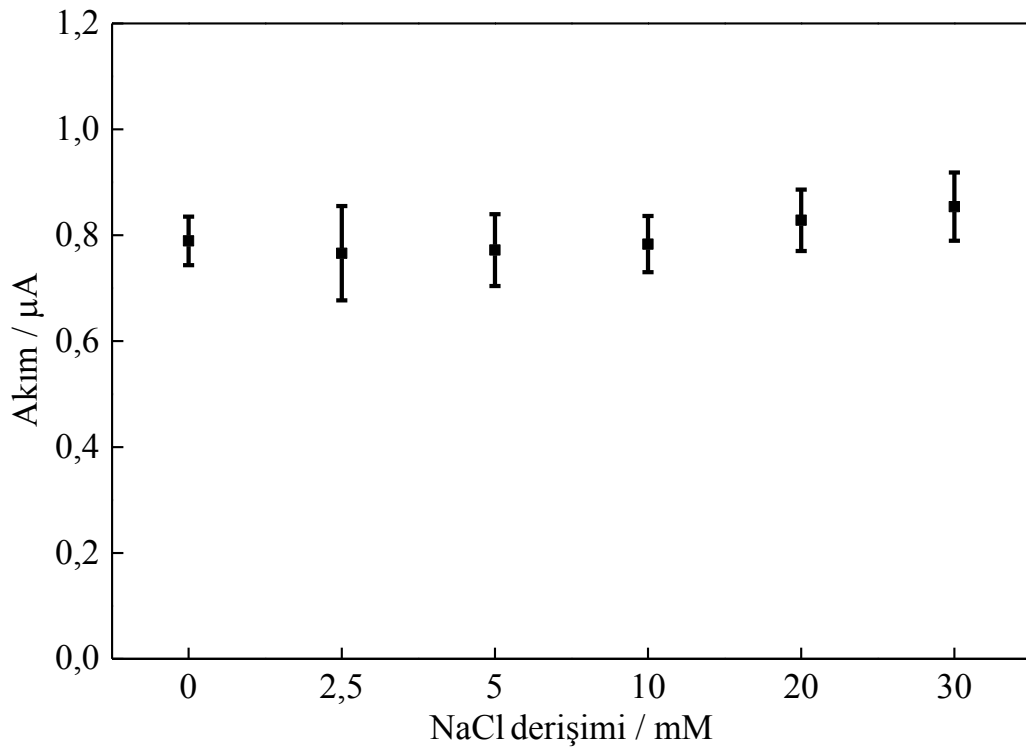
20,0 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(AMT) elektrodu 10,0 mg/L NFT ile farklı miktarda NaCl (2,5–50,0 mM) içeren asetat tamponlarında Bölüm 3.12.1’de anlatıldığı şekilde etkileştirildi. Etkileşim sonrası diferansiyel puls voltamogramları kaydedildi ve guanin yükseltgenme pik akımları karşılaştırıldı. Şekil 4.49’da NaCl derişimine karşı guanin yükseltgenme akımları çizildi. NaCl derişimi arttıkça guanin sinyallerinin 30 mM’e kadar artığı daha sonra ise sabit kaldığı görüdü. Buradan NFT’in dsDNA’ya interkalasyon ve elektrostatik olmak üzere iki şekilde bağlanabileceği düşünülebilir. Düşük NaCl derişimlerinde pozitif yüklü NFT’in dsDNA’nın negatif fosfat gruplarına elektrostatik olarak bağlandığı varsayılabilir. NaCl derişimi arttıkça dsDNA’nın çevresi Na^+ iyonları ile çevrelendiğinden NFT dsDNA ile elektrostatik olarak etkileşemez. Böylece yüksek NaCl derişimlerdeki etkileşimin ise interkalasyondan kaynaklandığı söylenebilir (Kara vd. 2002b, Radi vd. 2003, Nawaz vd. 2006).



Şekil 4.51 NFT–dsDNA etkileşimine NaCl derişiminin (2,5–50,0 mM) etkisi (NFT=10,0 mg/L, dsDNA=20,0 mg/L)

4.15.2 Gemsitabin-dsDNA etkileşimine NaCl miktarının etkisinin incelenmesine ait bulgular

40,0 mg/L dsDNA adsorbe edilen GCE/P(PDCA) elektrodu 30,0 mg/L GEM ile farklı miktarda NaCl (2,5–30,0 mM) içeren asetat tamponlarında Bölüm 3.12.2’de anlatıldığı şekilde etkileştirildi. Etkileşim sonrası diferansiyel puls voltamogramları kaydedildi ve guanin yükseltgenme pik akımları karşılaştırıldı. Şekil 4.50’de NaCl derişimine karşı guanin yükseltgenme sinyalleri çizildi. NaCl derişimi arttıkça guanin sinyallerinin önemli ölçüde değişmediği görüldü. Ortamın tuz derişimi elektrostatik olarak bağlanan ilaçlarla değiştiğinden ve gemsitabin’in dsDNA ile etkileşebilecek pozitif yükü olmadığından gemsitabin’in dsDNA’ya oluk bağlanması ile bağlanabileceği düşünülebilir.



Şekil 4.52 GEM–dsDNA etkileşimine NaCl derişiminin (2,5–30,0 mM) etkisi (GEM=30,0 mg/L, dsDNA=40,0 mg/L)

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında antibakteriyel ilaç olan nitrofurantoin (NFT) ve antikanser ilaç olan gempisabin'in (GEM) tayini için polimer film temelli elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirildi. Bu amaçla öncelikle çalışma elektrodu olarak kullanılan camı karbon elektrotlar poli(5-amino,2-merkapt-1,3,4 tiyadiazol) (P(AMT)) veya poli(2,6-pirindikarboksilik asit) (P(PDCA)) filmleri ile dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak kaplandı ve GCE/P(AMT) ve GCE/P(PDCA) elektrotlar elde edildi. FTIR spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elektrokimyasal yöntemlerle yüzey karakterize edildi. Polimer film kaplı elektrotlara çift sarmal DNA (dsDNA) immobilize edildi ve hazırlanan modifiye elektrotlar ile elde edilen sonuçlar aşağıda sunuldu.

Polimer film kaplı elektrotlara dsDNA immobilizasyonu;

- GCE/P(AMT) elektroduna dsDNA'nın adsorpsiyon süresi ve miktarı optimize edildi. 20,0 mg/L dsDNA ve 15 dakika adsorpsiyon süresi en uygun değerler olarak seçildi.
- GCE/P(PDCA) elektrodunda ise 40,0 mg/L dsDNA ve 30 dakika adsorpsiyon süresi en optimum değerler olarak belirlendi.

Nitrofurantoin ve gempisabin tayinleri geliştirilen iki elektrot da kullanılarak DNA'nın yapısında bulunan guanin bazının yükseltgenme sinyali üzerinden DPV tekniği ile yapıldı.

Nitrofurantoin tayini;

- GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla yapılan optimizasyon çalışmalarında dsDNA ile NFT arasındaki etkileşim süresi 120 s olarak belirlenmiş ve 2,17–25,0 mg/L derişim aralığında bir doğrusallık ($R^2=0,998$) saptanmıştır. TS ve TAS değerleri sırasıyla 0,65 mg/L ve 2,17 mg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrilerine ait hesaplamalar yapılarak ilgili çizelgede verilmiştir.

- GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla yapılan optimizasyon çalışmalarında ise dsDNA ve NFT arasındaki etkileşim süresi 150 s olarak belirlenmiş ve 1,0–20,0 mg/L derişim aralığında bir doğrusallık ($R^2=0,989$) saptanmıştır. TS ve TAS değerleri sırasıyla 0,309 mg/L ve 1,0 mg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle elde edilen kalibrason eğrilerine ait hesaplamalar yapılarak ilgili çizelgede verilmiştir.

Gemsitabin tayini;

- GCE/P(AMT)/dsDNA elektrotla yapılan optimizasyon çalışmalarında dsDNA ile GEM arasındaki etkileşim süresi 90 s olarak belirlenmiş ve 2,5–30,0 mg/L derişim aralığında bir doğrusallık ($R^2=0,993$) saptanmıştır. TS ve TAS değerleri sırasıyla 0,69 mg/L ve 2,29 mg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle elde edilen kalibrason eğrilerine ait hesaplamalar yapılarak ilgili çizelgede verilmiştir.
- GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotla yapılan optimizasyon çalışmalarında ise dsDNA ve NFT etkileşim süresi 150 s olarak belirlenmiş ve 1,0–30,0 mg/L derişim aralığında bir doğrusallık ($R^2=0,991$) saptanmıştır. TS ve TAS değerleri sırasıyla 0,276 mg/L ve 0,922 mg/L olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntemle elde edilen kalibrason eğrilerine ait hesaplamalar yapılarak ilgili çizelgede verilmiştir.

Hazırlanan DNA biyosensörleri kullanılarak basit, hızlı ve ön işlem gerektirmeden farmasötik preparattaki etken madde miktarları tayin edilmiştir. Kapsül veya enjeksiyon çözeltisinde bulunabilecek katkı maddelerinin bu tayini etkileyip etkilemediği araştırılmış ve uygun geri kazanım sonuçları elde edilmiştir.

Her iki etken maddenin de tayininin biyolojik ortamda yapılıp yapılamayacağı araştırılmış ve insan serumunda yapılan analizler sonucunda oldukça düşük % bağıl standart sapma değerleri elde edilmiştir. Buradan biyolojik ortamda bulunan ve

yükseltgenebilecek türleri içeren ortamda bu etken maddelerin geliştirilen DNA biyosensörleriyle başarılı bir şekilde analiz edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Nitrofurantoin tayini için elde edilen parametreler literatürde yapılan çalışmalarla aşağıdaki çizelgelerde karşılaştırılmıştır. Çizelge 5.1 incelendiğinde, NFT için GCE/P(AMT)/dsDNA ve GCE/P(PDCA)/dsDNA elektrotlarla geniş doğrusal çalışma aralığı ve düşük teşhis sınırı elde edilmiştir.

Çizelge 5.1 NFT'nin voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması

Elektrot	Çalışma aralığı	TS	Tekrarlanabilirlik	Literatür
HDME	4,2–210 μM	1,06 μM	-	Fogg ve Ghawji 1988
HDME	0,01–0,2 μM	0,00132 μM	-	Hammam 2002
GCE	nr	nr	BSS %2,7	Buoro vd. 2014
GCE/P(AMT)/dsDNA	9,1–105 μM	2,73 μM	BSS %1,15	Bu çalışma
GCE/P(PDCA)/dsDNA	4,2–84 μM	4,2 μM	BSS %3,51	Bu çalışma

Gemsitabin tayini için elde edilen parametreler literatürde yapılan çalışmalarla aşağıdaki çizelgelerde karşılaştırılmıştır. Çizelge 5.2 incelendiğinde hazırlanan elektrotlarla GEM tayininin geniş doğrusal çalışma aralığı ve düşük teşhis sınırı ile elde edildiği sonucuna varıldı.

Çizelge 5.2 GEM'in voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması

Elektrot	Çalışma aralığı	TS	Tekrarlanabilirlik	Literatür
GCE	5 μM –0,75 mM	1,06 μM	BSS %1,68	Kalanur vd. 2009
AuE	0,1–15,0 μM	0,06 μM	BSS %1,31	Naik ve Nandibewoor 2013
GCE/dsDNA	nr	nr	nr	Buoro vd. 2014
GCE/P(AMT)/dsDNA	9,0–108 μM	2,62 μM	BSS %2,43	Bu çalışma
GCE/P(PDCA)/dsDNA	3,8–114 μM	1,0 μM	BSS %3,51	Bu çalışma

Etken maddelerin dsDNA ile etkileşim türlerini belirlemek amacıyla UV-Vis spektroskopisi ve viskozite ölçümü yöntemleri kullanıldı. Yapılan UV-Vis spektrofotometrisi çalışmaları sonucunda nitrofurantoin absorbandsında dsDNA ilaveleri ile bir azalma (hipokromizm) ve hafif uzun dalga boyuna kayma (red shift) gösterdiği görüldü. Bu davranışın literatürde interkalasyon bağlanması ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir (Kashanian ve Zeidali 2011, Cui vd. 2011a). Viskozite ölçüm çalışmalarında dsDNA'nın bağıl viskozitesinin NFT'in derişimi arttıkça arttığı belirlenmiştir. Bu davranış klasik interkalasyona yol açan bir madde olan etidyum bromüre oldukça benzediğinden NFT'nin dsDNA yapısına interkalasyon ile bağlanabileceği düşünülebilir (Liu vd. 2006, Ma vd. 2013, Aydoğdu vd. 2014).

Gemsitabin'in dsDNA ilavesiyle elde edilen UV-Vis spektrumlarında ise absorbandsında artma (hiperkromizm) ve dalga boyunda çok az miktarda düşük dalga boyuna kayma (blue shift) görüldü. Bu davranışı gösteren maddelerin dsDNA'ya oluk bağlanması (groove binding) ile bağlanabileceği rapor edilmiştir (Sirajuddin vd. 2013). Gemsitabin'in dsDNA ile viskozite ölçüm çalışmalarında dsDNA'nın bağıl viskozitesinin GEM'in derişiminin artışıyla değişmediği gözlenmiştir. Bu da maddenin dsDNA ile etkileşiminin elektrostatik olarak veya oluk bağlanması ile olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ilaç etken maddelerin dsDNA ile etkileşim türünün belirlenmesinde kullanılan bir diğer parametre de tuz derişimin etkisidir. Nitrofurantoin'in dsDNA ile GCE/P(AMT) elektrot yüzeyinde etkileşimi farklı miktarda NaCl içeren asetat tamponunda incelendi. Ortamdaki NaCl miktarı 2,5 mM'den 30,0 mM'a arttıkça guanin yükseltgenme sinyalinin arttığı, 30,0 mM'den sonra ise sabitlendiği görüldü. Buradan düşük tuz derişimlerinde NFT'in dsDNA'yla elektrostatik olarak, yüksek tuz derişimlerinde ise interkalasyon ile bağlandığı yorumlanabilir (Nawaz vd. 2006).

Gemsitabin'in dsDNA ile GCE/P(PDCA) elektrot yüzeyinde etkileşimi farklı miktarda NaCl içeren asetat tamponu içerisinde incelendi. Ortamdaki NaCl miktarı 2,5 mM'den 30,0 mM'a arttıkça guanin yükseltgenme sinyalinin önemli ölçüde değişmediği gözlemlendi. dsDNA'ya elektrostatik olarak bağlanan ilaçların ortamdaki tuz derişiminden

etkilendiği bildirilmiştir (Nawaz vd. 2006). Buradan GEM'in dsDNA'yla oluk bağlanması ile etkileştiği yorumlanabilir.

Sonuç olarak, hazırlanan polimer modifiye elektrotlar dsDNA'nın immobilizasyonu için geniş bir yüzey alanı sağlamış ve polimer film temelli DNA biyosensörleri geliştirilmiştir. İlaç etken madde tayinleri dsDNA'daki yükseltgenebilen baz olan guanin üzerinden yapılmıştır. Guanin sinyaline dayalı ilaç etken madde tayinleri, indikatör gereksinimini ortadan kaldırdığı için çalışma süresini kısaltmıştır. dsDNA–ilaç etken madde etkileşim türü elektrokimyasal, spektrofotometrik ve viskozimetrik ölçümler ile aydınlatılmış ve sonuçlar birbirleriyle uyumlu bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2015. Web Sitesi: <http://www.ilacrehberi.com/v/piyelo-septyl-50-mg-30-kapsul-9466/kub/farmakolojik-ozellikler/>. Erişim Tarihi: 08.07.2015
- Anonim. 2015. Web Sitesi: <http://www.ilacrehberi.com/v/gemko-1000-mg-iv-infuzyon-icin-liyofilize-toz-ice4d2/kub/farmakolojik-ozellikler/> Erişim Tarihi: 12.10.2015
- Anonymous. 2015. Web Sitesi: <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions#Introduction> Erişim Tarihi: 12.19.2015
- Abbar, J. C., Malode, S. J., and Nandibewoor, S. T. 2012. Electrochemical determination of a hemorheologic drug, pentoxifylline at a multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Bioelectrochemistry*, 83, 1-7.
- Andreoli, E., Rooney, D. A., Redington, W., Gunning, R., and Breslin, C. B. 2011. Electrochemical Deposition of Hierarchical Micro/Nanostructures of Copper Hydroxysulfates on Polypyrrole–Polystyrene Sulfonate Films. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115, 8725-8734.
- Arias, P., Ferreyra, N. F., Rivas, G. A., and Bollo, S. 2009. Glassy carbon electrodes modified with CNT dispersed in chitosan: Analytical applications for sensing DNA–methylene blue interaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 634, 123-126.
- Ay, B., Doğan, N., Yildiz, E., and Kani, İ. 2015. A novel three dimensional samarium(III) coordination polymer with an unprecedented coordination mode of the 2,5-pyridinedicarboxylic acid ligand: Hydrothermal synthesis, crystal structure and luminescence property. *Polyhedron*, 88, 176-181.
- Aydoğdu, G., Günendi, G., Zeybek, D. K., Zeybek, B., and Pekyardımcı, ř. 2014. A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 197, 211-219.
- Baird, W. M., Hooven, L. A., and Mahadevan, B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45, 106-114.
- Banitaba, M. H., Davarani, S. S. H., and Mehdinia, A. 2011. Study of interactions between DNA and aflatoxin B1 using electrochemical and fluorescence methods. *Analytical Biochemistry*, 411, 218-222.
- Bard, A. J. and Faulkner, L. R. 1980. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley.
- Bard, A. J. and Faulkner, L. R. 2000. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley.

- Barton, J. K., Goldberg, J. M., Kumar, C. V., and Turro, N. J. 1986. Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 2081-2088.
- Bo, Y., Wang, W., Qi, J., and Huang, S. 2011. A DNA biosensor based on graphene paste electrode modified with Prussian blue and chitosan. *Analyst*, 136, 1946-1951.
- Bond, A. M. 1980. *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*, Taylor & Francis.
- Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P.-O., Clark, A., Pradhan, S., and Jacobsen, S. E. 2007. UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science*, 317, 1760-1764.
- Brabec, V. 1981. Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 128, 437-449.
- Brett, A. M. O., Macedo, T. R. A., Raimundo, D., Marques, M. H., and Serrano, S. H. P. 1998. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 861-867.
- Brett, A. M. O., Serrano, S. H. P., Gutz, I., La-Scalea, M. A., and Cruz, M. L. 1997. Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor. *Electroanalysis*, 9, 1132-1137.
- Buerk, D. G. 1995. *Biosensors: Theory and Applications*, Taylor & Francis.
- Buoro, R. M., Lopes, I. C., Diculescu, V. C., Serrano, S. H. P., Lemos, L., and Oliveira-Brett, A. M. 2014. In situ evaluation of gemcitabine–DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry*, 99, 40-45.
- Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., and Paleček, E. 1997. Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces. *Analytica Chimica Acta*, 344, 65-76.
- Carter, M. T. and Bard, A. J. 1987. Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 109, 7528-7530.
- Carter, M. T., Rodriguez, M., and Bard, A. J. 1989. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 8901-8911.
- Cha, J., Han, J. I., Choi, Y., Yoon, D. S., Oh, K. W., and Lim, G. 2003. DNA hybridization electrochemical sensor using conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1241-1247.

- Chaubey, A. and Malhotra, B. D. 2002. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 441-456.
- Cox, J. A., Gadd, S. E., and Das, B. K. 1988. Modification of glassy carbon with a stable film containing iridium oxide and palladium. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 256, 199-205.
- Cui, F., Huo, R., Hui, G., Lv, X., Jin, J., Zhang, G., and Xing, W. 2011a. Study on the interaction between aglycon of daunorubicin and calf thymus DNA by spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 1001, 104-110.
- Cui, L., Ai, S., Shang, K., Meng, X., and Wang, C. 2011b. Electrochemical determination of NADH using a glassy carbon electrode modified with Fe₃O₄ nanoparticles and poly-2,6-pyridinedicarboxylic acid, and its application to the determination of antioxidant capacity. *Microchimica Acta*, 174, 31-39.
- Çolak, Ö. 2014. Sakkoroz Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dangler, C. A. 1996. *Nucleic Acid Analysis: Principles and Bioapplications*, Wiley.
- Deng, K. Q., Li, C. X., Ling, Y. L., Xu, G. R., and Li, X. F. 2011. Fabrication of poly (2,6-pyridinedicarboxylic acid)/MWNTs modified electrode for simultaneous determination of guanine and adenine in DNA. *Chinese Chemical Letters*, 22, 981-984.
- Dervan, P. B. 1988. Sequence Specific Recognition of Double Helical DNA. A Synthetic Approach. In: Eckstein, F. and Lilley, D. J. (eds.) *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer Berlin Heidelberg.
- Dimitrakopoulou, A., Dendrinou-Samara, C., Pantazaki, A. A., Alexiou, M., Nordlander, E., and Kessissoglou, D. P. 2008. Synthesis, structure and interactions with DNA of novel tetranuclear, [Mn₄(II/II/II/IV)] mixed valence complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 618-628.
- Dogan-Topal, B. and Ozkan, S. A. 2011a. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. *Electrochimica Acta*, 56, 4433-4438.
- Dogan-Topal, B. and Ozkan, S. A. 2011b. A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination. *Talanta*, 83, 780-788.
- Dogan-Topal, B., Uslu, B., and Ozkan, S. A. 2009. Voltammetric studies on the HIV-1 inhibitory drug Efavirenz: The interaction between dsDNA and drug using electrochemical DNA biosensor and adsorptive stripping voltammetric determination on disposable pencil graphite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2358-2364.

- Dönmez, S. 2014. Hepatit C'nin Belirlenmesine Yönelik Yeni bir DNA Biyosensörünün Hazırlanması. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Drummond, T. G., Hill, M. G., and Barton, J. K. 2003. Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotech*, 21, 1192-1199.
- Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C., and Jaffrezic-Renault, N. 2008. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*, 29, 171-180.
- Ebrahimi, M., Raoof, J. B., and Ojani, R. 2015. Novel electrochemical DNA hybridization biosensors for selective determination of silver ions. *Talanta*, 144, 619-626.
- Eggins, B. R. 2008. *Chemical Sensors and Biosensors*, Wiley.
- Ensafi, A. A., Heydari-Bafrooei, E., and Rezaei, B. 2013. Different interaction of codeine and morphine with DNA: A concept for simultaneous determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 627-633.
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U. S., and Ozsoz, M. 1999. DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Hepatitis B Virus. *Electroanalysis*, 11, 586-587.
- Erdem, A., Kosmider, B., Osiecka, R., Zyner, E., Ochocki, J., and Ozsoz, M. 2005. Electrochemical genosensing of the interaction between the potential chemotherapeutic agent, cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) and DNA in comparison with cis-DDP. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 645-652.
- Erdem, A. and Ozsoz, M. 2001. Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA. *Analytica Chimica Acta*, 437, 107-114.
- Erdem, A. and Ozsoz, M. 2002. Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions. *Electroanalysis*, 14, 965-974.
- Erdem, A., Pividori, M. I., del Valle, M., and Alegret, S. 2004. Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567, 29-37.
- Etaiw, S. E.-d. H. and El-bendary, M. M. 2015. A new organometallic complex based on the trimethyltin cation and 2,6-pyridinedicarboxylic acid as a potential anticancer agent. *Polyhedron*, 87, 383-389.
- Fagan, D. T., Hu, I. F., and Kuwana, T. 1985. Vacuum heat-treatment for activation of glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 57, 2759-2763.

- Feng, L.-J., Zhang, X.-H., Liu, P., Xiong, H.-Y., and Wang, S.-F. 2011. An electrochemical sensor based on single-stranded DNA–poly(sulfosalicylic acid) composite film for simultaneous determination of adenine, guanine, and thymine. *Analytical Biochemistry*, 419, 71-75.
- Flechsig, G.-U. and Reske, T. 2007. Electrochemical Detection of DNA Hybridization by Means of Osmium Tetroxide Complexes and Protective Oligonucleotides. *Analytical Chemistry*, 79, 2125-2130.
- Fogg, A.G. and Ghawji, A.B. 1988. Reductive amperometric determination of nitrofurantoin and acetazolamide at a sessile mercury drop electrode using flow injection analysis. *Analyst*, 113, 727-730.
- Frederick, C. A., Williams, L. D., Ughetto, G., Van der Marel, G. A., Van Boom, J. H., Rich, A., and Wang, A. H. J. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, 29, 2538-2549.
- Friedmann, T. and Brown, D. M. 1978. Base-specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine. *Nucleic Acids Research*, 5, 615-622.
- Fukuda, R., Takenaka, S., and Takagi, M. 1990. Metal ion assisted DNA-intercalation of crown ether-linked acridine derivatives. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1028-1030.
- Gerard, M., Chaubey, A., and Malhotra, B. D. 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 345-359.
- Gibson, D. 2002. Drug-DNA interactions and novel drug design. *Pharmacogenomics J*, 2, 275-276.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., and Reimhult, E. 2008. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8, 1400.
- Grueso, E., López-Pérez, G., Castellano, M., and Prado-Gotor, R. 2012. Thermodynamic and structural study of phenanthroline derivative ruthenium complex/DNA interactions: Probing partial intercalation and binding properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106, 1-9.
- Gu, H., Su, X. D., and Loh, K. P. 2005. Electrochemical Impedance Sensing of DNA Hybridization on Conducting Polymer Film-Modified Diamond. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 13611-13618.
- Guo, X., Song, Z., Sun, J., and Song, J. 2011. Interaction of calf thymus dsDNA with anti-tumor drug tamoxifen studied by zero current potentiometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4001-4005.

- Hamman, E. 2002. Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 651-659.
- Hart, J. P. 1990. *Electroanalysis of biologically important compounds*, E. Horwood.
- He, J.-B., Qi, F., Wang, Y., and Deng, N. 2010. Solid carbon paste-based amperometric sensor with electropolymerized film of 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145, 480-487.
- Inzelt, G., Lewenstam, A., Scholz, F., and Baucke, F. G. 2013. *Handbook of reference electrodes*, Springer.
- Jakubowski, M. and Trzcinka-Ochocka, M. 2005. Biological Monitoring of Exposure: Trends and Key Developments. *Journal of Occupational Health*, 47, 22-48.
- Johnston, D. H. and Thorp, H. H. 1996. Cyclic Voltammetry Studies of Polynucleotide Binding and Oxidation by Metal Complexes: Homogeneous Electron-Transfer Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry*, 100, 13837-13843.
- Kalanur, S. S., Katrahalli, U., and Seetharamappa, J. 2009. Electrochemical studies and spectroscopic investigations on the interaction of an anticancer drug with DNA and their analytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 636, 93-100.
- Kalimuthu, P. and John, S. A. 2009a. Electropolymerized film of functionalized thiadiazole on glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Bioelectrochemistry*, 77, 13-18.
- Kalimuthu, P. and John, S. A. 2009b. Modification of electrodes with nanostructured functionalized thiadiazole polymer film and its application to the determination of ascorbic acid. *Electrochimica Acta*, 55, 183-189.
- Kalimuthu, P. and John, S. A. 2009c. Nanostructured electropolymerized film of 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole on glassy carbon electrode for the selective determination of l-cysteine. *Electrochemistry Communications*, 11, 367-370.
- Kalimuthu, P. and John, S. A. 2009d. Selective electrochemical sensor for folic acid at physiological pH using ultrathin electropolymerized film of functionalized thiadiazole modified glassy carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3575-3580.
- Kamat, A. M. and Lamm, D. L. 2004. Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer. *Urology*, 63, 457-460.
- Kannan, P. and John, S. A. 2011. Ultrasensitive detection of l-cysteine using gold-5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole core-shell nanoparticles film modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 30, 276-281.

- Kara, P., Cavdar, S., Meric, B., Erensoy, S., and Ozsoz, M. 2007. Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases. *Bioelectrochemistry*, 71, 204-210.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P. E., and Ozsoz, M. 2002a. Label-Free and Label Based Electrochemical Detection of Hybridization by Using Methylene Blue and Peptide Nucleic Acid Probes at Chitosan Modified Carbon Paste Electrodes. *Electroanalysis*, 14, 1685-1690.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., and Ozsoz, M. 2002b. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. *Electrochemistry Communications*, 4, 705-709.
- Karabacak, M., Bilgili, S., and Atac, A. 2015. Molecular structure investigation of neutral, dimer and anion forms of 3,4-pyridinedicarboxylic acid: A combined experimental and theoretical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 270-282.
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., and Bhargava, K. 2015. Chapter 1 - Introduction to Biosensors. In: Benjamin, C. K. B. (ed.) *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier.
- Kashanian, S. and Zeidali, S. H. 2011. DNA Binding Studies of Tartrazine Food Additive. *DNA and Cell Biology*, 30, 499-505.
- Kerman, K., Kobayashi, M., and Tamiya, E. 2004. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Measurement Science and Technology*, 15, R1.
- Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y. S., Klironomos, G., and Mikkelsen, S. R. 1996. Comparison of an Intercalating Dye and an Intercalant-Enzyme Conjugate for DNA Detection in a Microtiter-Based Assay. *Analytical Chemistry*, 68, 1197-1200.
- Kotlensky, W. V. and Martens, H. E. 1965. Tensile Properties of Glassy Carbon to 2,900[deg] C. *Nature*, 206, 1246-1247.
- Koyuncu Zeybek, D., Demir, B., Zeybek, B., and Pekyardımcı, Ş. 2015. A sensitive electrochemical DNA biosensor for antineoplastic drug 5-fluorouracil based on glassy carbon electrode modified with poly(bromocresol purple). *Talanta*, 144, 793-800.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman.
- Levison, P. R., Dennis, J. W., Jones, K. D., Philpott, R. W., Taylor, S. L., and Grimm, V. 1998. New Approaches in the Binding of DNA for Clinical Applications. *Clinical Chemistry*, 44, 2060-2061.

- Li, C., Qiu, X., and Ling, Y. 2013. Electrocatalytic oxidation and the simultaneous determination of guanine and adenine on (2,6-pyridinedicarboxylic acid)/graphene composite film modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 704, 44-49.
- Li, J., Liu, Q., Liu, Y., Liu, S., and Yao, S. 2005. DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. *Analytical Biochemistry*, 346, 107-114.
- Li, Q., Batchelor-McAuley, C., and Compton, R. G. 2010. Electrochemical Oxidation of Guanine: Electrode Reaction Mechanism and Tailoring Carbon Electrode Surfaces To Switch between Adsorptive and Diffusional Responses. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 7423-7428.
- Liu, F. Q., Wang, Q. X., Jiao, K., Jian, F. F., Liu, G. Y., and Li, R. X. 2006. Synthesis, crystal structure, and DNA-binding properties of a new copper (II) complex containing mixed-ligands of 2,2'-bipyridine and p-methylbenzoate. *Inorganica Chimica Acta*, 359, 1524-1530.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A. P. F., and Mascini, M. 2004. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 515-530.
- Luong, J. H. T., Male, K. B., and Glennon, J. D. 2008. Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, 26, 492-500.
- Ma, Y., Pan, J., Zhang, G., and Zhang, Y. 2013. Binding properties of butylated hydroxytoluene with calf thymus DNA in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 126, 112-118.
- Mahadevan, S. and Palaniandavar, M. 1998. Spectroscopic and Voltammetric Studies on Copper Complexes of 2,9-Dimethyl-1,10-phenanthrolines Bound to Calf Thymus DNA. *Inorganic Chemistry*, 37, 693-700.
- Mai, A. T., Duc, T. P., Thi, X. C., Nguyen, M. H., and Nguyen, H. H. 2014. Highly sensitive DNA sensor based on polypyrrole nanowire. *Applied Surface Science*, 309, 285-289.
- Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L., and Zambonin, P. G. 1990. Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film. *Analytical Chemistry*, 62, 2735-2740.
- Maruyama, K., Mishima, Y., Minagawa, K., and Motonaka, J. 2002. DNA Sensor with a Dipyrrophenazine Complex of Osmium(II) as an Electrochemical Probe. *Analytical Chemistry*, 74, 3698-3703.
- Mascini, M. 2002. Affinity Electrochemical Biosensors for Pollution Control. In: Gianguzza, A., Pelizzetti, E. and Sammartano, S. (eds.) *Chemistry of Marine Water and Sediments*. Springer Berlin Heidelberg.

- Mascini, M., Palchetti, I., and Marrazza, G. 2001. DNA electrochemical biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369, 15-22.
- McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P., and Linn, C. P. 1995. The nucleic acid ligand. A new tool for molecular recognition. *Analytical Chemistry*, 67, 663A-668A.
- Mikkelsen, S. R. 1996. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis*, 8, 15-19.
- Mikkelsen, S. R. and Rechnitz, G. A. 1989. Conductometric transducers for enzyme-based biosensors. *Analytical Chemistry*, 61, 1737-1742.
- Millan, K. M. and Mikkelsen, S. R. 1993. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Analytical Chemistry*, 65, 2317-2323.
- Millan, K. M., Saraullo, A., and Mikkelsen, S. R. 1994. Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode. *Analytical Chemistry*, 66, 2943-2948.
- Müller, W. and Crothers, D. M. 1975. Interactions of Heteroaromatic Compounds with Nucleic Acids. *European Journal of Biochemistry*, 54, 267-277.
- Muti, M., Gençdağ, K., Nacak, F. M., and Aslan, A. 2013. Electrochemical polymerized 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole modified single use sensors for detection of quercetin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 181-186.
- Nataraj, A., Balachandran, V., Karthick, T., Karabacak, M., and Atac, A. 2012. FT-Raman, FT-IR, UV spectra and DFT and ab initio calculations on monomeric and dimeric structures of 3,5-pyridinedicarboxylic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1027, 1-14.
- Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K., and Khalid, A. M. 2006. Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin-DNA interaction. *Analytical Biochemistry*, 354, 28-34.
- Ohe, T., Watanabe, T., and Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567, 109-149.
- Oliveira-Brett, A. M., Piedade, J. A. P., Silva, L. A., and Diclescu, V. C. 2004. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry*, 332, 321-329.
- Oliveira Brett, A. M. and Matysik, F.-M. 1997a. Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 111-116.
- Oliveira Brett, A. M. and Matysik, F.-M. 1997b. Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 429, 95-99.

- Osteryoung, J. G. and Osteryoung, R. A. 1985. Square wave voltammetry. *Analytical Chemistry*, 57, 101A-110A.
- Ouyang, X., Luo, L., Ding, Y., Liu, B., and Xu, D. 2014. Simultaneous determination of purine and pyrimidine bases in DNA using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/graphene composite film. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 735, 51-56.
- Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., and Ozsoz, M. 2002. Allele-Specific Genotype Detection of Factor V Leiden Mutation from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor. *Analytical Chemistry*, 74, 5931-5936.
- Ozsoz, M., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., and Ozkan, D. 2003. Electrochemical Biosensor for the Detection of Interaction Between Arsenic Trioxide and DNA Based on Guanine Signal. *Electroanalysis*, 15, 613-619.
- Paleček, E. 1988. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 20, 179-194.
- Paleček, E. 1996. From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes. *Electroanalysis*, 8, 7-14.
- Paleček, E., Fojta, M., Jelen, F., and Vetterl, V. 2007. Electrochemical Analysis of Nucleic Acids. *Encyclopedia of Electrochemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Paleček, E., Fojta, M., Tomschik, M., and Wang, J. 1998. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 621-628.
- Peng, H., Zhang, L., Soeller, C., and Travas-Sejdic, J. 2009. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. *Biomaterials*, 30, 2132-2148.
- Peng, H., Zhang, L., Spires, J., Soeller, C., and Travas-Sejdic, J. 2007. Synthesis of a functionalized polythiophene as an active substrate for a label-free electrochemical genosensor. *Polymer*, 48, 3413-3419.
- Pividori, M. I., Merkoçi, A., and Alegret, S. 2000. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 291-303.
- Plambeck, J. A. and Lown, J. W. 1984. Electrochemical Studies of Antitumor Antibiotics: V. An Electrochemical Method of Measurement of the Binding of Doxorubicin and Daunorubicin Derivatives to DNA. *Journal of The Electrochemical Society*, 131, 2556-2563.
- Pletcher, D. and Group, S. E. 2001. *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood.

- Radi, A., El Ries, M. A., and Kandil, S. 2003. Electrochemical study of the interaction of levofloxacin with DNA. *Analytica Chimica Acta*, 495, 61-67.
- Rahman, M., Li, X.-B., Lopa, N., Ahn, S., and Lee, J.-J. 2015. Electrochemical DNA Hybridization Sensors Based on Conducting Polymers. *Sensors*, 15, 3801.
- Raoof, J. B., Ojani, R., Chekin, F., Jahanshahi, M., and Rashid-Nadimi, S. 2009. Fabrication of Nanocomposite Containing Naphthoquinone and Nanogold Supported on Poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) Film for Voltammetric Determination of N-Acetyl-L-Cysteine. *Electroanalysis*, 21, 2674-2679.
- Rusling, J. F. 1984. Variations in electron-transfer rate at polished glassy carbon electrodes exposed to air. *Analytical Chemistry*, 56, 575-578.
- Saenger, W. 1984. Principles of nucleic acid structure, Springer-Verlag.
- Shah, A., Nosheen, E., Munir, S., Badshah, A., Qureshi, R., Rehman, Z.-u., Muhammad, N., and Hussain, H. 2013. Characterization and DNA binding studies of unexplored imidazolidines by electronic absorption spectroscopy and cyclic voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120, 90-97.
- Shahabadi, N. and Bagheri, S. 2015. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of the drug olanzapine with calf thymus DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, Part C, 1454-1459.
- Shi, J.H., Chen, J., Wang, J., and Zhu, Y. Y. 2015. Binding interaction between sorafenib and calf thymus DNA: Spectroscopic methodology, viscosity measurement and molecular docking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, Part B, 443-450.
- Sinden, R. R. 1994. CHAPTER 1 - Introduction to the Structure, Properties, and Reactions of DNA. In: Sinden, R. R. (ed.) *DNA Structure and Function*. San Diego: Academic Press.
- Sirajuddin, M., Ali, S., and Badshah, A. 2013. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19.
- Skoog, D. A. 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Thomson-Brooks/Cole.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., ve Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. 2000. *Enstrümantal analiz ilkeleri*, Bilim Yayıncılık.
- Steel, A. B., Herne, T. M., and Tarlov, M. J. 1998. Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. *Analytical Chemistry*, 70, 4670-4677.

- Steenken, S. and Jovanovic, S. V. 1997. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 617-618.
- Stutts, K. J., Kovach, P. M., Kuhr, W. G., and Wightman, R. M. 1983. Enhanced electrochemical reversibility at heat-treated glassy carbon electrodes. *Analytical Chemistry*, 55, 1632-1634.
- Subastri, A., Ramamurthy, C. H., Suyavaran, A., Mareeswaran, R., Lokeswara Rao, P., Harikrishna, M., Suresh Kumar, M., Sujatha, V., and Thirunavukkarasu, C. 2015. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of troxerutin with DNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 122-129.
- Sui, J., Zhang, L., and Peng, H. 2013. Label-free DNA sensor construction using self-assembled poly(o-methoxyaniline) hollow nanospheres. *European Polymer Journal*, 49, 139-146.
- Takenaka, S., Ihara, T., and Takagi, M. 1990. Bis-9-acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1485-1487.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S., and Wilson, W. D. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31, 3103-3112.
- Taylor, R. J. and Humffray, A. A. 1975. Electrochemical studies on glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 64, 63-84.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., and Wilson, G. S. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131.
- Thomas, F. and Henze, G. 2001. *Introduction to Voltammetric Analysis: Theory and Practice*, CSIRO PUBLISHING.
- Thornton, D. C., Corby, K. T., Spendel, V. A., Jordan, J., Robbat, A., Rutstrom, D. J., Gross, M., and Ritzler, G. 1985. Pretreatment and validation procedure for glassy carbon voltammetric indicator electrodes. *Analytical Chemistry*, 57, 150-155.
- Van der Linden, W. E. and Dieker, J. W. 1980. Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 119, 1-24.
- Velusamy, V., Arshak, K., Yang, C. F., Yu, L., Korostynska, O., and Adley, C. 2011. Comparison between DNA Immobilization Techniques on a Redox Polymer Matrix. *American Journal of Analytical Chemistry*, Vol.02No.03, 4.

- Vidal, J.C., Garcia-Ruiz, E., Castillo, J.R. 2003. Recent Advances in Electropolymerized Conducting Polymers in Amperometric Biosensors. *Microchimica Acta*, 143, 93-111.
- Wakelin, L. P. G. and Waring, M. J. 1976. The binding of echinomycin to deoxyribonucleic acid.
- Wang, D.-F., Wang, Z.-H., Zhang, T., Huang, R.-B., and Zheng, L.S. 2014. Novel networks of silver(I) cations assembled with 2,3-pyridinedicarboxylic acid: From 2D sheet to 3D network. *Journal of Molecular Structure*, 1068, 210-215.
- Wang, J. 2006a. *Analytical Electrochemistry*, Wiley.
- Wang, J. 2006b. *Study of Electrode Reactions and Interfacial Properties. Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc.
- Wang, J., Bollo, S., Lopez Paz, J. L., Sahlin, E., and Mukherjee, B. 1999. Ultratrace Measurements of Nucleic Acids by Baseline-Corrected Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*, 71, 1910-1913.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., and Shiraishi, H. 1996a. Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. *Analytica Chimica Acta*, 326, 141-147.
- Wang, J., Fernandes, J. R., and Kubota, L. T. 1998a. Polishable and Renewable DNA Hybridization Biosensors. *Analytical Chemistry*, 70, 3699-3702.
- Wang, J. and Hutchins, L. D. 1985. Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. *Analytica Chimica Acta*, 167, 325-334.
- Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D. H., Chicharro, M., Fernandes, and J., Paleček, E. 1998b. Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45, 33-40.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Farias, P. A. M., Dontha, N., and Luo, D. 1996b. Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 332, 139-144.
- Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J. R., Jiang, M., Paz, J. L. L., Waymire, R., Nielsen, T. W., and Getts, R. C. 1998c. Adsorption and Detection of DNA Dendrimers at Carbon Electrodes. *Electroanalysis*, 10, 553-556.
- Wang, L., Wang, Z., and Wang, E. 2004. Novel hydrogen-bonded three-dimensional network complexes containing copper-pyridine-2,6-dicarboxylic acid. *Journal of Coordination Chemistry*, 57, 1353-1359.

- Wang, Z., Liu, D., and Dong, S. 2001. In situ infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 53, 175-181.
- Wasylina, L., Kucharska, E., Weglinski, Z., and Puszko, A. 1999. The ^{13}C NMR, UV and IR absorption spectra of pyridinedicarboxylic acids. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 35, 186-194.
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., and Loeb, L. A. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14, 473-486.
- Xie, J., Chen, D., Wu, Q., Wang, J., and Qiao, H. 2015. Spectroscopic analyses on interaction of melamine, cyanuric acid and uric acid with DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 714-721.
- Xu, X., Wang, D., Sun, X., Zeng, S., Li, L., and Sun, D. 2009. Thermodynamic and spectrographic studies on the interactions of ct-DNA with 5-fluorouracil and tegafur. *Thermochimica Acta*, 493, 30-36.
- Yamada, S. and Sato, H. 1962. Physics - Some Physical Properties of Glassy Carbon. *Nature*, 193, 261-&.
- Yang, J., Yang, T., Feng, Y., and Jiao, K. 2007. A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2,6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment. *Analytical Biochemistry*, 365, 24-30.
- Yang, T., Zhang, W., Du, M., and Jiao, K. 2008. A PDDA/poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid)-CNTs composite film DNA electrochemical sensor and its application for the detection of specific sequences related to PAT gene and NOS gene. *Talanta*, 75, 987-994.
- Ying, L., Haitao, F., Yifan, Z., and Wuji, W. 2003. Study on the inhibiting behavior of AMT on bronze in 5% citric acid solution. *Journal of Materials Science*, 38, 407-411.
- Yola, M. L. and Özaltn, N. 2011. Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653, 56-60.
- Zambonin, C. G. and Losito, I. 1997. Kinetic Investigation of the Reactions Connected to the System Ascorbate + O_2 by Amperometric Detection of H_2O_2 at a Modified Platinum Electrode. *Analytical Chemistry*, 69, 4113-4119.
- Zeybek, B. 2010 Bazı İletken Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi ve Uygulamaları. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zhou, C., Dong, Y., Li, Z., Xu, X., and Liu, Z. 2010a. Electrochemistry of magnolol and interaction with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 642, 115-119.

Zhou, F., Xing, D., Wu, B., Wu, S., Ou, Z., and Chen, W. R. 2010b. New Insights of Transmembranal Mechanism and Subcellular Localization of Noncovalently Modified Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Letters*, 10, 1677-1681.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gözde AYDOĞDU TİĞ

Doğum Yeri : AYDIN

Doğum Tarihi : 01.01.1987

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise : Aydın Süleyman Demirel Anadolu Lisesi (2005)

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2009)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı,
(Eylül 2009-Haziran 2011)

Çalıştığı Kurum ve Yıl:

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Araştırma Görevlisi, 2009-devam ediyor.

Yayınlar (SCI)

1. **Gozde Aydoğdu Tığ**, Derya Koyuncu Zeybek, Şule Pekyardımcı, Fabrication of amperometric cholesterol biosensor based on SnO₂ nanoparticles and Nafion-modified carbon paste electrode, Chemical Papers 2015 (*Accepted*).

2. Ceren Erdem, Derya Koyuncu Zeybek, **Gozde Aydogdu**, Bulent Zeybek, Sule Pekyardimci, Esmâ Kilic, Electrochemical glucose biosensor based on nickel oxide nanoparticle-modified carbon paste electrode, Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2014, 42, 237-244.

3. **Gozde Aydogdu**, Gulendem Gunendi, Derya Koyuncu Zeybek, Bulent Zeybek, Sule Pekyardimci, A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-

mercapto-1,3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin, 2014, Sensors and Actuators B-Chemical, 2014, 197, 211-219.

4. Gozde Aydogdu, Derya Koyuncu Zeybek, Sule Pekyardimci, Esmâ Kilic A novel amperometric biosensor based on ZnO nanoparticles-modified carbon paste electrode for determination of glucose in human serum, Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2013, 41, 332-338.

5. Gozde Aydogdu, Derya Koyuncu Zeybek, Bulent Zeybek, Sule Pekyardimci, Electrochemical sensing of NADH on NiO nanoparticles-modified carbon paste electrode and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor, Journal of Applied Electrochemistry, 2013, 43, 523-531.

Ulusal Kongre Sunum

G. Aydoğdu, D.K. Zeybek, E. Kılıç, Ş. Pekyardımcı “Glukoz Tayini için ZnO Nanopartikül Modifiye Amperometrik Karbon Pasta Elektrot Geliştirilmesi” 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27.06-02.07.2011, [P.] Erzurum, Türkiye.

Uluslararası Kongre Sunum

G. Aydoğdu, D. Koyuncu, Ş. Pekyardımcı, E. Kılıç “Amperometric Glucose Biosensor Based on Carbon Paste Electrode Modified Zinc Oxide Nanoparticles and Various Mediators”, EUROanalysis 16 (Challenges in Modern Analytical Chemistry)” this European Conference on Analytical Chemistry, 11-15 Sep 2011, [P.], Belgrade, Serbia.

G. Aydoğdu, D. Koyuncu, E. Kılıç, Ş. Pekyardımcı “A new carbon paste electrode based on SnO₂ nanoparticles for cholesterol determination” 9th Internaional Electrochemistry Meeting in Turkey, 25-29 Sep 2011, [P.] Çeşme, İzmir.

G. Aydoğdu, D. K. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, E. Kılıç “Amperometric Cholesterol Biosensor Based on Tin Oxide Nanoparticles Modified Carbon Paste Electrode” BIOMED 2011, 17th International Biomedical Science&Technology Symposium, 23-25 Nov 2011, [P.] Ankara, Turkey.

C. Erdem, D. K. Zeybek, G. Aydoğdu, B. Zeybek, Ş. Pekyardımcı, E. Kılıç “A practical glucose biosensor based on NiO nanoparticles modified-carbon paste electrode” 8th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, 15-19 Sep 2013 [P.] Thessaloniki, Greece.

G. Aydoğdu, D. K. Zeybek, B. Zeybek, Ş. Pekyardımcı “Electrocatalytic oxidation of NADH based on NiO nanoparticles modified carbon paste electrode” 8th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, 15-19 Sep 2013, [P.] Thessaloniki, Greece.

R. Rapini, G. Aydoğdu, G. Marrazza “A novel DNA-aptamer based array for pesticide detection”, Functional DNA Nanotechnology, 19-20 June 2014 [P.] Rome, Italy.

R. Rapini, G. Aydoğdu, G. Marrazza, “DNA technology for small molecules sensing: a new approach for pesticide detection”, XXV Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, 7-12 Sep 2014 [P.] Calabria, Italy.

E. Yalın, G. Aydoğdu, Ş. Pekyardımcı, “Disposable electrochemical DNA biosensor for the study of unexplored benzoxazoles-DNA interaction”, 10th European Symposium on Biomedical Engineering Sciences & 6th International Forum on Industrial Bioprocesses, 7-10 Sep 2014 [P.] Lille, France.

H. Şen, G. Aydoğdu, Ş. Pekyardımcı, “Electrochemical sensing of furosemide and its interaction with dsDNA by using graphene oxide modified glassy carbon electrode”, 10th European Symposium on Biomedical Engineering Sciences & 6th International Forum on Industrial Bioprocesses, 7-10 Sep 2014 [P.] Lille, France.

G. Aydoğdu, G. Günendi, D. Koyuncu Zeybek, B. Zeybek, S. Pekyardımcı, “A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) for assaying of antibacterial drug nitrofurantoin”, Biosensors 2014, 27-30 May 2014 [P.] Melbourne, Australia.

G. Aydoğdu, G. Günendi, S. Pekyardımcı, T. Ertan Bolelli, İ. Yalçın “Poly-3-amino-1,2,4-triazole-5-thiol modified glassy carbon electrodes for DNA and DNA–

antibacterial agent interaction” 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), 9-12 June 2015 [P.] Ankara, Turkey.

G. Aydoğdu, S. Pekyardımcı “DNA-functionalized electrochemical biosensor based on poly-(2,6-pyridine dicarboxylic acid) coated glassy carbon electrode for the study of anticancer drug gemcitabine” 6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques, 1-3 Sep 2015, [P.] Valencia, Spain.

G. Aydoğdu Tığ, E. Ö. Bolat, M. B. Koçer, Ş. Pekyardımcı “Hesperidin-dsDNA interaction based on electrochemically reduced graphene oxide and poly-(2,6-pyridine dicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode” 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (7th BBCAC), 10-15 Sep 2015, [P.] Varna, Bulgaria.