

**ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN NIVOLUMAB VE
BEVASİZUMAB'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT
KULLANARAK VOLTAMETRİK YÖNTEMLERLE
TAYİNİ VE dsDNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**



MEHMET ASLAN

ARALIK 2023

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN NIVOLUMAB VE
BEVASİZUMAB'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT
KULLANARAK VOLTAMETRİK YÖNTEMLERLE
TAYİNİ VE dsDNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

MEHMET ASLAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV
YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
KİMYA ANA BİLİM DALINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

ARALIK 2023

DİYARBAKIR

**ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN NIVOLUMAB VE
BEVASİZUMAB'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT KULANARAK
VOLTAMETRİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ VE dsDNA İLE
ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet ASLAN tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Kimya Ana Bilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Prof. Dr. Fırat AYDIN
Danışman, **Kimya Bölümü,**
Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT
İkinci Danışman, **Kimya Bölümü,**
Batman Üniversitesi

Sınav Jürisi:

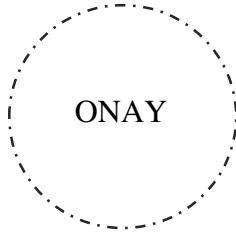
Prof. Dr. Bengi USLU (*)
Eczacılık Temel Bilimleri Bölümü, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Fırat AYDIN (**)
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Ömer YAVUZ
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Birol OTLUDİL
Biyoloji Bölümü, Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Yavuz YARDIM
Eczacılık Temel Bilimleri Bölümü, Van Yüzüncü Yıl
Üniversitesi



Savunma Tarihi: 04/ 12 / 2023

(*) Jüri Başkanı.

(**) Tez Danışmanı.



Dostlarıma...

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılıyıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımınla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Mehmet ASLAN

İmza:

TEŞEKKÜR

İlk başta, çalışmanın konsept aşamasından, örnekleme, deney setleri, analiz yorumlama ve tez taslağındaki düzeltmelere kadar gösterdikleri rehberlik ve sabır için danışmanım Prof. Dr. Fırat AYDIN' a ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT' e minneti borç bilir teşekkür ederim. Ayrıca jüri üyelerime yapıcı eleştirileri ve bu tezi geliştirmeye dönük yönlendirmeleri için teşekkür ederim.

Tez kapsamında bilgi paylaşımları için Prof. Dr. Ömer YAVUZ ve Prof. Dr. Birol OTLUDİL' e teşekkür ederim.

Arkadaşım Abdulkadir KILIÇ' a çalışmamda bana sunduğu teknik destekten dolayı teşekkür ederim.

Beni araştırma yapmaya motive ettikleri ve güven kaybına zamanlarda bile bana inandıkları için aileme teşekkür etmek istiyorum.

Bu tez çalışması için sağladıkları finansal destek için Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (DÜBAP), (Proje No: DÜBAP-21012) için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
TABLolar LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1 Kanser	4
2.1.1 Nivolumab (NIVO)	6
2.1.2 Bevasizumab (BEVA).....	9
2.2 Elektrokimya	15
2.2.1 Voltametri	16
2.2.2 Dönüşümlü Voltametri (CV)	16
2.2.3 Diferansiyel puls voltametresi (DPV).....	17
2.2.4 Elektrokimyasal hücre.....	19
2.2.5 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS).....	25
2.2.6 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis.)	28
2.2.7 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	30
2.2.8 Enerji Dağılımı X- ışını Spektroskopisi (EDX)	31
2.3. Biyosensörler	31
2.3.1 Biyosensör bileşenleri ve fonksiyonları	32
2.3.2 Biyosensör özellik	34
2.4 DNA İlaç Etkileşimleri	36
2.4.1 DNA	36
2.4.2 İlaç DNA etkileşimi ve önemi.....	37

2.4.3 İlaç DNA etkileşim türleri.....	38
2.4.4 İlaç/DNA etkileşiminin voltametrik yöntemlerle incelenmesi	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM	47
3.1 Materyal	47
3.1.1 Çalışmada kullanılan maddeler	47
3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar	48
3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.2 CV ve EIS deneyleri.....	51
3.3 UV-Vis Spektroskopisi ile İlgili Deneyler	52
3.4 SEM görüntüleri.....	52
3.5 Voltametrik Teknik Seçimi ve Yöntem	52
3.5.1 Diferansiyel puls parametrelerinin elektrot yanıtına etkisi	53
3.6 Farklı tampon sistemleri ile pH'nin elektrot yanıtına etkisi.....	53
3.7 Sıyırma parametreleri.....	54
3.8 Optimum dsDNA İmmobilizasyonu	54
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	55
4.1 CV deneyleri	55
4.2 NİVO için destek elektrolit ve pH etkisi.....	57
4.3 Sıyırma /Biriktirme koşulları	59
4.4 Diferansiyel Puls Parametrelerinin Elektrot Yanıtına Etkisine Ait Bulgular... 61	
4.4.1 Gerilimin adımının elektrot yanıtına etkisi	61
4.4.2 Modülasyon genliğinin elektrot yanıtına etkisi.....	61
4.4.3 Modülasyon süresinin elektrot yanıtına etkisi.....	62
4.4.4 Zaman aralığının elektrot yanıtına etkisi.....	63
4.5 Geliştirilen yöntemin analitik performans özellikleri	64
4.6 Gerçek Örneklerde Analiz.....	66
4.7 Dönüşümlü voltametri.....	67

4.8	BEVA için destek elektroliti ve pH etkisi	69
4.9	Biriktirme/sıyırma koşullarının etkisi	72
4.10	BEVA için Diferansiyel Puls Parametrelerinin Elektrot Yanıtına Etkisine Ait Bulgular.....	73
4.10.1	Gerilim adımının elektrot yanıtına etkisi	73
4.10.2	Modulasyon genliğinin elektrot yanıtına etkisi.....	74
4.10.3	Modulasyon süresinin elektrot yanıtına etkisi	75
4.10.4	Zaman aralığının elektrot yanıtına etkisi.....	76
4.11	Geliştirilen yöntemin analitik performans özellikleri	76
4.12	Gerçek Örneklerde Analiz	78
4.13	Girişim	79
4.14	dsDNA Miktarının Belirlenmesine Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarım Çalışmalarına Ait Bulgular	80
4.14.1	Voltametrik teknik seçimine ait bulgular.....	80
4.14.2	dsDNA'nın farklı tampon sistemlerinin ve pH'nin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular	81
4.14.3	NaCl Miktarının etkisinin incelenmesi	81
4.14.4	DNA miktarının belirlenmesine ait bulgular.....	83
4.14.5	Karıştırma hızının elektrot yanıtına etkisine ait bulgular.....	84
4.14.6	dsDNA İmmobilizasyon süresinin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular	85
4.14.7	dsDNA'ya ait diferansiyel puls parametrelerinin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular	86
4.15	NIVO dsDNA Etkileşiminin İncelenmesi.....	90
4.15.1	Elektrokimyasal karakterizasyon	90
1.1 4.15.3	NIVO-dsDNA etkileşiminin UV-Vis. spektrofotometrisi ile incelenmesi.....	99
4.16	BEVA dsDNA Etkileşiminin İncelenmesi.....	101

4.16.1 Elektrokimyasal karakterizasyon	101
4.16.2 BEVA dsDNA etkileşiminin diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile incelenmesine ait bulgular.....	105
4.16.3 BEVA-dsDNA etkileşiminin UV-Vis. spektrofotometrisi ile incelenmesi	108
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	110
5.1 Sonuçlar	110
KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ	121

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Yaygın kullanılan elektroanalitik yöntemler	15
Şekil 2.2 Voltametrik teknikler ve sınıflandırılması	16
Şekil 2.3 (a) CV’de zamana karşı uygulanan gerilim grafiği;(b) CV’de akım-gerilim grafiği.	17
Şekil 2.4 (a) Analog cihazlarda DPV’e ait uyarma sinyali; (b) DPV voltamogramı .	18
Şekil 2.5 Üçlü elektrot sistemi	19
Şekil 2.6 Voltametrde çalışma elektrotları.....	20
Şekil 2.7 Karbon temelli elektrotlar (A) CPE, (B) SPE, (C) GCE (D) PGE	21
Şekil 2.8 (a) Ag/AgCl, (b) DKE, (c) SHE	24
Şekil 2.9 Platin tel elektrot	25
Şekil 2.10 (a) EIS devre elemanları, (b) Nyquist diyagramı.....	26
Şekil 2.11 Empedans ölçüm ve karakterizasyonu için akış diyagramı	27
Şekil 2.12 Absorpsiyon pikindeki olası kaymalar	29
Şekil 2.13 Taramalı elektron mikroskobunun şematik görünüm	30
Şekil 2.14 Biyosensöre ait bileşenler ve çalışma prensibi	31
Şekil 2.15 Biyosensörlerde kullanılan bileşenler,dönüştürücüler ve tayin edilebilen analitler.....	32
Şekil 2.16 Biyosensörlerin biyoreseptör türlerine göre sınıflandırılmaları.....	33
Şekil 2.17 DNA, RNA ve pirimidin ve pürin bazları.....	36
Şekil 2.18 RNA ve DNA’daki 2-deoksiriboz ve ribozun kimyasal yapıları.....	37
Şekil 2.19 DNA, RNA’nın nükleotid ve nükleozidlerinin yapıları.....	37
Şekil 2.20 DNA çift sarmalı ve şematik görünümü	38
Şekil 2.21 İnterkale olmuş bileşen ile DNA dizisi.....	39
Şekil 2.22 Guanin bazıyla indikale olmuş DNA dizi algılanması	40
Şekil 2.23 İndikatör olmadan DNA dizi algılama yöntemi.....	40
Şekil 2.24 DNA’da kovalent olmayan bağlanma çeşitleri.	41
Şekil 2.25 DNA elektrot yüzeyine bağlanma yöntemleri	44
Şekil 3.1AUTOLAB, PGSTAT128N cihazı.....	48
Şekil 3.2 Kullanılacak yöntemin şematize hali	53

Şekil 4.1 PGE PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde NIVO (1.0 mg/ mL) için elde edilen dönüşümlü voltamogramları (A) Üç döngülü voltamogram; (100 mV s ⁻¹ tarama hızı) (B) Tarama hızları (1):50 mVs ⁻¹ , (2): 100 mVs ⁻¹ , (3):200 mVs ⁻¹ , (4): 300 mVs ⁻¹ , (5):400 mVs ⁻¹ , (6):500 mVs ⁻¹ ve (7):600 mVs ⁻¹	55
Şekil 4.2 $\sqrt{v}$ - i_p , v - i_p ve $\log v$ - $\log i_p$ Ep- logv grafikleri	56
Şekil 4.3 0.2 mg /mL NIVO PBS (pH 3.0, 4.0, 7.4 ve 9.0, 0.02 M NaCl) ve ABS (pH 4.8, 0.02 M NaCl) tamponlarında PGE ile elde voltamogramlar, içeren DPV parametreleri: Gerilim adımı, 0.02 V; Modulasyon genliği,0.08V; Modulasyon süresi,0.04 s; Zaman aralığı,0.4 s.	57
Şekil 4.4 0.2 mg /mL NIVO'nun BR (pH 2.0-8.0, 0.02 M NaCl) PGE ile elde edilen voltamogramlar. DPV parametreleri şekil 4.3'te verilmiştir.	58
Şekil 4.5 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PGE kullanarak elde edilen eğri. DPV parametreleri şekil 4.3'te verilmiştir. Kesikli çizgi PBS (pH 3.0) destek elektrolit çözeltisidir.	58
Şekil 4.6 0.2 mg /mL NIVO E _p ve I _p üzerine pH etkisi, BR (pH 2.0- 8.0)	59
Şekil 4.7 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 V) aralığında farklı biriktirme potansiyeline ait diferansiyel pulse voltamogramları.	60
Şekil 4.8 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (30- 150 s) aralığında farklı biriktirme sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.	60
Şekil 4.9 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.08 V) aralığında farklı gerilim adımlarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.	61
Şekil 4.10 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.05- 0.1 V) aralığında farklı modulasyon genliklerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.	62
Şekil 4.11 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.6 s) aralığında farklı modulasyon sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.	63
Şekil 4.12 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 s) aralığında farklı zaman aralıklarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.	64

Şekil 4.13 (A) NIVO'nun farklı derişimlerde (0.01- 0.07 mg/mL) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) alınan voltamoglar. DPV parametreleri: gerilim adımı, 0.02 V; modülasyon genliğı,0.09V; modülasyon süresi,0.4 s;zaman aralığı,0.1 s. (B): i_p/C_{NIVO} kalibrasyon grafiğı.	65
Şekil 4.14 NIVO'nun PBS (pH 3,0, 0,02M NaCl) ortamında (0,02 -0,06 mg/mL) standart ilavelerinden sonra idrar numunelerinde DPV voltoramları Kesikli çizgi, destekleyici elektrolit . DPV parametreleri şekil 4.13'te verilmiştir.	67
Şekil 4.15 PGE için PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içinde BEVA (12.5 mg/mL) için elde edilen dönüşümlü voltamogramları (A) Üç döngülü voltamogram; 100 mV s ⁻¹ tarama hızı ve (B) Tarama hızları (1):25 mVs ⁻¹ , (2): 50 mVs ⁻¹ , (3):100 mVs ⁻¹ , (4): 200 mVs ⁻¹ , (5):300 mVs ⁻¹ , (6):400 mVs ⁻¹ ve (7) 500 mVs ⁻¹	68
Şekil 4.16 $\sqrt{v}$ - i_p , v - i_p ve $\log v$ - $\log i_p$ ve E_p - $\log v$ grafikleri	69
Şekil 4.17 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4 ve 9.0, 0.02 M NaCl) ve ABS (pH 4.8, 0.02 M NaCl) tamponları içinde PGE ile elde edilen voltamogramlar, DPV parametreleri: Gerilim adımı, 0.02 V; Modülasyon genliğı,0.08V; Modülasyon süresi,0.04 s;Zaman aralığı,0.4 s.	70
Şekil 4.18 2.5 mg/mL BEVA'nın BR tamponu içinde (pH 2.0- 8.0, 0.02 M NaCl) PGE ile edilen voltamogramlar. DPV parametreleri şekil 4.17'de verilmiştir.	70
Şekil 4.19 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PG elektrot kullanarak elde edilen eğrileri. DPV parametreleri şekil 4.17'de verilmiştir. Kesikli çizgi PBS (pH 3.0) destek elektrolit.	71
Şekil 4.20 BEVA (2.5 mg/mL) E_p ve i_p üzerine pH etkisi. BR (pH 2.0-8.0)	71
Şekil 4.21 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0- 210 s) aralığında farklı biriktirme sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları. DPV parametreleri şekil 4.25'te verilmiştir.....	72
Şekil 4.22 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 V) aralığında farklı biriktirme potansiyeline ait diferansiyel pulse voltamogramları. DPV parametreleri; Gerilim adımı, 0.03 V; Modülasyon genliğı,0.08V; Modülasyon süresi,0.01 s;Zaman aralığı,0.1 s.....	73
Şekil 4.23 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.05 V) aralığında farklı gerilim adımlarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.	74

Şekil 4.24 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.05- 0.1 V) aralığında farklı modülasyon genliklerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.	75
Şekil 4.25 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.05 s) aralığında farklı modülasyon sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.	75
Şekil 4.26 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 s) aralığında farklı zaman aralıklarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.	76
Şekil 4.27 (A) BEVA'nın farklı derişim aralığında (0.1- 0.7 mg/mL) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde kaydedilen DPV değışkenleri: gerilim adımı, 0.03 V; modülasyon genliğı,0.08V; modülasyon zamanı,0.01 s;zaman aralığı,0.1 s. (B): i_p/C BEVA kalibrasyon eğrisi. (DP/DT:+0.3 V/180 s)	77
Şekil 4.28 BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında (0.047 -2.01 mg/mL) standart ilavelerinden sonra idrar numunelerinde DPV voltoramları. Kesikli çizgi, destekleyici elektrolit . DPV parametreleri şekil 4.27'de verilmiştir.	79
Şekil 4.29 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın diferansiyel puls PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) tamponunda. Elektrot aktivasyonu; +1.4 V/60 s (DP/DT:+0.6 V/ 240 s, 600 rpm karıştırma hızı)	80
Şekil 4.30 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4), ABS (pH 4.8) tamponlarında BR (pH 2.0- 7.0) ortamlarında diferansiyel puls voltamogramları. Elektrot aktivasyonu; +1.4 V/ 60 s, (+0.6 V, 240 s İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı)	81
Şekil 4.31 PG yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın (0.0- 0.1 M) aralıklarında NaCl'nin pik sinyali üzerindeki diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).	82
Şekil 4.32 dsDNA'nın 10- 50 µg/ mL derişim aralığında PG yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında diferansiyel puls voltamogramları.	84
Şekil 4.33 20 µg/ mL dsDNA'nın PG elektrot yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında 350- 700 rpm farklı karıştırma hızlarındaki diferansiyel puls voltamogramları.	85

Şekil 4.34 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında (120- 420 s) farklı immobilizasyon zamanlarında diferansiyel puls voltamogramları.	86
Şekil 4.35 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.005- 0.03 V) aralığında farklı gerilim adımlarında diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).	87
Şekil 4.36 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.02- 0.12 V) aralığında farklı modülasyon genliklerinde diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).	88
Şekil 4.37 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.02- 0.12 s) farklı modülasyon sürelerinde diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).	89
Şekil 4.38 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde farklı (0.1- 0.5 s) zaman aralığında diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).	89
Şekil 4.39 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5.0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl çözeltisindeki CV voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s ⁻¹)	91
Şekil 4.40 Yalın PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5,0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri ve devre elemanları... ..	92
Şekil 4.41 (A) Yalın halde PGE (B) 20 µg/mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) 20 µg/mL DNA'nın immobilizasyonu ve 0.2 mg/mL NIVO etkileşimi sonrasında PG elektrotlarına ait SEM görüntüleri.	93
Şekil 4.42 (A) Yalın PGE, (B) 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 0.2 mg/mL NIVO ile etkileşimi sonrasındaki EDX spektrumları.....	94
Şekil 4.43 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın diferansiyel puls voltamogramı, 0.02 M NaCl içeren PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl). (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri: gerilim adımı, 0.02 V; modülasyon genliği, 0.08V; modülasyon süresi, 0.04 s; zaman aralığı, 0.4 s. .	95
Şekil 4.44 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PG elektrot kullanarak elde edilen diferansiyel puls voltogramı. DPV parametreleri şekil 4.13'te verilmiştir.	96

Şekil 4.45 20 µg/ mL dsDNA ile 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde etkileşim sürelerine (30- 210 s) ait diferansiyel puls voltogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.	97
Şekil 4.46 20 µg/ mL dsDNA ve 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde (a) Etkileşim öncesi (b) 150 s, Etkileşim sonrası, diferansiyel puls voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.	98
Şekil 4.47 (A) UV- Vis. Absorbsiyon spectrometresinde (10-100 µg/mL) NIVO (B). 1-10 µg/mL DNA (C). 40 µg/mL NIVO ve) 1-10 µg/mL DNA etkileşimine ait spektrumlar. (D) NIVO ve dsDNA arasındaki etkileşim için bağlanma sabiti için Bensessi-Hildebrand grafiği.....	100
Şekil 4.48 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5,0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 100 mV s ⁻¹)	102
Şekil 4.49 (a) PGE, (b) PGE/dsDNA ve (c) PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5.0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri ve devre elemanları.....	103
Şekil 4.50 (A) Yalın halde PGE (B) 20 µg/mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) 20 µg/mL DNA'nın immobilizasyonu ve 2.5 mg/mL BEVA etkileşimi sonrasında PG elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri.....	104
Şekil 4.51 (A) Yalın PGE, (B) 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 2.5 mg/mL BEVA ile etkileşimine ait EDX spektrumları.	104
Şekil 4.52 20 µg/ mL dsDNA ile 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde etkileşim sürelerine (30- 240 s) ait diferansiyel puls voltogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.	106
Şekil 4.53 20 µg/ mL dsDNA ve 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde (a) Etkileşim öncesi (b) 210 s, Etkileşim sonrası, diferansiyel puls voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.	107

Şekil 4.54 (A) UV- Vis. Absorbsiyon spectrometresinde (50-400 $\mu\text{g/mL}$) BEVA (B). 1-10 $\mu\text{g/mL}$ DNA (C). 100 $\mu\text{g/mL}$ BEVA ve) 1-10 $\mu\text{g/mL}$ DNA etkileşimine ait spektrumlar. (D) BEVA ve dsDNA arasındaki etkileşim için bağlanma sabiti için Bensessi-Hillebrand grafiği..... 109



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1 Antineoplastik ajanların sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2 NIVO'nun genel özellikler	6
Tablo 2.3 NIVO için analiz yöntemleri.....	9
Tablo 2.4 BEVA ve bazı özellikleri	10
Tablo 2.5 Bevasizumab için analiz yöntemleri	14
Tablo 2.6 PG elektrot ile ilaç-DNA etkileşimi ile ilgili çalışmalar.....	23
Tablo 3.1 Kullanılan malzeme ve araç gereçler aşağıdaki gibi listelenmiştir.....	47
Tablo 3.2 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda belirtilmiştir.	48
Tablo 4.1 NIVO tayini için geliştirilen voltametrik yöntem ile elde edilen aletsel değişkenler	66
Tablo 4.2 NIVO barındıran idrar örneklerinde geri kazanım	67
Tablo 4.3 BEVA tayini için voltametrik yöntem ile elde edilen deneysel ve aletsel değişkenler	78
Tablo 4.4 BEVA içeren idrar örneklerinde geri kazanım	79
Tablo 4.5 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5.0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması.	91
Tablo 4.6 EDX spektrumlarında karbon, oksijen, fosfor atomları için elementel ağırlık ve atomik yüzdeleri (A) Yalın PGE (B) PGE' de 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 0.2 mg/mL NIVO ile etkileşiminden sonra.....	94
Tablo 4.7 PG elektrot yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içerisinde 20 µg/ mL dsDNA ve 0.2 mg/mL NIVO etkileşim öncesi ve sonrası adenin ve guanin öncesi ve sonrası değişim.....	98
Tablo 4.8 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5.0 mM [Fe (CN) ₆] ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl içindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mV s ⁻¹)	102
Tablo 4.9 EDX spektrumlarında karbon, oksijen, fosfor atomları için elementel ağırlık ve atomik yüzdeleri (A) Yalın PGE (B) PGE' de 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 2.5 mg/mL BEVA ile etkileşiminden sonra.....	105

Tablo 4.10 PG elektrot yüzeyinde 0.02 M NaCl PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde 20 µg/ mL dsDNA ve 2.5 mg/mL BEVA etkileşim öncesi ve sonrası adenin ve guanin öncesi ve sonrası değişim.....	107
Tablo 5.1 NIVO'nun voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması	110
Tablo 5.2 BEVA'nın voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması	111



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
Pt	Platin
pH	Asit, baz derecesi
NaCl	Sodyum Klorür
SiO ₂	Silika
mV	Milivolt
C _d	Elektriksel Çift Tabaka Direnci
R _s	Elektrolit Çözeltisinin Direnci
R _p	Elektron Aktarım Direnci
W	Warburg Devre Elemanından
ω	Sinüzoidal Frekans
λ	Dalga boyu
K	Bağlanma Sabiti
A ₀	İlaç Absorbansı
ϵ_G	İlacın absorpsiyon katsayısı
ϵ_{H-G}	DNA- İlaç kompleksinin absorpsiyon katsayısı
Δi	Akım farkı
s	Standart sapma
s	Saniye
m	Eğim
Ru	Rutenyum
Co	Kobalt
ΔG^0	Gibbs serbest enerjisi
T	Mutlak sıcaklık
NaOH	Sodyum hidroksit
H ₃ BO ₃	Borik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit

CH₃COOH

Asetik asit

Na₂HPO₄

Di sodyum monohidrojen fosfat

NaCl

Sodyum klorür

HNO₃

Nitrik asit

HCl

Hidroklorik asit

Kısaltma

Açıklama

DNA

Deoksiribo Nükleik Asit

ds DNA

Çift Sarmallı DNA

fsDNA

Balık spermi deoksiribo nükleik sit

EDS/EDX

Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi

CPE

Karbon Pasta Elektrot

GCE

Camsı Karbon Elektrot

SEM

Taramalı Elektron Mikroskobu

SPCE

Perde Baskılı Karbon Elektrot

ÖZET

ANTİKANSER ÖZELLİK GÖSTEREN NIVO VE BEVASİZUMAB'IN KALEM GRAFİT ELEKTROT KULLANARAK VOLTAMETRİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ VE dsDNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

ASLAN, Mehmet

Doktora, Kimya Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Fırat AYDIN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Aralık 2023, 145 sayfa

Bu tez çalışmasında, Nivolumab (NIVO) ve Bevasizumab (BEVA) ilaç etken maddelerinin kalem grafit elektrot (PGE) üzerinde elektrokimyasal davranışlarını ve DNA ile etkileşimlerini değerlendiren bir elektrokimyasal biyo algılama sensörü geliştirilmiştir. PG elektrotunun yüzey karakterizasyonu ve elektrokimyasal özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), elektro impedans spektroskopisi (EIS) ve dönüşümlü voltametri (CV) gibi tekniklerle karakterize edilerek detaylı bir analiz yapılmıştır. NIVO ve BEVA'nın elektrokimyasal davranışları, CV ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemleriyle incelenmiştir. DPV tekniği ile yapılan ölçümlerde, PGE yüzeyinde 0.02 M NaCl içeren PBS (pH 3.0) içerisinde NIVO ve BEVA biriktirilmiştir. NIVO'nun +0.88 V (Ag/AgCl'ye karşı) gerilim değerinde, BEVA'nın ise +0.90 V (Ag/AgCl) gerilim değerinde iyi bir sinyal verdiği belirlenmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal biyo algılama sensörüyle NIVO ve BEVA'nın miktar tayini yapılmıştır. NIVO'nun 0.01-0.07 mg/mL derişim aralığında doğrusal bir yanıt verdiği ve LOD değerinin 2.49 µg/mL, LOQ değerinin ise 8.30 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. BEVA'nın ise 0.1-0.7 mg/mL derişim aralığında doğrusal bir yanıt verdiği ve LOD değerinin 0.026 mg/mL, LOQ değerinin ise 0.086 mg/mL olduğu belirlenmiştir. NIVO ve BEVA moleküllerinin DNA ile etkileşimleri ise karakterize edilen şartlar altında adenin ve guanin sinyalleri üzerinden değerlendirilmiştir. Ayrıca etkileşimlerin UV-Vis. absorpsiyon spektrometresiyle analiz edilerek bağlanma sabitleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, NIVO ve BEVA' nın DNA ile interkalasyon ve elektrostatik bağlanma yoluyla etkileşim gösterdiğini göstermektedir. Bu çalışma, NIVO ve BEVA ilaçlarının elektrokimyasal analizi ve DNA ile etkileşimlerinin anlaşılması için önemli bir katkı sunmaktadır. Geliştirilen elektrokimyasal biyo algılama sensörü, ilaçların hızlı ve duyarlı bir şekilde tespit edilmesini sağlayarak kanser tedavisindeki antikörlerin analitik karakterizasyonunda kullanılabilir. Ayrıca, bu çalışma, elektrokimyasal analiz yöntemlerinin ilaç araştırmalarında ve biyoteknoloji alanında kullanılması potansiyelini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Nivolumab, Bevasizumab, Voltametri, PGE, dsDNA etkileşim

ABSTRACT

DETECTION OF ANTICANCER PROPERTIES OF NIVO AND BEVASIZUMAB BY VOLTAMETRIC METHODS USING PENCIL GRAPHITE ELECTRODE AND INVESTIGATION OF THEIR INTERACTION WITH dsDNA

ASLAN, Mehmet

PhD, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Fırat AYDIN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

December 2023, 145 pages

In this thesis, an electrochemical biosensing sensor was developed to evaluate the electrochemical behavior of Nivolumab (NIVO) and Bevacizumab (BEVA) drug active ingredients on pencil graphite electrode (PG) and their interactions with DNA. The surface morphology and electrochemical properties of the PG electrode were characterized and analyzed in detail by techniques such as scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX), electro impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV). The electrochemical behavior of NIVO and BEVA was investigated by CV and differential pulse voltammetry (DPV). In the measurements using DPV technique, NIVO and BEVA were deposited on the PGE surface in PBS (pH 3.0) containing 0.02 M NaCl. It was determined that NIVO gave a good signal at a voltage value of +0.88 V (vs. Ag/AgCl) and BEVA gave a good signal at a voltage value of +0.90 V (vs. Ag/AgCl). Quantification of NIVO and BEVA was performed with the developed electrochemical biosensing sensor. It was found that NIVO gave a linear response in the concentration range of 0.01-0.07 mg/mL and its LOD value was 2.49 µg/mL and LOQ value was 8.30 µg/mL. BEVA gave a linear response in the concentration range of 0.1-0.7 mg/mL and the LOD value was 0.026 mg/mL and the LOQ value was 0.086 mg/mL. The interactions of NIVO and BEVA molecules with DNA were evaluated based on adenine and guanine signals under the characterized conditions. The interactions were also analyzed by UV-Vis. absorption spectrometry and binding constants were determined. The results show that NIVO and BEVA interact with DNA via intercalation and electrostatic binding. This study provides an important contribution to the electrochemical analysis of NIVO and BEVA and to the understanding of their interactions with DNA. The developed electrochemical biodetection sensor can be used for analytical characterization of antibodies in cancer therapy by providing rapid and sensitive detection of drugs. Furthermore, this study demonstrates the potential of using electrochemical analysis methods in pharmaceutical research and biotechnology.

Keywords: Cancer, Nivolumab, Bevacizumab, Voltammetry, PGE, dsDNA interaction

1.GİRİŞ

Yeni nesil ilaçlarla birlikte yapılan farmosötik çalışmalarda, ilaç DNA etkileşimleri oldukça önemli bir yer tuttuğu görülmektedir. İlaç-protein ve gen ekspresyonu etkileşimlerini inceleyen uzmanlar filter bağlanma, DNA-parmak izi, floresans temelli jel ve hareketlilik geçişi birçok tayin yöntemlerini kullanmaktadır. Ancak bu yöntemlerde doğrudan ölçümler alınmayan sistemlerdir ve bunlarla çalışılırken farklı yöntem, teknik ve stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni nesil ilaçların keşfedilmesi ve onaylanması ilaç-DNA ve protein etkileşimlerinin analizleri için düşük maliyetli sürekli ve hızlı veri alınabilen tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyokimyasal tepkimelerde hedeflenen analitleri belirlemek için kullanılacak küçük algılayıcı sistemlere biyosensör adı verilmektedir. Biyokimyasal ve elektrokimyasal olmak üzere sistemlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Biyokimyasal bölüm, analizi yapılacak maddeyle etkileşime girerek tanıma olayını gerçekleştirilirken, elektrokimyasal bölüm ise tanıma olayına nitelik kazandırarak veriye dönüştürmektedir. Bu teknolojisi eczacılık, tıp, gıda sektörü, ziraat, çevresel kirlilik analizleri gibi farklı alanlarda kullanıldığı görülmüştür (Erdem vd., 2002).

DNA biyosensörleri, DNA'yı teşhis malzemesi olarak kullanan sensörlerdir (genosensörler). Son yıllarda araştırmacılar biyosensör tasarımında nükleik asit bazlı genosensörlerin gelişimini hızlandırmışlardır. Genetiksel veya bulaş riski yüksek hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçların DNA etkileşimi ve etkileşimin yeni yöntemlerle teşhis edilmesi ve hastalıkların tedavisi açısından yeni ilaç tasarımlarında önem arzetmektedir (Erdem vd., 1999).

Etken maddelerin miktar tayinlerinin incelenmesiyle genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı tedavisine yönelik veriler elde edilebileceği gibi bazı ilaçların DNA varlığında elektrokimyasal ölçümlerinin uygulanması ve ilaçların DNA ile etkileşim modlarının belirlenmesi de mümkündür (Kara vd., 2007).

Etken madde tayinleri, DNA da bulunan bazlardan birinin yükseltgenme mekanizmasındaki değişimden olabileceği gibi bu bazlarla etkileşen interkalatör veya hibridizasyon indikatörlerin elektrokimyasal değişimleri ile de belirlenebilir (Bo vd., 2011).

Toksik maddeler ve çevreyi kirleten ajanlara benzer maddelerin dsDNA ile interkalasyonu, dsDNA da bulunan bazlara karşı duyarlı elektrokimyasal genosensör tasarımları geliştirilmiştir. Bir maddenin dsDNA ile etkileşimi sonrasında DNA'yı değişime uğratarak meydana gelen ürünlerin erken aşamada teşhisleri kanser ve benzer hastalıkların araştırmaları ve tedavi süreçleri için önem arz etmektedir. Bundan dolayı genosensör tasarımları geliştirilecek yeni nesil ve kişiye özgü ilaçların geliştirilmesi ve tedavilerinde kullanımlarının önünü açacaktır.

Elektrokimyasal tayinler, etken maddelerin DNA ile etkileşim mekanizmasının türüne göre etken maddenin sinyalindeki değişim veya DNA'daki genelde elektroaktif bazlar olan Adenin ve Guanin bazlarındaki değişimlerde belirlenmektedir. Bu amaçla DNA'nın immobilize olduğu farklı çalışma elektrotlarıyla; kalem grafit elektrotlar (PGE), camı karbon elektrotlar (GCE), bor katkılı elmas elektrot (BDDE), altın elektrotlar (AuE), platin elektrotlar (Pt) ile eser miktarlarda dahi güvenilir, hasas sonuçlar vermektedir (Gerard vd., 2002).

Çalışma elektrotları farklı maddeler ile modifiye etmek için kullanılacak malzemenin ilk başta iletkenliği, optik, çevreye duyarlı, biyolojik özellikleri, kolay hazırlanmaları ve geniş uygulama potansiyellerinden dolayı araştırmacıların çalışmalarında kullanmalarının önünü açmaktadır (Gerard vd., 2002).

Biyosensör yapımında sentezlenecek olan elektrokimyasal olarak aktiflikleri bulunan malzemeler, sensörlerin seçiciliğini, hızını ve duyarlılığını geliştirmekle beraber iyi bir çalışma ortamı sağlarlar. Farklı alanlar olan biyoteknoloji, çip teknolojisi, klinik, tarım ve çevre alanlarında farklı maddelerin analizleri için biyosensörler tasarlanıp geliştirilmiştir (Vidal vd., 2003). Son yıllarda genosensörler elektrokimyasal olarak aktif fonksiyonel uç içeren maddelerin sentezlenmektedir. (Sui vd., 2013; Feng vd., 2011). Bu maddelerin amin ($-NH_2$), tiyol ($-SH$), karboksil ($-COOH$), hidroksil ($-OH$) içeren fonksiyonel gruplara DNA'nın bağlandığını öne sürmüşlerdir (Rahman vd., 2015).

Tez çalışması üç aşama altında planlanmaktadır.

İlk aşamada;

Nivolumab (NIVO) ve Bevasizumab (BEVA) ilaç etken maddelerinin tayini için prosedür geliştirilecektir. Bu amaçla voltametrik teknik seçimi, çalışma elektrotu, uygun çalışma ortamı, aletsel parametreler belirlenip uygun çalışma aralığında miktar tayini yapılacaktır.

İkinci aşamada;

DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu ve sensör çalışması gerçekleştirilecektir. Bu amaçla cihaz parametreleri, çalışma ortamı, optimum DNA derişimi, immobilizasyon süresi, biriktirme süresi ve potansiyeli, karıştırma hızı, NaCl derişimi belirlenip optimum immobilizasyon parametreleri belirlenecektir.

Üçüncü aşamada;

Belirlenen yöntem, ortam ve parametreler ile NIVO ve BEVA ilaç etken maddelerinin DNA etkileşim çalışması yapılacaktır. Elektrot aktivasyonu ile optimum derişimde DNA elektrot yüzeyine immobilize edilecektir. NIVO ve BEVA etken maddeleri, belirlenecek etkileşim süreleriyle elektrot yüzeyine tutturulacaktır ve DNA'da bulunan adenin, guanin bazlarının yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimler incelenecektir. Oluşan yalın elektrot, DNA immobilize olmuş elektrot ve DNA ile etken maddelerin etkileşime geçtiği elektrotlar belirlenip yüzey karakterizasyonu yapılacaktır. Bu amaçla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX), Dönüşümlü Voltametri (CV) ve Elektro İmpedans Spektroskopisi (EIS) tekniklerinden faydalanılacaktır. UV-Vis. spektrometresiyle ilaçların DNA etkileşim modları, bağlanma sabitleri ve enerjileri belirlenecektir. Bu veriler voltametrik teknik ile elde edilen veriler ile karşılaştırılıp desteklenecektir. Çalışmanın en sonunda ise NIVO ve BEVA içeren ilaçların ticari preparatlarında ve serum ortamlarında tayini araştırılacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kanser

Kanser, modern tıp alanında en çok çalışma, araştırma ve geliştirme yapılan hastalıkların başında gelir. Bu yoğun ilgi, kanserin dünya genelinde ciddi bir sağlık sorunu olması ve yüksek ölüm oranlarıyla ilişkilendirilmesinden kaynaklanır (Ölgen vd., 2002). Kanser, vücutta hücrelerin kontrolsüz çoğalmasının neden olduğu 100'den fazla hastalık barındıran bir mekanizma olarak karşımıza çıkar. Kanser klinik olarak, ortaya çıktıkları hücre tipine göre değişim sergileyen çok sayıda farklı hastalıkla ilişkili bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Kanserler farklı yaş gruplarında, büyüme hızı, yayılma, evre ve tedaviye yanıt açısından farklılık gösterir. Öyle olsa bile, tüm kanserler, onları tek bir ailede birleştirmenin ortak karakteristik özelliğini paylaşır. Bütün kanser hücreleri kendilerine ait iki ana özelliği paylaşır.

Düzensiz hücre bölünmesi ve büyümesidir.

Normal sınırlar içinde, anormallikler hücrelerin yayılmasını ve vücudun diğer bölümlerine girmesini önler. Normal hücrelerde uygun zaman, yer ve şekilde ifade edilen genler bu görevleri kontrol eder. Kanserde kullanılan tedavi yöntemleri üç ana başlıkta toplanabilir;

1. Cerrahi Girişim
2. İlaçla Tedavi
3. Işın Tedavisi

Tümör (neoplastik) hücreleri başlangıçta cerrahi veya radyasyon tedavisi yoluyla büyümelerini yavaşlatmak için azaltılır. Daha sonra kemoterapi, immünoterapi veya bu tedavilerin bir kombinasyonu uygulanır. Kanser tedavilerinde amaç, tümörün büyümesini, farklı odaklarda yeniden büyümesini ve tümörün tamamen ortadan kaldırılmasını önlemek için kullanılan ilaçlarla sitotoksik etki sağlamaktır. Kemoterapi (antineoplastik) tedavisinin temel amacı, tümör hücresi büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse hastanın veya konağın normal hücrelerine zarar vermeden onları yok etmektir. Ancak bu ilaçların seçiciliği çok düşüktür. Bu nedenle son zamanlarda popüler hale gelen immünoterapi ilaçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser immünoterapisinin amacı, bağışıklık kontrol noktalarını inhibe ederek karmaşık bir bağışıklık sisteminde bağışıklık hücresi aktivitesini kontrol etmektir. Öte yandan,

immün kontrol noktası inhibitörlerinin yan etkileri vardır. Birçok çalışma kanser bağışıklığının anlaşılmasına katkıda bulunmuştur; ancak, karmaşık tümör mikroçevresini ve çeşitli tümör doku tiplerini dikkate alan ayrıntılı bir mekanizmaya dayalı immünoterapi gerekecektir. Bu tezde, kimyasal ve farmakolojik özellikleri aşağıda listelenen iki antikanser ajan ile voltametrik çalışmalar yapılmıştır. Tablo 2.1'de ilaç tedavisinde kullanılan antineoplastik ajanların mekanizmalarına göre kategorilenmiştir.

Tablo 2. 1 Antineoplastik ajanların sınıflandırılması

Alkilleyici ajanlar	Altretamin, Semustin, Dakarbazin, Busulfan, Siklofosamid, Mekloreタミン, Klorambusil, Melfalan, İfosamid, Aziridin, Lemustin, , Prokarbazin, Karmustin,
Antimetabolitler	5-Fluorourasil ,Metotreksat, Aminopterin, Raltitrekseid ,Kladribin, Merkaptopurin, Tioguanin, Gempitabin, Fludarabin, Sitarabin
Bitkisel kaynaklı formülasyonlar ve Vinka alkaloidleri	Vinblastin, Vinkristin, Vindesin, Vinorelbin, Podofilotoksin, Etoposid, Tenipozid, Paklitaksel, Dosetaksel, İrinotekan, Topotekan,
Sitotoksit antiyobiyotikler	Aknitinomisin-D, Daunorubisin, Adriamisin, Epirubisin, Aklarubisin, Mitozantron, Bleomisin, Plikamisin Mitomisin,
Platin bazlı formülasyonlar	Sisplatin, Karboplatin, Oksaliplatin, Amifostin,
Hormon antagonistleri ve hormonlar	Estrojenler, Progestinler, Antiöstrojenler, Antiandrojenler, GnRH analogları, Glukokortikoid Hormonlar, Mitotan, Aminoglütetimid, Trilostan, Bikalutamid
İmmün sistemli formülasyonlar	Nivolumab, Bevasizumab, Adalimumab, İpilimumab, Pembrolizumab, Omalizumab, Trastuzumab, Natalizumab, Panitumumab, Ramucirumab, Pertuzumab

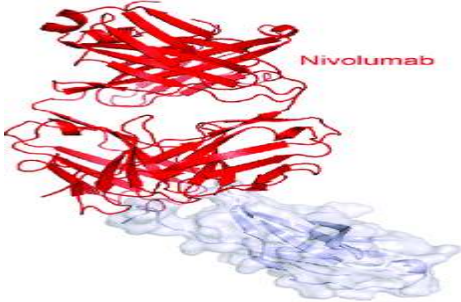
2.1.1 Nivolumab (NIVO)

NIVO, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini hedef almasına ve öldürmesine yardımcı olan bir immünoterapi ilacıdır. Immünoterapi, bağışıklık sistemi veya bağışıklık yanıtının prensiplerini kullanarak kanserle mücadele etmek için kullanılan nispeten yeni bir kanser tedavi yöntemidir. Bu tedavi stratejisi, vücudun bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıması, hedeflemesi ve elimine etmesi üzerine odaklanmaktadır.

NIVO iki özdeş ağır zincirden (her biri 440 amino asit) oluşur, bu zincirler arası di sülfür bağlarıyla bağlanır ve anti tümör bağışıklığını geri kazandıran, tamamen insanlaştırılmış bir IgG4 monoklonal antikordur. Cerrahi olarak çıkarılamayan veya diğer ilaçlara artık yanıt vermeyen metastatik melanomu olan hastalarda kullanım için etkilidir.

Kanser İmmünoterapi, vücudun bağışıklık sisteminin anti-tümör yanıtı indüklemek ve böylece hastalıkları yenmek için kullanıldığı, farklı terapötik seçenekler arasında çok önemli bir stratejidir. Kanser tedavisinde adaptif hücre transferi, immün kontrol noktası inhibitörleri, onkolitik virüs, aşılar, monoklonal antikorlar ve diğerleri gibi çeşitli immünoterapi türleri kullanılmıştır. Bunlar arasında monoklonal antikorlar (mAb), klinik olarak ilgili etki mekanizmaları nedeniyle dikkat çekmiştir (Machini vd., 2019).

Tablo 2.2 NIVO'nun genel özellikler

Genel özellikleri	
	Formül $C_{6362}H_{9862}N_{1712}O_{1995}S_{42}$
	Mol ağırlığı: 143599,39 g/mol
	Kategori: Antineoplastik immünolator ajan
	Fiziksel görünüş: Toz, kirli beyaz
Saklama koşulları: -20 °C	

NIVO için uygulanan elektrokimyasal yöntemler:

Monoklonal antikorlara dayalı kanser tedavisi, en başarılı terapötik stratejilerden biri haline geldi. Monoklonal antikorlar arasında NIVO nispeten yeni bir antikanser ilaç olarak öne çıkıyor. dsDNA NIVO etkileşimi, inkübe edilmiş çözeltilerde diferansiyel puls voltametri, UV-Görünür spektrofotometri ve jel elektroforezi ile ve yerinde ds DNA-, poli [G]- veya poli [A] elektrokimyasal biyosensörler ile diferansiyel puls voltametri ile değerlendirildi. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ve kuvars kristali mikro terazi ds DNA elektrokimyasal biyosensörün arayüz davranışı da döngüsel voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile araştırıldı. dsDNA NIVO etkileşim mekanizması, daha kısa süreler için NIVO' nun DNA'ya bağlanmasına neden olarak bir dsDNA NIVO kompleksine ve daha uzun süreler için bu karmaşık yapının gevşemesine neden olmuştur. Monoklonal antikor NIVO, DNA'ya oksidatif hasarı tespit edilmedi (Machini vd., 2019).

NIVO için uygulanan diğer analiz yöntemleri:

LC-MS / MS yöntemine bağlı bir LC, terapötik monoklonal antikorun kantitasyonu için yeni bir yaklaşım olduğu bununla birlikte, bu yöntemde ciddi iyonlaşma bastırma ve zaman alan numune hazırlama vardır. Yapılan çalışmada, immünoglobulin G4 (IgG4) saflaştırma ve hareketsizleştirilmiş triptik sindirimi kullanarak iyi analitik performansla serum NIVO'ın ölçmek için basit ve hızlı bir LC-MS / MS yöntem geliştirdi (Abe vd., 2020).

Nano yüzey ve moleküler yönelim sınırı (nSMOL) stratejisi, proteaz nanopartikülü (200 nm) ve antikor reçinesi gözeneği (100 nm) arasındaki boyut farkını kullanan seçici sınırlı proteoliz yöntemi ile insan plazmasındaki NIVO'ın tamamen doğrulanmış bir LC-MS analizine uyguladı. İmmünoglobulin fraksiyonu, Protein A reçinesi kullanılarak toplandı. Çalışmada, nSMOL biyo analizinin NIVO ve diğer antikor ilaçlarının klinik farmakokinetik çalışmaları için güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Iwamoto vd., 2016).

On dört terapötik monoklonal antikor (mAb), bir Fc-füzyon proteini ve diğer birkaç yaygın glikoprotein, glikoproteinlerin FTIR spektrumlarının glikan ve monosakkarit bileşimlerine göre spektral varyasyonlar gösterdiğini göstermek için kullanılmıştır (Derenne vd., 2020).

NIVO' nun fizikokimyasal kararlılığı değerlendirmek için ultraviyole (UV) - spektroskopi, dinamik ışık saçılımı ve kromatografisi kullanılıp, farmakolojik varyasyonlar içinde, bir fonksiyonel bağlanma inhibisyon yöntemi ile in vitro izlenilmeye çalışıldı (Le Guyader vd., 2020).

LC-MS / MS kullanarak NIVO için kantifikasyon yöntemi geliştirmek ve bunun klinik terapötik ilaç izlemedeki uygulaması değerlendirildi (Irie vd., 2018).

NIVO için literatürde yapılmış kromatografik ve spektroskopik yöntemler Tablo 2.3'te bildirilmiştir.

Tablo 2.3 NIVO için analiz yöntemleri

Madde	Yöntem	Dedektör	LOD/LOQ	Matris	Kaynak
Nivolumab	LC-MS	MS	2 µg/L	Serum	(Abe vd., 2020)
Nivolumab	TM	UV-Spect	-	Nivo çözeltisi	(Guyader vd.,2020)
Nivolumab	LC-MS	MS	0.977 µg /mL	Plazma	(Iwamoto vd.,2016)
Nivolumab	LC-MS	MS	-	Plazma	(Irie vd., 2018)
Nivolumab	CV-EIS	GCE	-	Nivo çözeltisi	(Machini vd., 2019)
Nivolumab	DPV	GCE	-	Nivo çözeltisi	(Machini vd., 2019)
Nivolumab Bevasizuma	FTIR	-	-	İlaç	(Derenne vd.,2020)
Nivolumab Bevasizuma	LC-MS	MS	-	Plazma	(Chiu vd., 2018)
Pembrolizub					
Nivolumab	LC-MS	MS	-	Plazma	(Irie vd., 2018)

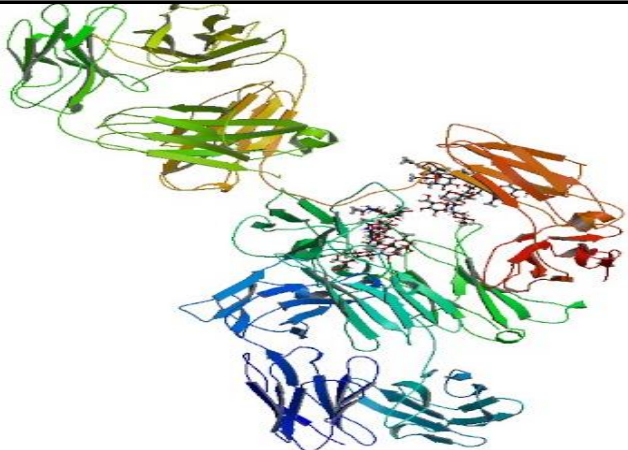
Yöntem: LC; sıvı kromatografisi, DPV; Diferansiyel puls voltametri, CV; Dönüşümlü voltametri HPLC, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, TM; Türbidimetri **Dedektör:** UV; Ultraviyole, EIS; Elektro impedans spektroskopisi, MS; kütle spektrometresi, GCE; Camı karbon elektrot

2.1.2 Bevasizumab (BEVA)

Kanserin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, klasik kemoterapi ve radyoterapiye kıyasla potansiyel olarak daha etkili ve yan etkileri azalmış çok sayıda yeni antikanser tedavisinin yolunu açtı. Monoklonal antikorlar (mAb), daha spesifik ve daha etkili terapötik özellikleri nedeniyle özel ilgi çekmiş ve kanser tedavisi için en umut verici stratejilerden biri haline gelmiştir. Bir antikor olan BEVA, çeşitli kanser türlerini ve belirli bir göz hastalığını tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. BEVA,

vasküler endotelyal büyüme faktörü A'yı (VEGF-A) hedefleyen rekombinant insanlaştırılmış bir IgG1 antikordur (%93 insan, %7 murin sekansları). BEVA, VEGF-A molekülünü inhibe ederek, anjiyogenezi bloke eder ve tümörlerin kan akışını sınırlar, böylece büyümesini yavaşlatır veya kesintiye uğratar (Issaad vd., 2016). BEVA, ileri kolorektal kanseri tedavi etmek için ilk olarak 2004 yılında FDA tarafından onaylanmış bir intravenöz ilaçtır. Etkili antikanser ilaçlar olarak monoklonal antikorların geliştirilmesi ve uygulanmasında, fizyolojik etki mekanizmalarında yer alan reaksiyonların incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin değerli bir araç olduğu kanıtlanmıştır ve bunların ve klinik onkolojide kullanılan diğer ilaçların in vitro davranışları söz konusu olduğunda sağlam bir iç görü elde etmeyi sağlamıştır.

Tablo 2.4 BEVA ve bazı özellikleri

Genel özellikleri	
	Kimyasal formülü: $C_{6638}H_{10160}N_{1720}O_{2108}S_{44}$
	Molar kütle: 149198,87 g/mol
	Kategori: Antineoplastik immünolator ajan
	Fiziksel görünüş: Renksiz soluk kahverengi, steril, pH 6.2 çözelti
	Saklama koşulları: -20 °C

BEVA için uygulanan elektrokimyasal yöntemler:

Doğal ve denatüre BEVA' nın elektrokimyasal oksidasyonu, geniş bir pH aralığında ve camı bir karbon elektrot üzerinde BEVA-ince film voltametri kullanılarak çözelti içinde incelenmiştir. Doğal BEVA için, tirozin ve triptofan amino asit kalıntılarının oksidasyonuna karşılık gelen sadece bir pH bağımlı oksidasyon zirvesi gözlemlendi. BEVA'nın camı karbon yüzeyindeki arayüzey davranışı ve adsorpsiyonu voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile değerlendirildi. Protein 3D morfolojik

yapısının açılması, kimyasal maddeler, denatüre edici madde sodyum dodesil sülfat ve redüktanlar tris (2-karboksietil) fosfin ve ditiyotritol ile denatürasyonu elektrokimyasal olarak karakterize edildi. GCE üzerindeki denatüre BEVA-ince film'nin elektrokimyasal oksidasyonu, sistein ve histidin kalıntıları oksidasyon zirveleri gösterdi (Issaad vd., 2016).

Antikanser monoklonal antikor BEVA çift sarmallı DNA (ds DNA) ile etkileşimi, inkübe edilmiş örneklerde voltametri ve jel elektroforez ile ve ds DNA elektrokimyasal biyosensör kullanılarak çalışıldı. Voltametrik sonuçlar, artan inkübasyon süresiyle dsDNA oksidasyon zirvelerinde bir azalma ve kaybolma ortaya çıkardı ve BEVA'nın dsDNA'ya bağlandığını ancak elektrokimyasal olarak DNA oksidatif hasarı tespit edilmediği belirtildi. Denatüre edici olmayan agaroz jel-elektroforez deneyleri, kompakt dsDNA BEVA eklentisinin oluşumunu gösteren voltametrik sonuçlarla uyumlu olduğu, inkübe edilmiş çözeltilerdeki dsDNA elektrokimyasal biyosensör, BEVA'nın ayrıca dsDNA'ya bağlanması üzerine yapısal modifikasyona uğradığını gösterdiği ve BEVA elektroaktif amino asit kalıntıları oksidasyon zirveleri tespit edildi (Tomé vd., 2015).

Nano yapıli mezo gözenekli silika (SiO₂) filmler, in vitro olarak monoklonal antikor BEVA yüklemek ve serbest bırakmak için biyo uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir mezo gözenekli SiO₂ formu, tek kristalli Si'nin elektrokimyasal aşındırması ve ardından 800 °C'de havada termal oksidasyon ile hazırlanmıştır. Gözenekli SiO₂, fizyolojik pH'ta (7.4) negatif bir yüzey yükü sergilediği ve pozitif yüklü antikoru sulu bir fosfat tamponlu salin solüsyonundan kendiliğinden adsorbe etmesine izin verdiği araştırılmıştır. İlaç yüklemesi, ince gözenekli filmin optik interferometri ölçümleriyle izlenmiştir (Andrew vd., 2010).

Erken kanser teşhisi, metastazın önlenmesi için çok önemlidir. Ancak kanserin teşhis ve değerlendirmesini iyileştirmek için basit ve etkili yöntemlere ihtiyaç vardır. Burada, kanser teşhisi için insan plazmasındaki vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) saptamak için manyetik grafen oksit (MGO) -modifiye Au elektrotuna dayalı yeniden kullanılabilir bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu biyosensörde, özel biyo tanıma ögesi olarak BEVA kullanılmış ve BEVA yüklemesi için taşıyıcı olarak MGO kullanılır. MGO kullanımı, biyo aktivite kaybını önleyen manyetik özellikleri sayesinde hızlı

saflaştırma sağladığı. Ayrıca, biyosensör, saptamaya devam etmek için uygun olan bir kurutma işlemi gerektirmeden hızlı bir şekilde oluşturulabilir. Yeniden kullanılabilir biyosensör, klinik teşhisler için uygun hassasiyeti sağlayan bir algılama stratejisi sağladığı görülmüştür (Lin vd., 2015).

BEVA için uygulanan diğer analiz yöntemleri:

Hastanede monoklonal antikor (mAb'ler) bileşimi sürekli olarak artar. Kantifikasyona ve tanımlamaya dayalı olarak bileşik mAb'lerin kalite kontrolü (QC), potansiyel hataları önlemek için gereklidir ve ayakta tedavi kemoterapi uygulamasını yönetmek için hızlı bir yöntem gereklidir. Analizör yazılımından yayınlanan en küçük kare eşleştirme yöntemiyle ilişkili akış enjeksiyon analizini kullanan basit ve ultra hızlı (30 saniyeden az) bir yöntem gerçekleştirildi ve üç bileşik bevacizumab, infliksimab ve rituksimab için mAb'nin rutin hastane QC'si için değerlendirildi. Yöntem kalitatif ve kantitatif parametrelerle değerlendirildi. UV emiliminin ön analizi ve mAb'lerin ikinci türev spektrumları, analitik koşulları mAb'lerin terapötik aralığına göre uyarlanmasına izin verdiği, Kantitatif kalite kontrol açısından doğrusallık, doğruluk ve kesinlik ICH kılavuzlarında belirtildiği gibi değerlendirildi. Niteliksel analitik parametreler ayrıca bir karışıklık matrisi aracılığıyla özgünlük, duyarlılık ve global kesinlik açısından değerlendirildi (Jaccoulet vd., 2018).

Monoklonal antikor (mAb) ilaçları, çeşitli hastalıkların tedavisi için son yıllarda büyük ilgi uyandırmıştır. İmmünoglobulin G (IgG), Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış yüksek bir mAb ilaç yüzdesini temsil eder. Terapötik ilaç izlemeyi ve farmako-kinetik / farmakodinamik çalışmaları kolaylaştırmak için, insan plazmasındaki IgG bazlı mAb'lerin konsantrasyonunu ölçmek için genel LC-MS / MS yöntemi geliştirdi. Yöntemimizi göstermek için IgG bazlı üç ilaç (Bevacizumab, NIVO ve Pembrolizumab) seçildi. Protein G boncukları, IgG bazlı ilaçları yakalama konusundaki evrensel yeteneklerinden dolayı numune ön tedavisi için kullanıldı. Tripsin sindiriminden sonra elde edilen vekil peptitler, LC-MS / MS kullanılarak ölçüldü (Chiu vd., 2018).

Terapötik proteinlerin şarj varyantı geleneksel olarak kapiler elektroforez veya iyon değişim kromatografisi ile gerçekleştirilir. Son zamanlarda, kılcal elektroforezin kütle spektrometresi ile hecelenmesindeki gelişmeler ve kütle spektrometrisiyle uyumlu

arka plan elektrolitlerinin kullanıma sokulması, elektroforetik ayırmadan elde edilen yük varyant profilinin doğal kütle spektrometrik tespitinin uygulanmasına izin vermiştir. Mikro akışkan elektroforetik platformun düşük akış operasyonu, kapilerde 1 ng kadar düşük numune miktarları kullanıldığında bile, kütle spektrometrik duyarlılığı önemli ölçüde artırdığı ve dinamik aralığını artırır. Genel olarak, CE-ESI-MS platformunun terapötik protein yükü varyantı profillemesi için hızlı ve sağlam bir araç olduğu kanıtlandığı ve oldukça bilgilendirici karakterizasyon verilerinin oluşturulması için doğal kütle spektrometresi ile verimli birleştirme yapıldı (Carillo vd., 2020).

Tümör kan damarlarının büyümesini engelleyen bir anti-vasküler endotelial büyüme faktörüdür (anti-VEGF). Günümüzde saflaştırması, çok pahalı bir ligand olan protein A kullanılarak afinite kromatografisi (AC) ile elde edilmektedir. Öte yandan, VEGF fragmanında bulunan peptit BEVA yüksek afansite ile bağlanır. Bu kısa peptid ligandı, protein A'dan daha yüksek stabiliteye ve daha düşük maliyete sahip ve katı faz peptid sentezi ile çok kolay bir şekilde hazırlanabildiği gözlenmiştir (Barredo vd., 2020).

BEVA' nın farklı ilaç dağıtım sistemlerine dahil edilmesi, ayrıca biyolojik sıvılar ve ilaç dağıtım sistemleri de dahil olmak üzere BEVA' nın kalitatif ve kantitatif analizleri için yöntemler hakkında detaylı araştırma yapılmıştır. Bu amaçla, son zamanlarda çeşitli detektörlerle birleştirilmiş HPLC, LC, MS ve ELISA kullanılmıştır. Bu nedenle, bu inceleme, nanoyapılı sistemler tarafından taşınan BEVA' nın faydalarını ve bu ilaçların tespiti ve kantifikasyonu için mevcut analitik yöntemleri değerlendirmek için kan ve ilaç üzerinde çalışma yapılmıştır (Filippo vd., 2021).

Terapötik monoklonal antikorlar (mAbs) olan BEVA, İnfliksimab ve Trastuzumab'ın nicelleştirilmesi için uygun ve güvenilir bir yöntem geliştirmek amacıyla diyot dizisi saptama HPLC/DAD yöntemi ile yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi ile çalışıldı. Daha sonra yöntem, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik) özgüllük (zorunlu bozunma çalışmaları ile), sağlamlık ve sistem uygunluğu açısından değerlendirildi (Martínez-Ortega vd., 2018).

BEVA için literatürde yapılmış kromatografik ve spektroskopik analiz yöntemleri Tablo 2.5'te sunulmuştur.

Tablo 2.5 Bevasizumab için analiz yöntemleri

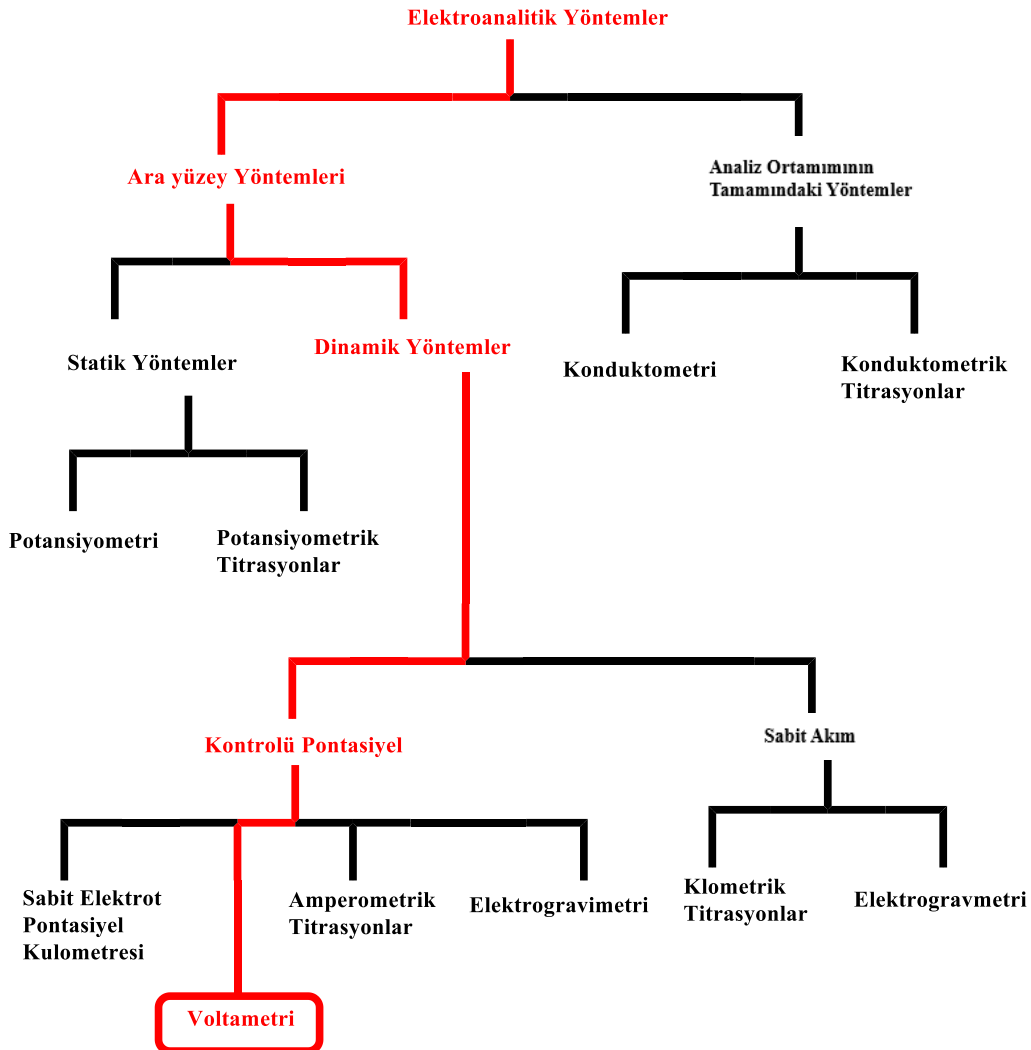
Madde	Yöntem	Dedektör	LOD	Matris	Kaynak
		r			
Bevasizumab	LC-MS	MS		Plazma	(Chiu vd.,2018)
Nivolumab			-		
Pembrolizub					
Bevasizumab	UV-Spek.	-	-	Plazma	(Jaccoulet vd., 2018)
İnfliksimab					
Rituksimab					
Bevasizumab	DPV	GCE	-	Plazma	(Issaad vd., 2016)
Bevasizumab	DPV	MGO-Au	-	Plazma	(Lin vd., 2015)
Bevasizumab	CE-ESI	MS	-	İlaç	(Carillo vd., 2020)
Trastuzumab					
Rituksimab					
Bevasizumab	AC	-	-	Protein A	(Barredo vd., 2020)
Bevasizumab	HPLC/LC-ELISA/M		-	İlaç-Kan	(Filippo vd., 2020)
	S				
Bevasizumab	HPLC	DAD	-	Plazma,	(Ortega vd., 2018)
İnfliksimab				Serum	
Trastuzumab					

Yöntem: AC: Afinite kromatografisi, ELISA: Enzim bağlı immünosorbent deneyi, LC; sıvı kromatografisi, DPV; Diferansiyel puls voltametri, CV; Dönüşümlü voltametri HPLC, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, TM; Türbidimetri **Dedektör:** DAD: Diyot dizi sınırlama, UV; Ultraviyole, EIS; Elektro impedans spektroskopisi, MS; kütle spektrometresi, GCE; Camsı karbon elektrot

2.2 Elektrokimya

Kimyasal süreçler ile elektrik enerjisi arasındaki bağlantının incelenmesi elektrokimya olarak bilinir. Elektrokimya, elektrik ve kimyanın nasıl bir ilişki içinde olduğu ve tipik olarak akım, potansiyel veya yük gibi elektriksel özellikler sağlar. Çevresel analiz, kalite kontrol ve biyolojik uygulamalar, elektrokimyasal ölçümlerin analitik amaçlar için en sık kullanıldığı alanlardır (Wang, 2006).

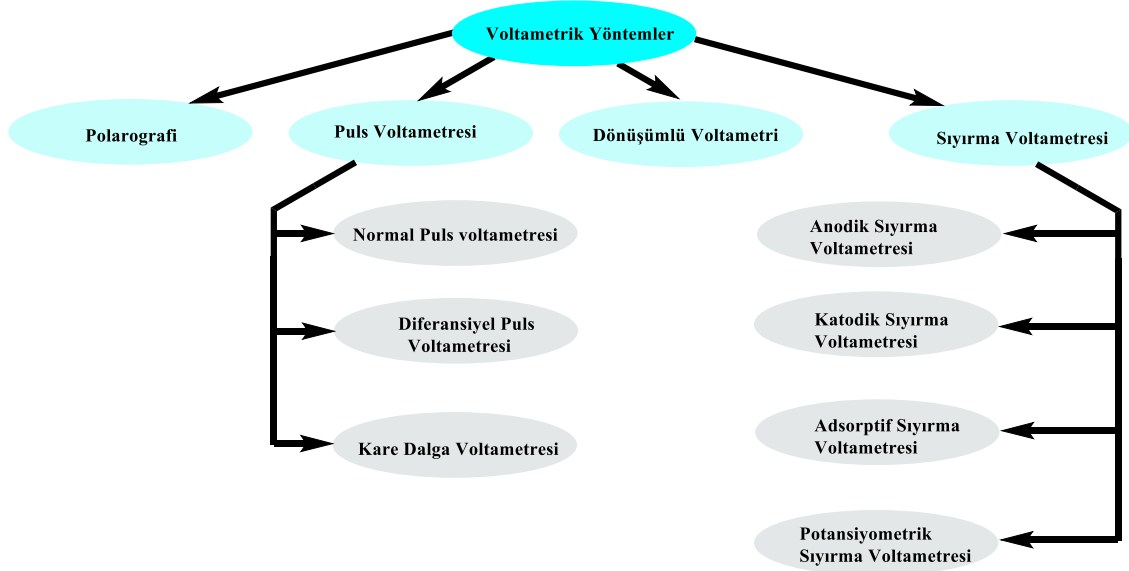
Bir akımın var olup olmamasına bağlı olarak, elektrokimyasal süreçler sabit veya hareketli olarak sınıflandırılabilir. Sabit yöntemlerin hızı ve seçiciliği ayrı bir öneme sahip olsa da, dinamik akım türleri elektroanalitik kimyada daha sık kullanılır. Şekil 2.1 bu tekniklerin bir özeti aşağıda sunulmaktadır.



Şekil 2.1 Yaygın kullanılan elektroanalitik yöntemler

2.2.1 Voltametri

Voltametri, çalışılan madde hakkında veri elde etmek için çalışma elektrodunun polarize koşulları altında elektroda uygulanan gerilim ve akımı ölçen bir elektroanalitik prosedürler topluluğudur. Şekil 2.2'de bu stratejiler sunulmuştur.

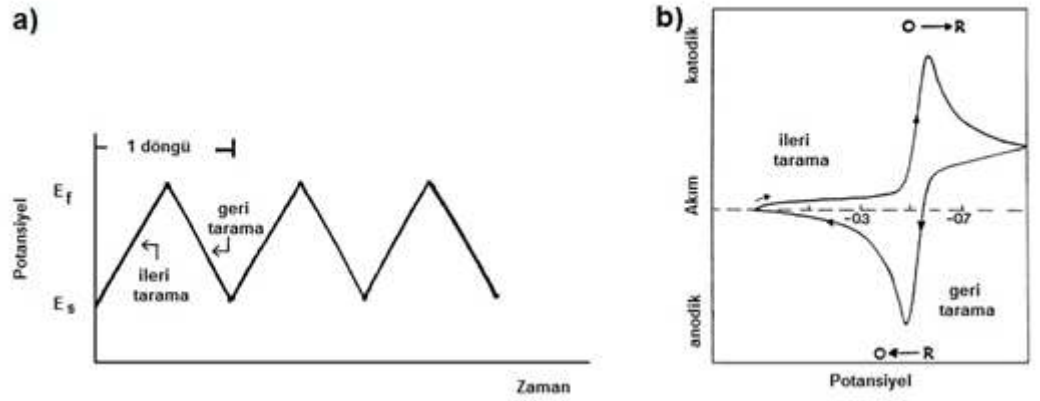


Şekil 2.2 Voltametrik teknikler ve sınıflandırılması

2.2.2 Dönüşümlü Voltametri (CV)

CV tekniği, akım potansiyelin fonksiyonu olarak değerlendirilir. Potansiyel değerler dönüşümlü olarak taranır ve akımdaki değişim sürekli değişen potansiyel değerlere karşı düzenli aralıklarla çizilir. Bunlar CV voltammogramları olarak adlandırılır (Şekil 2.3).

Üçlü elektrot sistemine sahip sakin bir sistemde, dönüşümlü Voltametri difüzyona bağlı olarak hızı değiştirerek çalışır. Voltammogram, maddenin indirgenmesi ve yükseltgenmesi hakkında bilgi sağlar. Potansiyel, başlangıç değerine doğrusal olarak düşmeden önce maksimum bir değere yükselir. Analit bileşimine bağlı olarak, ilk tarama yönü pozitif veya negatif olabilir.



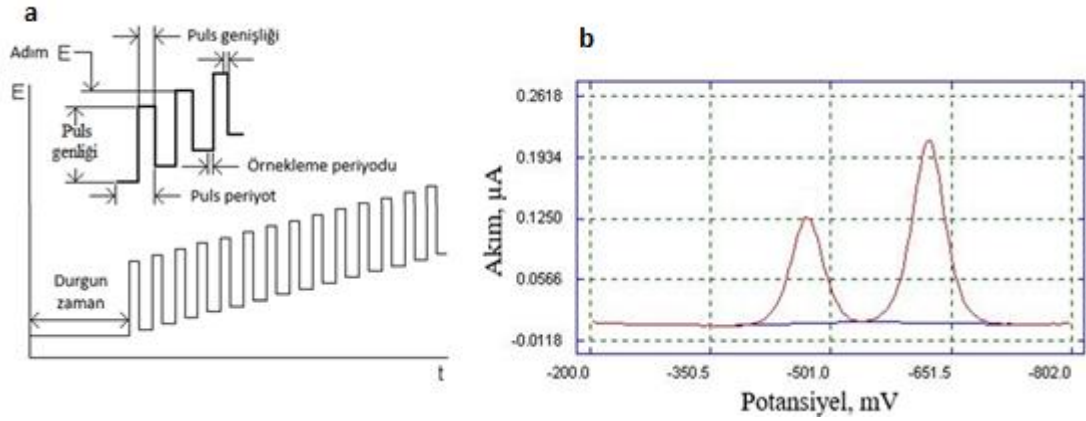
Şekil 2.3 (a) CV'de zamana karşı uygulanan gerilim grafiği;(b) CV'de akım-gerilim grafiği.

Bu yöntem miktar belirleme için uygun olmasa da maddenin davranışı hakkında bilgi verir. Bu teknikle üretilen voltammogramlar, oksidasyon veya redüksiyonun gerçekleştiği gerilim, mekanizmadaki adım sayısını, maddenin yüzeyde tutulmasını, tersinir olup olmadığını, elektrot reaksiyonunun kimyasal bir reaksiyonla birlikte gerçekleşme durumu ve oksidasyon veya redüksiyon ürünlerinin kararlı olup olmadığını belirlemek için kullanılabilir.

2.2.3 Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Normal bir puls Voltametri pulsunun sonunda elde edilen akımın küçük bir sığa bileşeni keşfedilmiştir. Diferansiyel puls voltametri, ölçülen akımdaki sığa bileşenini azaltmak ve seçiciliğini artırmak için bir pulsun akımlardaki farklılıkları ölçmek için kullanılan bir tekniktir.

DPV tekniği kullanılarak, yarı dalgaya ait potansiyeller 0.04 ile 0.05 V arasında değişen maddelerde bile farklı konumlarda maksimum pikler elde edilebilir. Diferansiyel puls polarografi, 10^{-7} - 10^{-8} M tespit limiti ve yüksek seçiciliği ile standart puls polarografiden daha hassas bir yöntemdir.

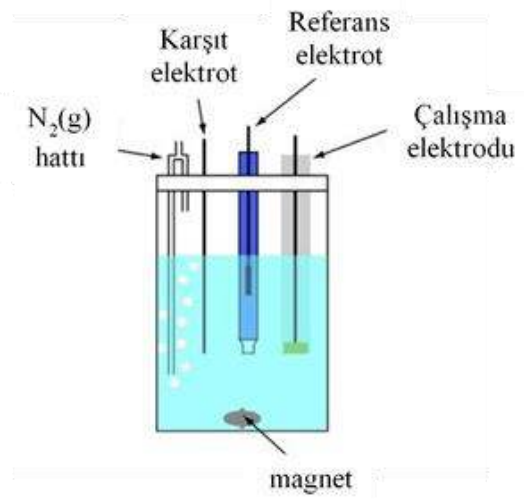


Şekil 2.4 (a) Analog cihazlarda DPV'e ait uyarma sinyali; (b) DPV voltamogramı

Bir damla civaya 10 mV veya 50 mV büyüklüğünde bir darbe uygulandığında, belirli bir süre öncesinde ve sonrasında darbe başına (Δi), doğrusal olarak artan potansiyel kaydedilir. Bu potansiyelin yüksekliği, derişimle orantılı olan bir diferansiyel eğri şeklinde gözlenir ve bu eğrinin tepe noktası, tersinir bir reaksiyonda ortaya çıkar. Tepe noktasının potansiyeli, yarı reaksiyonun standart potansiyeline eşittir. Artan hassasiyet, şarj akımının ne çok düşük ne de çok yüksek olmasını açıklayabilir. Elektrot etrafındaki yüzey tabakasında bir elektrik yükü varsa, gözlemlenen akımdaki artış, çözünme için yeni potansiyel ile analit konsantrasyonunu azaltır. Potansiyel denge derişimine ulaşıldığında, akım difüzyonla karşılaşılan bir düzeye düşer, bu da difüzyon güdümlü akım olarak bilinir. Elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında elektroaktif bir tür bulunduğunda, analiz edilecek maddenin konsantrasyonunu gereken yeni potansiyel seviyesine indirgeyen bir akım artışı gözlenir (örneğin, potansiyel aniden 50 mV arttığında). Ancak, bu potansiyel seviyesine ulaşıldığında, denge konsantrasyonu için gereken düzeye ulaşılır ve akım, difüzyon dengeleyici bir seviyeye düşen difüzyon kontrollü bir akım olarak adlandırılır. Akım artışı, akım puls polarografisiyle tamamen durdurulmadan önce ölçülür. Toplam akımın difüzyon akımından daha büyük olduğu keşfedilir. Damla yeniden şekillendirildiğinde, çözelti analiz edilecek madde açısından homojen bir hale gelir. Gerilim darbesi uygulandığında, faradayik olmayan akım, yükteki artıştan dolayı damla üzerinde dalgalanma gösterir. Damlanın yüzey alanı ömrünün sonuna doğru çok az değiştiğinde, bu akım zamanla azalır ve sifıra yaklaşır. Faradayik olmayan kalan akım durumunda, akımın büyük ölçüde azaldığı gözlemlenir ve bu süreçte akım ölçüldüğünde sinyal/gürültü oranı artar (Skoog, 2004).

2.2.4 Elektrokimyasal hücre

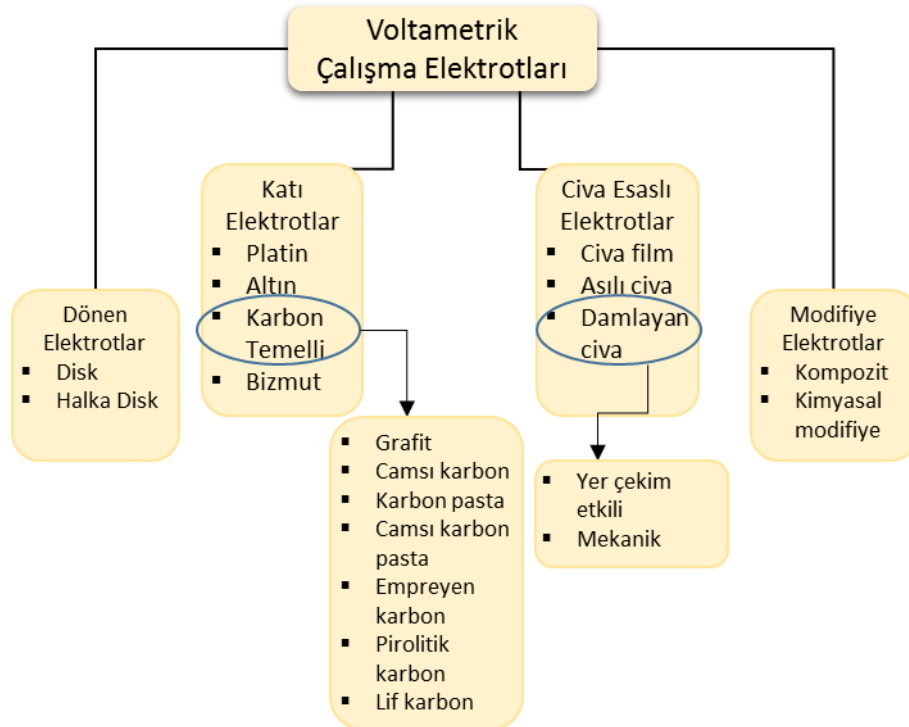
Elektrokimyasal reaksiyonlar, elektronların bir türden diğerine aktarıldığı yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarıdır. Birçok kimyasal ölçümün aksine, elektrokimyasal reaksiyonlar elektrokimyasal hücreler olarak bilinen sistemlerde elektrot-çözelti arayüzünde gerçekleşir. Potansiyometrik ve potansiyostatik ölçümler en yaygın iki elektrokimyasal ölçüm türüdür. Elektrokimyasal hücre, iki veya daha fazla elektrot (iletken) ve bir destek elektrolit çözeltisi kullanarak çalışan bir sistemdir. Bu hücrede, elektrotlar analiz için kullanılan indikatör veya çalışma elektrodu ile referans elektrot olarak bilinen elektrotlardan oluşur. Elektrolit ise bu elektrotlar arasında bulunan temas çözeltisidir. Potansiyometrik ölçümler sırasında, hücreden akım geçmediği için iki elektrotlu bir sistem yeterlidir. Bu durumda, çalışma elektrodundaki potansiyel, referans elektrotun sabit potansiyeline bağlı olarak belirlenir. Voltametrik ölçümlerde ise hücreye harici bir potansiyel uygulanır ve akım ölçülür. Ancak, çözeltinin direncinden kaynaklanan potansiyel düşüşü nedeniyle, bu uygulanan potansiyel hücre boyunca kontrol edilemez. Bu nedenle, akım ölçen devrelerde, karşıt elektrotun polarizasyonu gereklidir. Üç elektrotlu bir sistem ise daha iyi potansiyel kontrolü sağlar. Bu mekanizmada, potansiyel kontrolü için çalışma elektrodu referans elektrotla ilişkilendirilir. Akım ise çalışma elektrodu ile yardımcı elektrot arasında hareket eder. Bu yapı, daha hassas ve kontrol edilebilir potansiyel ölçümleri sağlamak için kullanılır. Şekil 2.5, tipik bir elektrokimyasal hücrenin basit bir temsilini göstermektedir. Bu hücredeki elektrotlar ve elektrolit arasındaki etkileşimler, elektrokimyasal analizlerde potansiyel ve akım ölçümlerinin gerçekleştirilmesini sağlar.



Şekil 2.5 Üçlü elektrot sistemi

Çalışma elektrodu, elektrokimyasal sistemde madde ile reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Bu elektrot, reaksiyonun türüne bağlı olarak katodik, anodik, indirgeyici veya oksitleyici olabilir. Voltametrik ölçümlerde çalışma elektrodunun malzemesi, ölçümlerin doğruluğu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca, çalışma elektrodunun yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonun tekrarlanabilir bir yanıt ve yüksek bir sinyal-gürültü oranına sahip olması kritik öneme sahiptir. Çalışma elektrodunun seçiciliği, etken maddenin redoks davranışı ve artık akım gibi iki temel faktöre bağlıdır. Bunun yanı sıra, potansiyel aralığı, elektrik iletkenliği, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, maliyet ve toksisite gibi parametreler de dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir (Zhou vd., 2010). Şekil 2.6, voltametri deneylerinde kullanılan çeşitli çalışma elektrotları kullanılmaktadır. Bu elektrotlar, ölçümlerde istenen özelliklere ve analitik gereksinimlere uygun olarak seçilir.

Çalışma elektrodunun seçiciliği, etken maddenin redoks davranışı ve artık akım gibi iki temel faktöre bağlıdır. Bunun yanı sıra, potansiyel aralığı, elektrik iletkenliği, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, maliyet ve toksisite gibi parametreler de dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir



Şekil 2.6 Voltametride çalışma elektrotları

Karbon Temelli elektrotlar:

En yaygın karbon elektrotlar arasında;

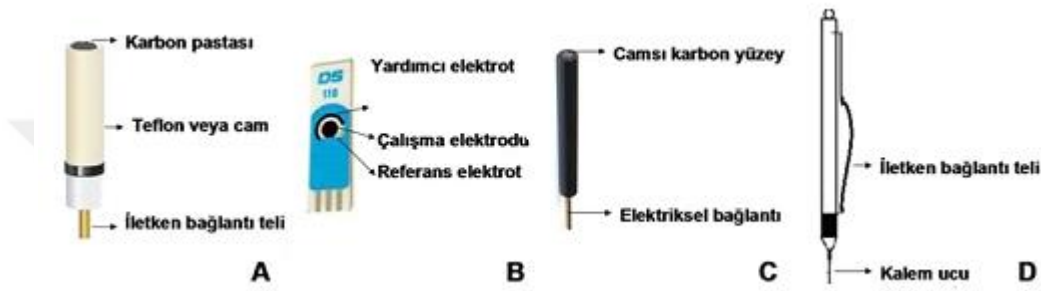
Camsı karbon elektrot (GCE)

Kalem grafit elektrot (PGE)

Ekran baskılı karbon elektrot (SPCE)

Karbon pasta elektrotu (CPE) bulunmaktadır.

Bu elektrotlar farklı yapıları ve özellikleri nedeniyle çeşitli uygulamalarda kullanılır.



Şekil 2.7 Karbon temelli elektrotlar (A) CPE, (B) SPE, (C) GCE (D) PGE

En yaygın kullanılan karbon bazlı elektrotlar şunlardır:

Camsı Karbon Elektrot (GCE): Yüksek saflıkta karbonun termal işlem görmesiyle elde edilen bir elektrottur. Yüksek mekanik dayanıklılığa sahiptir ve geniş bir elektrokimyasal pencereye sahiptir.

Ekran Baskılı Karbon Elektrot (SPCE): Karbon mürekkebi veya pastası kullanılarak ekran baskı tekniğiyle üretilen bir elektrottur. Küçük, taşınabilir ve tek kullanımlık olabilen bir yapıya sahiptir. Ölçümlerde yüksek tekrarlanabilirlik sağlar.

Karbon Pasta Elektrot (CPE): Karbon tozu veya partiküllerin bir bağlayıcı maddeyle karıştırılmasıyla elde edilen bir elektrottur. Esneklik ve şekillendirme kolaylığı sağlar. Özelleştirilmiş elektrotlar yapmak için farklı karbon pastaları kullanılabilir. Bu elektrotlar, elektrokimyasal analizlerde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ve analitik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen karbon elektrotlardır.

Kalem Grafit Elektrot (PGE): Basit bir kurşun kalem grafitinden yapılan bir elektrottur. Kolaylıkla elde edilebilir ve düşük maliyetlidir. Elektrokimyasal analizler

için popüler bir seçenektir (Wang, 2001). PGE düşük tespit limiti, düşük maliyet ve tek kullanımlık olmaları gibi avantajları nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir (Wang vd., 2001). Çalışmalarda farklı sertliğe ve çaplara sahip kaleml uçları kullanılmaktadır. Bu uçlar, grafitin balmumu ve kil içinde dağıtılmasıyla ısıl işleme tabi tutulmasıyla oluşturulur. Bazı durumlarda organik malzemelerden olan selüloz kullanılarak karbona dönüşümü gerçekleştirilir. Bu şekilde elde edilen elektrotlar esnek bir yapıya sahiptir. Kurşun kalem elektrotları (PG elektrotları) karbon macunu ve pirolitik karbon kadar kırılğan veya sert değildir. Bu çalışmanın amacı, PGE alışma elektrodu kullanarak BEVA ve NIVO'nun DNA etkileşimini ve miktar tayinini incelemektir. PGE ve DNA etkileşimi üzerine yapılan çalışmalar, kaynakça taramasından elde edilen Tablo 2.6 ile aktarılmıştır.



Tablo 2.6 PG elektrot ile ilaç-DNA etkileşimi ile ilgili çalışmalar

İlaç	Elektrot	Modifikasyon	Yöntem	Kaynakça
Glifosat	PGE	-	DPV	(Congur, 2020)
Daunorubisin	PGE	(cQD)	DPV	(Eksin vd., 2020)
Tramadol	PGE	(CuO-NPs	SWV	(Arabali vd., 2020)
Mitomisin C	PGE	GNFs	DPV-CV	(Findik vd., 2020)
İrinotekan	PGE	CTAB-MWCNTs	DPV	(Bolat, 2020)
Epirubicin	PGE	-	DPV	(Elik vd., 2017)
Mitomisin C	PGE	-	DPV	(Karadeniz vd., 2007)
Mitoksantron	CPE	-	DPV, CV	(Erdem vd., 2001)
Daunorubisin	PGE	SWCNT	DPV, EIS	(Erdem vd., 2009)
Chrysoidine	PGE	MWCNTs-PDDA	DPV	(Ensafi vd., 2014)
6-Tioguanin	PGE	-	DPV, EIS	(Eksin vd., 2014)
Mitomisin C	PGE	SWCNT-CHIT	DPV, EIS	(Canavar vd., 2015)
Mitomisin C	PGE	SWCNT-PVF+	DPV, EIS	(Canavar vd., 2011)
Temozolamid	PGE	-	DPV, CV	(Altay vd., 2015)
Bleomisin	PGE	-	EIS	(Erdem vd., 2013)
Mitomisin C	PGE	IL-CHIT	DPV, EIS, CV	(Eksin vd., 2013)
Mitomisin C	PGE	Grafen oksit	DPV, EIS,	(Erdem vd., 2012)
Mitomisin C	PGE	Sepiyolit-SWCNT	DPV, EIS,	(Erdem vd., 2012)
Cis-BAFDP	PGE	-	DPV	(Erdem vd., 2005b)

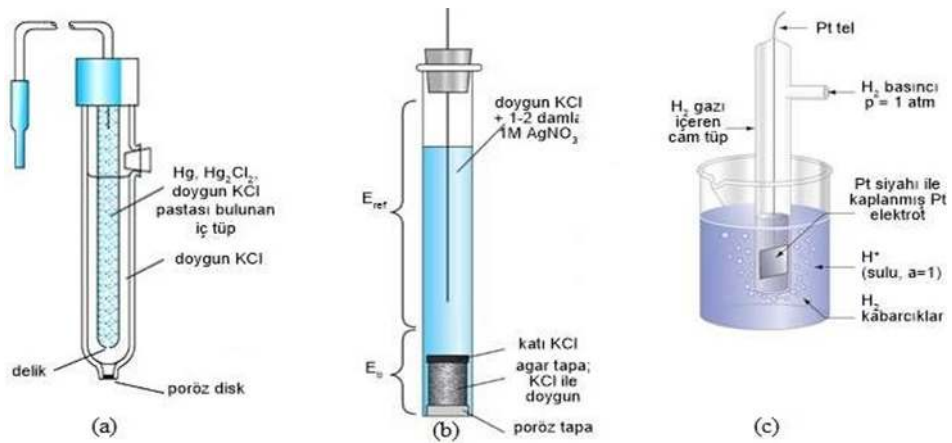
Referans elektrot: Voltametri, inert bir yardımcı elektrot, referans elektrot ve çalışma elektrodu kullanarak gerçekleştirilen bir analiz tekniğidir. Teknikte, çalışma elektrodunun özelliklerini veya üzerindeki değişiklikleri kolayca polarize ederek ölçer. Referans elektrotlar, Voltametri de kullanılan elektrokimyasal hücrelerde potansiyel ölçümlerinin referans noktasını sağlar. Bazı yaygın kullanılan referans elektrotlar şunlardır:

Ag/AgCl Elektrotu: Ag/AgCl elektrot, potansiyel ölçümlerinde gümüş ve gümüş klorür arasındaki elektrokimyasal dengeye dayanır. Ag/AgCl elektrot, istikrarlı bir referans potansiyeli sunar ve yaygın olarak kullanılır.

Doymuş Kalomel Elektrotu (DKE): DKE, çözeltideki klorür iyonlarıyla reaksiyona girerek bir potansiyel denge oluşturan kalomel (Hg_2Cl_2) ve potasyum klorür (KCl) içeren bir sistemdir. DKE, genellikle elektrokimyasal çalışmalarda referans elektrot olarak kullanılır.

Standart Hidrojen Elektrotu (SHE): SHE, hidrojen gazının 1 atmosfer basınç ve 25 °C sıcaklıkta elektrokimyasal dengeye ulaştığı referans elektrottur. Hidrojenin potansiyelini sıfır kabul eder ve diğer elektrotların potansiyelleriyle karşılaştırma yapılmasında kullanılır. Ancak, pratik uygulamalarda kullanımı daha zordur.

Bu referans elektrotlar, Voltametri ve diğer elektrokimyasal tekniklerde potansiyel ölçümlerinin güvenilirliğini sağlamak için kullanılır. Her bir elektrotun avantajları, dezavantajları ve uygun kullanım alanları bulunmaktadır, bu nedenle analizin gereksinimlerine göre en uygun referans elektrot seçilmelidir.



Şekil 2.8 (a) Ag/AgCl, (b) DKE, (c) SHE

Yardımcı elektrot: Doğru, akım taşımak için genellikle inert bir iletken malzeme olan platin veya grafit yapılı malzemeler kullanılmaktadır. Bu elektrota karşı veya yardımcı elektrot olarak da bilinir. Karşı inert elektrot (genellikle platin tel) için aranan ana özellikler şunlardır:

1. İndikatör elektrodun potansiyelini etkilememesi: Karşı elektrot, çalışma elektrodunun potansiyelini mümkün olduğunca etkilememelidir, böylece ölçümler doğru bir şekilde yapılabilir.

2. Çalışma elektrodu üzerinden geçen akımı etkilememesi: Karşı elektrot, çalışma elektrodu üzerinden geçen akımı mümkün olduğunca etkilememelidir, böylece elektrokimyasal tepkimelerin incelenmesi sırasında ölçümler doğru sonuçlar verir.

3. Çalışma elektrodu üzerinde gerçekleşen tepkimeleri etkilememesi: Karşı elektrot, çalışma elektrodu üzerinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkimeleri mümkün olduğunca etkilememelidir. Bu, ölçümlerin spesifik tepkimelere odaklanmasını sağlar.

4. Aşırı gerilim gerektirmemesi: Karşı elektrot, aşırı bir gerilim gerektirmeden elektrokimyasal reaksiyonları desteklemelidir.

5. Akımı sınırlayıcı bir etkisi olmaması: Karşı elektrotun akımı sınırlayıcı bir etkisi olmamalıdır. Bu, çalışma elektrodu üzerinden geçen akımın kontrolünü ve ölçümün doğruluğunu sağlar.

6. Yardımcı elektrodu ile indikatör elektrot arasında bir elektriksel alan oluşmasını sağlaması: Bu elektrokimyasal tepkimelerin istenen şekilde gerçekleşmesini sağlar.

Sınır akım etkisinden kaçınmak amacıyla, yardımcı elektrodun yüzey alanı çalışma elektrodunkinden daha fazla olmalıdır. Bu, akımın homojen bir şekilde dağılmasını sağlar ve elektrotlar arasındaki direnç farkını azaltır.



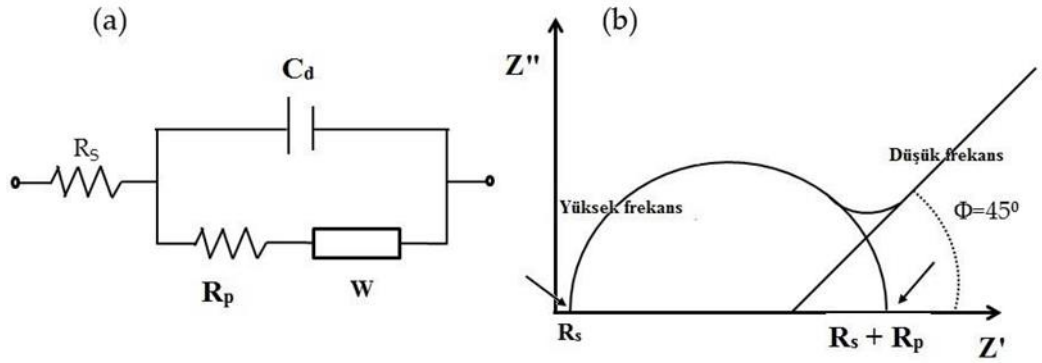
Şekil 2.9 Platin tel elektrot

2.2.5 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

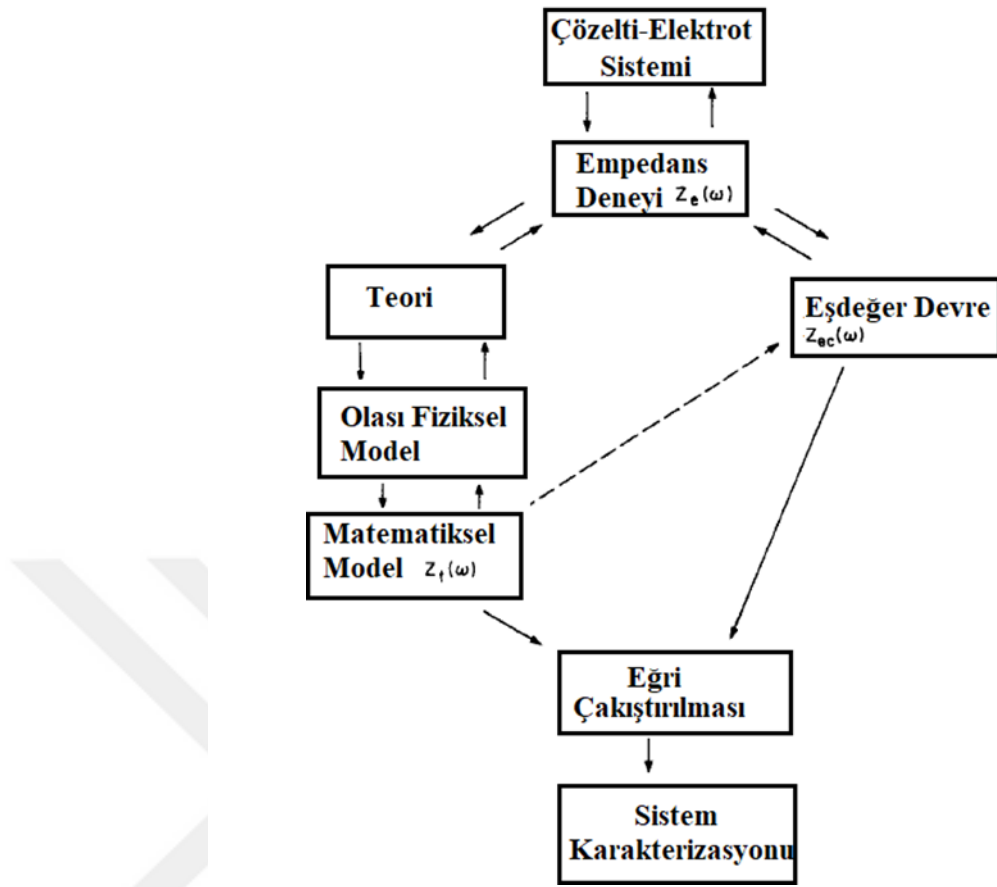
Modifikasyona tabi olmuş elektrotların elektrokimyasal davranışlarını araştırmak için kullanılan tekniklerden biridir. Temel elektrokimyasal çalışmaların yanı sıra, EIS

tekniki son yıllarda modern elektrokimyasal immünosensörlerde ve DNA biyosensörlerinde biyoafinite olaylarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Elektrot çözeltisi arayüzünde elektrokimyasal değişimler meydana gelir. Elektrot yüzeyindeki bu dönüşümler elektronik devre elemanları ve deneysel empedans spektrumları açısından modellenenebilir. Şekil 2.10.a, Randles ve Ersler tarafından modellendiği şekliyle elektrot yüzeyinde meydana gelen olayların faydalı bir devre modelini göstermektedir. Bu modelde, elektrokimyasal çift katmana ait direnç (C_d), çözeltiye ait direnci (R_s), elektron transfer direnci (R_p) ve elektrot-çözelti arayüzünde difüzyon nedeniyle oluşan Warburg (W) devre elemanı gibi parametreler yer alır (Yang, 2018).



Şekil 2.10 (a) EIS devre elemanları, (b) Nyquist diyagramı



Şekil 2.11 Empedans ölçüm ve karakterizasyonu için akış diyagramı

Elektrot çözeltisi arayüzünün empedansı Ohm denklemi kullanılarak hesaplanabilir.

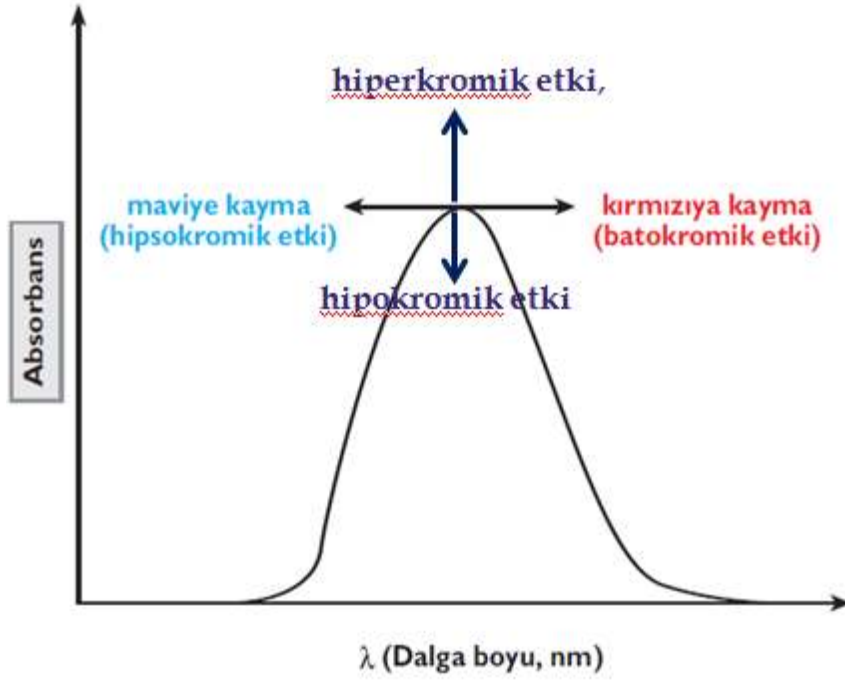
$$Z(\omega) = R_s + \frac{R_p}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_{dl}^2)} - \frac{j\omega R_p^2 C_{dl}}{(1 + \omega^2 R_p^2 C_{dl}^2)} = z' + z'' \quad j = \sqrt{-1} \quad (2.1)$$

EIS, düşük genlikli sinüzoidal frekanstaki potansiyelin elektrokimyasal ölçümüdür. Bu potansiyel hücreye uygulanır ve ortaya çıkan akım ölçülür. Nyquist diyagramı ortaya çıkan faradayik empedans spektrumunu ifade eder (Şekil 2.10.b). Nyquist eğrisi elektrik yüklü yüzeyi ve elektron transfer reaksiyonunu gösterir. Eğri, yüksek frekanslarda elektron transfer direncini temsil eden yarım daireden ve düşük frekanslarda ise liner bir bölüm oluşur. Bu diyagramlar elektron transfer kinetiğini ve difüzyona ait özellikleri gösterir. Elektron transferi çok hızlı olduğunda, örneğin, empedans spektrumu sadece doğrusal bir kısımdan oluşur Yarım daire ve doğrusal kısım, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) deneylerinde sıklıkla gözlenen bir impedance şeklidir.

Yarım daire, elektrokimyasal sistemdeki elektron transfer hızının düşük olduğu durumlarda ortaya çıkar. Bu yarımdaire, Nyquist plotunda (gerçek kısmı Z' eksen, sanal kısmı Z'' eksen) görülen bir kısımdır. Yarımdairenin çapı, elektrokimyasal sistemdeki elektron transfer direncini (R_p) temsil eder. Elektron transfer hızı azaldıkça yarımdairenin çapı artar. Doğrusal kısım ise yüksek frekanslarda gözlenen bir bölümdür. Bu bölüm, elektrokimyasal sistemdeki elektrolit çözeltisi direncini (R_s) temsil eder. Yüksek frekanslarda, elektrot-çözelti arayüzünde difüzyon etkileri ihmal edilebilir ve impedans, elektrolit çözeltisi direncine bağlı olarak doğrusal bir şekilde artar. Bu tekniklerin performansı çalışma elektrodunun fiziksel ve kimyasal özellikleriyle ilişkilidir. İndikatör elektrodu yüksek bir sinyal-gürültü oranına sahip olmalı ve Voltametrik ölçümlerde tekrarlanabilir yanıt sağlamalıdır. Ayrıca, çalışma elektrodu seçilirken potansiyel çalışma aralığı, elektrik iletkenliği, yüzey tekrarlanabilirliği, maliyet ve toksisite gibi özellikler de göz önünde bulundurulmalıdır (Wang, 2006).

2.2.6 UV-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis.)

Organik maddelerin ultraviyole (200-400 nm) ve görünür (400-800 nm) ışıkla etkileşimini incelemek için kullanılan bir yöntemdir (Yang, 2018). Organik bileşiklerin fonksiyonel grupları, belirli dalga boylarında karakteristik absorbans sergileyerek spesifik elektronik geçişlere sahiptir. Bu özellik, numunelerin kalitatif analizi için kullanışlıdır. Ayrıca, kimyasal yapıya bağlı olarak elektronik geçişlerin farklılık gösterebileceği ve bazı fonksiyonel grupların birden fazla geçiş sergileyebileceği unutulmamalıdır (Yang, 2018).



Şekil 2.12 Absorpsiyon pikindeki olası kaymalar

Benesi-Hildebrand denklemi, DNA ile ilaç etkileşiminin miktarını gösteren bağlanma sabiti (K) değerini hesaplamak için kullanılabilir.

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G}} + \frac{\epsilon_G}{\epsilon_{H-G} - \epsilon_G} \times \frac{1}{K[DNA]} \quad (2.2)$$

K = Bağlanma/birleşme sabiti

A₀ = İlacın absorbansı

A = DNA-ilacın kompleksinin absorbansı

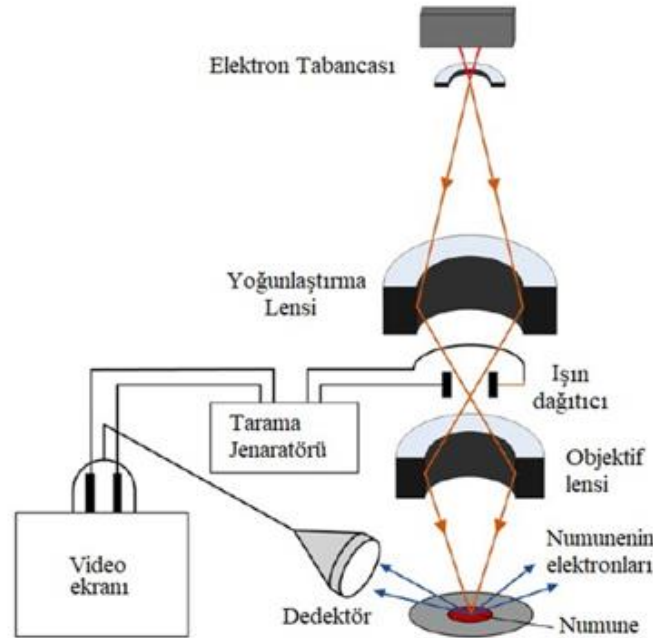
ε_G (ε_a) = İlacın absorpsiyon katsayısı

ε_{H-G} (ε_f) = DNA-ilacın kompleksinin absorpsiyon katsayısı

DNA-ilacın kompleksinin bağlanma sabitini (K) hesaplamak için, DNA konsantrasyonunun artan absorbans değerleriyle ilişkisini kullanırız. A₀ / (A-A₀) ile 1 / [DNA] arasındaki değerler çizilir. y eksenini kestiği nokta, ε_G / (ε_{H-G}-ε_G) değerini temsil ederken, eğim ise [ε_G / (ε_{H-G}-ε_G)] / K ifadesini verir (Rahman vd., 2017). Bu bağlanma sabiti (K) değeri, DNA ile ilaç arasındaki etkileşim miktarını gösteren Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak hesaplanabilir.

2.2.7 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Numunelerin yüzey morfolojisiyle ilgili bilgi sağlamak amacıyla, bu teknik optik mikroskopla karşılaştırıldığında daha yüksek çözünürlük ve ölçek sunar (Yang, 2018). SEM, çok bileşenli malzemelerin yapılarını analiz etmek ve faz morfolojilerini gözlemlemek için sıkça kullanılır. SEM, dört bölümden oluşur. Yüksek enerjili elektron ışını, elektron tabancası tarafından üretilir ve genellikle iki veya üç elektromanyetik mercekten geçerek numune yüzeyine odaklanır. Tarama sistemi, elektron ışınına numune yüzeyini adım adım tarayarak hareket ettirir. Bu süreçte geri saçılan elektronlar (BSE) ve ikincil elektronlar (SE) üretilir. Bu üretilen elektronlar dedektörlere yönlendirilir ve sinyal olarak iletilmeden önce dedektörler tarafından algılanır. (Şekil 2.13). Elektron demetinin çapı SEM görüntüsünün çözünürlüğünü etkiler. Yüzey morfolojisi SE kontrastı ile bağlantılıdır. Örnekleme hacmindeki atom numarası, BSE kontrastı, SE numunenin yüzey morfolojisi, BSE ise yüzeyin bileşimini göstermektedir. SEM büyütme ise, taranan numune aralığına göre ekran boyutunun oranı olarak tanımlanır. Taranan aralık küçüldükçe büyütme artar. Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobunun (FESEM) çözünürlüğü 1 nm kadar yüksek olabilir (Yang, 2018).



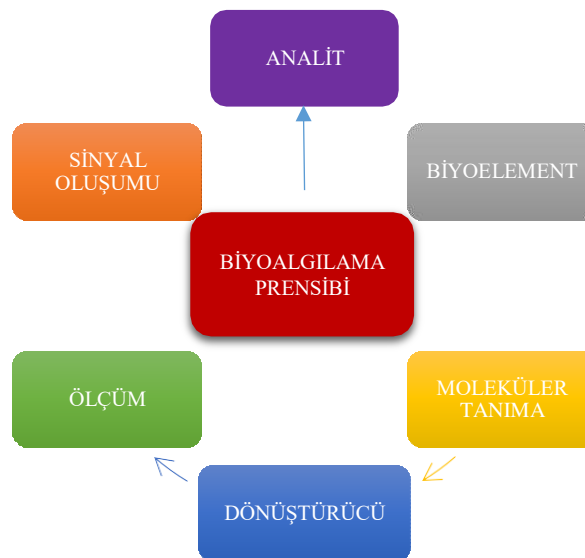
Şekil 2.13 Taramalı elektron mikroskobunun şematik görünüm

2.2.8 Enerji Dağılımı X- ışını Spektroskopisi (EDX)

EDX, kimyasal olarak analiz ve karakterizasyon için popüler bir yöntemdir (Scimecca vd., 2018). Numune tarafından yayılan karakteristik X-ışınları parmak izi görevi görür ve numuneler için numune profili ve dağılımı (elementel / kimyasal haritalama) gibi elementel bilgilerin yanı sıra yarı nicel ve nicel veriler sağlar.

2.3. Biyosensörler

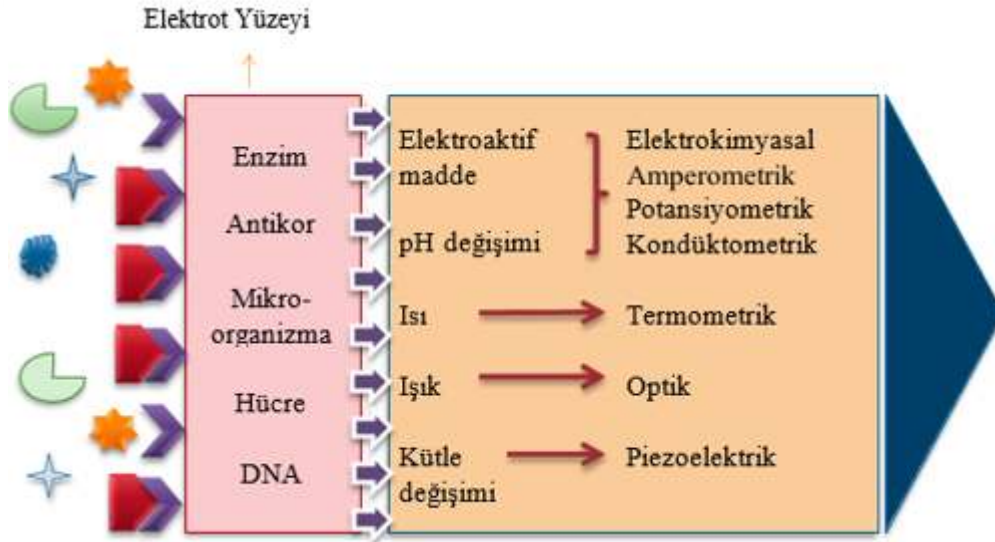
Biyosensörleri, çeşitli analitlerin kantitatif tayini için bir biyolojik tanı molekülü (biyoelement) ile bir fizikokimyasal dönüştürücüyü (transdüser) birleştiren cihazlar olarak tanımlamaktadır. Bu biyosensörler, biyoelementlerin yardımıyla kimyasal veya fiziksel bir sinyallere dönüştürerek ölçüm yapar. Transdüser, biyosensörün tanıma sisteminden gelen bilgileri ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir diğer bileşenidir. Bir biyosensörün dönüştürücüsü dedektör, sensör veya elektrot olarak da bilinir (Thévenot vd., 2001). Biyosensörlerin birincil işlevi, bir numunedeki analit konsantrasyonuyla orantılı bir elektrik sinyali üretmektir. Bir biyosensörün çalışma prensibi şöyledir: algılamadan sorumlu biyoreseptör analitle etkileşiminden sonra bir tanıma olayı meydana gelir. Dönüştürücü bu tanıma olayını ölçülebilir bir elektronik sinyale dönüştürür. Afinite sensörleri, bir biyo-element bir analite bağlandığında ancak herhangi bir kimyasal dönüşüm gerçekleşmediğinde kullanılır. Katalitik sensörler, bir etkileşim sonucunda kimyasal bir değişim meydana geldiğinde kullanılır. Şekil 2.14'te biyosensörün çalışma elemanları gösterilmektedir (Karunakaran vd., 2015).



Şekil 2.14 Biyosensöre ait bileşenler ve çalışma prensibi

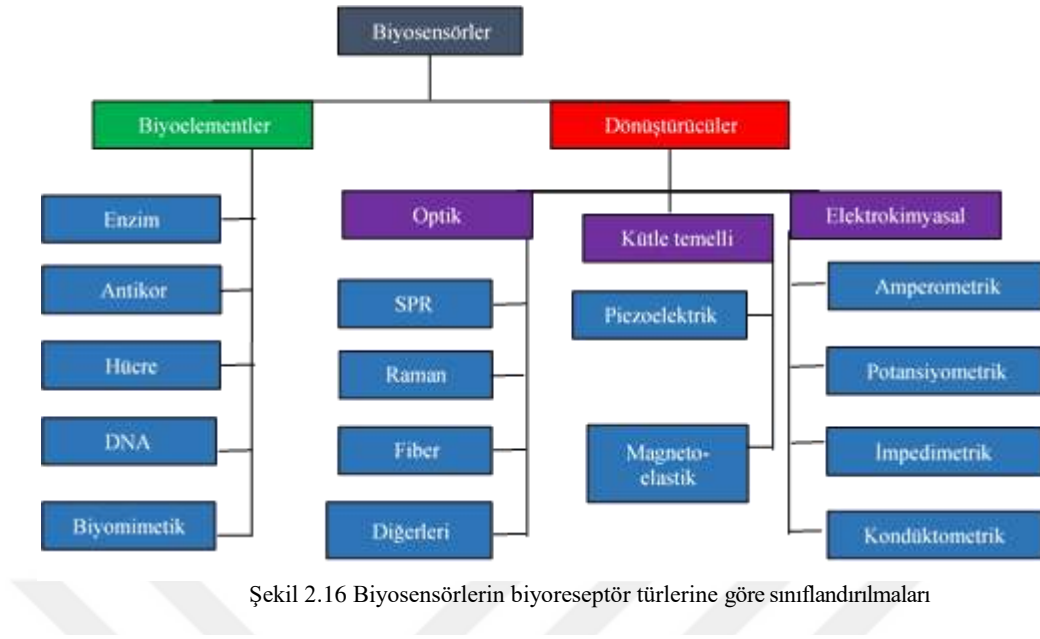
2.3.1 Biyosensör bileşenleri ve fonksiyonları

Biyosensörlerin özgünlük mekanizması onları sınıflandırmak için kullanılabilir. Biyosensörlerin biyolojik bileşenleri katalitik veya katalitik olmayan olarak sınıflandırılır. Enzimler, mikroorganizmalar ve dokular katalitik biyolojik bileşenlere örnek teşkil ederken, antikorlar, reseptörler ve nükleik asitler katalitik olmayan biyolojik bileşenlere (DNA, RNA) örnek teşkil etmektedir. Biyosensörler ayrıca elektrokimyasal, optik, kolorimetrik ve piezoelektrik dönüştürücüleri içeren analitleri belirlemek için kullanılan dönüştürücülere göre geniş bir şekilde sınıflandırılır. Şekil 2.15 biyosensörlerin tespit edebildiği analitleri, kullanılan biyo-bileşenleri ve dönüştürücüleri özetlemektedir.



Şekil 2.15 Biyosensörlerde kullanılan bileşenler, dönüştürücüler ve tayin edilebilen analitler

Biyosensörler tipik olarak dönüştürücü tiplerine göre sınıflandırılır. Şekil 2.16' da biyosensörlerin biyoelement veya dönüştürücü şekline göre sınıflandırılması gösterilmektedir.



Biyolojik tanıma elemanları olarak da bilinen biyo-bileşenler, biyosensörler için çok önem arz eden bileşenlerdir (Eggins, 2008). Biyoeleman, sensörün tanıma sistemine katılıp ilgili maddeye doğru yönlendirilir. Sensör yüzeyinde bulunduğu için analitin bağlanmasından sorumludur. Biyoelementler beş tipte sınıflandırılır: enzimler, antikorlar/antijenler, nükleik asitler/DNA, hücreler ve biyomimetik elementler. Transdüserler, biyolojik tanıma sinyallerini okunabilen elektrik sinyallerine dönüştüren biyosensör bileşenleridir. Bu transdüserler, farklı fiziksel prensiplere dayanan çeşitli tiplerde olabilir. Elektrokimyasal, optik, kalorimetrik, kütle değişimi ve manyetik sinyaller gibi çeşitli transdüserler kullanılarak biyolojik tanıma sinyalleri tespit edilebilir. Elektrokimyasal transdüserler, potansiyometri, kondüktometri, impedimetri, amperometri, Voltametri gibi elektrokimyasal prensipleri kullanarak biyolojik tanıma sinyallerini elektrik sinyallerine dönüştürür. Optik transdüserler, kolorimetri, florimetri, lüminesans, interferometri gibi optik prensipleri kullanarak sinyalleri algılar. Kalorimetrik transdüserler termistörleri kullanırken, kütle değişimi transdüserleri piezoelektrik veya akustik dalga prensiplerini temel alır. Manyetik transdüserler ise manyetik sinyalleri tespit etmek için kullanılır. Biyosensörlerde kullanılmak üzere birçok yeni transdüser geliştirilmektedir, ancak elektrokimyasal transdüserler hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu durum, elektrokimyasal transdüserlerin kullanım kolaylığı, taşınabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle. Özellikle hasta başı testlerinde, elektrokimyasal biyosensörler hızlı ve güvenilir sonuçlar elde etmek için tercih edilen bir seçenektir (Eggins, 2008).

2.3.2 Biyosensör özellik

Seçicilik: Biyosensör analiz edilecek maddenin yanı sıra numuneyle etkileşime girebilecek diğer maddeleri kesin ve doğru bir şekilde ayırt edebilme yeteneğini ifade eden bir özelliktir. Biyosensör, sadece hedefin konsantrasyonundaki değişimlere hassas bir şekilde yanıt vermelidir ve diğer türlerden kaynaklanan girişimden etkilenir. Biyosensör çalışmalarında, biyolojik ortamlarda var olan diğer maddelerin potansiyel girişim etkilerini tespit etmek önemlidir. Bu, biyosensörün seçiciliğini değerlendirmek ve analiz sonuçlarının doğruluğunu, hassasiyetini ve doğrusalığını göstermek için yapılır. Yüksek seçicilik, hedef analiti diğer maddelerden ayırtabilme yeteneğini ifade eder. Bu, biyosensörün analit molekülleri ile diğer bileşikler arasında spesifik ve seçici etkileşimler kurabilme kabiliyetine bağlıdır. Biyosensörlerde yüksek seçicilik, güvenilir analiz sonuçları elde etmek ve arka plan girişiminden kaynaklanan hataları en aza indirmek için önemlidir. Bu, biyosensörlerin uygulama alanlarında etkinliklerini artırır ve analitlerin kesin, güvenilir ve spesifik ölçülmesini sağlar.

Duyarlılık: Elde edilen kalibrasyon eğrisinin eğimi, biyosensör yanıtının analit konsantrasyonu değişimiyle doğrusalılığı olarak ifade edilen hassasiyeti hesaplamak için kullanılır. Bir biyosensörde yüksek hassasiyet ideal olacaktır.

Kararlılık: İdeal biyosensörlerin en önemli özelliklerinden biri yüksek elektrot kararlılığıdır. Kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı kararlılığı belirler. Yüksek stabilite sayesinde, aynı biyosensörle birden fazla analiz gerçekleştirilebilir ve bu da maliyetleri düşürür.

Tekrarlanabilirlik: Aynı koşullar altında yapılan ardışık ölçümlerin sonuçlarının hassasiyetini ifade eder. Bu, aynı numune veya analit üzerinde yapılan birden fazla ölçümün tutarlı sonuçlar vermesi gerektiği anlamına gelir. Tekrarlanabilirlik çalışmaları, bir biyosensörün ölçüm sonuçlarının ne kadar tutarlı olduğunu değerlendirmek için yapılır. Bu çalışmalar genellikle aynı numune veya analit üzerinde yapılan birden fazla ölçümü içerir ve elde edilen sonuçların istatistiksel analizine dayanır. Ölçüm sonuçlarının yüzde bağıl standart sapması (BSS) gibi istatistiksel parametreler kullanılarak tekrarlanabilirlik değerlendirilir. Yüksek tekrarlanabilirlik, bir biyosensörün aynı koşullar altında tekrar tekrar ölçüm yaparak istikrarlı sonuçlar verdiğini gösterir. Bu, analiz sürekliliğini sağlamak, ölçüm sonuçları arasında tutarlılık sağlamak ve analit konsantrasyonunu güvenilir bir şekilde belirlemek için önemlidir.

Tekrar üretilebilirlik: aynı şekilde hazırlanan farklı elektrotların uyumluluğunu gösteren ve ölçüm sonuçlarının hassasiyetini değerlendiren bir parametredir. Bu parametre, aynı elektrot üretim yöntemi ve koşulları kullanılarak farklı elektrotların aynı analizi yapabilme yeteneğini ifade eder.

Kullanım ömrü: Hazırlanan biyosensörün çalışma süresi boyunca performansını koruyabilme yeteneğini ifade eder. Çok sayıda ölçüm ve sık ölçümlerin her ikisi de daha kısa bir kullanım ömrüne katkıda bulunur. Biyomolekül aktivitesini korumak için biyosensörler buzdolabında saklanmalıdır.

Hızlı yanıt süresi: Yanıt süresi, kararlı durum akımlarının yüzde 90-95'ine ulaşmak için geçen zaman olarak tanımlanır. Biyosensörde örneğe karşı hızlı bir yanıt aranır

Doğrusal çalışma aralığı: İyi bir sensör, geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip olmalıdır. Bu, biyosensörün düşük konsantrasyonlardan yüksek konsantrasyonlara kadar geniş bir analit konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt gösterebilmesi anlamına gelir. Doğrusal bir çalışma aralığı, analit konsantrasyonundaki değişikliklerin doğru bir şekilde ölçülebileceği ve analit konsantrasyonu ile ölçüm değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu gösterir.

LOD ve LOQ: Substrat konsantrasyonuna karşı akım farkları çizilerek bir doğrusal grafiğe ulaşılır. Teşhis limiti, analiz edilen numunenin gözlemlendiği ancak kantitatif limitlere girmediği en düşük konsantrasyondur. Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

$$LOD = 3x \frac{s}{m} \quad (2.3)$$

Standart sapma (s), m ise kalibrasyon eğrisinin eğim değeridir. Kalibrasyon eğrisinin analitin kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla ölçülebildiği en düşük konsantrasyonunu oluşturan konsantrasyon alt tayin sınırıdır. Hesaplama deneylerinde aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

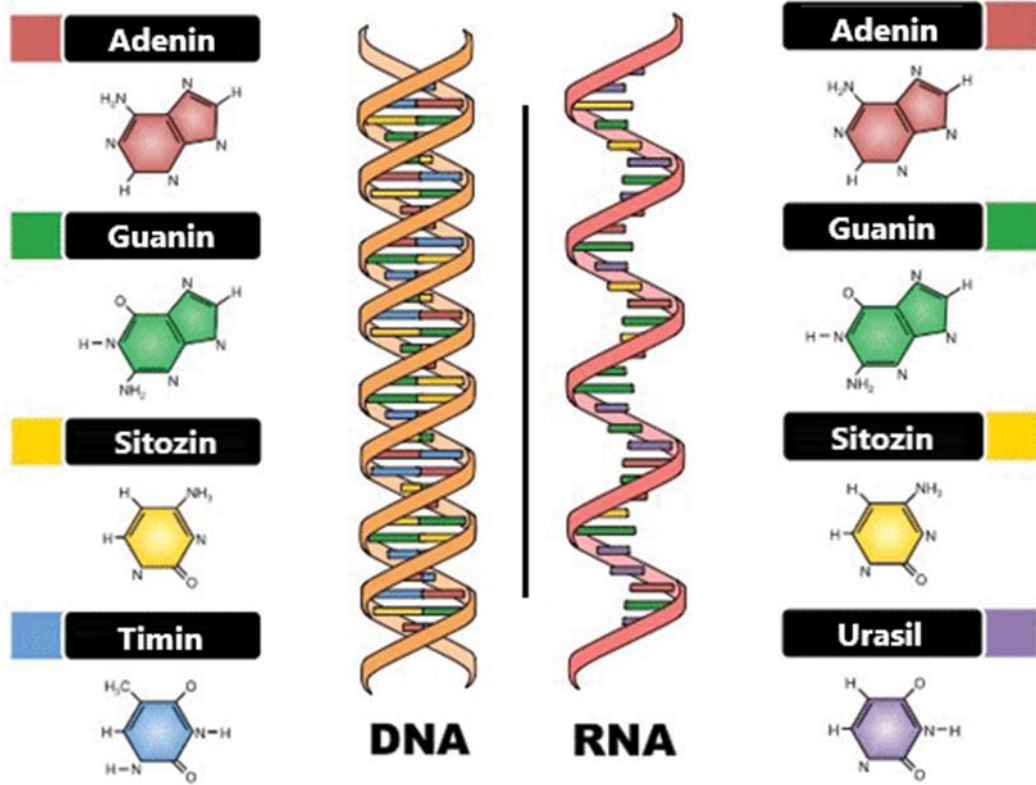
$$LOQ = 10x \frac{s}{m} \quad (2.4)$$

Standart sapma (s), ve m, ise doğrusal grafiğin eğim değeridir (Thévenot vd., 2001).

2.4 DNA İlaç Etkileşimleri

2.4.1 DNA

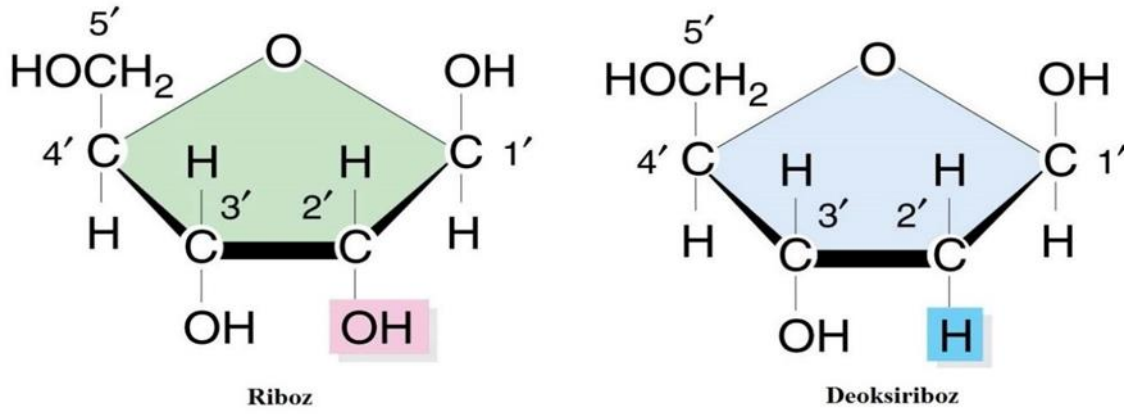
DNA, canlı organizmaların yapısında bulunan ve genetik bilginin depolandığı, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan bir nükleik asittir. Nükleotidler, nükleik asitlerin yapı taşlarını oluşturur. Bu nükleotidler, iki uzun polimerin ester bağlarıyla birbirine bağlanmış şekeri, fosfatı ve baz gruplarını içeren omurgayı oluşturur.



Şekil 2.17 DNA, RNA ve pirimidin ve pürin bazları

DNA'da sitozin, adenin, guanin ve timin bazları bulunmaktadır. Nükleik asit adını 5 karbonlu pentoz şekerinden alır. RNA riboz içerirken, DNA deoksiriboz içerir.

Bir nükleozit, pentoz şekeri ve pirimidin veya pürin bazı içeren bir moleküle bir fosfat grubunun bağlanmasıyla oluşan kimyasal bir birimdir. Bir nükleotid, bir nükleozide bir fosfat grubunun bağlanmasıyla oluşur.



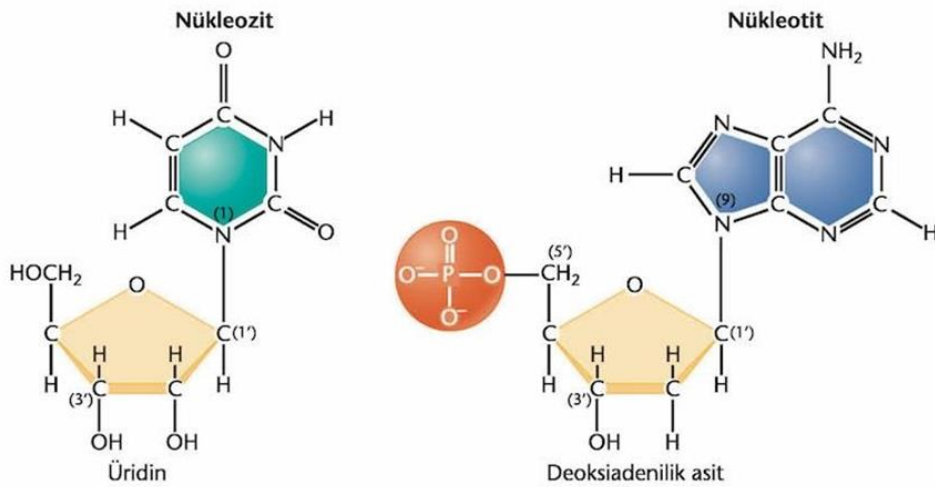
Şekil 2.18 RNA ve DNA'daki 2-deoksiriboz ve ribozun kimyasal yapıları

WatsonCrick modelinin özellikleri;

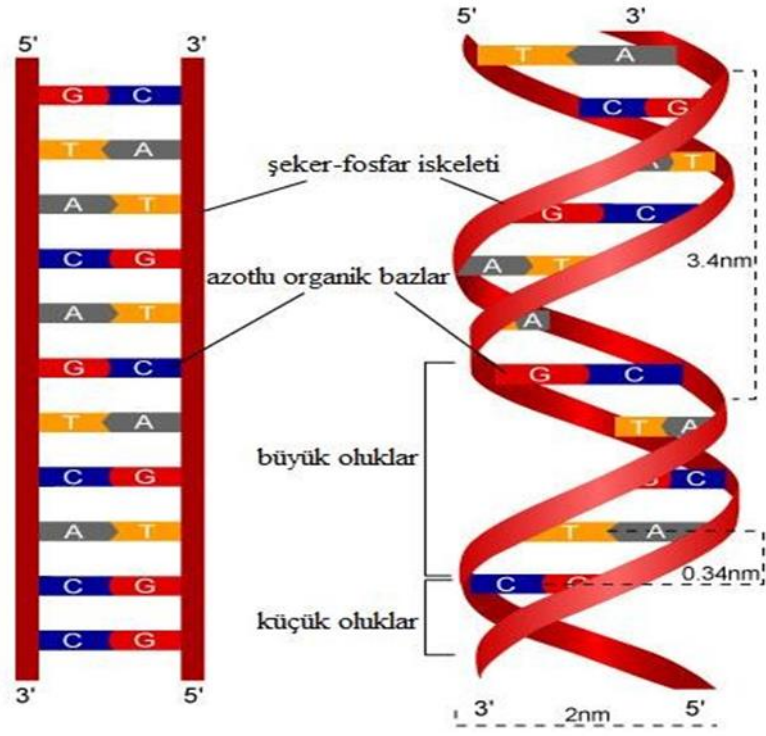
1. Uzun iki polinükleotid zincirinden oluşur.
2. İki zincir paralel değildir. Yani, C5' ucundan C3' ucuna kadar iki zincirin yönleri zıttır.
3. Bu zincirlerin tabanları düzlemseldir.
4. Hidrojen bağları bazıları birbirine bağlar.
5. DNA ekseninde, geniş ve daha dar oluklar vardır.
7. DNA'nın çapı 2 nm'dir.

2.4.2 İlaç DNA etkileşimi ve önemi

DNA canlı organizmaların yaşamında önemli bir rol oynar. Bundan dolayı antiviral, antikanser ve antibiyotik ilaçlar için araştırmalar için önemli hale gelmiştir (Sirajuddin vd., 2013).



Şekil 2.19 DNA, RNA'nın nükleotid ve nükleozidlerinin yapıları



Şekil 2.20 DNA çift sarmalı ve şematik görünümü

DNA'ya bağlanan küçük moleküllerin incelenmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Ayrıca, ilaç-DNA etkileşimlerinin anlaşılması, daha güçlü ve seçici olan yeni DNA hedefli ilaçların geliştirilmesine yardımcı olacağı için önemlidir (Temerk vd., 2016).

2.4.3 İlaç DNA etkileşim türleri

Elektrokimyasal olarak DNA biyosensörleri, dizi algılama, öncelikle etiketli veya etiketsiz teknikler kullanılarak tek sarmallı DNA'nın (ssDNA) veya çift sarmallı DNA'nın (dsDNA) elektrokimyasal davranışının incelenmesiyle gerçekleştirilir. Bir dönüştürücü ve bir prob dizisi, diziye özgü DNA biyosensörlerinin bileşenleridir (Wang vd., 1998). Hibridizasyonu belirlemek için dört temel yaklaşım kullanılmaktadır:

1. İşaretleyici olarak seçici olarak ssDNA veya dsDNA'ya bağlanan bir molekülün indirgenme/yükseltgenme pik akımındaki değişimin incelenmesi.
2. Guanin veya adenin gibi elektroaktif bazların yükseltgenme/indirgenme sinyallerindeki değişimin incelenmesi.

3. Enzim etiketli bir probun kullanımıyla hibridizasyon sonrasında substratın elektrokimyasal sinyali izlenebilir.

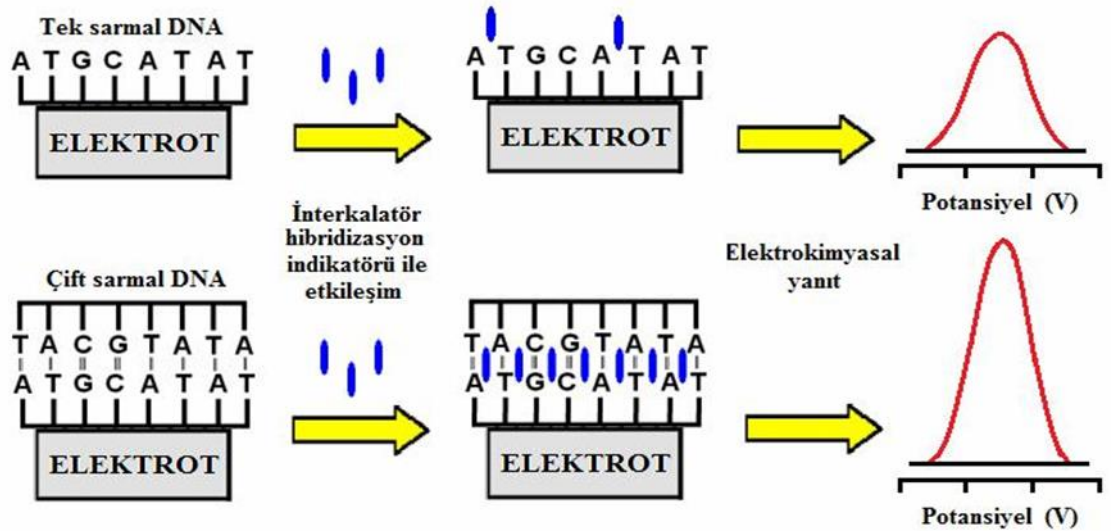
4. Nanopartikül işaretli probun elektrokimyasal sinyalleri, hedef dizinin varlığını veya yokluğunu belirlemek için bir gösterge olarak kullanılabilir (Kerman vd., 2003).

İndikatörle DNA dizisi algılama yöntemleri

Bu prosedürde, DNA interkalasyonunu sağlayan ilaçlar veya DNA bazlarıyla etkileşebilen elektroaktif bileşenler kullanılır. Bu maddeler, (Erdem vd., 1999) tarafından çalışmalarda kullanılmıştır. Elektrokimyasal yanıt, prob ve hedef dizinin hibridizasyonu ile oluşan hibridin, etkileşime giren indikatörün artan veya azalan sinyalidir.

(I) İnterkalatör ile DNA dizi algılanması:

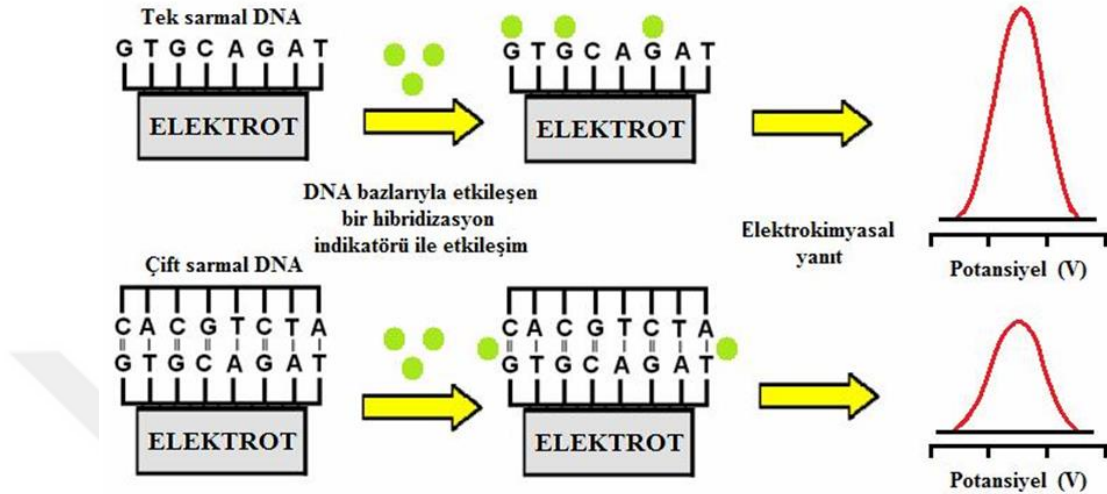
İnterkalasyon, maddenin iki DNA zinciri arasında yer almasıdır. Bu durumda, madde ile dsDNA'nın etkileşimi sonucunda elde edilen sinyal, tek iplikli DNA'da elde edilenden daha yüksektir (Şekil 2.21) (Cai vd., 1997).



Şekil 2.21 İnterkale olmuş bileşen ile DNA dizisi

(II) DNA bazlarıyla indikatör ile algılama yöntemi:

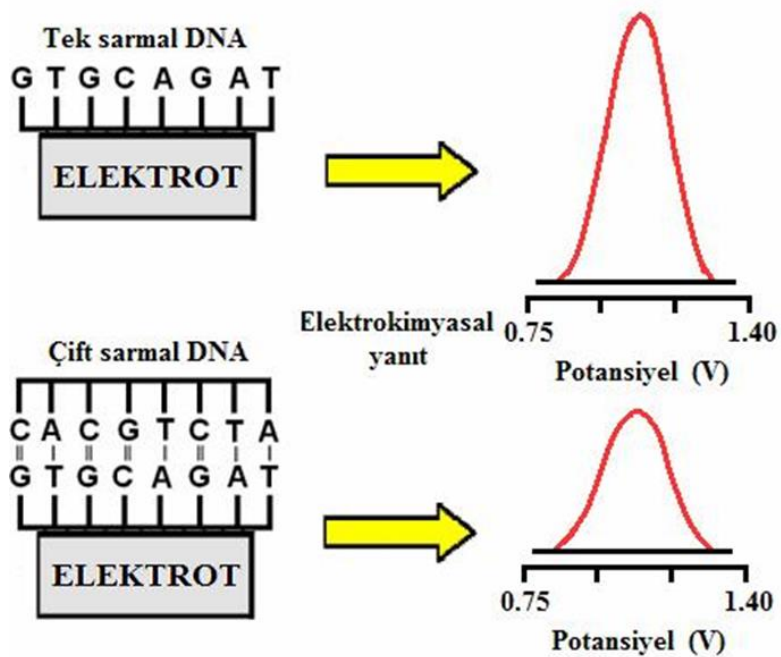
Maddenin DNA'nın elektroaktif olan guanin bazı ile etkileşime girerse, Şekil 2.22'de gösterildiği gibi guanin bazı ile etkileşim daha serbest olduğu için sinyal tek sarmallı DNA'da çift sarmallı DNA'dan yüksek olacaktır (Millan ve Mikkelsen., 1993).



Şekil 2.22 Guanin bazıyla indikale olmuş DNA dizi algılanması

İndikatörsüz yapılan DNA dizi algılama yöntemleri:

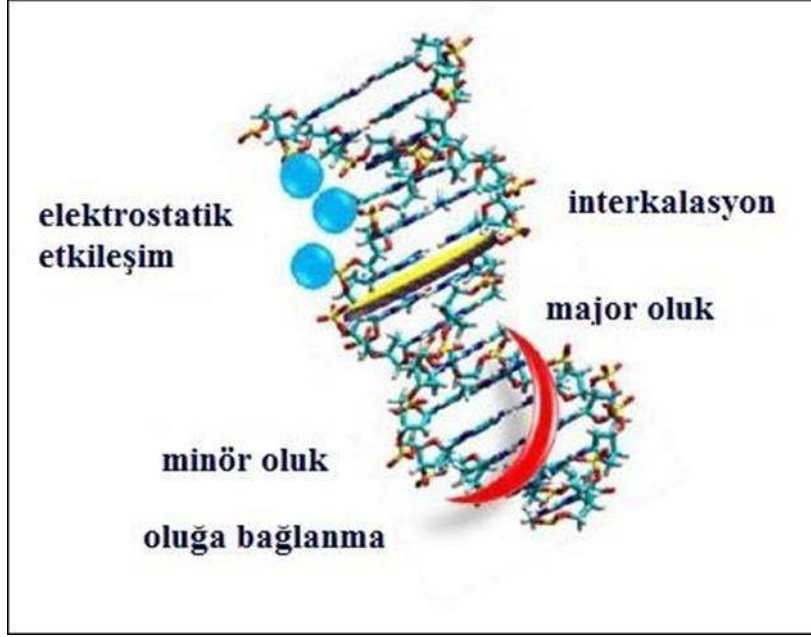
Hedef dizi ile hibridizasyondan sonra, elektrot yüzeyine immobilize edilmiş tek iplikli prob dizisinin guanin sinyalleri azalır ve bu azalma hibridizasyon tespit sinyali olarak kullanılır (Şekil 2.24) (Erdem vd., 2005).



Şekil 2.23 İndikatör olmadan DNA dizi algılama yöntemi

2.4.4 İlaç/DNA etkileşiminin voltametrik yöntemlerle incelenmesi

İlaç DNA etkileşimlerinin spektroskopik çalışmalarına alternatif yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir. Elektrokimyasal teknikler, ilaç DNA etkileşim mekanizmasını açıklamak için de kullanılabilir. Bu mekanizmanın keşfi, yeni antikanser ilaçların geliştirilmesine yönelik kritik bir adımdır (Temerk vd., 2016).



Şekil 2 24 DNA’da kovalent olmayan bağlanma çeşitleri.

Elektrokimyasal teknikler kullanılarak antikanser ilaçların DNA ile etkileşimi üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda ilgi görmeye başlamıştır. Bu yöntemlerle ilaç-DNA etkileşimini incelemek için genellikle antikanser ilacın DNA varlığında ve yokluğunda elektrokimyasal davranışı kullanılır. Eğer kullanılan antikanser ilaç elektroaktif ise bu etkileşim ilaç sinyalizasyonu kullanılarak çalışılabilir. Eğer kullanılan ilaç elektroaktif değilse etkileşim için uygun koşullar sağlandığında elektroaktif olan DNA üzerindeki Adenin veya Guanin bazları kullanılarak çalışılabilir (Aydodu vd., 2014; Rauf vd., 2005).

Antikanser ilaçların DNA ile etkileşimini araştırmak için farklı çalışma elektrotlar kullanılabilir. Bu elektrotlar şunları içerebilir: CPE (Wang vd., 1998; Bayraktepe vd., 2016), damlayan cıva elektrot (Gherghi vd., 2003), Au (Mehdinia vd., 2009), PGE (Eksin vd., 2013) ve GCE (Nawaz vd., 2006; Aydoğdu vd., 2014). Araştırmalar tipik

olarak DNA-ilaç etkileşimlerini incelemek için üçlü bir sistem olan çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrot kullanmış ve bu amaçla çeşitli voltametrik yöntemlere başvurmuştur.

DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu:

DNA biyosensörlerinin elektrokimyasal tasarımında, DNA'nın elektrot yüzeyine bağlanma işlemi son derece önemlidir. Bu adımın başarıyla gerçekleştirilmesi, prob dizisinin yüzeye kolayca ve güvenli bir şekilde bağlanmasını sağlar. Bu sayede, hedef dizinin elektrot yüzeyi ile etkileşimi daha verimli hale gelir ve oluşan hibrit yapının dış etkenler tarafından yüzeyden ayrılması gibi olumsuz etkiler önlenir. Immobilizasyon yöntemleri arasında adsorpsiyon, yakalama, kovalent bağlanma ve biyotin-avidin etkileşimi gibi farklı yaklaşımlar vardır. Her bir yöntem, DNA'nın elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamak için farklı prensipler kullanır ve özelliklerine göre tercih edilebilir.

Adsorpsiyon:

DNA'yı elektrotta immobilize etmek için en temel yöntem DNA problemlerinin elektrot yüzeyine rastgele ve birden fazla noktada bağlanmasıdır. Bu yöntem, bir kimyasal veya DNA dizisi modifikasyonuna ihtiyaç duyulmaz. DNA problemleri, elektrotta doğrudan adsorbe edilerek immobilizasyon sağlanır. Bu sayede DNA, elektrot üzerinde istenen noktalarda tutulmuş olur ve ilgili analiz veya reaksiyonlar için kullanılabilir hale gelir (Pividori vd., 2000).

(I) Fiziksel adsorpsiyon:

DNA sensörü, bir elektrotun DNA barındıran bir elektrolite batırılmasıyla ve belirli zaman boyunca orada tutulmasıyla gerçekleşir. Bu süreçte elektrot, DNA moleküllerini yüzeyine bağlamak için kullanılır. Farklı elektrot türleri, immobilizasyon için kullanılabilir. Örneğin, karbon elektrotlar, iletken polimerler, altın elektrotlar ve cıva elektrotlar, DNA'nın immobilize edilmesi için yaygın olarak kullanılan elektrot türleridir. Bu elektrotlar DNA moleküllerini tutma yetenekleri ve elektrokimyasal özellikleri nedeniyle DNA biyosensörlerinde sıklıkla tercih edilen seçeneklerdir (Pividori vd., 2000).

(II) Elektrokimyasal Adsorpsiyon:

Elektrota potansiyel uygulandığında, negatif yüklü DNA molekülleri, yüzeyde oluşan pozitif yüklerle elektrostatik olarak etkileşime girer. Elektrot yüzeyindeki pozitif yükler, DNA moleküllerini çekerek immobilizasyonunu sağlar. Bu elektrostatik etkileşim, DNA'nın elektrot üzerinde istenen konumda ve düzgün bir şekilde tutulmasını sağlayarak biyosensör uygulamalarında önemli bir adımdır.

Tutuklama:

Prob dizisi ve monomer aynı hücreye yerleştirilir ve polimerizasyon alternatif Voltametri kullanılarak izlenirken prob DNA'sı polimerik matriks içinde tutulur.

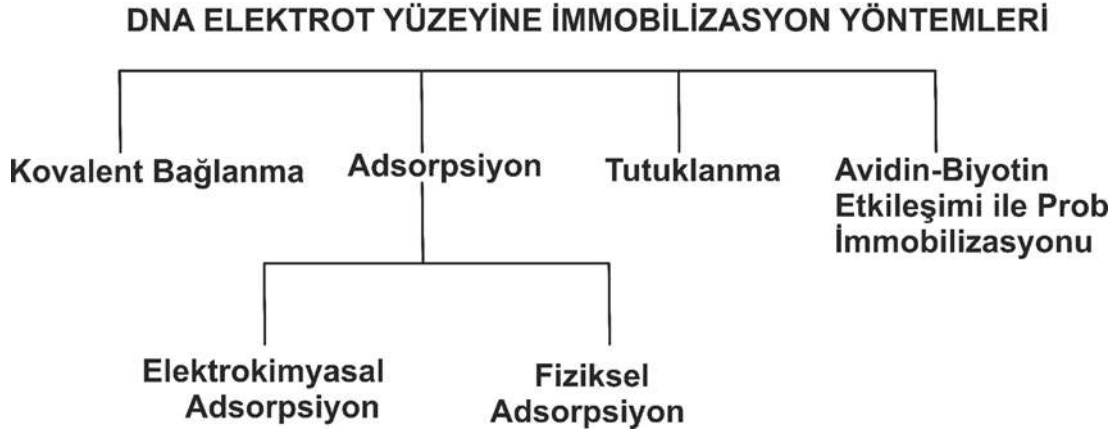
Kovalent bağlama:

Kovalent bağlar, problemleri elektrot yüzeyine bağlamak için kullanılır ve bu nedenle problemleri yüzeyden çıkarmak diğer yöntemlere göre daha zor olabilir. Elektrot seçimi genellikle altın ve karbon elektrotlar arasında yapılır. Altın elektrotlar tercih ediliyorsa, yüzey başlangıçta 3-merkaptopropiyonik asit veya L-sistein gibi bileşenlerle modifiye edilerek tiyol grupları oluşturulur. Sonrasında ise N-hidroksisüksinimid (NHS) ve etil karbodimid (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak NH₂ fonksiyonel grubu probun yüzeyine sıkıca bağlanır (Erdem ve Ozsoz, 2001).

Avidin-biyotin etkileşimiyle prob immobilizasyonu:

DNA biyosensörlerinde, avidin-biyotin etkileşimler sıklıkla kullanılır. Biotin, avidin bağlanma afinitesine sahip küçük bir moleküldür. Aşırı pH, sıcaklık ve organik çözücülerin üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Pividori vd., 2000). Bu prosedürde ilk olarak elektrota avidin damlatılır. Örnek daha sonra biyotinle işaretlenmiş bir prob çözeltisine daldırılarak immobilize edilir. Bu yöntem elektrot yüzeyinde spesifik olmayan bağlanmayı artırma dezavantajına sahiptir. DNA, belirli bir yöntem kullanılarak elektrot yüzeyine bağlanır (Şekil 2.25).

DNA'nın hedef molekülle etkileşime girdiği düşünülen çözeltiye eklenir. Elektroaktif Adenin ve Guanin bazlarının DNA üzerindeki oksidasyonu elektrot yüzeyinde gerçekleşir. Eğer çözeltideki bir molekül DNA ile etkileşime girerse, DNA'nın elektrota tutunmasından kaynaklanan akımpotansiyel sinyali veya çözeltideki ilacın akımpotansiyel sinyali azalır. Bu sayede etkileşim mekanizması ve DNA-ilac bağlanma sabiti gibi değişkenler hesaplanabilir (Tajik vd., 2015).



Şekil 2.25 DNA elektrot yüzeyine bağlanma yöntemleri

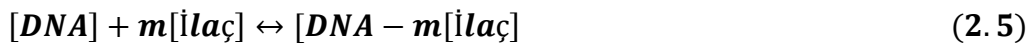
İlacın elektrota modifikasyonu ile incelenmesi:

İlacın elektrota modifiye edilerek sinyallerin okunması sağlanır. Bu yöntemde, ilaç molekülleri elektrot üzerindeki bağlantı noktaları aracılığıyla immobilize edilir ve DNA içeren bir çözeltiye daldırılır. İlaç molekülleri, bu çözelti içerisindeki DNA ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyaller, ilaçla modifiye edilmiş elektrot üzerinde algılanır ve yeniden değerlendirilir. Bu yöntem, ilaçların DNA ile etkileşim mekanizmalarının incelenmesi ve ilaçların etkinliklerinin değerlendirilmesi açısından önemli bir araştırma aracı olarak kullanılmaktadır.

İlaç/DNA etkileşiminin çözelti ortamında incelenmesi:

Çözeltide ilaç/DNA etkileşimini incelemek için, hem DNA hem de ilaç molekülleri aynı çözeltiye eklenir. Belirli bir etkileşim süresi boyunca bu çözeltide bulunurlar. Etkileşim süresi sonunda, ilaç-DNA kompleksinin voltametrik sinyali ölçülür. Bu sinyal, önceden kaydedilmiş DNA veya ilaç sinyaliyle karşılaştırılır ve ilgili hesaplamalar yapılır. Bu yöntem, ilaçların DNA ile etkileşiminin incelenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Etkileşim süresi ve sinyal ölçümleri, ilaç-DNA kompleksinin oluşumunu ve stabilitesini değerlendirmek için önemlidir. Karşılaştırmalı olarak ölçülen sinyaller, ilaç ve DNA arasındaki etkileşimin niteliği hakkında bilgi sağlar. Bu bilgiler, ilaç tasarımı ve etkinliği üzerindeki etkilerin anlaşılmasına yardımcı olur (Baytak vd., 2017).

İlaç/DNA etkileşime girdiğinde, verilen denkleme dayanarak bir kompleks oluşturdukları düşünülmektedir;



Bu kompleksin oluşum sabiti (K) ise;

$$K = \frac{[DNA - m(\text{ilaç})]}{[DNA][\text{ilaç}]^m} \quad (2.6)$$

Şekilde gösterilmiştir. K sabiti bu bağlamda DNA ve ilaç arasındaki bağlanma sabiti olarak adlandırılır. DNA-ilaç etkileşimi çalışmalarında yukarıda bahsedilen yöntemlerden herhangi biri kullanılarak ilacın veya DNA'nın konsantrasyonu sabit tutulurken diğer türün konsantrasyonu değiştirilir. Değişen akım sinyalleri kullanılarak ve sabit tür konak molekül, konsantrasyonu değişen ise misafir molekül olarak tanımlanarak bağlanma sabiti K denklem 2.7 kullanılarak hesaplanabilir.

$$\log\left(\frac{1}{[DNA]}\right) = \log K + \log\left(\frac{i_{E-M}}{i_E - i_{E-M}}\right) \quad (2.7)$$

Bu denkleme göre, ilk başta okunan sinyal ve artan DNA'ya veya ilaç derişim $\log\left(\frac{i_{E-M}}{i_E - i_{E-M}}\right)$ değeri $\log\left(\frac{1}{[DNA]}\right)$ değerine karşılık grafiğe aktarılır. Oluşan grafiğin y eksenini kestiği noktadan faydalanılarak K bağlanma sabiti bulunur (Sirajuddin vd., 2013).

Bağlanma sabiti K'nın hesaplanmasını takiben, Standart Gibbs serbest enerjisi (G^0). Denklem 2.8'de, hesaplanan bağlanma sabitini kullanarak G^0 ı hesaplamak için kullanılabilir. Negatif bir değerler, ilaç/DNA etkileşimin kendiliğinden gerçekleştiğini gösterir (Temerk vd., 2016).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2.8)$$

İlaç-DNA etkileşimlerinin UV-Vis. ile incelenmesi

UV-Vis. Spektroskopi, küçük moleküllerin DNA ile etkileşimini incelemek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde UV-Vis spektrumundaki değişimler kullanılır. Absorpsiyon bantlarındaki değişiklikler değerlendirilir. Bu modifikasyonlar hipsokromik, batokromik hiperkromik veya hipokromik etkiler olarak sınıflandırılır. Interkalasyon, DNA'nın baz çiftleri arasına küçük molekülün istiflenme etkileşimi olduğundan, DNA'ya bağlanan molekülün absorpsiyon bantlarında hipokromizm ve batokromizm etkileri gözlenir. Bu etkiler şu şekilde açıklanabilir:

1. Hipokromizm: DNA'nın içine girdiği zaman, kromafor grubu ile DNA baz çiftleri arasındaki mesafe kısalır. Bu, UV veya görünür ışıktaki absorpsiyon bantlarında bir azalmaya yol açar. DNA'nın bazlarındaki elektronik geçişler kısmen engellenir ve absorpsiyon bandında azalma, yani hipokromizm gözlenir.

2. Batokromizm: DNA baz çiftinin π orbitali ile küçük molekülün π^* orbitali arasında bir çift oluşur. Bu π - π^* konjugasyonu, enerji seviyeleri arasındaki farkı azaltır. Sonuç olarak, absorpsiyon bandında daha kırmızıya kayma (batokromik kayma) görülür. Bu, absorpsiyon bandının daha uzun dalga boylarında (daha yüksek enerjili ışık) görülmesine neden olur.

Bu hipokromik ve batokromik etkiler, DNA'ya interkale eden küçük moleküllerin UV veya görünür ışık absorpsiyon spektrumlarının değişmesine ve bu değişikliklerin DNA-etkileşimlerinin tespit edilmesinde kullanılmasına olanak sağlar (Zhou vd., 2010; Sirajuddin vd., 2013). Elektrostatik etkileşimlerin olduğu DNA ve küçük moleküller arasında, molekül DNA'nın konformasyonunu değiştirir ve bu nedenle hiperkromik etki gözlenir (Sirajuddin vd., 2013).

Moleküller DNA ile oluk bağlama yoluyla etkileşime girdiğinde, kompleksin kromafor grubunun elektronik durumunun DNA'nın oluklarındaki azotlu bazlarla örtüşmesinden dolayı absorpsiyon bandında önemli bir kayma gözlenmez (Shah vd., 2013).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu bölüm, faydalanılan elektrokimyasal cihaz, elektrotlar, ilaç etken maddeleri ve analiz için diğer tüm maddelerin hazırlanmasına ilişkin ayrıntıları içerir.

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan maddeler

Tablo 3.1 Kullanılan malzeme ve araç gereçler aşağıdaki gibi listelenmiştir.

a) Elektrokimyasal analiz cihazı	(AUTOLAB, PGSTAT128N) (şekil 3.1)(Nova 2.1.6 yazılımı ile birlikte)
b) Elektrotlar	Çalışma elektrotu: PG elektrot Karşılaştırma elektrotu: Ag/AgCl (3 M NaCl) (MF 1063, BAS) Yardımcı elektrot: Platin tel (MF 1032, BAS)
c) Deney hücresi	10 mL 3 bölmeli kapaklı standart cam Hücres (MR1208)
d) Karıştırma sistemi	Termo scientific Orion 3 star pH metre
e) Duyarlı terazi	Precisa 320XB 220A
f) Otomatik makro ve mikro pipetler	(Çeşitli ölçülerde)
g) Santrifüj	Soğutmalı Hettich ROTINA 380R
h) Çeşitli ölçülerde cam malzemeler (pyrex®)	Farklı hacimlerde tampon çözelti şişeleri, balonjoje, pipet, mezür, deney tüpleri, beher, erlen ve cam tüpler.
i) UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu UV 1700(PharmaSpec)



Şekil 3.1AUTOLAB, PGSTAT128N cihazı

3.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Tablo 3.2 Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda belirtilmiştir.

Maddenin Adı	Üretici Firma Adı
Nivolumab	Bristol-Myers Squiib
Bevasizumab	Roche
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Borik Asit (H_3BO_3)	Merck
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Merck
Glasiyel Asetik Asit (CH_3COOH)	Merck
Di sodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
Nitrik asit (HNO_3)	Sigma
Balık spermi deoksiribonükleik asit (fsDNA)	Sigma
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Tris-Hidroklorik asit	Merck
Etilen diamin tetra asetik asit di sodyum tuzu (EDTA)	Sigma

3.1.3 Çözeltilerin Hazırlanması

Tampon çözeltilerin hazırlanması:

Tezde, çeşitli elektrolit çözeltilerinin destek çözeltisi olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Bu elektrolit çözeltileri, Britton-Robinson tamponu çözeltisi (BR), Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ve Asetat tamponu çözeltisi (ABS) olarak adlandırılmaktadır. Her bir çözeltinin konsantrasyonu 0.04 M olarak belirlenmiştir.

BR tamponu için, 0.04 M H_3BO_3 (2.4732 g), 0.04 M H_3PO_4 (2.09 mL) ve 0.04 M CH_3COOH (2.29 mL) bileşenleri kullanılmıştır. PBS tamponu için, 0.04 M $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (10.723 g) kullanılmıştır. ABS tamponu ise 0.04 M CH_3COOH (2.29 mL) ile hazırlanmıştır.

Her bir çözeltinin pH değeri istenen seviyeye ayarlanmak için 5.0 M NaOH veya 5.0 M HCl çözeltisi kullanılmıştır. Tampon çözeltileri soğutulmuş ve Pyrex® cam şişelerde saklanmıştır.

Stok çözeltilerin hazırlanması:

Tez çalışması için Bristol-Myers Squibb (NIVO 40 mg/4 ml) ve Roche BEVA' dan (100 mg/5 ml) iki kanser tedavi maddesinin stok çözeltileri satın alınmıştır. Çözeltiler buzdolabında +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Stok çözeltiler uygun destek elektrolit çözeltisi ile seyreltilerek deneyde kullanılan çözeltiler elde edilmiştir.

Tris-EDTA (pH 8.0) tamponunun hazırlanışı:

Tampon çözeltisi olarak kullanılan Tris-HCl ve EDTA'nın birleştirilerek hazırlandığı belirtilmiştir. Tamponun konsantrasyonu 0.01 M olarak belirlenmiştir ve pH değeri 8.0 olarak ayarlanmıştır. Tris-HCl için, 1.576 g Tris-HCl ve EDTA için ise 0.372 g EDTA kullanılmıştır. Bu iki bileşen bir araya getirilerek tampon çözeltisi oluşturulmuştur. pH değerinin 8.0' e ayarlanması için 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl çözeltisi eklenmiştir. Ayarlama işlemi pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, 0.01 M Tris-HCl ve 1 mM EDTA içeren tampon çözeltisi (Tris-EDTA) hazırlanmış ve pH değeri 8.0 olarak ayarlanmıştır.

Stok dsDNA çözeltisinin hazırlanması:

Çalışmalarınızda kullanılan balık spermi tarafından sağlanan dsDNA (fsDNA), Sigmadan liyofilize toz olarak temin edilmiştir. fsDNA'nın stok çözeltisi, 1000 µg/mL

konsantrasyonda Tris-EDTA tampon çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) kullanılarak hazırlanmıştır ve sıfır santigrat derecenin altındaki bir sıcaklıkta saklanmıştır. Daha seyreltik fsDNA çözeltileri oluşturmak için, 0.5 M fosfat tampon çözeltisi (pH 3.0, PBS) içinde 20 mM NaCl bulunmaktadır. Deneyler, hazırlanan DNA stok çözeltisinin +4 °C'deki buzdolabında 3 gün boyunca stabil kaldığını göstermiştir. Üç günün sonunda, stok DNA çözeltisi yeniden hazırlanmış ve kullanılmıştır. Bu şekilde, fsDNA'nın kullanıldığı deneylerde Sigma tarafından temin edilen liyofilize toz halindeki balık spermi dsDNA'nın stok çözeltisi kullanılarak çalışmalarınız gerçekleştirilmiştir.

Sürfaktan çözeltilerinin hazırlanması:

Yüzey aktif madde içeren ortamlarda, anyonik yüzey aktif madde olarak sodyum dodekil sülfat (SDS), katyonik yüzey aktif madde olarak trimetilamonyum bromür (TBAB) ve setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) kullanılmıştır. Bu yüzey aktif maddeler, çeşitli konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmıştır. 0.1 M konsantrasyonunda stok çözeltiler kullanılarak, uygun destek elektrolitlerinde çeşitli konsantrasyonlarda yüzey aktif madde çözeltileri hazırlanmıştır. Bu şekilde, SDS, TBAB ve CTAB gibi anyonik ve katyonik yüzey aktif maddelerin kullanıldığı yüzey aktif madde çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarda hazırlandığı ve uygun destek elektrolitlerinde kullanılmıştır.

Girişim:

Biyolojik sıvılarda bulunabilecek ve dsDNA-NIVO/BEVA etkileşimlerini engelleyebilecek maddelerin etkisini araştırmak için Epinefrin, Dopamin, Ürik Asit, Triptofan, Norepinefrin ve Fe^{+3} , Sn^{+2} , Mg^{+2} stok çözeltileri kullanılmıştır. Bu maddelerin etkilerini incelemek amacıyla, NIVO/BEVA içeren bir elektrokimyasal hücreye, optimize edilmiş miktarlarda 10 kat derişik olacak şekilde eklenmişlerdir. dsDNA ile etkileşimden sonra, +0.0 V ile +1.3 V arasında voltammogramlar kaydedilmiş ve adenin oksidasyon pik akımları (I_x) hesaplanmıştır. Yapılan voltametrik ölçümlerle girişim türlerinin varlığı ve etkileri değerlendirilmiştir.

$$\%girişim = \frac{I_x - I_0}{I_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Voltametrik Yöntemin Gerçek Örneklerde Uygulaması:

İdrar: İlacın Ticari formuna; eczanelerden temin edilen OPTİVO (40 mg/4 ml) ve ALTUZAN enjektabl solüsyonları (100 mg/5 ml) kullanılmıştır. Flakonlar karıştırıldıktan sonra, bu karışımlardan μL 'si belirlenen şartlar altında destek çözelti içeren viyale eklenmiştir. Numune çözeltisi doğrudan analiz edildi ve kalibrasyon yoluyla miktar tayini yapıldı. Her deney üç kez tekrarlanmıştır.

Çalışmada kullanılacak PGE'nin hazırlanması

Deneylerde çalışma elektrodu olarak PGE'nin yanı sıra kırtasiyelerden ticari olarak temin edilebilen Rotring T 0.5 (Almanya) mekanik kurşun kalem modeli kullanılmıştır. PGE, Wang vd., (2000) tarafından önerilen yöntem kullanılarak oluşturulmuştur. Elektrik iletkenliğini sağlamak için, kalem gövdesinin ucunun metalik kısmı ve dış metalik tutma yeri tel ile tutturulmuştur. Uçlar (Tombo 0.5, Japonya) 60 mm uzunluğunda ve 0.5 mm çapındaydı ve düz kısımları 3 cm boyutunda kesildi. Elektrokimyasal hücrede, bu uçların 10 mm'lik bir bölümü (elektrot alanı, 15.9 mm^2) 5 mL analiz çözeltisine daldırıldı ve ölçümler alındı. EIS ve SEM ölçümlerinde kullanılacak elektrotlardan PGE/dsDNA (+1.4V/60s elektrot aktivasyonu +0.6 V /240 s ve 600 rpm karıştırma hızında DNA immobilize edilerek hazırlandı. PGE/dsDNA/NIVO elektrotu ise (+1.4V/60 s aktivasyon +0.6 V/240 s ve 600 rpm karıştırma hızında DNA immobilizasyonu ve +0.3 V/ 150 s NIVO ile etkileştirildi. Analizin 24 saat öncesinde bu elektrotlar köpüğe saplanarak kurutuldu.

3.2 CV ve EIS deneyleri

Elektrokatalitik özellikleri karşılaştırmak amacıyla, yalın hâldeki PGE, dsDNA ile immobilize edilmiş PGE ve dsDNA ile etkileşime giren BEVA ve NIVO içeren PGE için 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks probu ve 0.1 M KCl içinde CV ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 50 mV/s tarama hızında -0.3 V ila +0.6 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir. Nova 2.1.6 yazılımı kullanılarak, anodik ve katodik pik akımları (I_{pa} ve I_{pk}) ile pik potansiyelleri (E_{pa} ve E_{pk}) belirlenmiştir. Ayrıca, tepe ayrılma potansiyelleri (E_p) hesaplanmıştır. Bu şekilde, yalın hâldeki PGE, dsDNA ile immobilize edilmiş PGE ve dsDNA ile etkileşime giren BEVA ve NIVO içeren PGE için elektrokatalitik özelliklerin karşılaştırılması amacıyla siklik voltametri ölçümleri

gerçekleştirilmiş ve bu ölçümlerden anodik ve katodik pik akımları, pik potansiyelleri ve tepe ayrılma potansiyelleri belirlenmiştir.

3.3 UV-Vis Spektroskopisi ile İlgili Deneyler

Shimadzu Pharma Spec UV 1900 spektrofotometre, dsDNA ile ilaç etken maddesi etkileşimlerinin türlerini belirlemek için kullanılmıştır.

NIVO, 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1.0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) arasında değişen konsantrasyonlarda dsDNA ile etkileşime girmiş ve spektrumlar 200-400 nm dalga boyu aralığında kaydedilmiştir.

BEVA 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (1.0-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) konsantrasyonlarında dsDNA ile etkileşime girmiş ve 200-400 nm dalga boylarında spektrumlar alınmıştır.

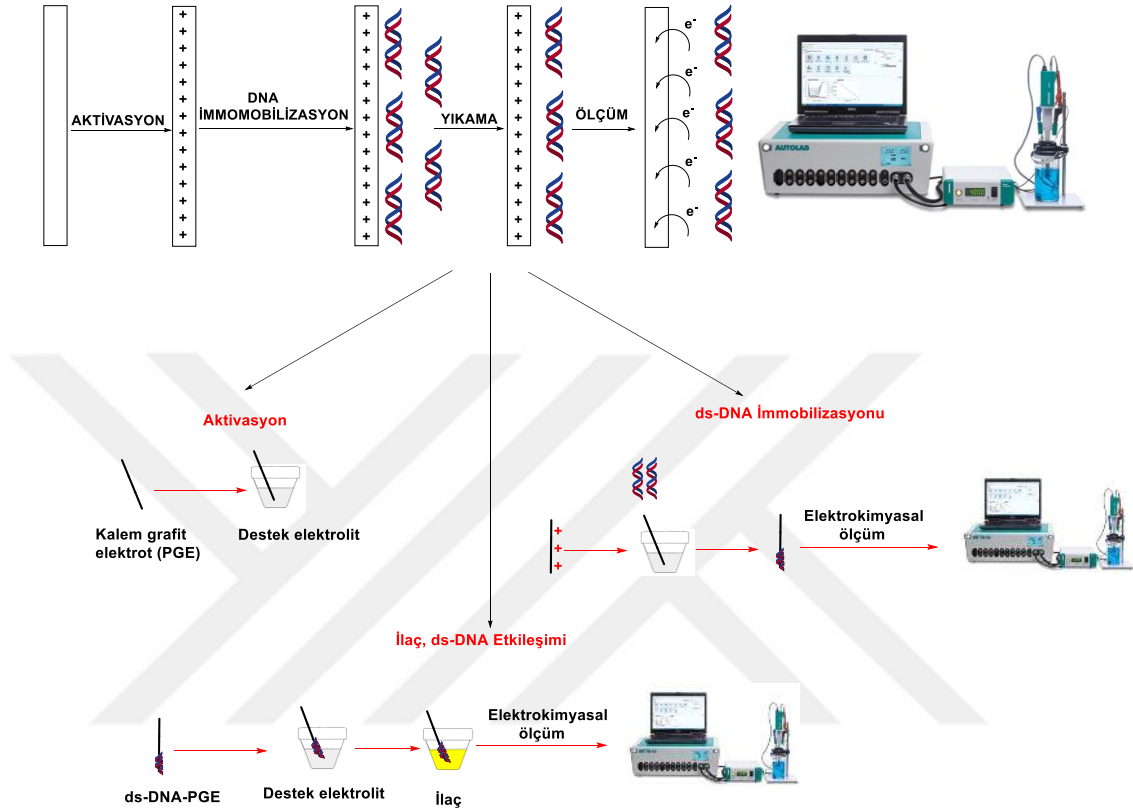
3.4 SEM görüntüleri

Yalın PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının SEM görüntüleri analizden 24 saat önce kurumaya bırakılarak, bilimsel araştırma merkezinde bulunan ZEISS LEO marka cihaz ile ölçümler alınmıştır. Elektrotlar cihazın örnek bölmesine ayrı ayrı yerleştirilerek 10000 KX büyütmede 200 nm'lik kesitler kaydedildi.

3.5 Voltametrik Teknik Seçimi ve Yöntem

BAS C3 ünitesiyle tüm Voltametrik ölçümleri CV, EIS ve DPV kaydetmek için kullanılmıştır. Referans, yardımcı ve çalışma elektrotları toplam 5,0 mL destek elektrolit ve aktif farmasötik bileşen içeren çözelti hacmine daldırılmıştır. Fosfat (pH 3.0) içinde +1.4 V uygulanarak 60 saniye ile karıştırılmadan destek çözeltisinde elektrot aktive edilip destek elektrolit içinde voltamogramlar alınmıştır. Sonra ilaç etken maddelerinin miktar tayinlerine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. NIVO ve BEVA 'nın optimize edilmiş cihaz parametreleriyle dsDNA etkileşimine yönelik DPV yönteminin PGE yanıtına etkisi için deney hücresi 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ds DNA, 0.04 M fosfat (pH 3.0) ve 0.02 M NaCl içerecektir. PGE yüzeyine dsDNA immobilize için aktive edilmiş PGE, karışan sistemde 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA içeren 0.5 M fosfat tamponu çözeltisinde, +0.6 V'da 240 saniye ile pozitif gerilim uygulanarak gerçekleştirilecektir. dsDNA kaplı PGE 10 saniye süreyle destek çözeltisi olan fosfat (pH 3.0) tamponunda yıkanacaktır. Sonra +0.0 V ile +1.3 V arasında fosfat çözeltisi (pH 3.0) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirilecektir.

PGE aktive edildikten sonra yüzeyine immobilize edilen ds DNA ile ilaç etken maddeleri olan NIVO ve BEVA' nın etkileşimlerinde izlenen deneysel yolun şematik olarak gösterimi aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Kullanılacak yöntemin şematize hali

3.5.1 Diferansiyel puls parametrelerinin elektrot yanıtına etkisi

DPV parametreleriyle duyarlı, hassas ve simetrik voltogramların için en iyi cihaz değişkenleri tespiti adına; gerilim adımı (0.001-0.05 V) aralığında, modülasyon amplitudu (0.01- 0.12 V) aralığında, modülasyon zamanı (0.01-0.12 s) aralığında ve zaman aralığı (0.1-1.0 s) aralıklarında deneyler gerçekleştirilip optimum parametreler belirlenecektir. Ölçümler alınırken bir parametrenin değişkenlik gösterdiği diğer üç parametrenin sabit tutulmasıyla ölçümler alınacaktır.

3.6 Farklı tampon sistemleri ile pH'nin elektrot yanıtına etkisi

Elektrokimyasal davranışın yanı sıra, ileriki çalışmalar için en uygun elektrolit ortamı ve pH değerini belirlemek amacıyla DPV tekniği kullanılarak ABS (pH 4.8), BR (pH 2.0-12.0) ve PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4, 9.0) tampon sistemlerinin pik akımı üzerindeki

etkisi araştırılmıştır. DPV tekniği ile elde edilen ölçümler, her bir tampon sistemindeki pik akımlarını karşılaştırmak için analiz edilmiştir. Bu ölçümler, her bir madde için daha büyük pik akımını ve daha anlamlı pik şeklini sağlayan destek çözelti ortamını ve pH değerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Elde edilen sinyallerin dikkate alındığı bu analizler sonucunda, her bir etken madde için daha uygun destek çözelti ortamı ve pH değeri belirlenmiştir. Bu değerler, maksimum sinyal verimliliği ve pik şekli kalitesi sağlayarak analiz performansını optimize etmek amacıyla önemlidir. Böylece, DPV tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarla ABS, BR ve BR sistemlerinin pik akımı üzerindeki etkisi incelenmiş ve her bir maddenin en iyi performansı gösterdiği destek çözelti ve pH değeri bulunmaya çalışılmıştır.

3.7 Sıyırma parametreleri

Araştırmamızın temel hedeflerinden bir tanesinde, NIVO ve BEVA'nın adsorptif sıyırma özelliklerini biriktirme süresi (t_{acc}) ve biriktirme potansiyeli (E_{acc}) açısından araştırmaktır. NIVO ve BEVA için biriktirme (akümülayon) süresi (t_{acc}) (0.0- 210 s) ve biriktirme gerilimi koşullarının (E_{acc}) (0.0- 0.5 V) aralığında ölçümler alınarak duyarlı bir tayin yöntemi geliştirilecektir.

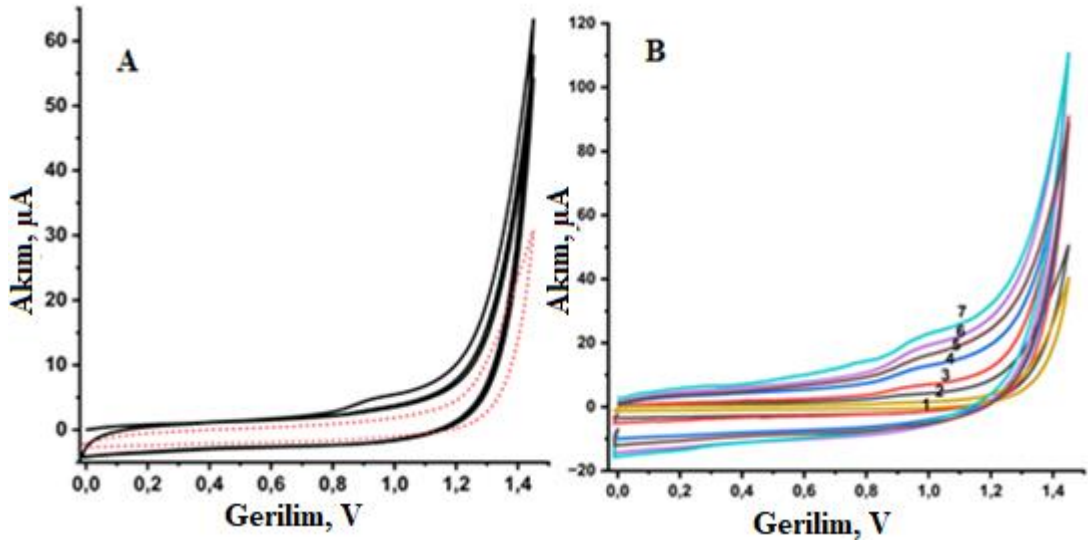
3.8 Optimum dsDNA İmmobilizasyonu

DNA'nın PGE yüzeyinde immobilizesi için karıştırma hızı (350- 600 rpm), immobilizasyon süresi (120- 420 s), DNA miktarının belirlenmesi (10- 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ve NaCl derişimi (0.0- 0.1 M) aralıklarında optimize edileceklerdir. İşlemler farklı immobilizasyon koşullarında fosfat destek çözeltisinde üç tekrar deney ile yapılacaktır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1 CV deneyleri

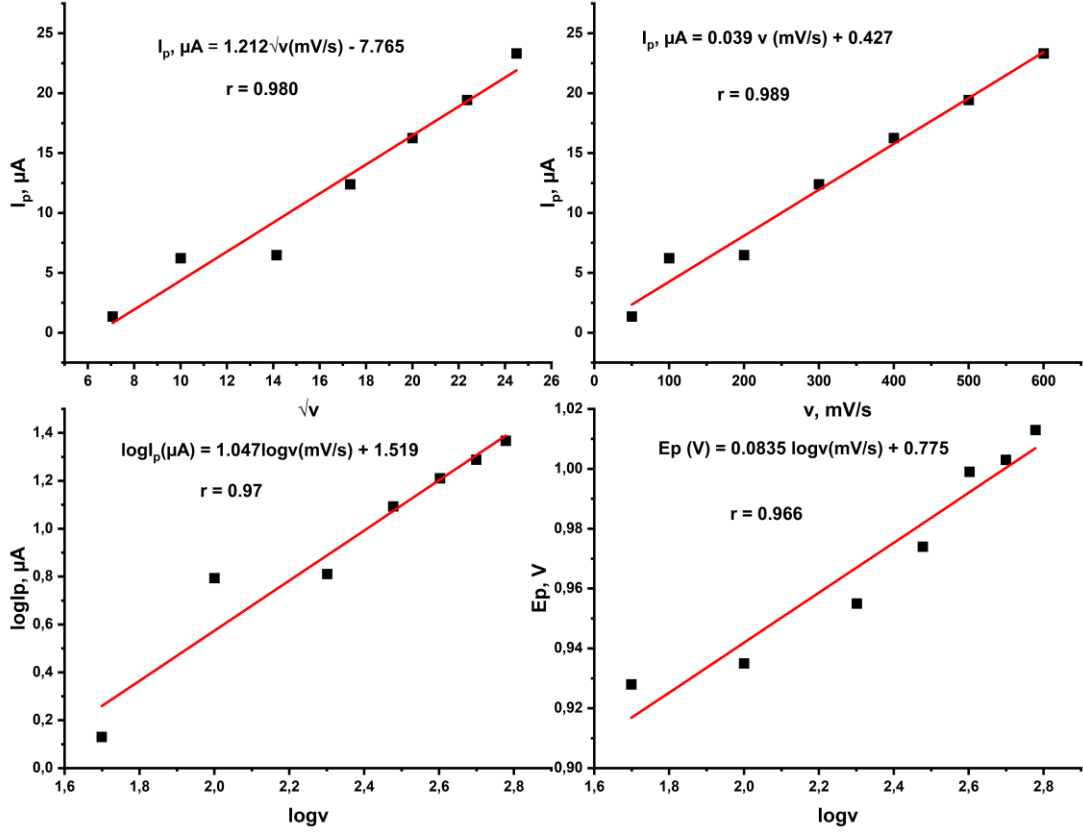
Araştırmanın başlangıcında, PGE kullanılarak 1.0 mg mL^{-1} NIVO PBS tamponunda (pH 3.0, 0.02 M NaCl) elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler, CV taramaları sırasında 0.0 V ile +1.5 V arasındaki gerilim aralığında gerçekleştirilerek elde edilmiştir. CV tekniği kullanılarak tarama hızının değiştirilmesi sonucunda pik yüksekliklerinin farklı şekillerde değiştiği gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler difüzyon, adsorpsiyon ve elektron transfer reaksiyonları ile ilişkilendirilen kimyasal reaksiyonların varlığını belirlemek amacıyla incelenmiştir. Tarama hızının değiştirilmesiyle pik yüksekliklerindeki değişimlerin incelenmesi, elektrokimyasal reaksiyon kinetiğini anlamak ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların doğasını değerlendirmek için önemlidir. Bu şekilde, adsorpsiyon, difüzyon ve elektron transferi gibi çeşitli kimyasal olaylar arasındaki etkileşimlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, NIVO molekülü ile ilgili elektrokimyasal ölçümler yapılarak, farklı tarama hızlarında pik yüksekliklerinin değişimleri incelenmiştir. Bu değişimler, elektrokimyasal reaksiyonların mekanizmasını ve ilgili kimyasal olayların varlığını anlamak için kullanılan bir yaklaşımdır.



Şekil 4.1 PGE PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde NIVO (1.0 mg/ mL) için elde edilen dönüşümlü voltamogramları (A) Üç döngülü voltamogram; (100 mV s^{-1} tarama hızı) (B) Tarama hızları (1): 50 mV s^{-1} , (2): 100 mV s^{-1} , (3): 200 mV s^{-1} , (4): 300 mV s^{-1} , (5): 400 mV s^{-1} , (6): 500 mV s^{-1} ve (7): 600 mV s^{-1}

1.0 mg /mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) ortamında 0.0 V ile 1.5 V aralığında NIVO 'nun PG elektrodu üzerindeki elektrokimyasal davranışını

incelenmesi için 100 mVs^{-1} tarama hızı Şekil 4.1A üç döngülü voltogramı kaydedilmiştir. NIVO'nun $+0.879 \text{ V}$ civarında tersinmez anodik tepe noktası verdiği görülmüştür. Şekil 4.1B'de NIVO'nun PGE üzerinde (50 mVs^{-1} - 600 mVs^{-1}) farklı tarama aralığında voltamogramlar kaydedilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik pik potansiyelinin pozitif bölgeye kaydığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2 $\sqrt{v}$ - i_p , v - i_p ve $\log v$ - $\log i_p$ E_p - $\log v$ grafikleri

PGE üzerinde gerçekleşen süreç için farklı tarama hızlarında alınan yükseltgenme piki Şekil 4.2'te doğrusal denklemler elde edilmiştir.

Teorik olarak $\log i_p / \log v$ denklemin eğiminin 1.047 çıkması i_p - v grfiğinin doğrusal olması NIVO'nu PGE yüzeyinde adsorbsiyon kontrollü bir mekanizma üzerinden yürüdüğünü gösterir.

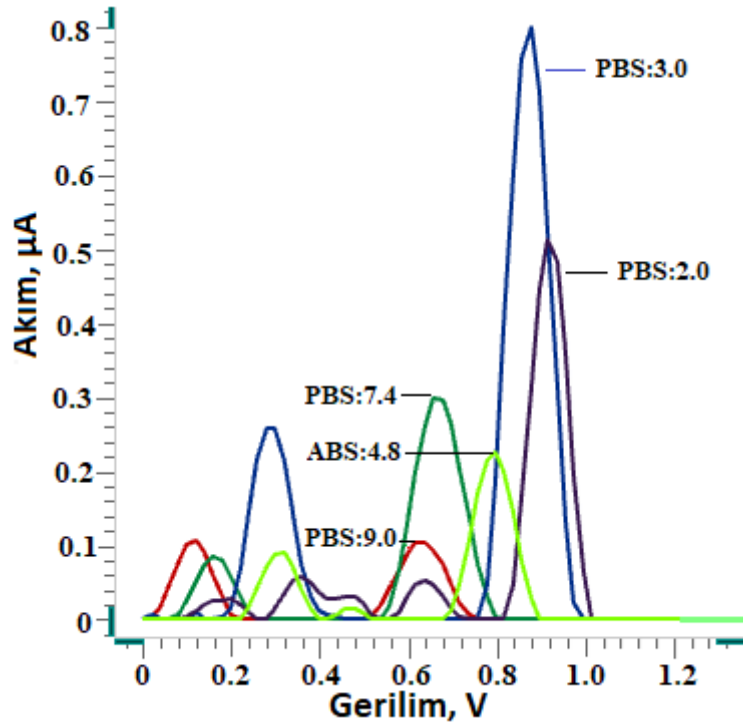
E_p ve $\log v$ arasındaki ilişki, tesinmez elektrot işleminde doğrusal bir ilişki gösterir (Laviron, E., 1979).

$$E_p = E^0 + \left(\frac{2.303RT}{\alpha nF} \right) + \left(2.303 \frac{RT}{\alpha nF} \right) \log v \quad (4.1)$$

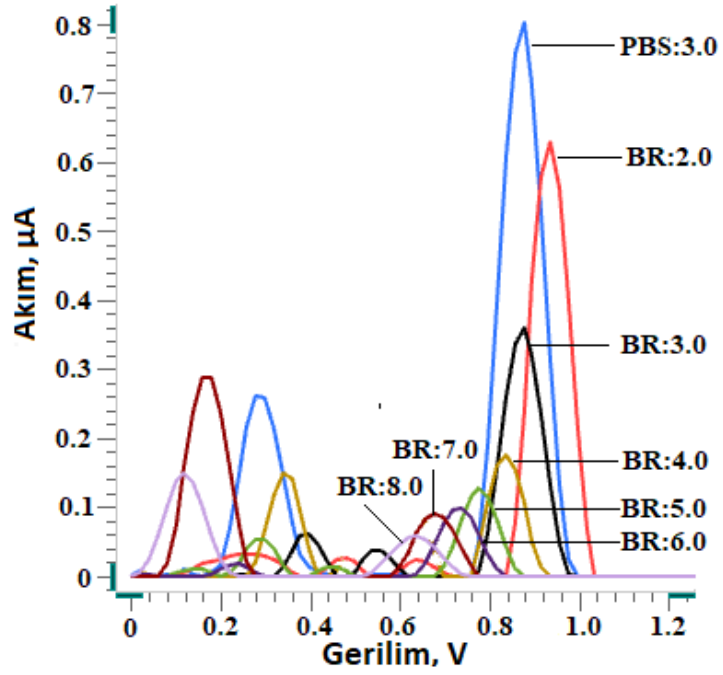
Yukarıdaki denklemde R ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), F (96480 C mol^{-1}) ve T (298 K) sabit değerlerdir. n , aktarılan elektron sayısı α , yük aktarım katsayısını ifade eder. Şekil 4.2'deki E_p -log v arasındaki eğim değeri 0.0835 'tir. Denklem 4.1'den faydalanılarak αn değeri 0.71 olarak belirlendi. Tersinmez elektrot olayında genellikle $\alpha = 0.5$ alınır ve n yaklaşık olarak $1.42 \sim 1$ dir.

4.2 NIVO için destek elektrolit ve pH etkisi

NIVO'nun elektrokimyasal davranışını derinlemesine incelemek için pH ve elektrolit ortamının oksidasyon pik akımı ve pik potansiyeli üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Bunun için farklı pH çalışma aralığına barındıran destek elektrolitleri, BR (2.0 - 8.0) tamponu, ABS (pH 4.8) ve PBS (2.0, 3.0, 7.4 ve 9.0) tamponları kullanılmış ve 0.2 mg /mL NIVO'nun farklı pH aralıklarında Diferansiyel puls voltamogramları kaydedilerek pik akımları okunmuştur. pH değerleri arttıkça pik akımının negatife doğru kaydığı şekil 4.3 ve 4.4'te gözlenmektedir.

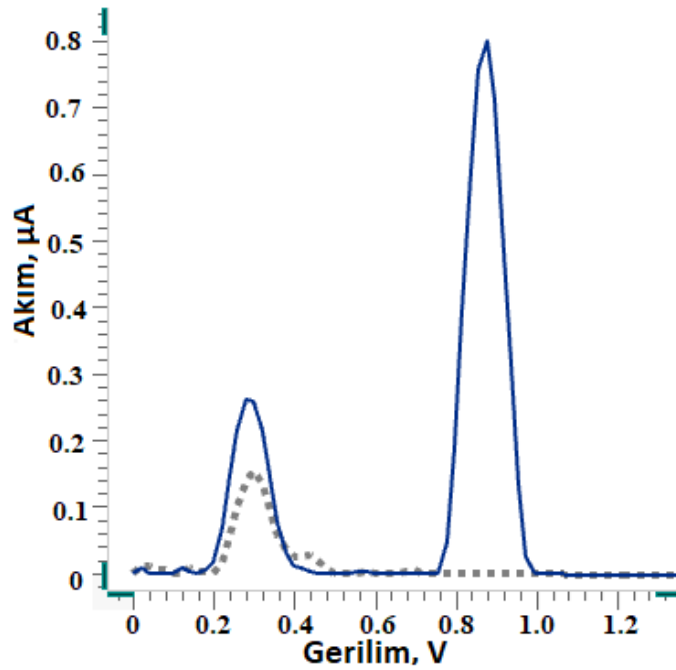


Şekil 4.3 0.2 mg /mL NIVO PBS (pH 3.0, 4.0, 7.4 ve 9.0, 0.02 M NaCl) ve ABS (pH 4.8, 0.02 M NaCl) tamponlarında PGE ile elde voltamogramlar, içeren DPV parametreleri: Gerilim adımı, 0.02 V ; Modülasyon genliği, 0.08 V ; Modülasyon süresi, 0.04 s ; Zaman aralığı, 0.4 s .

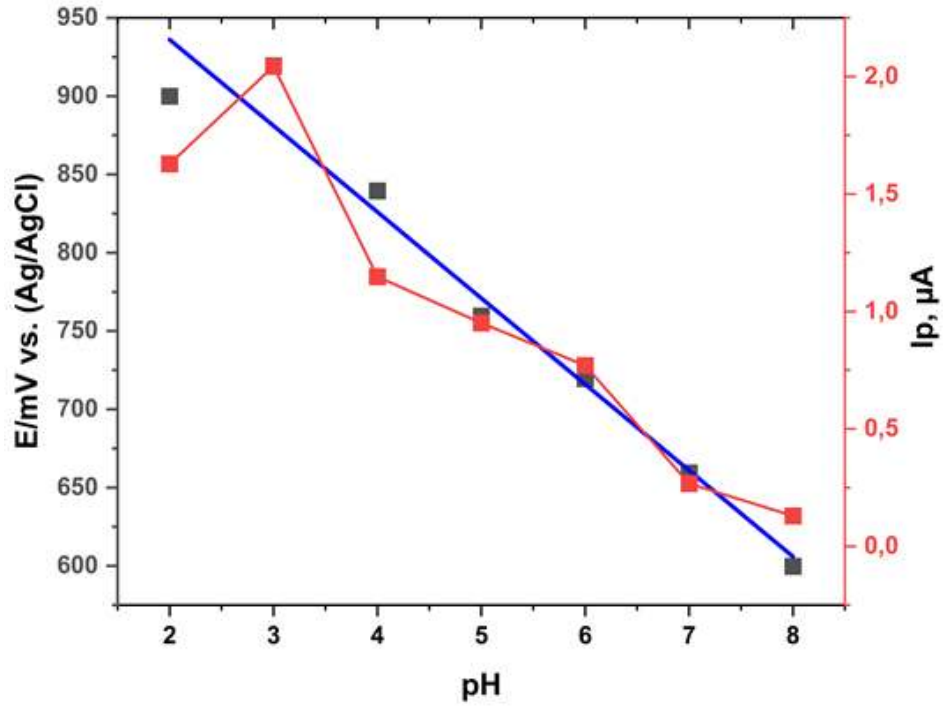


Şekil 4.4 0.2 mg /mL NIVO'ın BR (pH 2.0-8.0, 0.02 M NaCl) PGE ile elde edilen voltamogramlar. DPV parametreleri şekil 4.3'te verilmiştir.

Şekil 4.5'teki fosfat (pH 3.0) tampon sisteminde 0.88 V gerilim ve 0.8003 μA tepe akımı ile elde edilen sonuçların diğer tampon sistemleri ile alınan verilerden çok daha büyük olması ve tepe şekli ile ilgili bir sorun yaşanmaması nedeniyle çalışmada bu tampon sisteminin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.5 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PGE kullanarak elde edilen eğri. DPV parametreleri şekil 4.3'te verilmiştir. Kesikli çizgi PBS (pH 3.0) destek elektrolit çözeltisidir.



Şekil 4.6 0.2 mg /mL NIVO E_p ve I_p üzerine pH etkisi, BR (pH 2.0- 8.0)

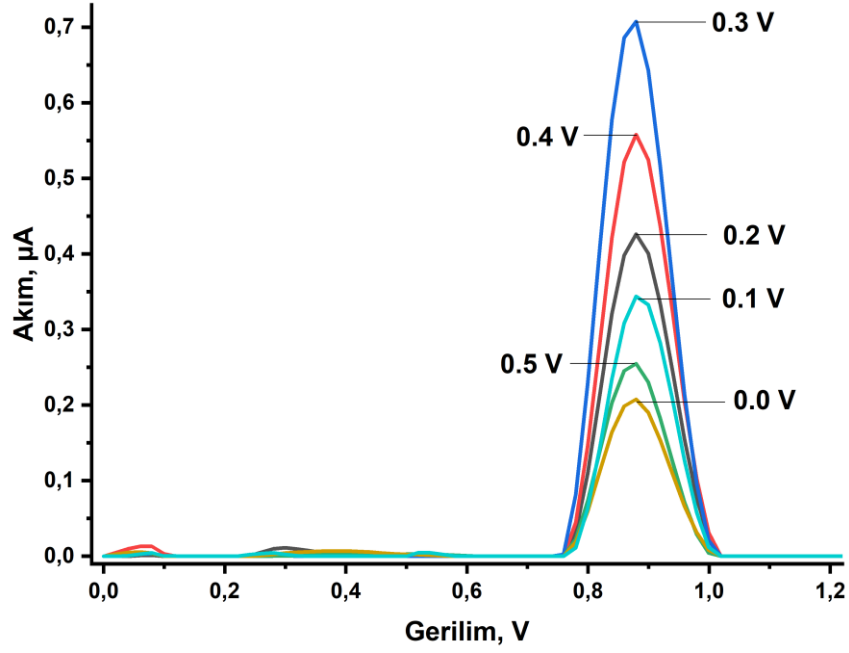
Verilerimize dayalı olarak, pik geriliminin pH değeri arttıkça daha negatif bir yönde kaydığını gözlemliyoruz. Bu izleme, NIVO yükseltgenme olayının sadece elektron transferi değil, aynı zamanda proton transferi açısından da etkili olduğunu kanıtlamaktadır. E_p -pH ilişkisini incelediğimizde, geniş bir pH aralığında iki farklı doğrusal bölge olduğunda gözlemlemekteyiz.

$$\text{pH } 2.0 - 8.0 \quad E_p(\text{mV}) = -55.1 \text{ pH} + 1046.3 \quad (r = 0.986) \quad (4.2)$$

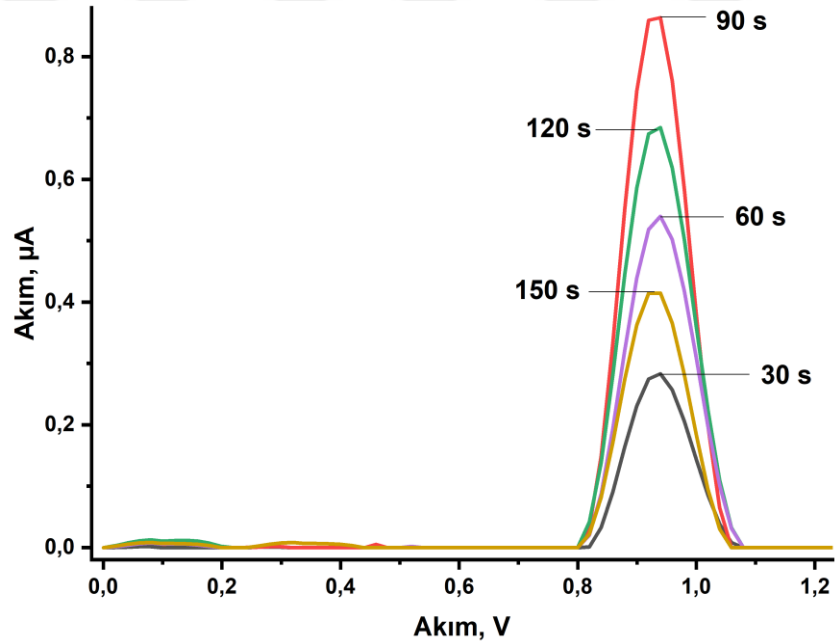
NIVO için E_p -pH incelendiğinde eğimli bölgeler görülmektedir. Eğimli bölgelerin kesim noktası pKa değerlerine karşılık gelmektedir.

4.3 Sıyırma /Biriktirme koşulları

Çalışmada NIVO molekülünün PGE üzerindeki adsorptif özellikleri irdelenmiştir. Şekil 4.7 ve 4.8, 0.2 mg/mL konsantrasyonda NIVO içeren PBS tamponunda (pH 3.0) biriktirme süresi (t_{acc}) ve biriktirme potansiyeli (E_{acc}) etkisini göstermektedir. Adsorpsiyon, bir molekülün yüzey üzerine bağlanma veya emilme sürecidir. PG elektrot üzerinde yapılan bu çalışma, NIVO molekülünün PG elektroda adsorpsiyon özelliklerini anlamak ve tespit etmek amacını taşımaktadır.



Şekil 4.7 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 V) aralığında farklı biriktirme potansiyeline ait diferansiyel pulse voltamogramları.



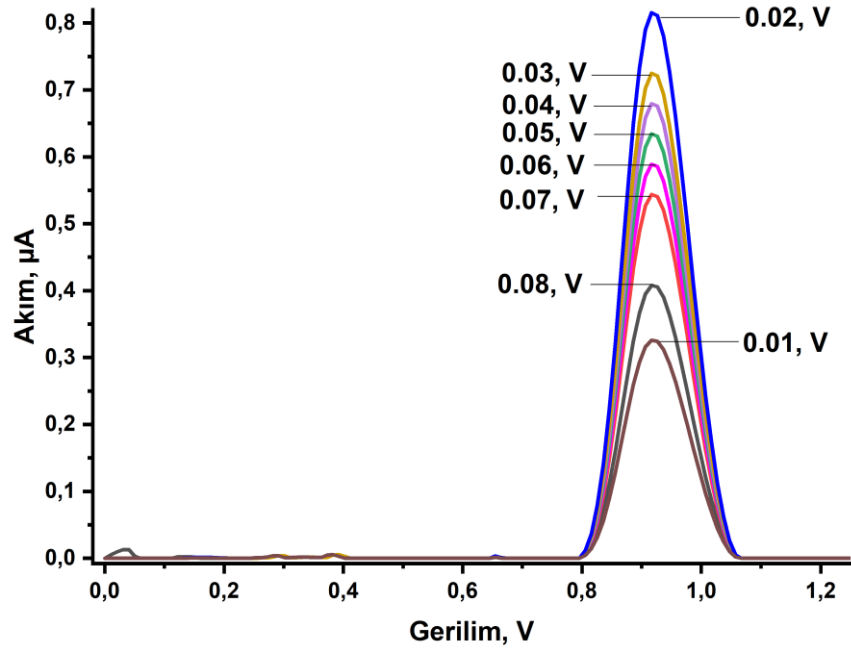
Şekil 4.8 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (30- 150 s) aralığında farklı biriktirme sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.

E_{acc} 'nin analitik sinyal üzerindeki etkisi, 0.0- 0.5 V arasında ölçümler alınmış ve ölçümlerde 0.3 V değerine kadar bir artma olduğu sonrasında ise bir miktar azaldığı gözlenmiştir. t_{acc} 'nin analitik sinyal üzerindeki etkisi ise 0-210 s aralığında ölçümler alınmıştır. Elde edilen sinyal 90 s'ye kadar artmış ve daha sonra hafifçe azalmıştır.

4.4 Diferansiyel Puls Parametrelerinin Elektrot Yanıtına Etkisine Ait Bulgular

4.4.1 Gerilimin adımının elektrot yanıtına etkisi

NIVO'nun (0.01- 0.08 V) farklı gerilim adımının fosfat tamponu (pH 3.0, 0.02M NaCl)) içerisinde NIVO sinyali üzerinden diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.9'da sunulmuştur.

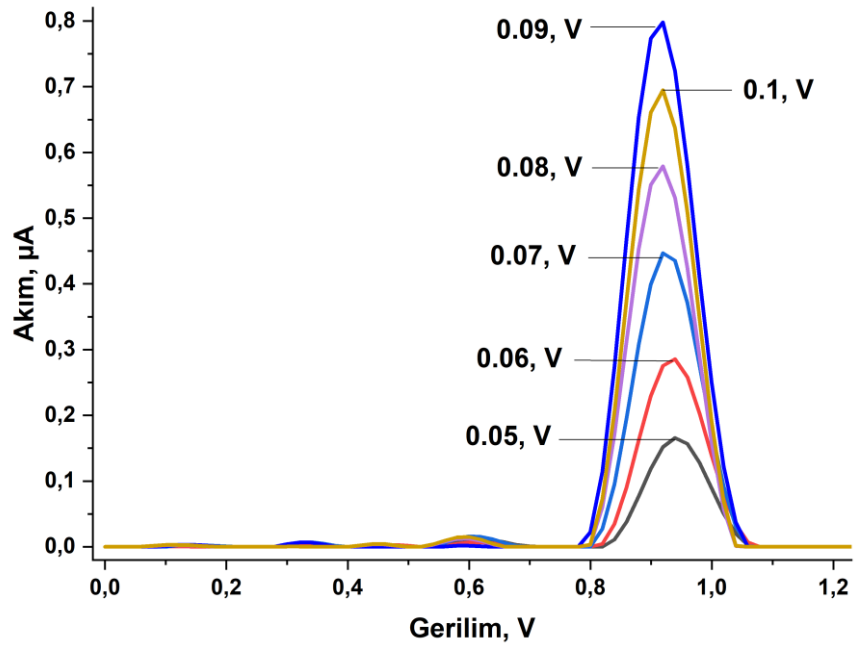


Şekil 4.9 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.08 V) aralığında farklı gerilim adımlarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle NIVO etkileşimine gerilim adımları incelendiğinde, NIVO için en iyi pik akımına sahip 0.798 μ A ile 0,02 V modülasyon genliği ile çalışmalara devam edilecektir.

4.4.2 Modülasyon genliğinin elektrot yanıtına etkisi

NIVO'nun (0.05-0.1 V) farklı modülasyon genliğinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde diferansiyel puls voltamogramları üç tekrar deneyi ile Şekil 4.10'da sunulmuştur.

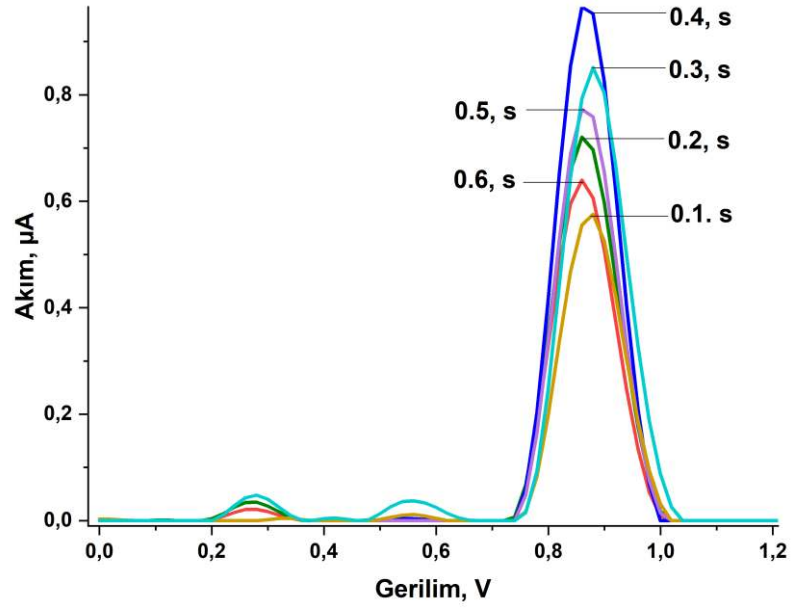


Şekil 4.10 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.05- 0.1 V) aralığında farklı modülasyon genliklerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle NIVO etkileşimine ait modülasyon genliği incelendiğinde, NIVO için en iyi pik akımına sahip 0.801 μA ile 0.09 V modülasyon genliği ile çalışmalara devam edilecektir.

4.4.3 Modülasyon süresinin elektrot yanıtına etkisi

Farklı modülasyon sürelerinin (0.1- 0.5 s) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde NIVO sinyali üzerinden diferansiyel puls voltamogramları üç tekrar deneyi ile Şekil 4.11'de sunulmuştur.

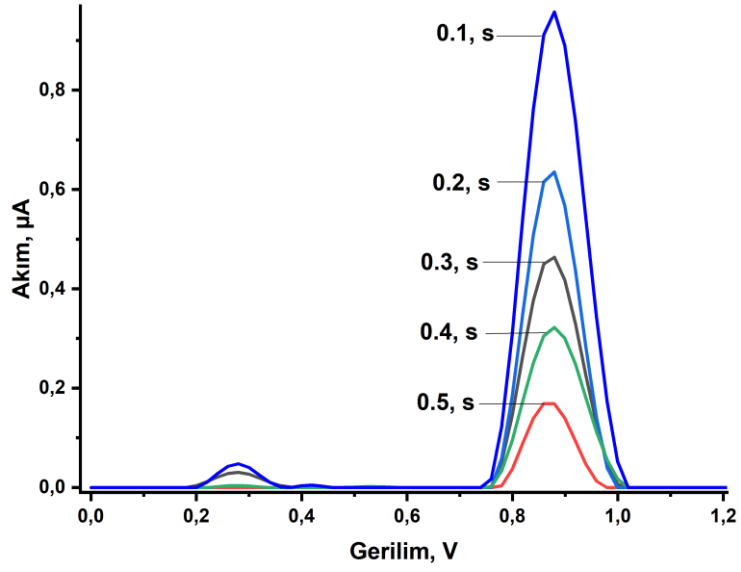


Şekil 4.11 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.6 s) aralığında farklı modülasyon sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle NIVO etkileşimine ait zaman aralığı incelendiğinde, NIVO için en iyi pik akımına sahip 0.957 μA ile 0.4 s modülasyon süresi ile çalışmalara devam edilecektir.

4.4.4 Zaman aralığının elektrot yanıtına etkisi

Farklı zaman aralığı (0.1- 0.5 s) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde NIVO sinyali üzerinden diferansiyel puls voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.12'de sunulmuştur.

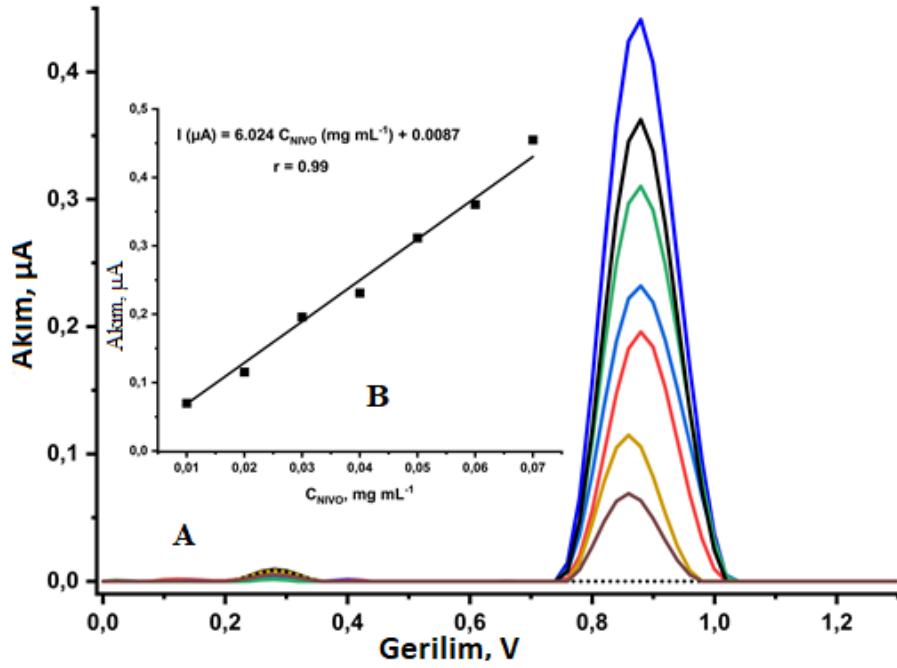


Şekil 4.12 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 s) aralığında farklı zaman aralıklarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle NIVO etkileşimine ait modülasyon zamanı incelendiğinde, NIVO için en iyi pik akımına sahip 0.964 μA ile 0.1 s modülasyon zamanı ile çalışmalara devam edilecektir.

4.5 Geliştirilen yöntemin analitik performans özellikleri

PGE üzerinde Voltametrik yöntemin analitik performans özellikleri optimum PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içeren destek çözeltisinde araştırılmış ve NIVO bileşiğinin belirlenmesi için en iyi Voltametrik özellikler Tablo 4.1'de sunulmuştur



Şekil 4.13 (A) NIVO'nun farklı derişimlerde (0.01- 0.07 mg/mL) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) alınan voltamogramlar. DPV parametreleri: gerilim adımı, 0.02 V; modülasyon genliğı, 0.09V; modülasyon süresi, 0.4 s; zaman aralığı, 0.1 s. (B): i_p/C_{NIVO} kalibrasyon grafiğı.

Yukarıdaki koşullar altında, elektrokimyasal hücreye belirli hacimlerde NIVO standart çözeltileri eklenmiş ve voltammogramlar kaydedilmiştir (üç kez). Her ilaveden sonra +0.8795 V civarındaki oksidasyon piki ölçülmüştür. Şekil 4.13 ilgili voltammogramları ve konsantrasyon pik akım ilişkisini göstermektedir. Şekil 4.13 B'de sunulan analitik eğri (0.01- 0.07 mg/mL) NIVO derişimi aralığında [$i_p (\mu A) = 6.024 C_{NIVO} (mg mL^{-1}) - 0.0087$ ($r = 0.99, n = 7$)] elde edilmiştir.

I_p yükseltgenmesiyle ilişkili olan pik şiddeti, C NIVO derişimi ve R korelasyon katsayısı, eşitlikteki önemli ölçütlerdir. Analitik eğriden LOD 3s/m ve LOQ 10s/m denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Burada, s pik akımının doğrusallık aralığındaki en düşük konsantrasyona karşılık gelen standart sapmasını (üç değerin ortalaması olarak) ve m ise denkleminin eğim değerini temsil eder. Buna göre LOD ve LOQ değerleri 2.49 µg/ mL ve 8.30 µg/ mL olarak belirlenmiştir.

PG elektrot yüzeyinde NIVO bileşığı için geliştirilen Voltametrik yöntemin tekrarlanabilirliğini test etmek için PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde 0.2 mg/mL NIVO konsantrasyonunda çözeltiler ideal deneysel koşullar altında hazırlanmış ve DPV voltammogramları aynı gün içerisinde 9 tekrar deneyiyle ölçüm alınmıştır.

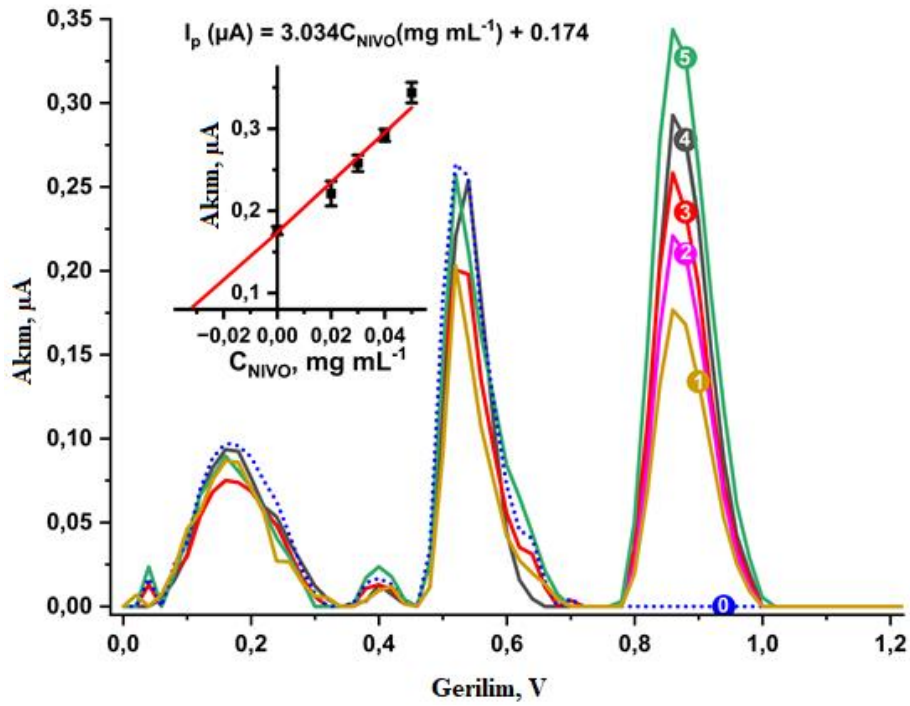
voltammogramlardaki oksidasyon pikine ait akım ve gerilim değerleriyle sonuçlar gün içi hassasiyet olarak yorumlanmıştır. Sonuçlar oksidasyon pik akımı ve gerilimi için BSS değerleri yüzde 0,78 ve yüzde 0,43 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1 NIVO tayini için geliştirilen voltametrik yöntem ile elde edilen aletsel değişkenler

Yöntem	DPV
Elektrot	PGE
Destek elektroliti	PBS tampon (pH 3.0)
DPV değişkenleri	
<i>Gerilim adımı</i>	0.02 V
<i>Modulasyon genliği</i>	0.09 V
<i>Modulasyon zamanı</i>	0.04 s
<i>Zaman aralığı</i>	0.1 s
Adsorptif sıyırma değişkenleri	
<i>Biriktirme süresi (t_{acc})</i>	90 s
<i>Biriktirme gerilimi (E_{acc})</i>	0.3 V

4.6 Gerçek Örneklerde Analiz

PGE kullanılarak geliştirilen voltametrik yöntemin, idrar numunelerindeki uygulanabilirliği test edilmiştir. 0.04M fosfat (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamından kaydedilen blank idrar ait DP voltammogramı kaydedilmiştir. Ürik aside ait pik yaklaşık +0.58 V civarında bir anodik pik gözlenmiştir NIVO'nun analizinin, bu anodik sinyali etkilemediği görülmüştür. +0.879 V civarında görülen bir anodik pikin, idrar numunesine eklenen NIVO ile arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14 NIVO'nun PBS (pH 3,0, 0,02M NaCl) ortamında (0,02 -0,06 mg/mL) standart ilavelerinden sonra idrar numunelerinde DPV voltoramları Kesikli çizgi, destekleyici elektrolit . DPV parametreleri şekil 4.13'te verilmiştir.

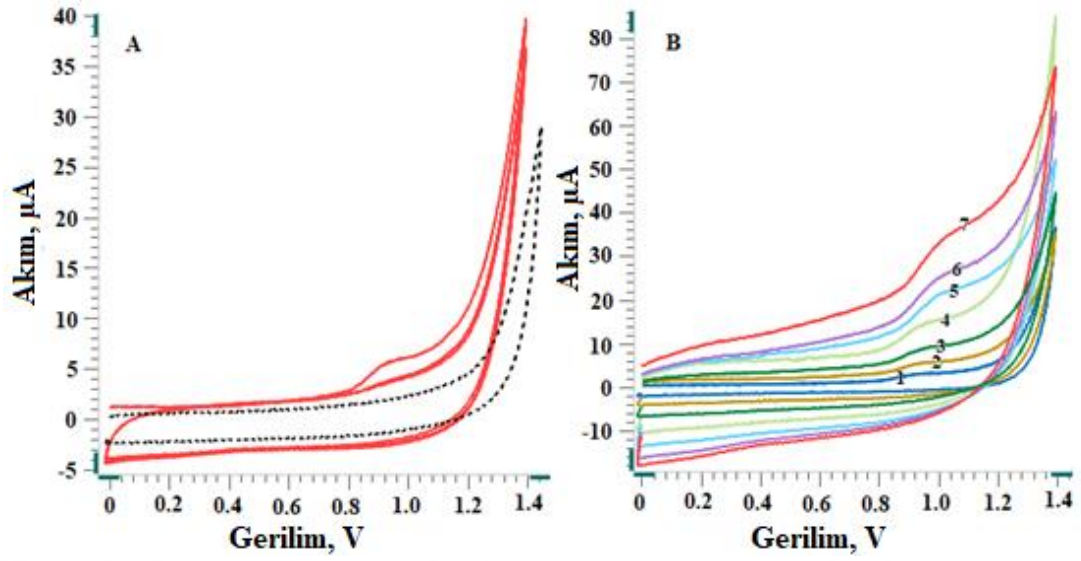
Tablo 4.2 NIVO barındıran idrar örneklerinde geri kazanım

İlave edilen	Bulunan (mg/mL) ^{a,b}	Geri kazanım ^b (%) ± %RSD
0	0.057	±4.21
0.02	0.075	90±3.97
0.04	0.095	96±3.86

Bu sonuçlar, idrar numunelerinde NIVO'nun başarılı bir şekilde analiz edilebileceğini göstermektedir.

4.7 Dönüşümlü voltametri

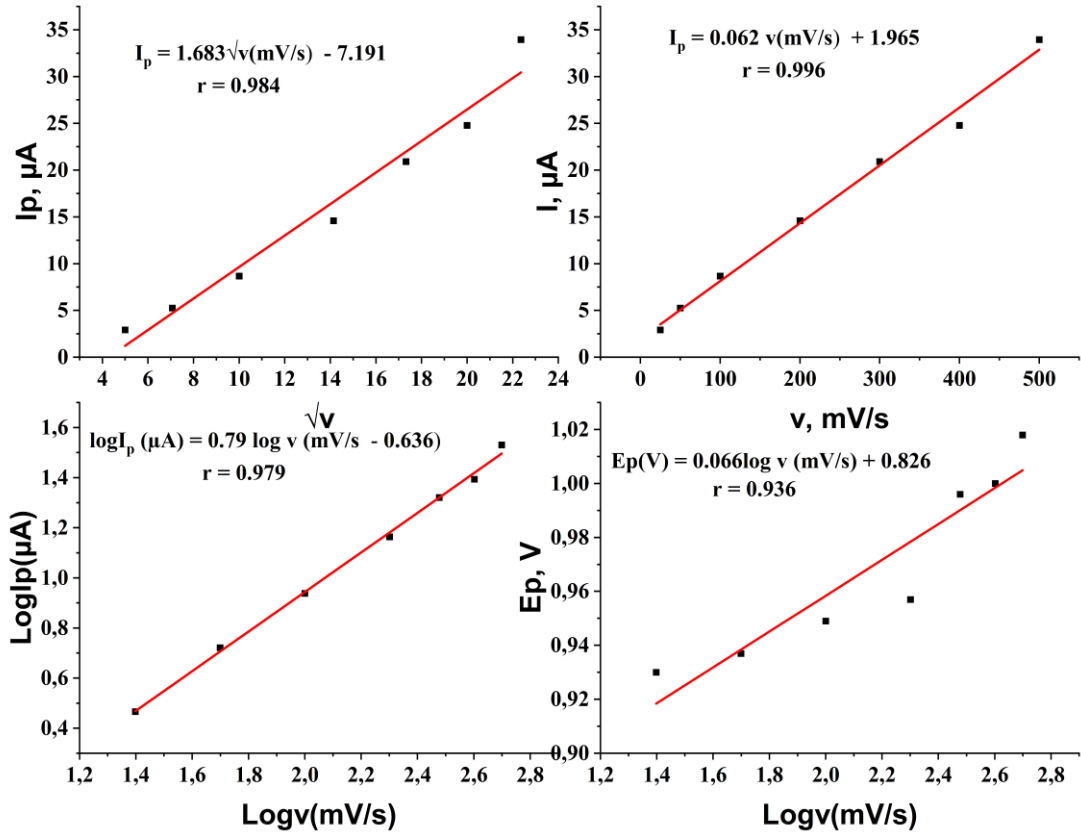
12.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.0M NaCl) ortamında (0.0- 1.5 V) aralığında BEVA'nın PG elektrodu üzerindeki elektrokimyasal davranışını incelenmesi için 100 mV s⁻¹ tarama hızında şekil 4.15A'da üç döngülü voltogramı kaydedilmiştir.



Şekil 4.15 PGE için PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içinde BEVA (12.5 mg/mL) için elde edilen dönüşümlü voltamogramları (A) Üç döngülü voltamogram; 100 mV s⁻¹ tarama hızı ve (B) Tarama hızları (1):25 mVs⁻¹, (2): 50 mVs⁻¹, (3):100 mVs⁻¹, (4): 200 mVs⁻¹, (5):300 mVs⁻¹, (6):400 mVs⁻¹ ve (7) 500 mVs⁻¹

BEVA'nın +0.90 V civarında tersinmez anodik tepe noktası verdiği görülmüştür. Şekil 4.15B'de BEVA'nın PGE üzerinde (25 mVs⁻¹- 500 mVs⁻¹) farklı tarama aralığında voltamogramlar kaydedilmiştir. Tarama hızı arttıkça anodik pik potansiyelinin pozitif bölgeye kaydığı gözlenmiştir.

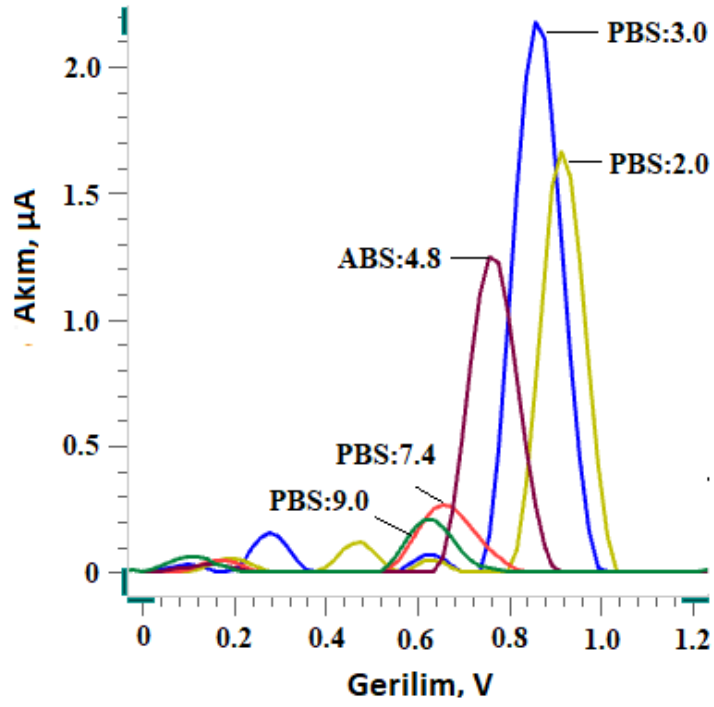
PGE'de gerçekleştirilen sürecin karakterizasyonunu için, yükseltgenme pikleri farklı tarama hızlarında kaydedildi ve bu verilere dayanarak Şekil 4.16'daki doğrusal denklem elde edildi. Teorik olarak, logip/logv denkleminin eğimi 0.79 olduğunda, ip-v grafiği doğrusal bir şekilde ilişkilendiği ve NIVO'nun PGE yüzeyinde difüzyon kontrollü adsorpsiyon mekanizması aracılığıyla gerçekleştiği gösterilir. Şekil 4.16'daki Ep-logv ilişkisinde bulunan eğim değeri 0.066 olarak belirlenmiştir. Eşitlik 4.1'den yararlanarak, αn değeri 0.896 olarak hesaplandı. Tersinmez elektrot olaylarında α 0.5 kabul edilebilir. Bu durumda, n değeri 1.792 (≈ 2) olarak bulunmuştur.



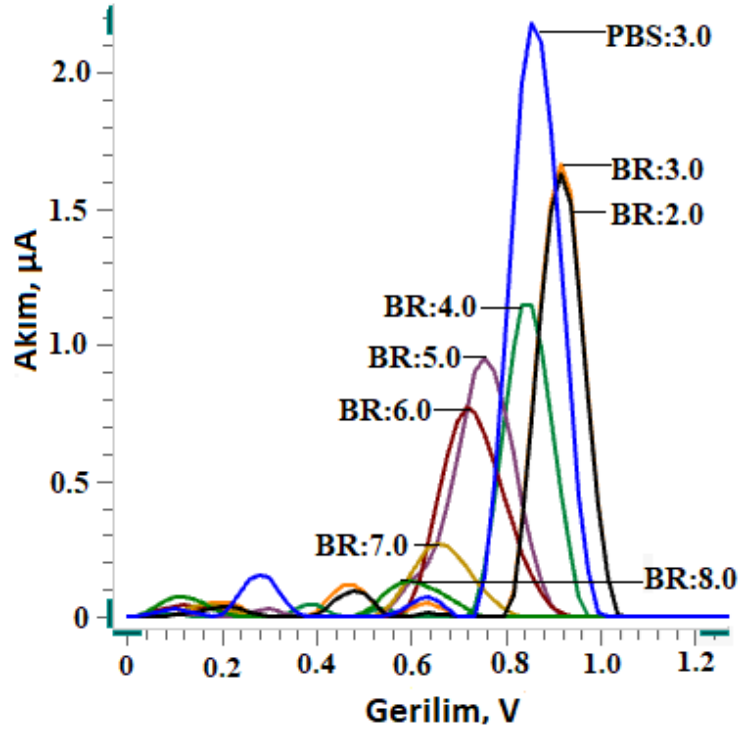
Şekil 4.16 $\sqrt{v}$ - i_p , v - i_p ve $\log v$ - $\log i_p$ ve E_p - $\log v$ grafikleri

4.8 BEVA için destek elektroliti ve pH etkisi

Malzemenin elektrokimyasal davranışını derinlemesine incelemek için pH ve elektrolit ortamının oksidasyon pik akımı ve potansiyeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Pik akımları, farklı pH aralıklarına sahip BR (pH 2.0-8.0), ABS (pH 4.8) ve PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4 ve 9.0) kullanılarak farklı pH aralıklarında 2.5 mg/mL BEVA'nın diferansiyel puls voltammogramları kaydedilerek ölçülmüştür. pH değerleri arttıkça pik akımının negatife doğru kaydığı şekil 4.17 ve 4.18'de gözlenmektedir.

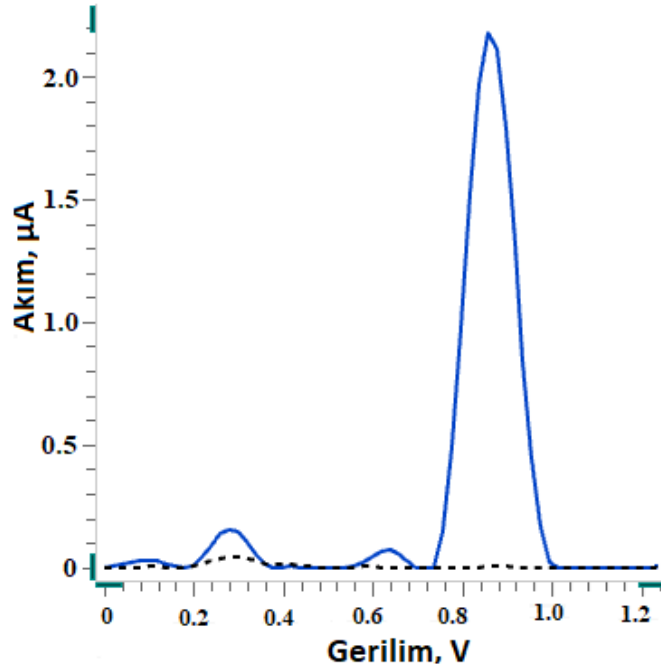


Şekil 4.17 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4 ve 9.0, 0.02 M NaCl) ve ABS (pH 4.8, 0.02 M NaCl) tamponları içinde PGE ile elde edilen voltamogramlar, DPV parametreleri: Gerilim adımı, 0.02 V; Modülasyon genliği, 0.08V; Modülasyon süresi, 0.04 s; Zaman aralığı, 0.4 s.

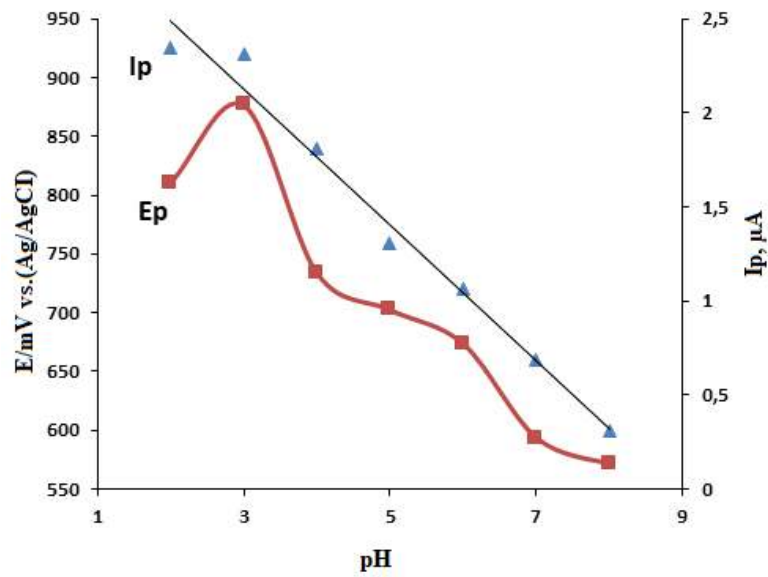


Şekil 4.18 2.5 mg/mL BEVA'nın BR tamponu içinde (pH 2.0- 8.0, 0.02 M NaCl) PGE ile edilen voltamogramlar. DPV parametreleri şekil 4.17'de verilmiştir.

Şekil 4.17'deki PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) tampon sisteminde 0.90 V gerilim ve 2.179 μ A tepe akımında elde edilen sonuçların diğer tamponlardan elde edilen sonuçlardan daha büyük olması ve tepe akımının şekliyle ilgili bir sorun yaşanmaması nedeniyle çalışmada bu tampon sisteminin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.19 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PG elektrot kullanarak elde edilen eğrileri. DPV parametreleri Şekil 4.17'de verilmiştir. Kesikli çizgi PBS (pH 3.0) destek elektrolit.



Şekil 4.20 BEVA (2.5 mg/mL) E_p ve i_p üzerine pH etkisi. BR (pH 2.0-8.0)

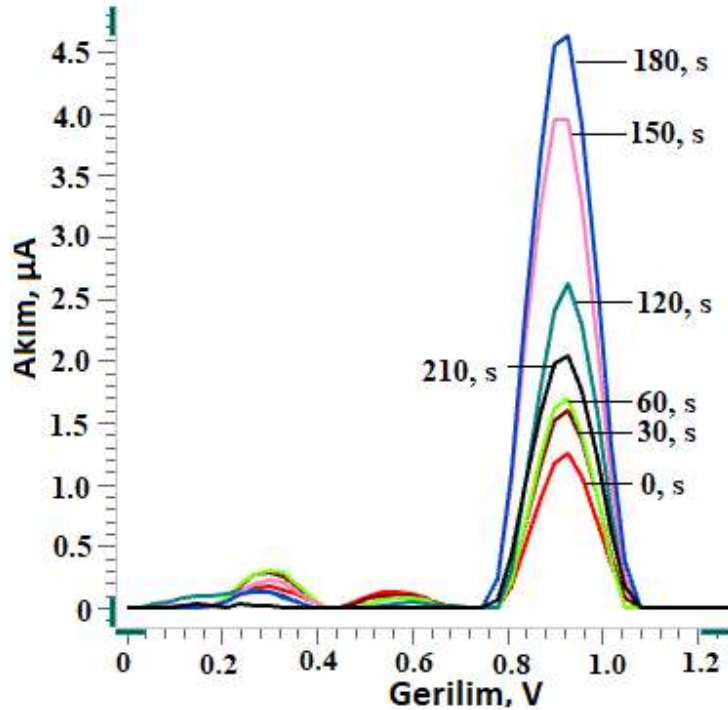
Verilere dayalı olarak gözlemlediğimiz üzere, pH değerinin büyümesi pik geriliminin daha negatif değerlere kaydığını görmekteyiz.

$$\text{pH } 2.0 - 8.0 \quad E_p(\text{mV}) = -57.7 \text{ pH} + 1063.2 \quad (r = 0.99) \quad (4.2)$$

Bu gözlem, BEVA yükseltgenme olayında elektron aktarımı kadar proton aktarımının da yer aldığının kanıtlamaktadır.

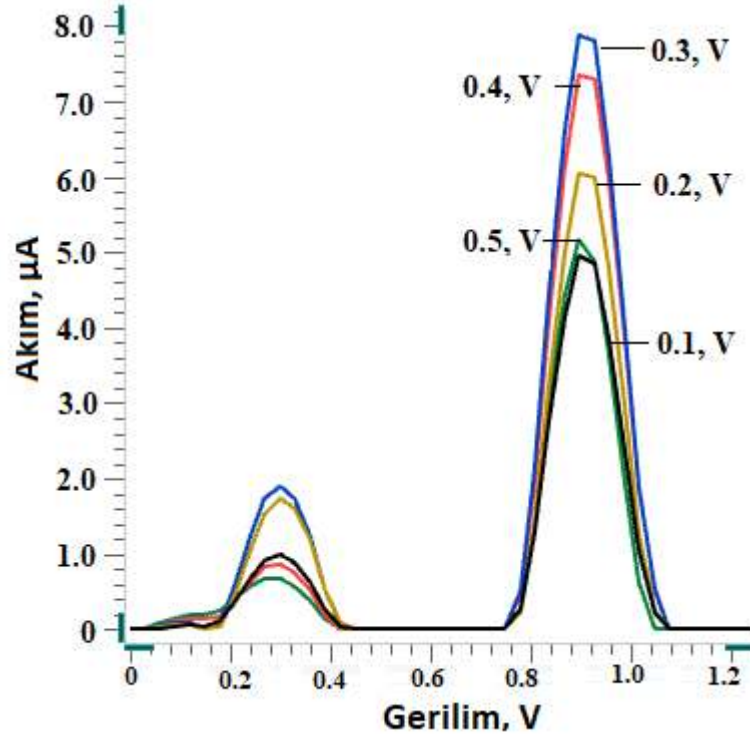
4.9 Biriktirme/sıyırma koşullarının etkisi

BEVA molekülünün PG elektrot üzerindeki adsorptif özellikleri incelenmiştir. Şekil 4.21 ve 4.22, 2.5 mg/mL derişiminde BEVA içeren PBS tamponunda (pH 3.0) biriktirme süresi (t_{acc}) ve gerilim (E_{acc}) koşullarının etkisini göstermektedir. Adsorpsiyon, bir molekülün yüzey üzerine bağlanma veya emilme sürecidir. PG elektrot üzerinde yapılan bu çalışma, BEVA molekülünün PG elektroda adsorpsiyon özelliklerini anlamak ve tespit etmek amacını taşımaktadır.



Şekil 4.21 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0- 210 s) aralığında farklı biriktirme sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları. DPV parametreleri şekil 4.25'te verilmiştir.

E_{acc} 'nin analitik sinyal üzerindeki etkisi, 0.1- 0.5 V arasında ölçümler alınmış ve ölçümlerde 0.3 V değerine kadar bir artma olduğu sonrasında ise bir miktar azaldığı gözlenmiştir. t_{acc} 'nin analitik sinyal üzerindeki etkisi ise 0-210 s aralığında ölçümler alınmıştır. Elde edilen sinyal 180 s'ye kadar artmış ve daha sonra hafifçe azalmıştır.

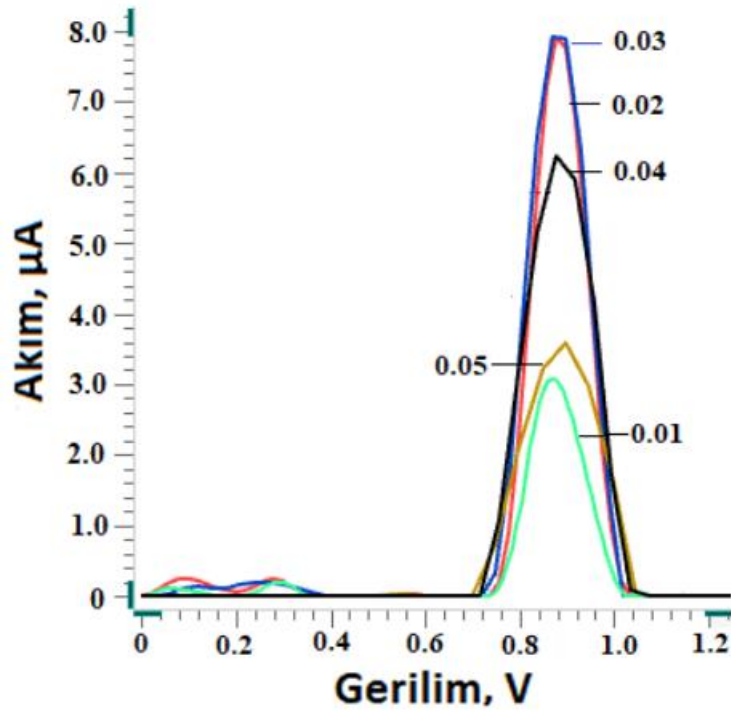


Şekil 4.22 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 V) aralığında farklı biriktirme potansiyeline ait diferansiyel pulse voltamogramları. DPV parametreleri; Gerilim adımı, 0.03 V; Modülasyon genliği, 0.08V; Modülasyon süresi, 0.01 s; Zaman aralığı, 0.1 s

4.10 BEVA için Diferansiyel Puls Parametrelerinin Elektrot Yanıtına Etkisine Ait Bulgular

4.10.1 Gerilim adımının elektrot yanıtına etkisi

BEVA'nın farklı gerilim adımının (0.01- 0.05V) aralığında PBS tamponu (pH 3.0) içerisinde adenin sinyali üzerinden diferansiyel puls voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.23'te verilmiştir.



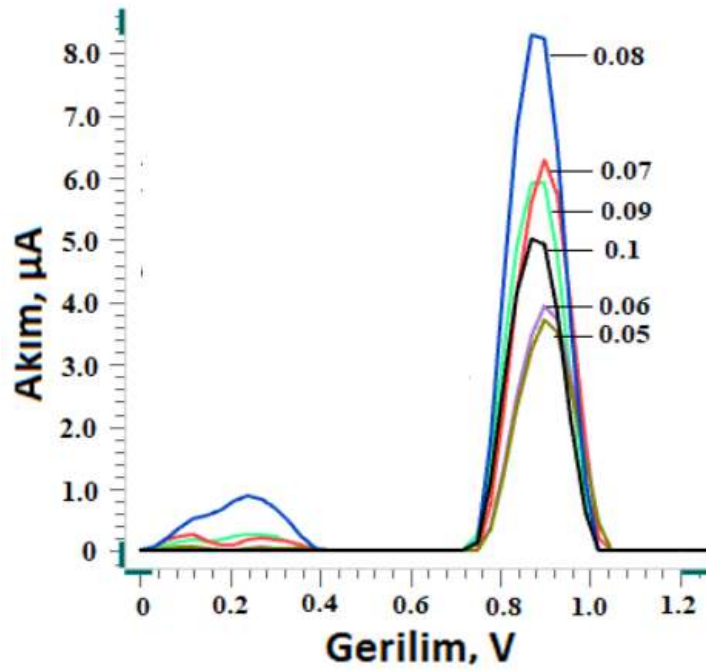
Şekil 4.23 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.05 V) aralığında farklı gerilim adımlarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle BEVA etkileşimine ait adım gerilimi incelendiğinde, BEVA için en iyi pik akımına sahip 7.91 μA ile 0.03 V adım gerilimi ile çalışmalara devam edilecektir.

4.10.2 Modülasyon genliğinin elektrot yanıtına etkisi

BEVA'nın farklı modülasyon genlik (0.05- 0.1 V) aralıklarında PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içerisinde diferansiyel puls voltamogramları üç tekrar deneyiyle Şekil 4.24'de verilmiştir.

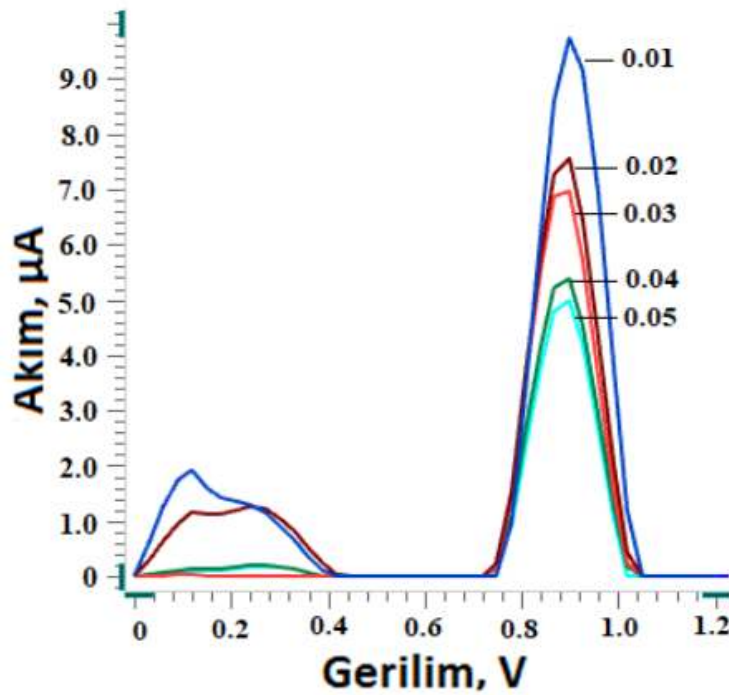
Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle BEVA etkileşimine ait modülasyon genliği incelendiğinde, BEVA için en iyi pik akımına sahip 8.01 μA ile 0.08 V modülasyon genliği ile çalışmalara devam edilecektir.



Şekil 4.24 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.05- 0.1 V) aralığında farklı modülasyon genliklerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.

4.10.3 Modülasyon süresinin elektrot yanıtına etkisi

BEVA' nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde farklı modülasyon sürelerine ait diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.25'te sunulmuştur.



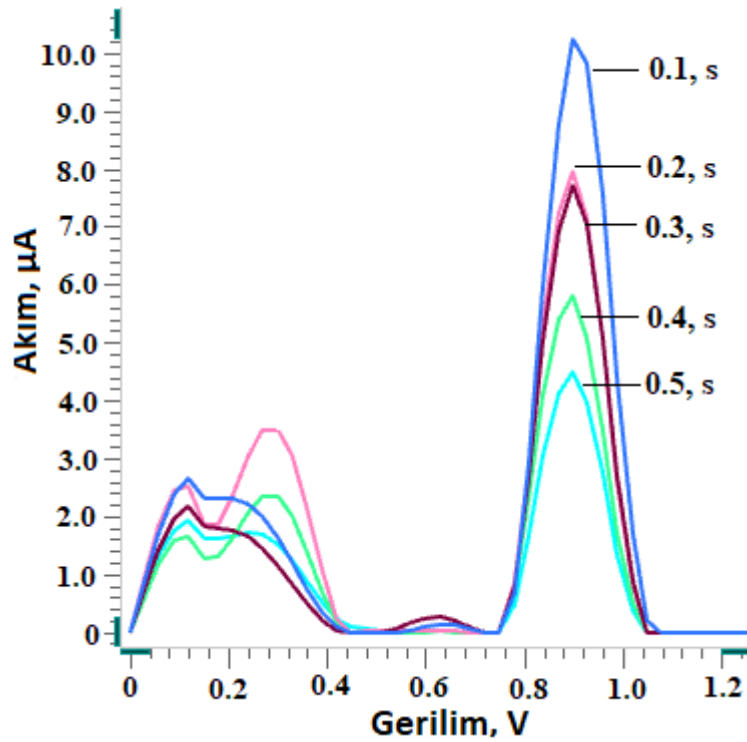
Şekil 4.25 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.01- 0.05 s) aralığında farklı modülasyon sürelerine ait diferansiyel pulse voltamogramları.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle BEVA etkileşimine ait modülasyon zamanı incelendiğinde, BEVA için en iyi pik akımına sahip 9.75 μA ile 0.01 s modülasyon zamanı ile çalışmalara devam edilecektir

4.10.4 Zaman aralığının elektrot yanıtına etkisi

Farklı zaman aralıklarında PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde BEVA sinyali üzerinden diferansiyel puls voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.26'da verilmiştir.

Aktive edilmiş PGE yüzeyiyle BEVA etkileşimine ait zaman aralığı incelendiğinde, BEVA için en iyi pik akımına sahip 11.026 μA ile 0.1 s zaman aralığı ile çalışmalara devam edilecektir.

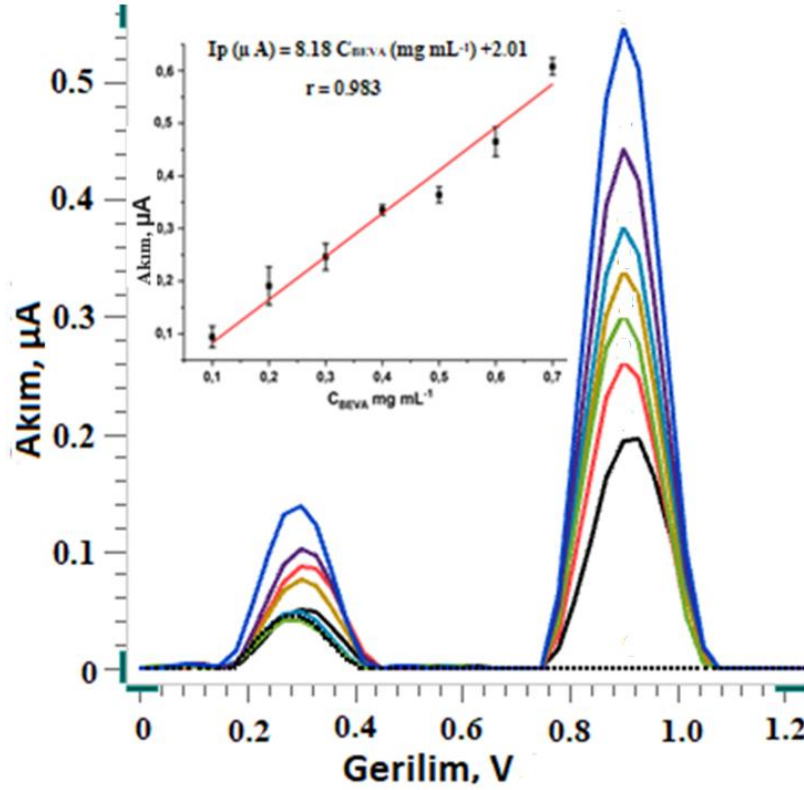


Şekil 4.26 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içinde PGE yüzeyinde (0.1- 0.5 s) aralığında farklı zaman aralıklarına ait diferansiyel pulse voltamogramları.

4.11 Geliştirilen yöntemin analitik performans özellikleri

PGE üzerinde Voltametrik yöntemin analitik performans özelliklerinin, belirtilen optimum PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içeren destek çözeltisinde araştırıldığı ve BEVA

bileşiminin tayini için en iyi Voltametrik ve analitik koşulların Tablo 4.3'te listelenmiştir.



Şekil 4.27 (A) BEVA'nın farklı derişim aralığında (0.1- 0.7 mg/mL) PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde kaydedilen DPV değişkenleri: gerilim adımı, 0.03 V; modülasyon genliği, 0.08V; modülasyon zamanı, 0.01 s; zaman aralığı, 0.1 s. (B): i_p/C BEVA kalibrasyon eğrisi. (DP/DT: +0.3 V/180 s)

Yukarıdaki koşullar altında, elektrokimyasal hücreye belirli derişimlerde BEVA standart çözeltileri eklenmiş ve voltammogramlar kaydedilmiştir (üç kez). Her ilaveden sonra +0,90 V civarındaki oksidasyon piki ölçülmüştür. Şekil 4.27 ilgili voltammogramları ve konsantrasyon pik akım ilişkisini göstermektedir.

Şekil 4.27 B'de verilen (0.1- 0.7 mg/mL) aralığında [$I_p (\mu A) = 8.18 C_{BEVA} (mg/mL) + 2.01$ ($r = 0.983$, $n=7$)] yanıt vermiştir. Eşitlikteki i_p yükseltgenme pik şiddeti, C_{BEVA} derişimi ve R korelasyon katsayısıdır.

LOD ve LOQ değerleri genellikle analitik yöntemlerin duyarlılığını değerlendirmek için kullanılır. LOD değeri, analitik sinyalin arka plan gürültüsüne oranıyla belirlenirken, LOQ değeri LOD'in 3 katı olarak hesaplanır. Bu değerler, analitik yöntemin ne kadar düşük konsantrasyonlarda analit tespit edebildiğini ve ölçebildiğini gösterir. Bu durumda, LOD, 0.026 mg/mL ve LOQ , 0.086 mg/mL olarak belirlenmiştir. LOD değeri, düşük konsantrasyonlarda bile analit sinyalinin arka plan gürültüsüne göre belirgin bir şekilde fark edilebildiğini gösterirken, LOQ değeri ise

daha düşük konsantrasyonlarda da analit tespit edilebildiğini ifade eder. Diğer bir ölçüm olan BSS (gün içi hassasiyet) ise, aynı gün içerisinde yapılan ölçümlerin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için kullanılır. Bu durumda, BEVA için oksidasyon pik akımı ve geriliminin BSS değerleri yüzde 4.74 ve yüzde 0.65 olarak bulunmuştur. Bu değerler, aynı gün içinde yapılan ölçümlerin istikrarlı ve tekrarlanabilir olduğunu gösterir.

Bu sonuçlar, analitik yöntemin duyarlılığını, hassasiyetini ve tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için önemli veriler sağlamaktadır. LOD ve LOQ değerleri, yöntemin hangi konsantrasyonlarda kullanılabileceğini belirlemeye yardımcı olurken, BSS değerleri de yöntemin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermektedir.

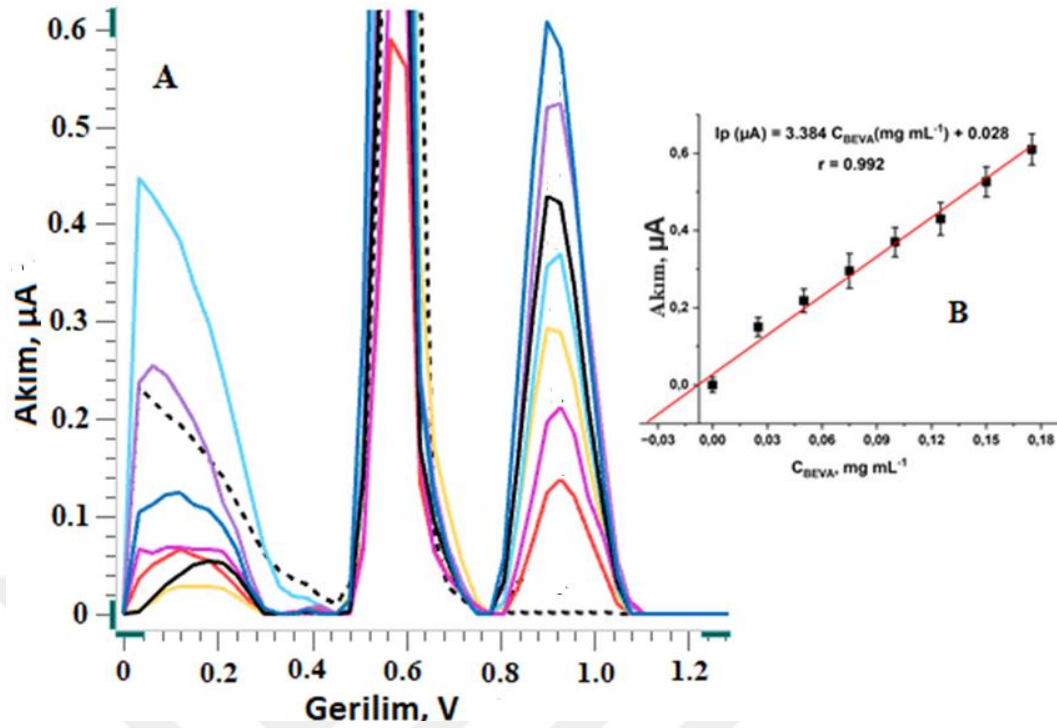
Bu veriler ışığında BEVA için belirlenen cihaz parametreleri Tablo 4.3 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 BEVA tayini için voltametrik yöntem ile elde edilen deneysel ve aletsel değişkenler

Yöntem	DPV
Elektrot	PGE
Destek elektroliti	PBS tampon (pH 3.0)
DPV değişkenleri	
<i>Gerilim adımı</i>	0.03 V
<i>Modulasyon genliği</i>	0.08 V
<i>Modulasyon zamanı</i>	0.01 s
<i>Zaman aralığı</i>	0.1 s
Adsorptif sıyırma değişkenleri	
<i>Biriktirme süresi (t_{acc})</i>	180 s
<i>Biriktirme gerilimi (E_{acc})</i>	0.3 V

4.12 Gerçek Örneklerde Analiz

PGE kullanılarak geliştirilen voltametrik yöntemin, idrar numunelerindeki uygulanabilirliği test edilmiştir. 0.04M (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamından kaydedilen blank ürine ait DP voltammogramı kaydedilmiştir. Ürik aside ait pik yaklaşık +0.58 V civarında bir anodik pik gözlenmiştir BEVA'nın analizinin, bu anodik sinyali etkilemediği görülmüştür. +0.90 V civarında beliren bir anodik pikin, idrar numunesine eklenen BEVA'nın sinyalinin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.28 BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında (0.047 -2.01 mg/mL) standart ilavelerinden sonra idrar numunelerinde DPV voltoramları. Kesikli çizgi, destekleyici elektrolit . DPV parametreleri şekil 4.27'de verilmiştir.

Tablo 4.4 BEVA içeren idrar örneklerinde geri kazanım

İlave edilen	Bulunan (mg/mL) ^{a,b}	Geri kazanım ^b (%) ± %RSD
0	0.187	± 2.74
0.1	0.281	94.20 ± 3.98
0.4	0.613	106.50 ± 3.26

Bu sonuçlar, idrar numunelerinde BEVA'nın başarılı bir şekilde analiz edilebileceğini göstermektedir.

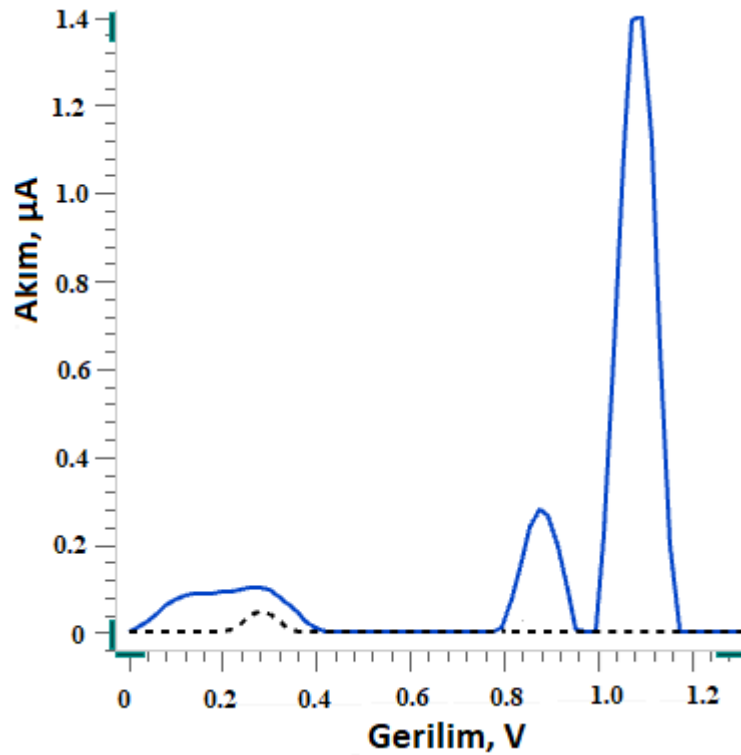
4.13 Girişim

Bu çalışmada biyolojik sıvılarda bulunma olasılığı yüksek epinefrin, eopamin, ürik asit, triptofan, norepinefrin ve Fe⁺³, Sn⁺², Mg⁺² çözeltilerde girişim çalışılmıştır. 0.2 mg/mL NIVO ve 2.5 mg/mL BEVA sabit tutularak girişim yapacak çözeltileri bu derişimlerden 10 kat kadar derişik kullanarak ölçümler alındığında NIVO ve BEVA pik akımı ve yüksekliğinde önemli bir değışime uğramadığı gözlemlendi.

4.14 dsDNA Miktarının Belirlenmesine Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarım Çalışmalarına Ait Bulgular

4.14.1 Voltametrik teknik seçimine ait bulgular

dsDNA'nın fosfat tampon sistemi içerisinde adenin ve guanin sinyalleri üzerinden DP voltamogramları ile Şekil 4.29'da elde edilen voltamogramı verilmiştir.

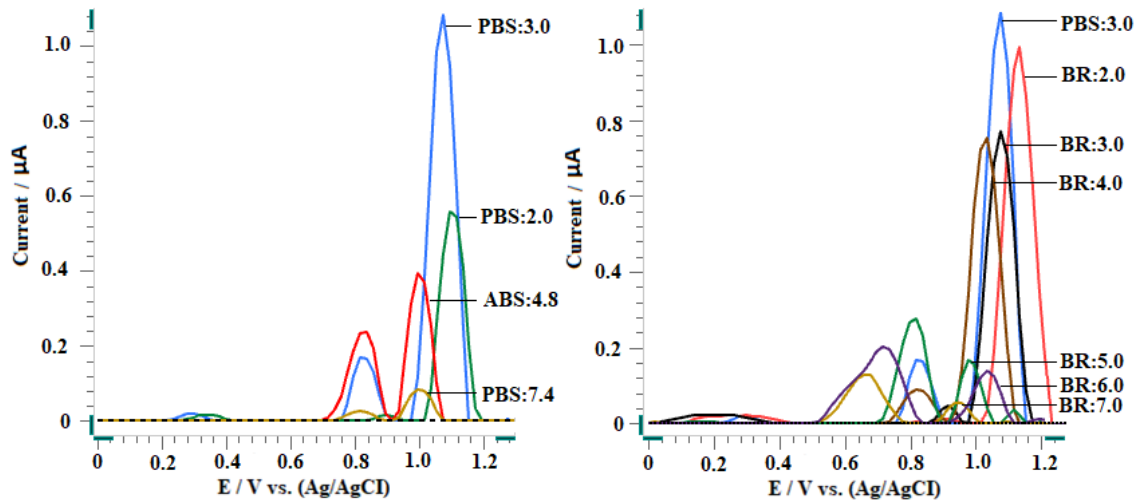


Şekil 4.29 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın diferansiyel puls PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) tamponunda. Elektrot aktivasyonu; +1.4 V/60 s (DP/DT:+0.6 V/ 240 s, 600 rpm karıştırma hızı)

Yüzeyi aktive edilmiş PGE'ye 20 µg/mL dsDNA immobilize edildikten sonra adenin bazına ait yükseltgenme sinyali; diferansiyel puls voltamogramı ile yaklaşık +1.1 V'da, üç ardışık ölçüm sonucu 1.4034 µA düzeyinde (bağıl standart sapması %2.06) elde edildi.

4.14.2 dsDNA'nın farklı tampon sistemlerinin ve pH'nin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular

dsDNA'nın farklı tampon sistemleri içerisinde Adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.30' da elde voltamogramlar verilmiştir

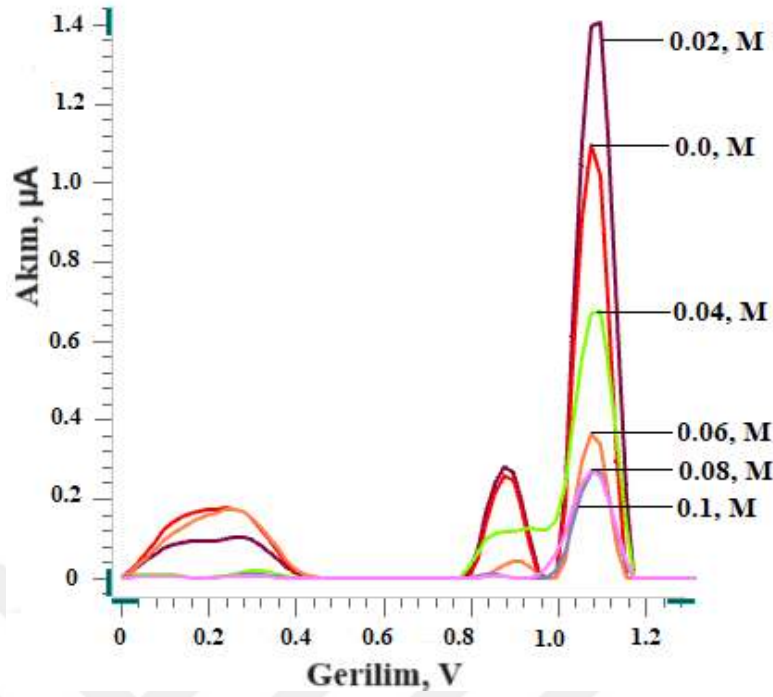


Şekil 4.30 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4), ABS (pH 4.8) tamponlarında BR (pH 2.0- 7.0) ortamlarında diferansiyel puls voltamogramları. Elektrot aktivasyonu; +1.4 V/ 60 s, (+0.6 V, 240 s İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı)

Elektrokimyasal çalışmalarda destek çözeltisi türü ve pH seçimi elektrot yüzeyinde ve çözelti ortamında meydana gelen değişimlerin yorumlanmasında son derece önemlidir. PG elektrot +1.4 V/ 60 s aktive edildikten sonra 20 µg/mL dsDNA ile +0.6 V/ 240 s ve 600 rpm hızında immobilize edip farklı tampon sistemleri; ABS (pH 4.8), PBS (pH 2.0, 3.0, 7.4), BR (pH 2.0- 7.0) içerisinde Adenin bazı üzerinden DP voltamogramları (Şekil 4.30 A, B) sunulmuştur. Şekil 4.30 detaylı bakıldığında pH değeri arttıkça adenin bazına ait pik potansiyeli ve guanin sinyalleri negatife doğru bir kayma gösterdikleri belirlendi. Farklı destek elektrolitlerde alınan ölçümlerde pH değişimlerinden etkilendiği (Şekil 4.30 A, B) görülmekte ve en duyarlı analitiksel pik sinyalinin PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) tamponu olduğu görülmektedir.

4.14.3 NaCl Miktarının etkisinin incelenmesi

Farklı NaCl derişimleri PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.31'te verilmiştir.



Şekil 4.31 PG yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA'nın (0.0- 0.1 M) aralıklarında NaCl'nin pik sinyali üzerindeki diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).

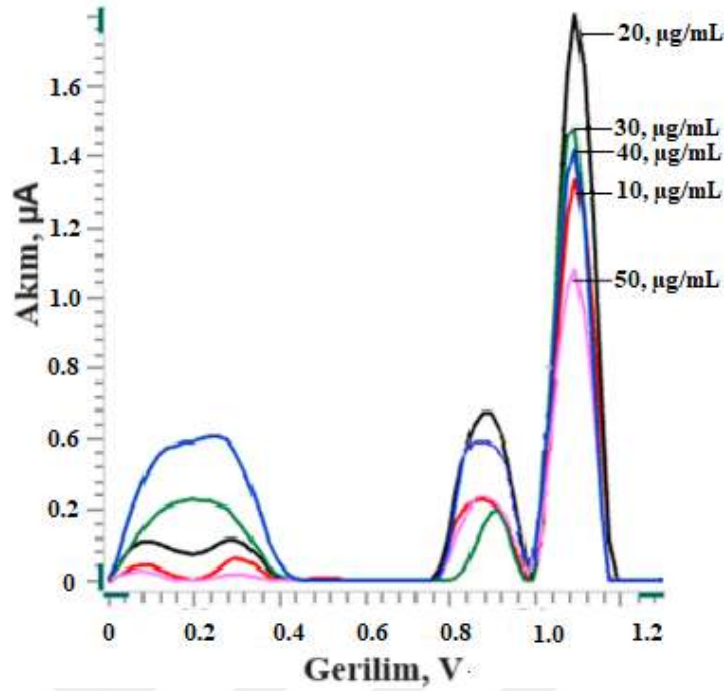
PGE/dsDNA elektrot üzerindeki adenin yükseltgenme sinyalinin NaCl derişiminin etkisiyle nasıl değıştiğini belirlemek amacıyla DP voltamogramları kullanılmıştır. Bu deneyde, PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) tampon içinde, farklı NaCl derişimleri (0.0-0.1M) aralığında örnekler hazırlanmış ve her bir derişim için DP voltamogramları kaydedilmiştir. Voltamogram verileri kullanılarak adenin pik akımları, NaCl derişimine bağılı olarak grafiksel olarak temsil edilmiştir. Elde edilen grafik, NaCl derişiminin adenin yükseltgenme pik akımları üzerindeki etkisini göstermektedir. Grafikte, NaCl derişimi arttıkça adenin pik akımlarının azaldığı görülmektedir. Bu durum, NaCl'nin dsDNA üzerinde oluşturduğu iyonik kuvvetin, adenin ve dsDNA arasındaki elektrostatik etkileşimi azalttığını gösterir. Yani, yüksek iyonik kuvvet koşullarında dsDNA'nın negatif yükleri daha iyi korunur ve adenin molekülleriyle elektrostatik etkileşim zayıflar.

Bu bulgular, dsDNA ile NIVO arasındaki etkileşiminin iyonik şiddetin etkisi altında olduğunu göstermektedir. Yüksek NaCl derişimi, dsDNA ve NIVO arasındaki elektrostatik etkileşimi azaltarak etkileşimi zayıflatabilir. Bu da dsDNA ve NIVO arasındaki etkileşimin daha çok interkalasyon yoluyla gerçekleştiğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, iyonik şiddetin, dsDNA ve NIVO arasındaki

etkileşimi etkileyen önemli bir faktör olduğu sonucuna varılabilir (Şekil 4.31). Adenin yükseltgenme sinyallerinin 0.02 M NaCl derişimine (Ortalama değer, 1.320 μ A; bağıl standart sapma, %5.18) kadar arttığı daha sonra ise azaldığı görüldü. Düşük NaCl konsantrasyonlarında, ilaçların dsDNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına elektrostatik olarak bağlanmaktadır. Bu elektrostatik etkileşim, ilaç moleküllerinin dsDNA üzerindeki fosfat grupları ile karşılıklı çekim kuvveti oluşturmaya dayanır. Düşük iyonik kuvvet koşullarında, fosfat gruplarının negatif yükleri daha belirgin hale gelir ve ilaç molekülleri bu negatif yüklere bağlanabilir. Bu durum, ilaçların dsDNA ile elektrostatik etkileşim yoluyla bağlanma eğilimini gösterdiğini ve interkalasyonun ön planda olmadığını gösterir. Bu tür elektrostatik etkileşimler, ilaçların dsDNA üzerinde spesifik bağlanma bölgeleri oluşturmaya ve ilaç etkinliğini etkileyen faktörlerden biri olmasına yol açabilir. Yüksek NaCl derişimlerinde, dsDNA molekülü pozitif yüklü Na⁺ iyonlarıyla yoğun bir şekilde etkileşir. Bu etkileşme sonucunda, dsDNA molekülü daha fazla Na⁺ iyonu tarafından çevrelenir. Bu çevreleme süreci, ilaç moleküllerinin dsDNA ile elektrostatik etkileşimini azaltır. Bu durumda, yüksek NaCl derişimlerinde dsDNA ve ilaç molekülleri arasındaki etkileşim genellikle interkalasyon yoluyla gerçekleşir. Interkalasyon, ilaç moleküllerinin dsDNA'nın çift sarmal arasına girerek yerleşmesi anlamına gelir. Bu durumda, dsDNA'nın negatif yükleri iyonik koruyucu bir kalkan oluşturarak ilaç moleküllerinin interkalasyonunu kolaylaştırır. Bu nedenle, iyonik kuvvetin artmasıyla birlikte ilaç molekülleri dsDNA çift sarmalı arasına interkale olma eğilimi gösterir. Bu bulgular, dsDNA-ilac etkileşimlerinin iyonik kuvvetin ve NaCl derişiminin önemli faktörler olduğunu göstermektedir (Zeybek vd., 2020).

4.14.4 DNA miktarının belirlenmesine ait bulgular

Farklı DNA derişimleri PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içerisinde adenin ve guanin sinyalleri üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.32'da verilmiştir.

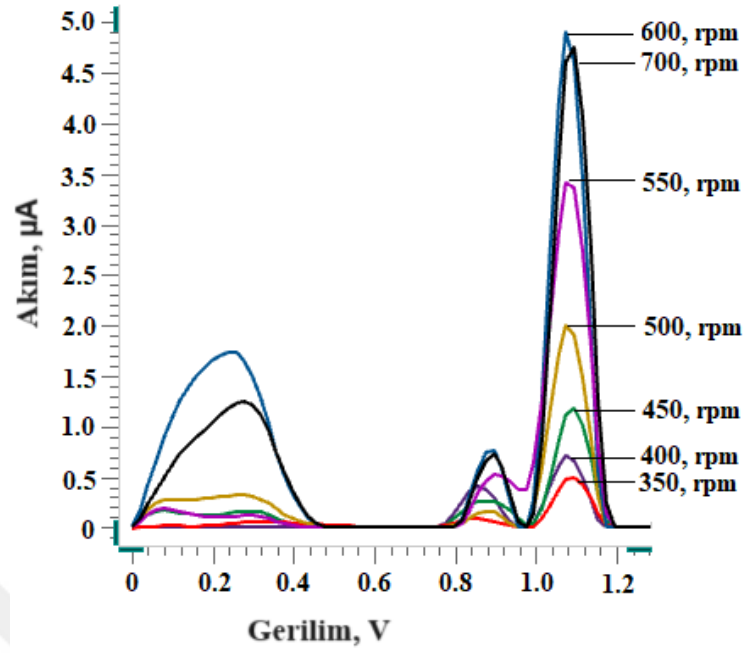


Şekil 4.32 dsDNA'nın 10- 50 µg/ mL derişim aralığında PG yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında diferansiyel puls voltamogramları.

DNA'nın çalışma elektrodu yüzeyinde sabitlenmesi, elektrokimyasal DNA sensörünün yapımında önemli bir adımdır. Yüzeyi aktive edilmiş PGE'e uygun dsDNA derişimini saptamak amacıyla PG elektrot yüzeyinde pozitif gerilim (+ 0.6 V) uygulayarak dsDNA elektrokimyasal olarak immobilize edildi. dsDNA (10-50 µg/ mL) farklı derişim aralıklarında DPV ölçümleriyle elde edilen adenin pik akım değerlerinden yararlanıldı. Yüzeydeki spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için PG elektrot yüzeyi PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) destek çözeltisiyle yıkandı. Alınan ölçümlerde Şekil 4.32'de görüldüğü gibi en iyi pik akımına sahip 20 µg/ mL DNA' ın daha immobilize olduğu gözlemlendi. Pik akımı değerleri sırasıyla 1.498 µA, 1.573 µA, 1.603 µA düzeylerinde bulundu (ortalama değer, 1.558 µA, % BSS 3.47)

4.14.5 Karıştırma hızının elektrot yanıtına etkisine ait bulgular

dsDNA'nın farklı karıştırma hızlarında PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.33'de elde edilen voltamogram verilmiştir.

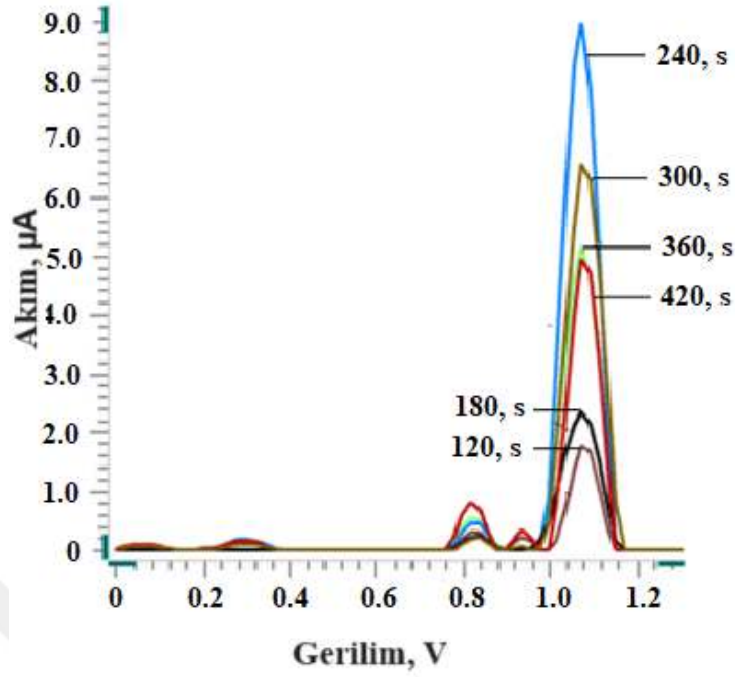


Şekil 4.33 20 µg/ mL dsDNA'nın PG elektrot yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında 350- 700 rpm farklı karıştırma hızlarındaki diferansiyel puls voltamogramları.

DNA'nın elektrot yüzeyinde sabitlenmesi için karıştırma hızıyla homojen bir yapı oluşturup DNA'nın elektroda immobilizasyonu kolaylaştırılabilmektedir. Bu amaçla (350- 600 rpm) aralığında ölçümler alınmıştır. Şekil 4.33 incelendiğinde DNA'nın PG elektrot yüzeyine 600 rpm karıştırma hızıyla daha iyi tutunduğu ve daha duyarlı bir pik verdiği görülmektedir. En iyi pik akımı değerleri sırasıyla 4.684 µA, 4.836 µA, 4.910 µA düzeylerinde bulundu (ortalama değer, 4.810 µA, % BSS 2.39).

4.14.6 dsDNA İmmobilizasyon süresinin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular

dsDNA'nın farklı immobilizasyon sürelerinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.34'te verilmiştir.



Şekil 4.34 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında (120- 420 s) farklı immobilizasyon zamanlarında diferansiyel puls voltamogramları.

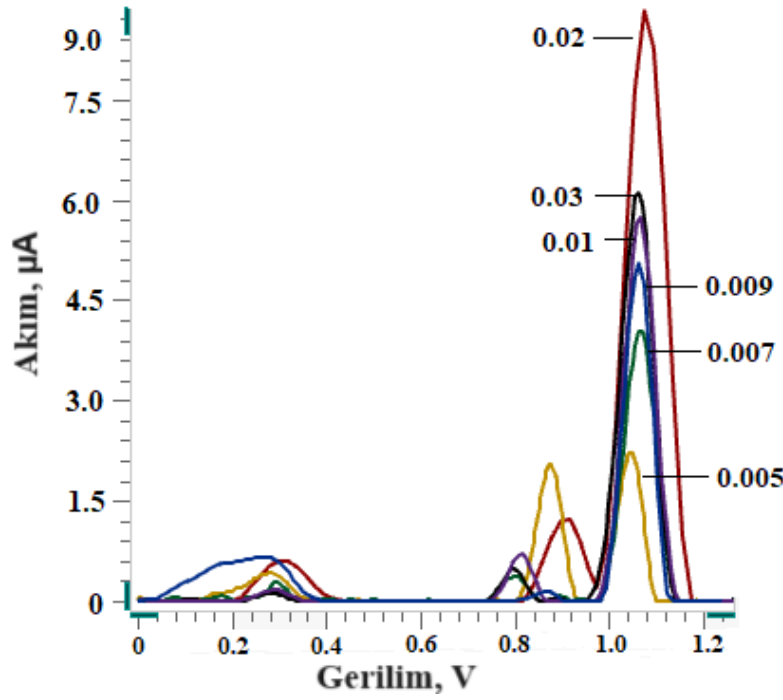
En iyi sensör DNA immobilisasyona ulaşmak için dsDNA derişimi ve karıştırma hızının ardından (120 -420 s) aralığında immobilizasyon süresi çalışıldı. Şekil 4.34'te 20 µg/ mL dsDNA immobilize edildikten sonra adenine ait pik şiddeti 240 s kadar bir artış gösterdiği, devamında sensör yanıtının pik şiddetinde bir azalmanın olduğu gözlemlendi. Bundan dolayı immobilizasyon süresi 240 s olarak devam edilmiştir. 240 s ait pik akımı değerleri sırasıyla 6.908 µA, 7.653 µA, 9.003 µA düzeylerinde bulundu (ortalama değer, 7.857 µA, % BSS 13.5).

4.14.7 dsDNA'ya ait diferansiyel puls parametrelerinin elektrot yanıtına etkisine ait bulgular

Hassas ve simetrik voltogramlar elde etmek için DPV'ye ait cihaz parametreleri çalışıldı. PBS (0.02 M NaCl içeren, pH 3.0) içerisinde +1.4 V / 60 s aktivasyonundan sonra 20 µg/ mL dsDNA ile +0.6 V/240 s ve 600 rpm hızında immobilize edilip adım potansiyeli (0.01- 0.09 mV), modulation genliği (0.02- 0.12 mV), modulation zamanı (0.02- 0.12 s) ve zaman aralığı (0.1- 0.5 s) aralıklarında adenin sinyali üzerinden parametreler optimize edildi. Bu amaçla çalışılan parametredeki veriler değiştirilmiş, diğer parametreler sabit tutularak ölçümler alınmıştır.

Gerilim adımının elektrot yanıtına etkisi:

dsDNA'nın farklı adım gerilimlerinde fosfat tamponu (pH 3.0) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.35'te verilmiştir.

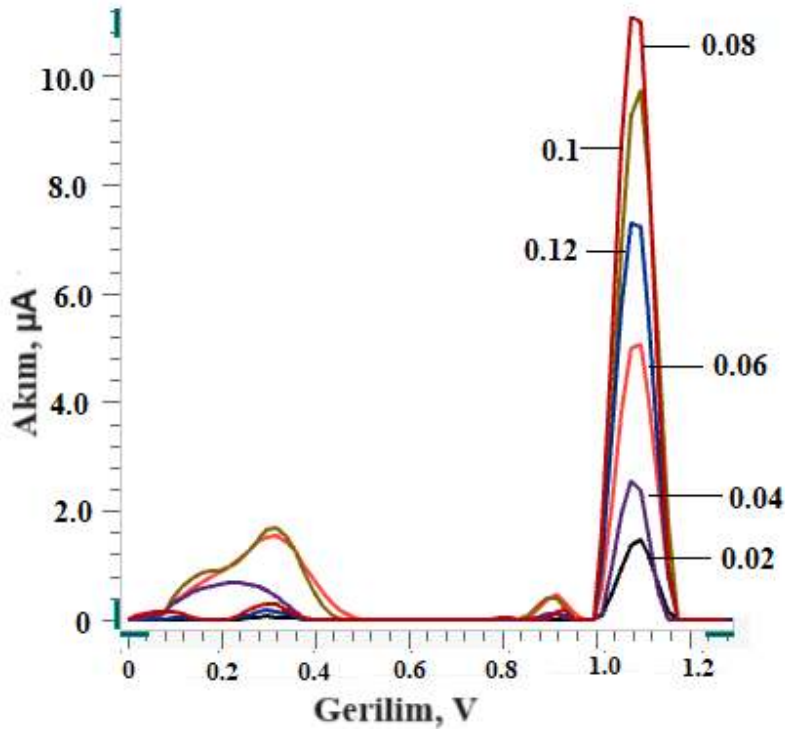


Şekil 4.35 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.005- 0.03 V) aralığında farklı gerilim adımlarında diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).

Aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş dsDNA etkileşimine ait adım gerilimi incelendiğinde, Adenin için en iyi pik akımına sahip 9.324 µA ile 0.02 V adım gerilimi ile çalışmalara devam edilecektir.

Modulasyon genliğinin elektrot yanıtına etkisi:

dsDNA'nın farklı modulasyon genliğinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.36'da verilmiştir.



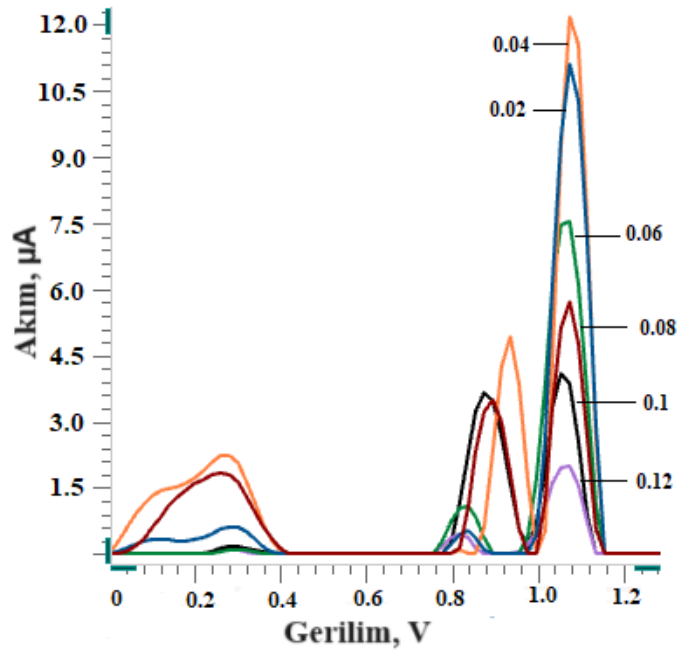
Şekil 4.36 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.02- 0.12 V) aralığında farklı modülasyon genliklerinde diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).

Aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş dsDNA etkileşimine ait modülasyon genlikleri incelendiğinde, Adenin için en iyi pik akımına sahip 10.938 µA ile 0.08 V modülasyon genliği ile çalışmalara devam edilecektir.

Modülasyon süresi elektrot yanıtına etkisi:

dsDNA'nın farklı modülasyon sürelerinde PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.37'de verilmiştir.

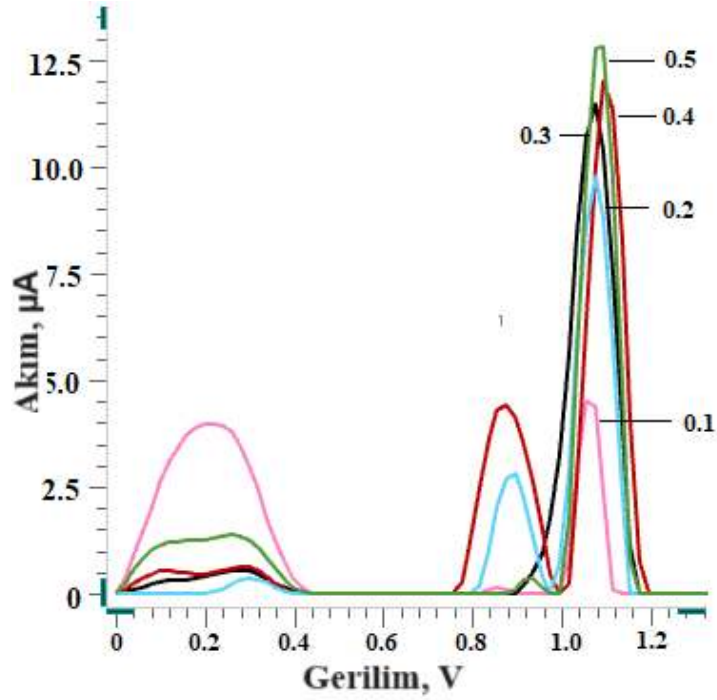
Aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş dsDNA etkileşimine ait modülasyon zamanı incelendiğinde, Adenin için en iyi pik akımına sahip 12.121 µA ile 0.04 s modülasyon zamanı ile çalışmalara devam edilecektir.



Şekil 4.37 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde (0.02- 0.12 s) farklı modülasyon sürelerinde diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).

Zaman aralığının elektrot yanıtına etkisi:

dsDNA'nın farklı zaman aralıklarında PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde adenin sinyali üzerinden DP voltamogramları ve üç tekrar deneyi ile Şekil 4.38'te verilmiştir.



Şekil 4.38 20 µg/ mL dsDNA'nın PG yüzeyinde farklı (0.1- 0.5 s) zaman aralığında diferansiyel pulse voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı).

Aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş dsDNA etkileşimine ait modülasyon zamanı incelendiğinde, Adenin için en iyi pik akımına sahip 12.254 μA ile 0.4 s zaman aralığı ile çalışmalara devam edilecektir. Bu veriler ışığında dsDNA için belirlenen cihaz parametreleri Tablo 4.5 'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5 dsDNA tayini için voltametrik yöntem ile elde edilen deneysel ve aletsel değişkenler

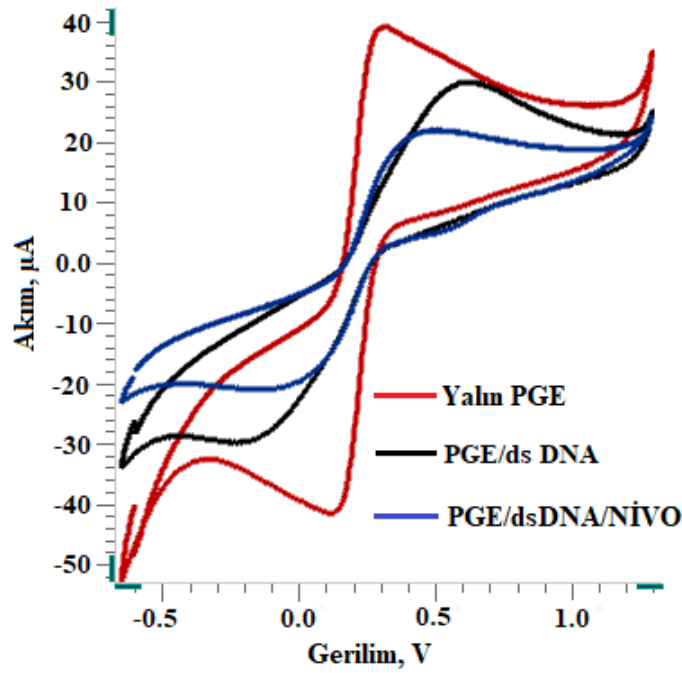
Yöntem	DPV
Elektrot	PGE
Destek elektroliti	PBS tampon (pH 3.0)
DPV değişkenleri	
<i>Gerilim adımı</i>	0.02 V
<i>Modülasyon genliği</i>	0.08 V
<i>Modülasyon zamanı</i>	0.04 s
<i>Zaman aralığı</i>	0.4 s

4.15 NIVO dsDNA Etkileşiminin İncelenmesi

4.15.1 Elektrokimyasal karakterizasyon

PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO (dsDNA ve NIVO ile modifiye edilmiş PG elektrotlarının elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Bu inceleme için 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (1:1) ve 0.1 M KCl çözeltisi kullanılmıştır. Dönüşümlü voltamogramlar, elektrotların elektrokimyasal davranışını değerlendirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu voltamogramlar, potansiyel aralığında gerçekleştirilen taramalar sırasında akım değişimlerini gösterir. Şekil 4.39'da PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarına ait dönüşümlü voltamogramlar görülmektedir. Voltamogramlar incelendiğinde, PGE yüzeyinin dsDNA ile kaplandığında anodik ve katodik pik akımları değişmiştir. Ayrıca, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ türüne ait piklerin 0.0- 0.5 V aralığında yer aldığı görülmüştür. PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotları için ΔE_p (anodik ve katodik pikler arasındaki potansiyel fark) değerleri sırasıyla 0.156 V, 0.666 V ve 0.537 V olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan, PGE/dsDNA elektrodun yükseltgenme mekanizmasını geliştirdiği sonucuna varılabilir. PGE/dsDNA/NIVO elektrotunda ise dsDNA'nın negatif yüküyle elektrot yüzeyinin kaplandığı ve dsDNA-NIVO etkileşimi sonucunda ΔE_p değerinde bir

azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, dsDNA'nın PGE/dsDNA yüzeyine immobilize olduğunu ve ilaç ile etkileşime girdiğini göstermektedir. Bu bulgular, elektrotların modifikasyonunun elektrokimyasal davranışları üzerindeki etkisini ve dsDNA ile NIVO arasındaki etkileşimi anlamamıza yardımcı olmaktadır. (Wang, 2006).



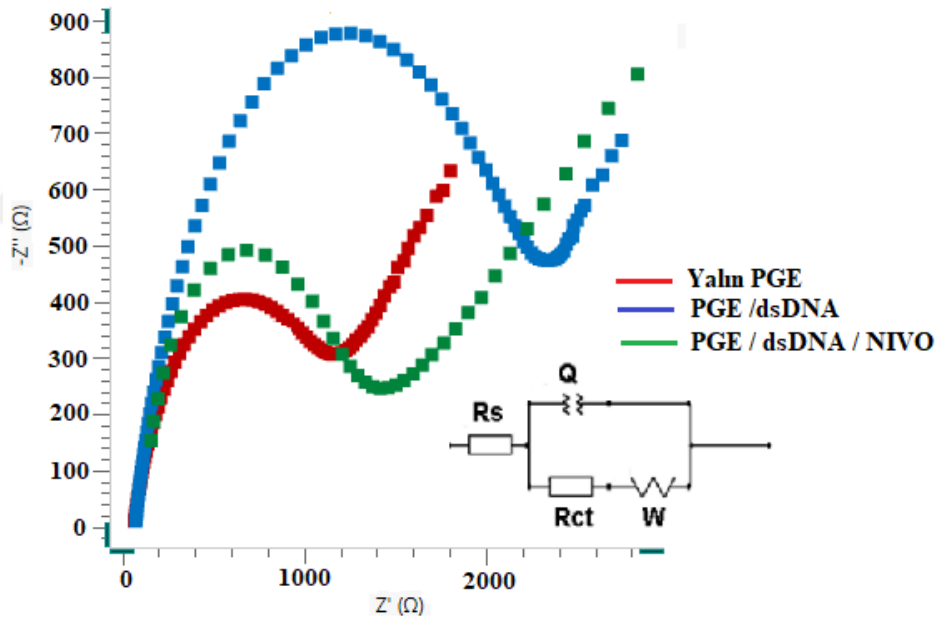
Şekil 4.39 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl çözeltisindeki CV voltamogramları (Tarama hızı 50 mV s^{-1})

Tablo 4.5 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması.

Elektrot	E_{pa} / V	E_{pc} / V	$\Delta E_p / \text{V}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$
PGE	0.298	0.142	0.156	39.934	-36.446
PGE/DNA	0.569	-0.097	0.666	23.298	-14.359
PGE/ NIVO-DNA	0.423	-0.114	0.537	16.642	-1.661

PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO (dsDNA ve NIVO ile modifiye edilmiş PG elektrotlarının elektron transfer özellikleri elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemiyle incelenmiştir. Şekil 4.40' ta, elde edilen Nyquist eğrileri gösterilmiştir. Nyquist eğrisi, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) spektrumunda yüksek frekanslarda yarım daire şeklinde ve düşük frekanslarda doğrusal bir bölüm olarak gözlenir. Yarım daire, sınırlı elektron transferini temsil

ederken, doğrusal bölüm difüzyon olayını ifade eder. Yarım dairenin çapı, genellikle elektron veya yük transfer direnci (R_{ct}) ile ilişkilidir. Büyük bir R_{ct} değeri, yarım dairenin çapının geniş olduğunu ve bu durumun elektron transferinin yavaş olduğunu gösterir. Nyquist eğrisi, elektrokimyasal sistemlerde elektron transferi ve difüzyonun analizinde önemli bir araç olarak kullanılır. Bu eğrilerin incelenmesi, elektrotların elektrokimyasal özellikleri hakkında bilgi sağlar. Örneğin, PGE/dsDNA elektrotunda dsDNA'nın eklenmesi, elektron transferinin sınırlı olduğu yarım daire kısmının genişlemesine ve R_{ct} değerinin artmasına neden olmuştur. PGE/dsDNA/NIVO elektrotunda ise NIVO'nun eklenmesi, elektron transfer direncinde değişikliklere yol açabilir. Nyquist eğrileri, elektrotların yüzey özellikleri, etkileşimleri ve elektrokimyasal davranışları hakkında bilgi sağlayarak, elektrotların performansını ve etkileşimlerini anlamamıza yardımcı olur.

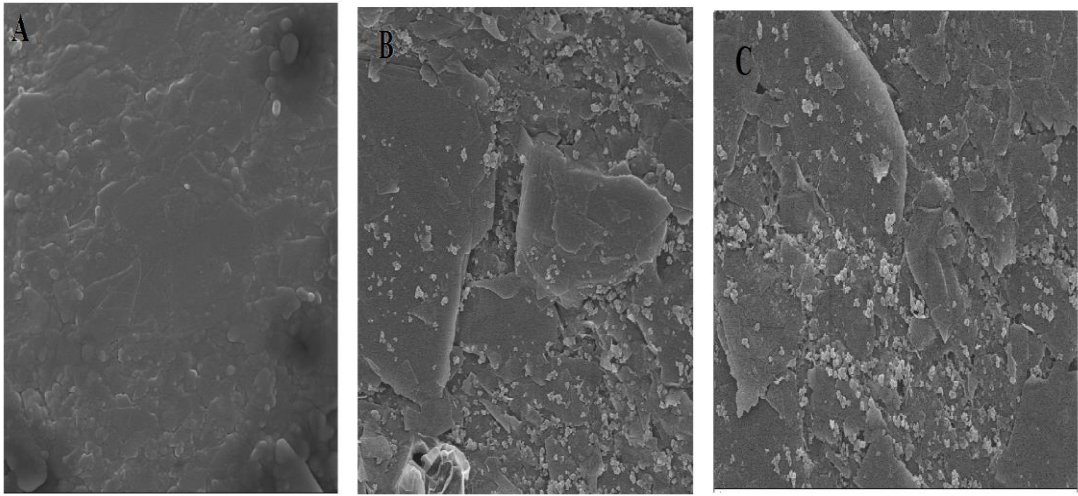


Şekil 4.40 Yalın PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarının 5,0 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri ve devre elemanları.

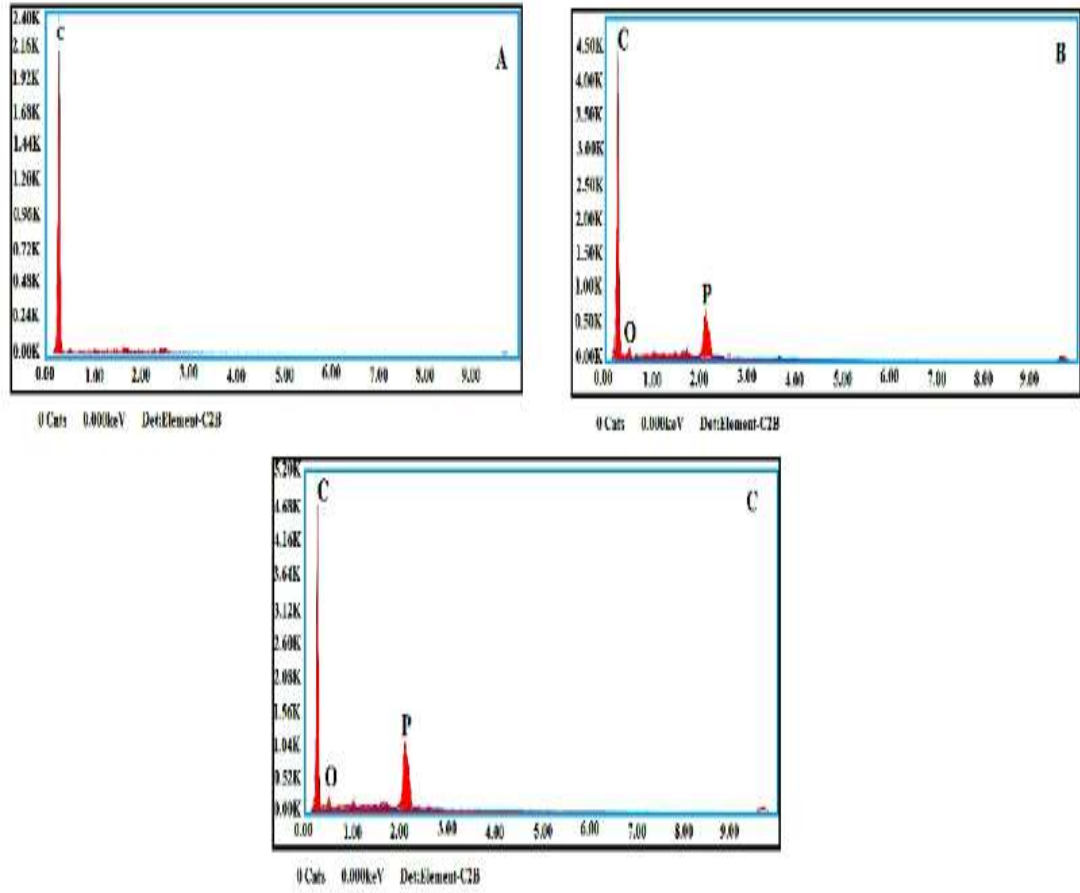
Şekil 4.40'ta EIS deneyleri, bir Randles tipi eşdeğer elektrik devre kullanıldı. Devrede elektron transfer hızını gösteren R_{ct} değerleri, yalın (PGE), 1032.2 Ω (PGE/dsDNA), 2440.9 Ω (PGE/dsDNA/NIVO) 1243.8 Ω R_{ct} değerlerinde gözlemlendi. Bu da DNA 'nın elektrot yüzeyinde immobilize olduğunu ve NIVO etkileşimi ile PG elektrot yüzeyinde elektron transferinin arttığı gözlenmektedir. Ayrıca PGE/dsDNA/NIVO (R_{ct} :1243.8 Ω)

elektrodunun yüzeyi PGE/dsDNA (R_{ct} :2440.9 Ω) elektrodunun yüzeyinden daha büyük olduğu görülmektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği kullanılarak DNA modifikasyonu ve NIVO DNA etkileşiminin mikroskobik karakterizasyonu incelenmiştir (Şekil 4.41 A). 20 μ g/ mL DNA'nın PGE'de immobilizasyonu, DNA moleküllerinin çok katmanlı grafit yüzeyinde istiflenmesiyle açıkça görülebilir (Şekil 4.41 B). 0.2 mg/mL NIVO ve 20 μ g/ mL DNA'nın PGE'deki etkileşiminden sonra, grafit yüzeyi kısmen kaplanabilir ve katmanlar üzerinde bazı parlak noktalar gözlemlenebilir (Şekil 4.41 C).



Şekil 4.41 (A) Yalın halde PGE (B) 20 μ g/mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) 20 μ g/mL DNA'nın immobilizasyonu ve 0.2 mg/mL NIVO etkileşimi sonrasında PG elektrotlarına ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.42 (A) Yalın PGE, (B) 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 0.2 mg/mL NIVO ile etkileşimi sonrasındaki EDX spektrumları.

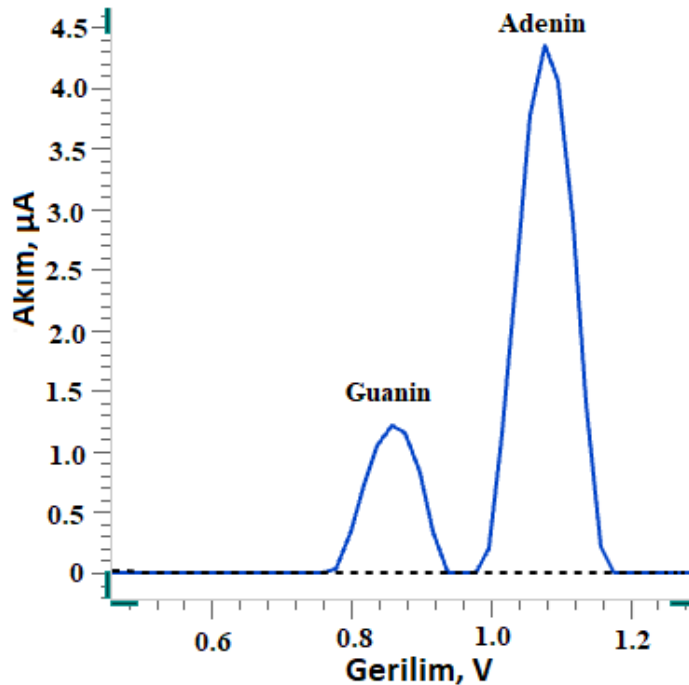
Tablo 4.6 EDX spektrumlarında karbon, oksijen, fosfor atomları için elementel ağırlık ve atomik yüzdeleri (A) Yalın PGE (B) PGE' de 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 0.2 mg/mL NIVO ile etkileşiminden sonra

	Element	Ağırlık %	Atomik%
A	C	100	100
	O	0.00	0.00
	P	0.00	0.00
B	C	86.17	91.31
	O	5.24	4.17
	P	8.59	4.52
C	C	84.26	89.48
	O	9.32	7.43
	P	6.42	3.09

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) spektrumları ve belirlenen atomlarının elementel konsantrasyonları Tablo 4.7’ de sunulmuştur. DNA'nın PGE üzerinde immobilizasyonundan sonra, O ve P ağırlıkça % değerlerinde artışa neden olduğu (Tablo 4.7) görülmektedir. Bu sonuç, PGE elektrot yüzeyinde DNA'nın immobilizasyon sürecinden sonra DNA'nın oksijen, azotlu baz ve fosfat omurgasına sahip nükleotidlerin devreye girmesinin bu atomların düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermektedir. NIVO/DNA'nın PGE yüzeyinde etkileşiminden sonra, C ve O atomlarından zengin NIVO moleküllerinin katılması sonucu O atomlarının düzeylerinde % oranlarında bir artışa neden olmuştur. Mikroskopik sonuçlar, DNA'nın immobilizasyonunun ve NIVO/DNA etkileşimin tek kullanımlık PG elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermiştir.

4.15.2 NIVO’ nun dsDNA etkileşimin diferansiyel puls voltametri tekniği ile araştırılmasına ait bulgular

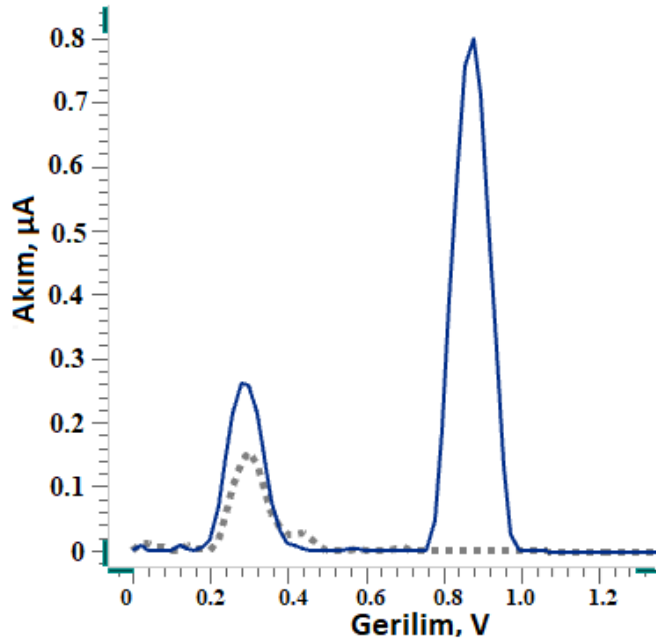
Optimize olmuş cihaz parametreleriyle elde edilen dsDNA’nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisindeki DP voltamogramı Şekil 4.43’te verilmiştir.



Şekil 4.43 PG elektrot yüzeyinde 20 µg/ mL dsDNA’nın diferansiyel puls voltamogramı, 0.02 M NaCl içeren PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl). (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri: gerilim adımı, 0.02 V; modülasyon genliği, 0.08V; modülasyon süresi, 0.04 s; zaman aralığı, 0.4 s.

Aktive edilmiş PGE yüzeyine 20 µg/ mL dsDNA, PBS (pH 3.0, 0.002M NaCl) içerisinde immobilize edildikten sonra adenin bazına ait yükseltgenme sinyali yaklaşık +1.0794 V'da gözlemlendi ve üç tekrar ölçüm sonucu 4.179 µA, 4.355 µA ve 5.031 µA düzeyinde bulunan pik akımlarında % BSS 9.95 olarak hesaplandı. Guanin bazına ait yükseltgenme sinyali ise yaklaşık +0.867 V'da gözlemlendi ve üç ardışık ölçüm sonucu 1.209 µA düzeyinde bulunan pik akımının bağıl standart sapması % 7.98 olarak hesaplandı.

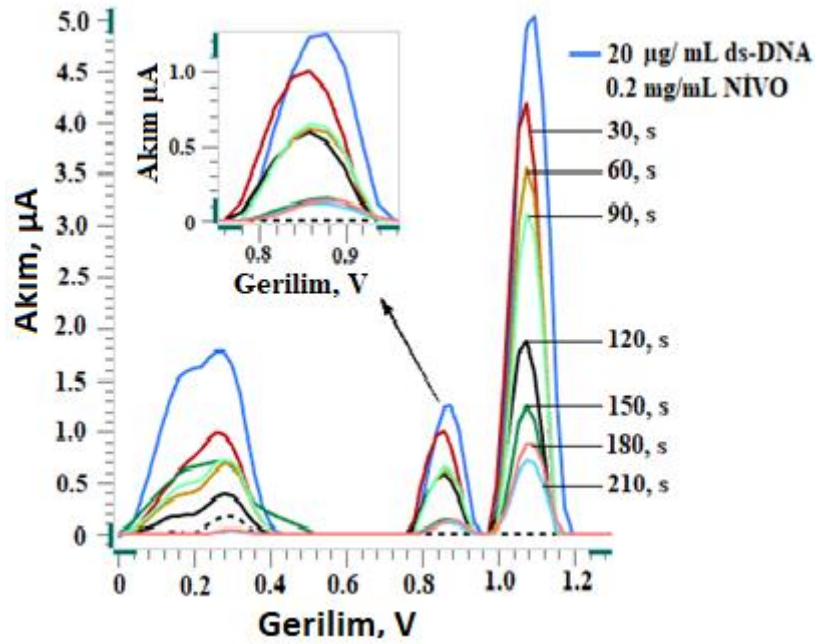
Optimum DPV parameterleriyle NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde DP voltamogramı Şekil 4.44'te sunulmuştur.



Şekil 4.44 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) PG elektrot kullanarak elde edilen diferansiyel puls voltamogramı. DPV parametreleri şekil 4.13'te verilmiştir.

Aktive edilmiş PGE yüzeyine PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde 0.2 mg/mL NIVO tuturulduktan sonra yükseltgenme sinyali yaklaşık +0.88 V'da gözlemlendi ve üç tekrar ölçüm sonucu 8.003 µA, 7.846 µA ve 6.968 µA düzeyinde bulunan pik akımlarında % BSS 7.32 olarak hesaplandı. dsDNA immobilize edilmiş elektrot ile NIVO arasındaki etkileşim süresinin belirlenmesi için (30- 210 s) saniye sürelerinde 0.2 mg/mL NIVO ile ölçümler alındı. Adenin ve guanin moleküllerinin etkileşim sonrasında, pH 3.0 ve 0.02 M NaCl içeren PBS ortamında (+0.0 V) - (+1.3 V) potansiyel aralığında DPV kullanılarak yükseltgenme pik akımları belirlendi (Şekil

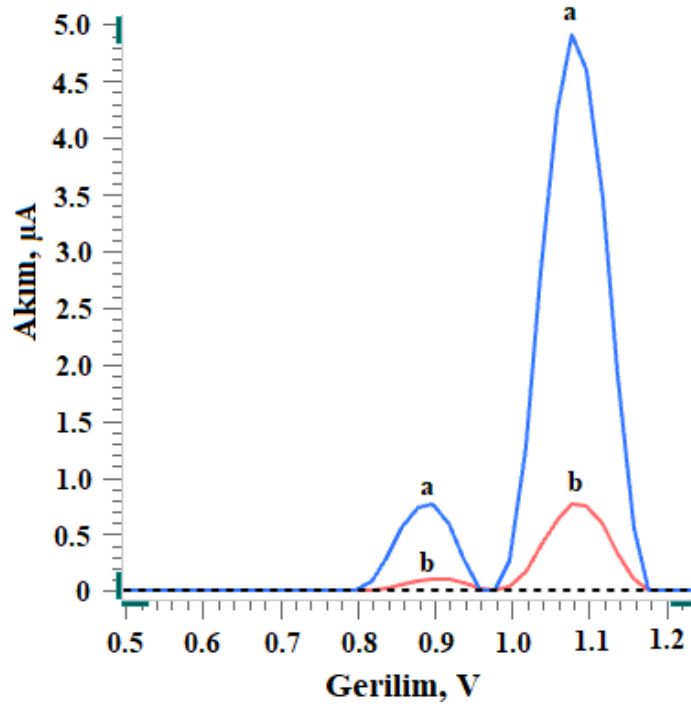
4.45). Şekil incelendiğinde, etkileşim süresi arttıkça adenin ve guanin sinyallerinin azaldığı gözlemlendi. Bu durum, DNA'nın elektrot yüzeyinde NIVO ile etkileştiğinde NIVO-DNA kompleksi oluşturmasıyla ilişkilidir. DNA miktarındaki azalma ve NIVO-DNA kompleksinin DNA'ya göre daha düşük etkinlik göstermesi, yükseltgenme pik potansiyelinde azalmaya neden olur. Guanin açısından, azalma oranının neredeyse sabit kaldığı 150 saniye süresi, optimum etkileşim süresi olarak seçilmiştir.



Şekil 4.45 20 µg/ mL dsDNA ile 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde etkileşim sürelerine (30- 210 s) ait diferansiyel puls voltogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.

Optimum deney koşulları belirlendikten sonra NIVO dsDNA arasındaki etkileşim Bölüm 3.5 belirtildiği gibi uygulanıp adenin ve guanin sinyallerindeki değişim araştırılmıştır. NIVO dsDNA arasındaki etkileşim sonucunda adenin ve guanin yükseltgenme sinyallerinin pik akımlarında analitiksel olarak değerlendirilecek bir azalma (Şekil 4.46 ve Tablo 4.8) gözlemlendi ve bu verilerden kolayca anlaşılacağı üzere NIVO'nun yük transfer kuvvetleriyle DNA'nın heliks yapısının arasına girerek DNA'yı deforme ettiği sonucuna varılır.

NIVO dsDNA ile etkileşiminin PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde alınmış DPV Şekil 4.46'da sunulmuştur.



Şekil 4.46 20 µg/ mL dsDNA ve 0.2 mg/mL NIVO'nun PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde (a) Etkileşim öncesi (b) 150 s, Etkileşim sonrası, diferansiyel puls voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.

Tablo 4.7 PG elektrot yüzeyinde PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) içerisinde 20 µg/ mL dsDNA ve 0.2 mg/mL NIVO etkileşim öncesi ve sonrası adenin ve guanin öncesi ve sonrası değişim.

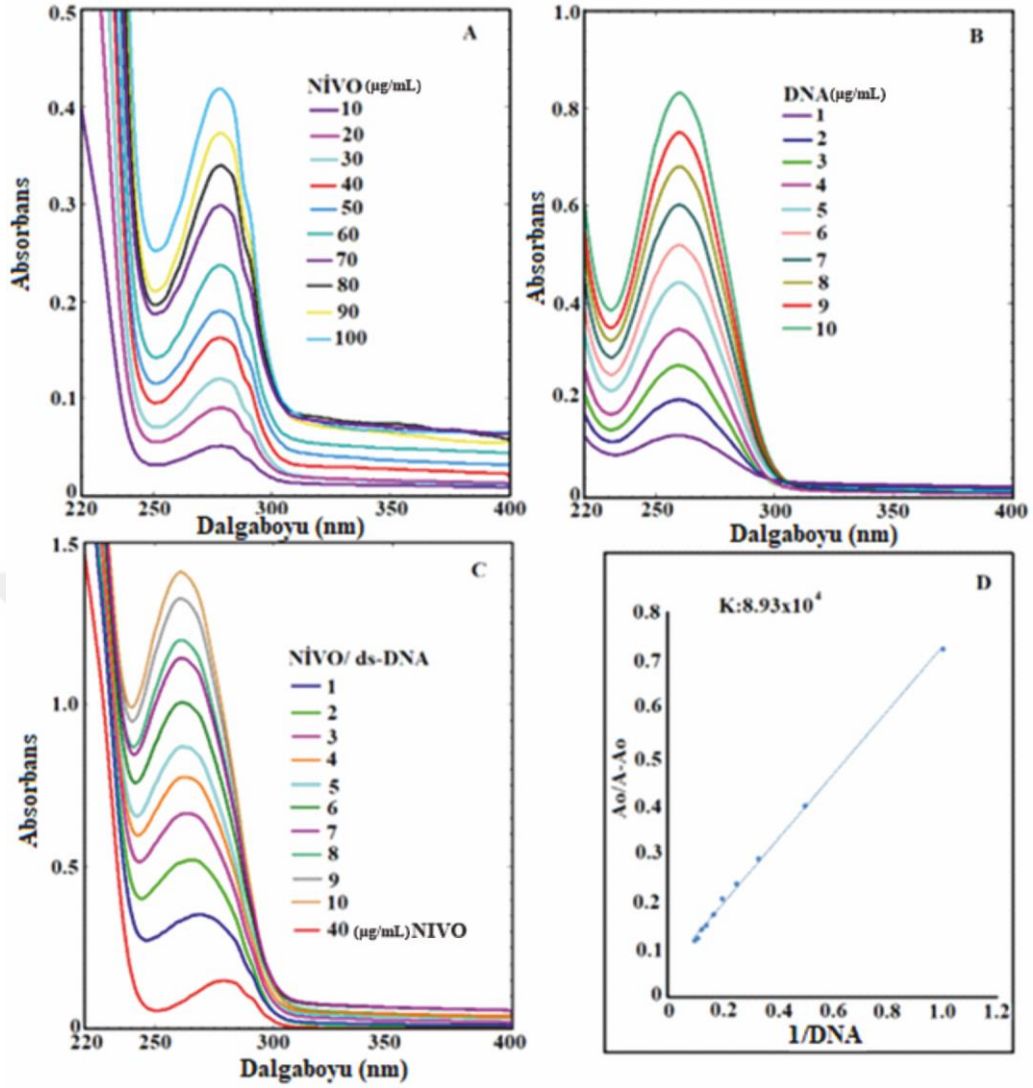
DPV Sonuçları	Etkileşim öncesi	Etkileşim sonrası	Sinyaldeki değişim %
Adenin yükseltgenme sinyali (µA)	4.753 ± 0.39	0.763 ± 0.28	%83.9
Guanin yükseltgenme sinyali (µA)	0.6905 ± 0.16	0.108 ± 0.22	%84.4

NIVO dsDNA arasındaki etkileşim sonucunda dsDNA'nın yükseltgenme sinyallerinin pik akımlarında analitiksel olarak değerlendirilecek bir azalma gözlemlendi. Ayrıca NIVO'ya ait yükseltgenme piki ile guanine ait yükseltgenme piki girişim yaptığından bu çalışma kapsamında DNA'nın adenin yükseltgenme sinyali üzerinden değerlendirilmesine karar verildi. Etkileşim öncesi 4753 nA düzeyinde bulunan

adenin pik akımının, etkileşim sonrasında 763 nA düzeyine gerilediği saptandı. Guanin ise etkileşim öncesi 690.5 nA, etkileşim sonrası ise 108 nA olduğu saptandı.

1.1 4.15.3 NIVO-dsDNA etkileşiminin UV-Vis. spektrofotometrisi ile incelenmesi

UV-görünür spektroskopi, ilaçlar ve DNA arasındaki etkileşimi incelemek için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Spektral değişiklikler, ilacın konsantrasyonu sabit tutularak ve artan düzeylerde DNA ilavesi ile gözlemlenebilir (Rehman vd., 2015). Şekil 4.47 A, B 'de 10-100 µg/mL NIVO ve 1-10 µg/mL dsDNA artan derişimlerde absorbsiyon band spektrumları doğrusal olarak artığı görülmektedir. NIVO molekülünün dsDNA ile etkileşimi UV-Vis Spektroskopisi tekniği kullanılarak incelenmiştir. NIVO, farklı derişimlerde (1-10 µg/mL) dsDNA ile etkileştirilmiş ve 220-400 nm dalga boyu aralığında spektrumları kaydedilmiştir. Sonuçlara göre, NIVO'nun 279.10 nm'de bir absorbsiyon piki olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.47C incelendiğinde, sabit NIVO içeren ortamda dsDNA miktarının artmasıyla birlikte NIVO'nun 279.10 nm'deki absorbsiyon pikinin azaldığı gözlenmiştir. dsDNA miktarındaki artışla her ölçümde NIVO pikinin yaklaşık olarak 1-2 nm daha kısa dalga boyuna kaydığı (hipsokromik etki olarak adlandırılan maviye kayma) gözlemlenmiştir. Bu etkilerin sebebi, DNA'daki bazlardaki ortaklanmamış elektron çiftleri ile hidrojen bağları vermesidir. Bu hidrojen bağları, NIVO molekülü ile etkileşime girerek NIVO'nun absorbsiyon özelliklerini değiştirebilir. Bu gözlemler, NIVO ve dsDNA arasındaki etkileşimin doğasını ve moleküler etkileşim mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olmaktadır. NIVO (40 µg/mL), artan dsDNA (1-10 µg/mL) konsantrasyonu etkileştirildiğinde, (Şekil 4.47 C). NIVO ve dsDNA arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle önemli hiperkromik etkide gözlemlendi. Bu, NIVO ve dsDNA'nın hidroksil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu yoluyla meydana gelen NIVO-dsDNA'da hiperkromik etkinin varlığını düşündürür. Buda, NIVO ve DNA arasındaki etkileşimin elektrostatik bağlanma yoluyla etkileştiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.47 (A) UV- Vis. Absorbsiyon spectrometresinde (10-100 µg/mL) NIVO (B). 1-10 µg/mL DNA (C). 40 µg/mL NIVO ve) 1-10 µg/mL DNA etkileşimine ait spektrumlar. (D) NIVO ve dsDNA arasındaki etkileşim için bağlanma sabiti için Bensesi-Hildebrand grafiği

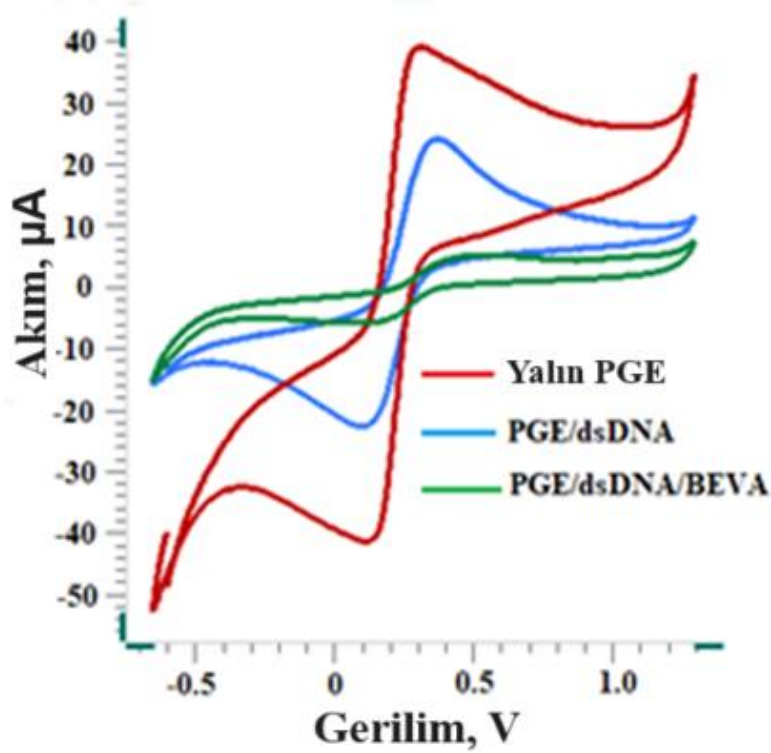
NIVO-DNA bağlanma sabiti veya birleşme sabiti, Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak belirlendi (Rahman vd., 2017; Bkz. Denklem 2.2). Bağlanma sabiti (K), ilaç-dsDNA kompleksinin absorbans değeri (A) ile ilacın absorbans değeri (A_0) arasındaki ilişkiyi temsil eder. Bu hesaplama için, ilacın ve NIVO-dsDNA kompleksinin absorpsiyon katsayıları olan ϵ_G ve ϵ_{H-G} kullanıldı. Bağlanma sabiti (K), $1/[DNA]$ grafiğinin $A_0/(A-A_0)$ karşısında çizildiği noktanın eğime oranından elde edildi. Bağlanma sabiti (K) değeri, 8.93×10^4 olarak hesaplandı. Bu değer, NIVO ve dsDNA arasındaki etkileşimin gücünü ve bağlanma termodinamiğini yansıtmaktadır. Bu bulgular, NIVO'nun dsDNA ile etkileşim mekanizmasının anlaşılmasına ve ilaç tasarımı süreçlerinde kullanılan bağlanma sabitlerinin belirlenmesine önemli bir katkı sağlamaktadır. Bağlanmanın serbest enerjisi (Husain vd., 2015; Bkz. Denklem 2.8);

Burada ΔG gözlemlenen bağlanma serbest enerjisidir, R gaz sabitidir ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T mutlak sıcaklıktır (298.15 K) ve Kb bağlanma sabitidir. ΔG - $6.754 \text{ kcal mol}^{-1}$ olarak bulundu. Buda bağlanmanın herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın kendiliğinden gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

4.16 BEVA dsDNA Etkileşiminin İncelenmesi

4.16.1 Elektrokimyasal karakterizasyon

PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının elektrokimyasal özelliklerini araştırmak amacıyla, 0.1 M KCl çözeltisi içinde $5.0 \text{ mM } [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($1:1$) redoks çifti kullanılmıştır. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ probu, modifiye elektrotların elektrokimyasal özelliklerini değerlendirmek için kullanılan bir redoks çiftidir. Dönüşümlü voltamogramlar, -0.6 V ile $+1.3 \text{ V}$ aralığında ve 100 mV/s tarama hızında kaydedilmiştir. Şekil 4.48'de PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarına ait döngülü voltamogramlar görülmektedir. Voltamogramlar incelendiğinde, PGE yüzeyinin dsDNA ile kaplandığında anodik ve katodik pik akımlarının azaldığı ve ΔE_p (pikler arasındaki potansiyel farkı) değerinin değiştiği görülmüştür. Tablo 4.9'da ise PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotları için hesaplanan ΔE_p değerleri sırasıyla 0.325 V , 0.214 V ve 0.292 V olarak belirlenmiştir. PGE/dsDNA elektrodunun reaksiyonunu önemli ölçüde geliştirdiği ve elektroaktif yüzeyi artırdığı söylenebilir. Ayrıca, PGE/dsDNA/BEVA elektrodunda dsDNA'nın negatif yüküyle kaplandığı ve dsDNA ile BEVA arasındaki etkileşim sonucunda ΔE_p değerinde bir değişim olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, dsDNA'nın PGE/dsDNA yüzeyine immobilize olduğunu ve ilaç olan BEVA ile etkileşime girdiğini düşündürmektedir. Elektrokimyasal özelliklerin ve elektrotların modifikasyonunun, elektrokimyasal redoks tepkimelerini etkileyebileceğini ve elektrot yüzeyindeki etkileşimlerin araştırılmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Wang, 2006).

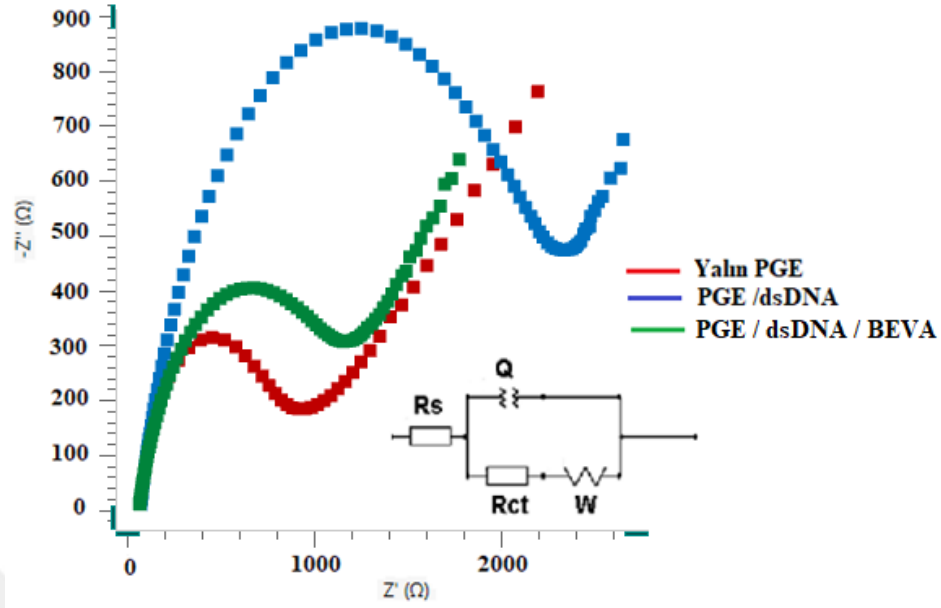


Şekil 4.48 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5,0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki dönüşümlü voltamogramları (Tarama hızı 100 mV s^{-1})

Tablo 4.8 PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl içindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mV s^{-1})

Elektrot	E_{pa} / V	E_{pk} / V	$\Delta E_p / \text{V}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pk} / \mu\text{A}$
PGE	0.411	0.086	0.325	29.38	-21.04
PGE/dsDNA	0.386	0.172	0.214	24.28	-29.26
PGE/dsDNA/BEVA	0.459	0.167	0.292	4.29	-3.96

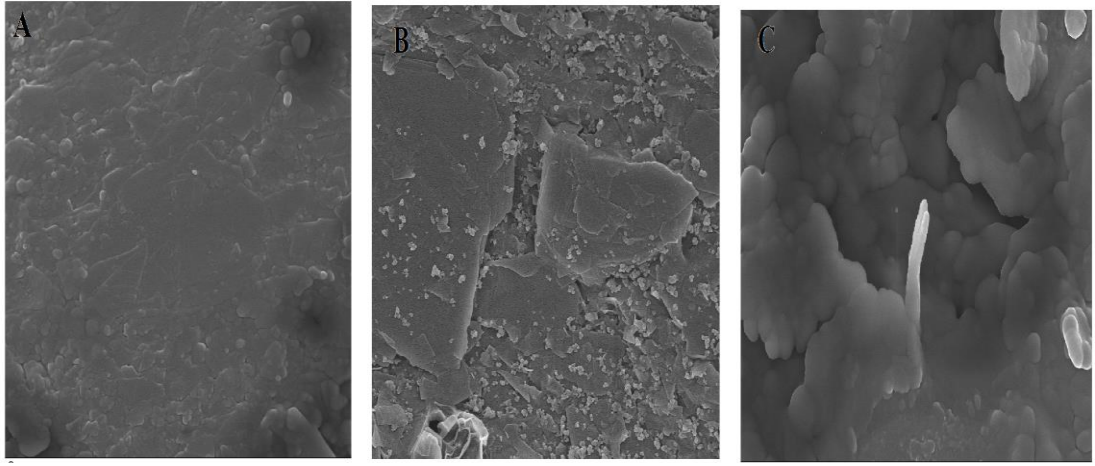
Bu çalışmada, PGE, PGE/dsDNA ve PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının elektron transfer özellikleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) metodu kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.49'da sunulan Nyquist eğrileri, yüksek frekanslarda yarı daire şeklinde ve düşük frekanslarda doğrusal bir bölgeye sahiptir. Yarı daire bölümü, elektron transferinin kısıtlayıcı bir olayı temsil ederken, doğrusal bölüm difüzyon olayını ifade etmektedir. Yarı dairenin çapı, elektron veya yük transfer direncine (R_{ct}) eşittir. Bu sonuçlar, elektrokimyasal etkileşimlerin ve elektron transferinin incelenmesinde EIS yönteminin kullanılabilirliğini göstermektedir.



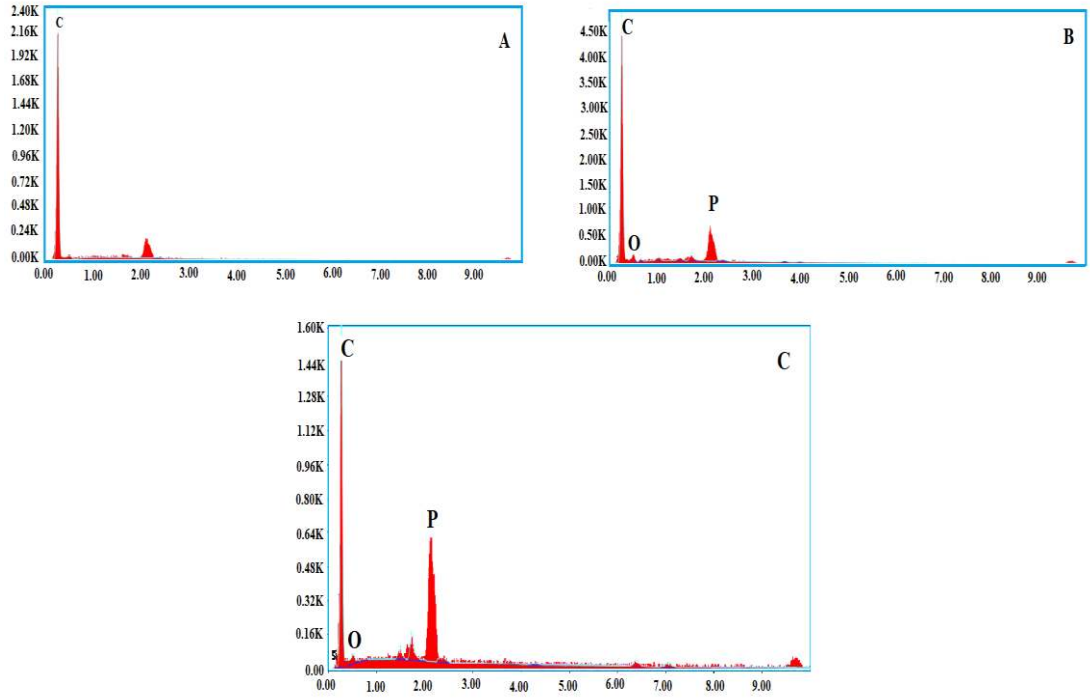
Şekil 4.49 (a) PGE, (b) PGE/dsDNA ve (c) PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarının 5.0 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki Nyquist eğrileri ve devre elemanları

Şekil 4.49’da EIS deneyleri, bir Randles tipi eşdeğer elektrik devre kullanıldı. Devrede elektron transfer hızını gösteren R_{ct} değerleri, yalın (PGE), 960.62 Ω (PGE/dsDNA), 2438.5 Ω (PGE/dsDNA/BEVA) 1331.3 Ω R_{ct} değerlerinde gözlemlendi. Bu da DNA ‘nın elektrot yüzeyinde immobilize olduğunu ve BEVA etkileşimi ile PG elektrot yüzeyinde elektron transferinin arttığını göstermektedir. Ayrıca PGE/dsDNA/NIVO (R_{ct} 1331.3 Ω) elektrodunun yüzeyi PGE/dsDNA (R_{ct} :2438.5 Ω) elektrodunun yüzeyinden daha büyük olduğu görülmektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği kullanılarak DNA modifikasyonu ve BEVA DNA etkileşiminin mikroskobik karakterizasyonu incelenmiştir (Şekil 4.50). 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA'nın PGE’de immobilizasyonu, DNA moleküllerinin çok katmanlı grafit yüzeyinde istiflenmesiyle açıkça görülebilir (Şekil 4.50 B). 2.5 mg/mL BEVA ve 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA'nın PGE’deki etkileşiminden sonra, grafit yüzeyi tamamen kaplandığı gözlemlenebilir (Şekil 4.50 C).



Şekil 4.50 (A) Yalın halde PGE (B) 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA'nın immobilizasyonu ve 2.5 mg/mL BEVA etkileşimi sonrasında PG elektrot yüzeylerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.51 (A) Yalın PGE, (B) 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA'nın 2.5 mg/mL BEVA ile etkileşimine ait EDX spektrumları.

Tablo 4.9 EDX spektrumlarında karbon, oksijen, fosfor atomları için elementel ağırlık ve atomik yüzdeleri (A) Yalın PGE (B) PGE' de 20 µg/ mL DNA'nın immobilizasyonundan sonra (C) PGE 'de 20 µg/ mL DNA'nın 2.5 mg/mL BEVA ile etkileşiminden sonra

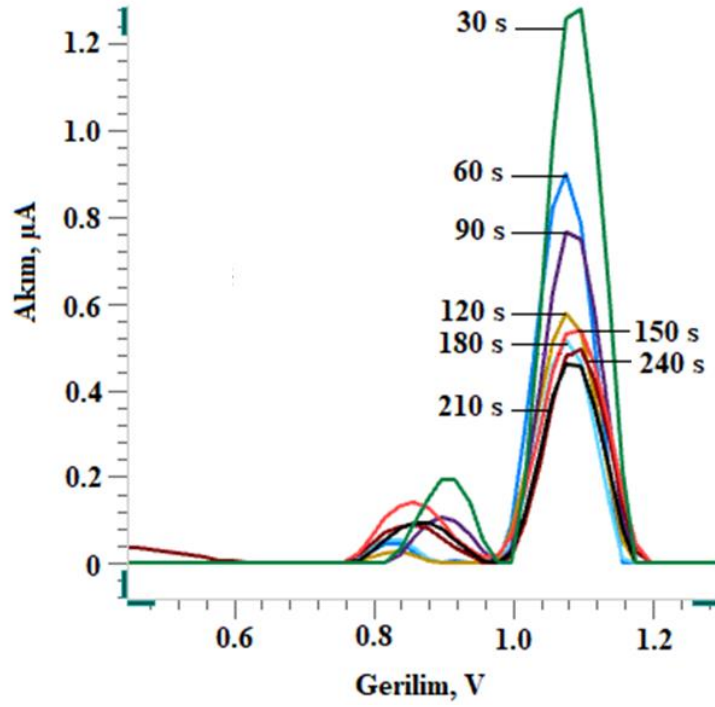
	Element	Ağırlık %	Atomik %
A	C	100	100
	O	0.00	0.00
	P	0.00	0.00
B	C	86.17	91.31
	O	5.24	4.17
	P	8.59	4.52
C	C	90.96	93.59
	O	6.32	5.43
	P	2.72	0.98

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) spektrumları ve C, O ve P atomlarının elementel konsantrasyonları Şekil 4.51 ve Tablo 4.10'da verilmiştir. DNA'nın immobilizasyonu, C, N, ağırlıkça % değerlerinde artışa neden olmuştur. P (Şekil 4.51 B) yalın elektrotla karşılaştırıldığında (Şekil 4.51A). Bu sonuç, DNA'nın azotlu baz ve fosfat omurgasına sahip nükleotidlerin devreye girmesinin bu atomlarda artışa neden olduğu düşünülebilir. BEVA ve DNA'nın PGE yüzeyinde etkileşiminden sonra, C ve O atomlarından zengin BEVA moleküllerinin katılması sonucu C ve O atomlarının ağırlık % değerleri artmıştır (Şekil 4.51C). Mikroskopik sonuçlar, DNA'nın immobilizasyonunun ve DNA ile BEVA arasındaki etkileşimin tek kullanımlık PGE'lerin yüzeyinde başarılı bir şekilde sağlanabileceğini göstermiştir.

4.16.2 BEVA dsDNA etkileşiminin diferansiyel puls voltametrisi tekniği ile incelenmesine ait bulgular

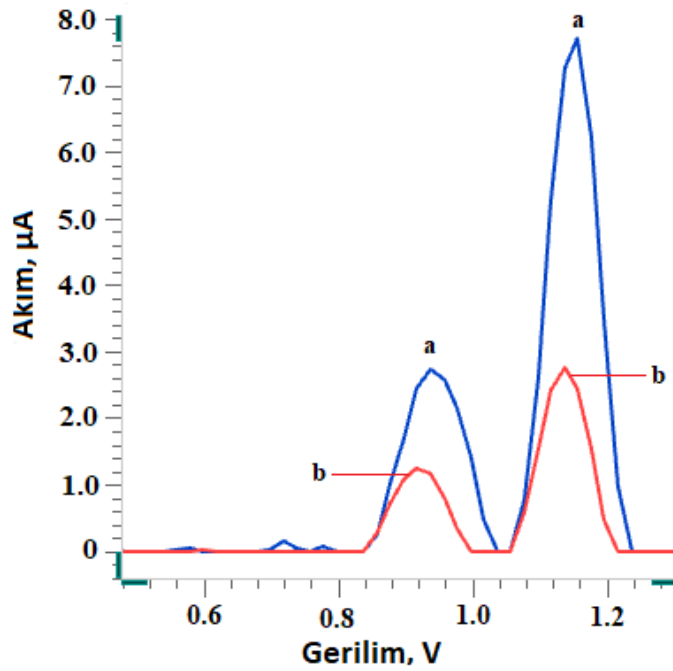
dsDNA immobilize edilmiş elektrot ile BEVA arasındaki etkileşim süresinin belirlenmesi için (30- 240 s) saniye sürelerinde 2.5 mg/mL BEVA ile ölçümler alındı. Etkileşim sonrası 0.02M NaCl içeren PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında (+0.0 V) – (+1.3 V) aralığında DPV'ler ölçülerek, guanin ve adenin yükseltgenme pik akımları belirlenmiştir (Şekil 4.52). Şekil incelendiğinde, etkileşim süresi arttıkça adenin ve guanin sinyallerinde azalma görüldü. Çünkü DNA BEVA ile elektrot yüzeyinde etkileştiğinde BEVA-DNA kompleksi oluşturmaktadır. DNA miktarındaki azalma ve

BEVA-DNA kompleksinin DNA ile karşılaştırıldığında aktifliğinin düşük olması pik potansiyelinde azalma ile kendini göstermektedir. Bu sinyaldeki azalma guanin bazı açısından neredeyse sabitlendiği süre olan 210 s en iyi etkileşim süresi olarak tespit edildi.



Şekil 4.52 20 µg/ mL dsDNA ile 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde etkileşim sürelerine (30- 240 s) ait diferansiyel puls voltogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.

BEVA'nın dsDNA ile PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) ortamında elde edilen DP voltamogramları kullanılarak etkileşiminin incelendiği Şekil 4.53'te belirtilmiştir.



Şekil 4.53 20 µg/ mL dsDNA ve 2.5 mg/mL BEVA'nın PBS (pH 3.0, 0.02 M NaCl) ortamında PG elektrot yüzeyinde (a) Etkileşim öncesi (b) 210 s, Etkileşim sonrası, diferansiyel puls voltamogramları. (+0.6 V, 240 s DNA İmmobilizasyon süresi, 600 rpm karıştırma hızı). DPV parametreleri şekil 4.43'te verilmiştir.

Tablo 4.10 PG elektrot yüzeyinde 0.02 M NaCl PBS (pH 3.0, 0.02M NaCl) içerisinde 20 µg/ mL dsDNA ve 2.5 mg/mL BEVA etkileşim öncesi ve sonrası adenin ve guanin öncesi ve sonrası değişim.

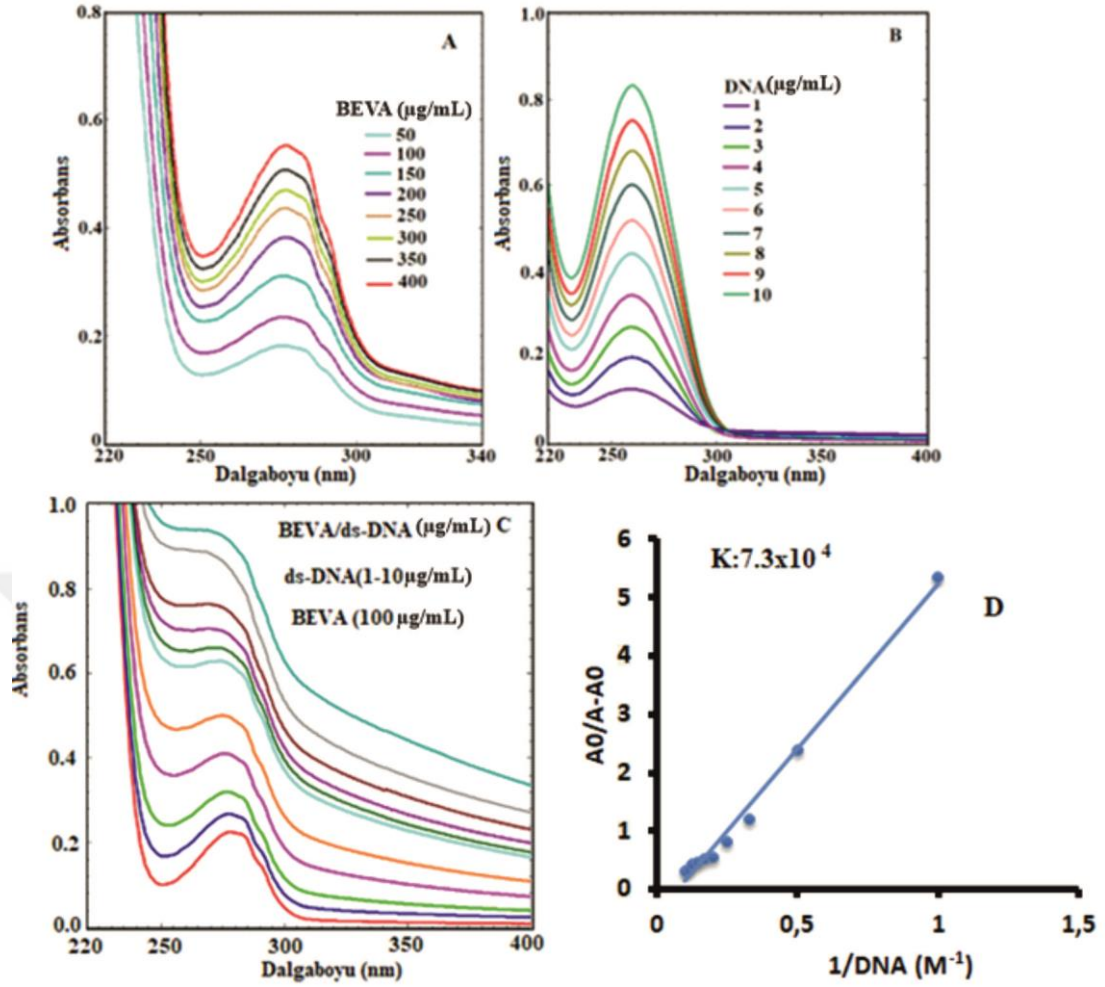
DPV Sonuçları	Etkileşim öncesi	Etkileşim sonrası	Sinyaldeki değişim %
Adenin yükseltgenme sinyali (µA)	7.81 ± 0.29	2.74 ± 0.23	64.92
Guanin yükseltgenme sinyali (µA)	2.69 ± 0.13	1.12 ± 0.11	58.36

BEVA dsDNA arasındaki etkileşim sonucunda DNA'nın yükseltgenme sinyallerinin pik akımlarında analitiksel olarak değerlendirilecek bir azalma gözlemlendi. Ayrıca BEVA'ya ait yükseltgenme piki ile guanine ait yükseltgenme piki girişim yaptığından bu çalışma kapsamında DNA'nın adenin yükseltgenme sinyali üzerinden değerlendirilmesine karar verildi. Etkileşim öncesi 7.81 µA düzeyinde bulunan adenin pik akımının, etkileşim sonrasında 2.74 µA düzeyine gerilediği

saptandı. Guanin ise etkileşim öncesi 2.69 μ A, etkileşim sonrası ise 1.12 μ A olduğu saptandı.

4.16.3 BEVA-dsDNA etkileşiminin UV-Vis. spektrofotometrisi ile incelenmesi

UV-görünür bölge spektroskopisiyle spektral değişiklikler, BEVA'nın konsantrasyonu sabit tutularak ve artan düzeylerde DNA ilavesi ile gözlemlenmiştir (Rehman vd., 2015). Şekil 4.54 A, B 'de 50- 400 μ g/mL BEVA ve 1-10 μ g/mL dsDNA artan derişimlerde absorbsiyon band spektrumları doğrusal olarak artığı görülmektedir. BEVA'nın dsDNA ile etkileşimi UV-Vis spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada, farklı derişimlerde (1-10 μ g/mL) dsDNA'nın 100.0 μ g/mL BEVA ile etkileştirildiği ve 220-400 nm dalga boyu aralığında spektrumlar kaydedildi. Sonuçlar, BEVA'nın 278.04 nm'de absorbsiyon piki verdiğini göstermiştir. Şekil 4.54C analiz edildiğinde, sabit miktarda BEVA içeren ortamda dsDNA miktarının artmasıyla, BEVA'nın 278.04 nm'deki pikinin belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, dsDNA miktarının artmasıyla birlikte her ölçümde BEVA pikinin yaklaşık 1-2 nm daha kısa dalga boylarına kaydığı gözlenmiştir. Bu bulgular, BEVA'nın dsDNA ile etkileşimi ve bu etkileşimin dalga boyuna bağımlılığı hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. UV-Vis spektroskopisi, BEVA ve dsDNA arasındaki moleküler etkileşimleri izlemek ve etkileşimin miktarına bağlı olarak değişimleri tespit etmek için etkili bir teknik olarak kullanılmıştır. (Hipsokromik etki maviye kayma). Bu durum, DNA'daki organik bazlardaki ortaklanmamış elektron çiftleriyle hidrojen bağları oluşturabilmesinden kaynaklanmaktadır. BEVA (100 μ g/mL), artan dsDNA (1-10 μ g/mL) konsantrasyonu etkileştirildiğinde, (Şekil 4.54 C). BEVA ve dsDNA arasındaki güçlü etkileşim nedeniyle önemli hiperkromik etkide gözlendi. Bu, BEVA ve dsDNA'nın hidroksil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu yoluyla meydana gelen BEVA-dsDNA'da hiperkromik etkinin varlığını düşündürür. Buda, BEVA ve DNA arasındaki etkileşimin elektrostatik bağlanma yoluyla etkileştiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.54 (A) UV- Vis. Absorbsiyon spektrometresinde (50-400 $\mu\text{g/mL}$) BEVA (B). 1-10 $\mu\text{g/mL}$ DNA (C). 100 $\mu\text{g/mL}$ BEVA ve 1-10 $\mu\text{g/mL}$ DNA etkileşimine ait spektrumlar. (D) BEVA ve dsDNA arasındaki etkileşim için bağlanma sabiti için Bensessi-Hillebrand grafiği.

BEVA-DNA bağlanma sabiti/birleşme sabiti, Benesi-Hildebrand denklemi uygulanarak belirlendi (Rahman vd., 2017; Bkz. Denklem 2.2).

K bağlanma sabiti değeri 7.3×10^4 bulunmuştur. Bağlanmanın serbest enerjisi (Husain vd., 2015; Bkz. Denklem 2.8);

Burada ΔG gözlemlenen bağlanma serbest enerjisidir, R gaz sabitidir ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T mutlak sıcaklıktır (298.15 K) ve K_b bağlanma sabitidir. ΔG - $6.635 \text{ kcal mol}^{-1}$ olarak bulundu. Buda bağlanmanın herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın kendiliğinden gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Antikanser özellik gösteren NIVO ve BEVA monoklonal antikorların PG elektrot yüzeyinde elektrokimyasal yükseltgenmeleri, voltametrik tayinleri ve DNA ile etkileşimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla elektrot yüzeylerinin analizi ve özellikleri CV, EIS, SEM, EDX teknikleriyle, ilaçların voltametrik analizleri, cihaz parametreleri, miktar tayinleri ve DNA etkileşimleri DPV ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler UV Vis. Spektrometresiyle karşılaştırılarak desteklenmiştir.

NIVO tayini;

- NIVO PG elektrot üzerinde optimum çalışma ortamı ve cihaz parametreleri optimizasyonu ile 90 s boyunca 0.3 V gerilim uygulanarak biriktirilmiştir. Miktar tayinine yönelik yapılan çalışmada (0.01- 0.07 mg/mL) derişim aralığında bir doğrusallık ($R^2=0.99$) saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri 2.49 µg/ mL ve 8.30 µg/ mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 5.1 NIVO'nun voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması

Elektrot	Çalışma aralığı	LOD	Pik sinyali	Literatür
GCE	-	-	1 nA	Machini vd., 2019
PGE	0.01-0.07 mg/mL	2.49 µg/ mL	0.8003 µA	Bu çalışma

PGE, PGE/dsDNA, PGE/dsDNA/NIVO elektrotlarla yapılan optmizasyon çalışmalarında yüzey morfolojisinin karakterizasyonu için CV, EIS, SEM ve EDX 'ten faydalanıldı. dsDNA ile NIVO arasındaki 150 s etkileşim süresi 600 rpm karıştırma hızıyla etkileştirildi. Adenin ve Guanin sinyallerinde sırasıyla %83.9 ve %84.4 lik bir değişim gözlemlendi.

BEVA tayini ve dsDNA etkileşimi;

- BEVA PG elektrot üzerinde optimum çalışma ortamı ve cihaz parametreleri optimizasyonu ile 180 s boyunca +0.3 V gerilim uygulanarak biriktirilmiştir. Miktar tayinine yönelik yapılan çalışmada (0.1- 0.7 mg/mL) derişim

aralığında bir doğrusallık ($R^2=0.983$) saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.026 mg/mL ve 0.086 mg/mL olarak bulunmuştur.

Tablo 5.2 BEVA'nın voltametrik tayini için elde edilen analitik parametrelerin literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılması

Elektrot	Çalışma aralığı	LOD	Pik sinyali	Literatür
GCE	-	-	500 nA	Issaad vd., 2016
PGE	0.1-0.7 mg/mL	0.026 mg/mL	2.179 μ A	Bu çalışma

PGE, PGE/dsDNA, PGE/dsDNA/BEVA elektrotlarla yapılan optmizasyon çalışmalarında yüzey morfolojisinin karakterizasyonu için CV, EIS, SEM ve EDX 'ten faydalanıldı. dsDNA ile BEVA arasındaki 210 s etkileşim süresi 600 rpm karıştırma hızıyla etkileştirildi. Adenin ve Guanin sinyallerinde sırasıyla %64.92 ve %58.36 lik bir değişim gözlemlendi.

NIVO ve BEVA UV Vis. Ölçümleri

Benzer yapıya sahip olan NIVO ve BEVA'nın dsDNA ile etkileşim mekanizmasını belirlemek amacıyla UV-Vis. spektroskopisinde kullanıldı. Yapılan UV-Vis spektrofotometrisi çalışmaları sonucunda NIVO 279.10 nm ve BEVA ise 278.04 nm dalgaboyunda spektrumları ölçüldü. Sabit ilaç miktarına karşılık 1-10 μ g/mL aralığında dsDNA standart olarak eklendiğinde oluşan yeni spektrumların dalga boyunun 260 nm doğru kaydığı (hipsokromik etki) ve önemli ölçüde hiperkromik etki gözlemlendi. Bu etkilerin varlığı elektrostatik bağlanmanın varlığını düşündürmektedir. Ayrıca NIVO/dsDNA ve BEVA/dsDNA bağlanma sabitlerinin 10^4 civarında çıkması aynı zamanda interkalasyonunda gerçekleştiğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, K., Shibata, K., Naito, T., Karayama, M., Hamada, E., Maekawa, M., & Kawakami, J. (2020). IgG saflaştırma ve hareketsizleştirilmiş triptik sindirim kullanılarak insan serumunda NIVO için kantitatif LC-MS/MS yöntemi. *Analitik Yöntemler*, 12 (1), 54-62.
- Andrew, J. S., Anglin, E. J., Wu, E. C., Chen, M. Y., Cheng, L., Freeman, W. R., & Sailor, M. J. (2010). Sustained release of a monoclonal antibody from electrochemically prepared mesoporous silicon oxide. *Advanced functional materials*, 20(23), 4168-4174.
- Aydoğdu, G., Günendi, G., Zeybek, D. K., Zeybek, B., & Pekyardımcı, Ş. (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.
- Barredo, G. R., Giudicessi, S. L., Ceron, M. C. M., Saavedra, S. L., Rodríguez, S., Risso, L. F., & Camperi, S. A. (2020). Protocol for bevacizumab purification using Ac-PHQQGHIGVSK-agarose. *MethodsX*, 7, 100769.
- Bayraktepe, D. E., Yazan, Z., & Polat, K. (2016). Sensitive and selective Voltametric determination of anti- cancer agent shikonin on sepiolite clay/TiO₂ nanoparticle/MWCNTs composite carbon paste sensor and investigation of its electro- oxidation mechanism. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 780, 38-45.
- Baytak, A. K., Duzmen, S., Teker, T., & Aslanoglu, M. (2017). Voltametric determination of methylparaben and its DNA interaction using a novel platform based on carbon nanofibers and cobalt-nickel-palladium nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 239, 330-337.
- Bo, Y., Wang, W., Qi, J., & Huang, S. (2011). A DNA biosensor based on graphene paste electrode modified with Prussian blue and chitosan. *Analyst*, 136(9), 1946-1951.
- 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

- Canavar, E., Kuralay, F., & Erdem, A. (2011). Interaction of Mitomycin C with DNA Immobilized onto Single-walled Carbon Nanotube/Polymer Modified Pencil Graphite Electrode. *Electroanalysis*, 23(10), 2343-2349.
- Canavar, P. E., Ekşin, E., & Gürhan, K. A. E. (2015). Electrochemical monitoring of the interaction between mitomycin C and DNA at chitosan--carbon nanotube composite modified electrodes. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(1), 1-12.
- Carillo, S., Jakes, C., & Bones, J. (2020). In-depth analysis of monoclonal antibodies using microfluidic capillary electrophoresis and native mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185, 113218.
- Carter, M. T., Rodriguez, M., & Bard, A. J. (1989). Voltametric 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(24), 8901-8911.
- Chaubey, A., & Malhotra, B. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17(6-7), 441-456.
- Chiu, H. H., Liao, H. W., Shao, Y. Y., Lu, Y. S., Lin, C. H., Tsai, I. L., & Kuo, C. H. (2018). Development of a general method for quantifying IgG-based therapeutic monoclonal antibodies in human plasma using protein G purification coupled with a two internal standard calibration strategy using LC-MS/MS. *Analytica chimica acta*, 1019, 93-102.
- Congur, G. (2021). Monitoring of glyphosate-DNA interaction and synergistic genotoxic effect of glyphosate and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid using an electrochemical biosensor. *Environmental Pollution*, 271, 116360.
- Corliss, R., 1993, Pacific Overtures Times, 142 (11), 68-70.
- Dasgupta, D., 1998, Artificial immune systems and their applications, Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, 45-52.
- Derenne, A., Derfoufi, K. M., Cowper, B., Delporte, C., & Goormaghtigh, E. (2020). FTIR spectroscopy as an analytical tool to compare glycosylation in therapeutic monoclonal antibodies. *Analytica chimica acta*, 1112, 62-71.
- Eggins, B. R. (2008). *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley & Sons.
- Ekşin, E., Congur, G., Mese, F., & Erdem, A. (2014). Electrochemical monitoring of surface confined interaction between 6-thioguanine and DNA by using single-use graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 733, 33-38.

- Eksin, E., Muti, M., & Erdem, A. (2013). Chitosan/Ionic Liquid Composite Electrode for Electrochemical Monitoring of the Surface-Confined Interaction Between Mitomycin C and DNA. *Electroanalysis*, 25(10), 2321-2329.
- Eksin, E., Muti, M., & Erdem, A. (2013). Chitosan/Ionic Liquid Composite Electrode for Electrochemical Monitoring of the Surface-Confined Interaction Between Mitomycin C and DNA. *Electroanalysis*, 25(10), 2321-2329.
- Eksin, E., Senturk, H., Zor, E., Bingol, H., & Erdem, A. (2020). Carbon quantum dot modified electrodes developed for electrochemical monitoring of Daunorubicin-DNA interaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 862, 114011.
- Elik, A., Gökçe, G., Bostancı, E., & Kızılloluk, D. (1949). Antikanser İlaç Olan Epirubicin'in DNA ile Etkileşiminin DNA Biyosensörleri ile Elektrokimyasal Tayini. *Cumhuriyet Science Journal (CSJ)*, 926.
- Ensafi, A. A., Jamei, H. R., Heydari-Bafrooei, E., & Rezaei, B. (2014). Development of a Voltametric procedure based on DNA interaction for sensitive monitoring of chrysoidine, a banned dye, in foods and textile effluents. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 224-231.
- Erdem, A., & Congur, G. (2013). Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA. *International Journal of biological macromolecules*, 61, 295-301.
- Erdem, A., & Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(14), 965-974.
- Erdem, A., & Özsöz, M. (2001). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(4), 469-476.
- Erdem, A., Karadeniz, H., & Caliskan, A. (2009). Single-walled carbon nanotubes modified graphite electrodes for electrochemical monitoring of nucleic acids and biomolecular interactions. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 21(3-5), 464-471.
- Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U. S., & Ozsoz, M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to

- the hepatitis B virus. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 11(8), 586-587.
- Erdem, A., Kosmider, B., Osiecka, R., Zyner, E., Ochocki, J., & 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(4), 645-652.
- Erdem, A., Kuralay, F., Cubukcu, H.E., Congur, G., Karadeniz, H. and Canavar, E., 2012, Sensitive sepiolite-carbon nanotubes based disposable electrodes for direct detection of DNA and anticancer drug–DNA interactions, *Analyst*, 137 (17), 4001-4004
- Erdem, A., Muti, M., Papakonstantinou, P., Canavar, E., Karadeniz, H., Congur, G., & Sharma, S. (2012). Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction. *Analyst*, 137(9), 2129-2135.
- Feng, L. J., Zhang, X. H., Liu, P., Xiong, H. Y., & 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(2), 71-75.
- Filippo, L. D. D., Dos Santos, K. C., Hanck-Silva, G., de Lima, F. T., Gremiao, M. P. D., & Chorilli, M. (2021). A critical review of biological properties, delivery systems and analytical/bioanalytical methods for determination of bevacizumab. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 51(5), 445-453.
- Findik, M., Bingol, H., & Erdem, A. (2021). Hybrid nanoflowers modified pencil graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between Mitomycin C and DNA. *Talanta*, 222, 121647.
- Gerard, M., Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 17(5), 345-359.
- Gherghi, I. C., Girousi, S. T., Voulgaropoulos, A. N., & Tzimou-Tsitouridou, R. (2003). Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE). *Talanta*, 61(2), 103-112.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400-1458.

- He, J. B., Qi, F., Wang, Y., & 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(1), 480-487.
- Holland, M., 2002, Guide to citing Internet sources [online], Poole, Bournemouth University, http://www.bournemouth.ac.uk/library/using/guide_to_citing_internet_sourc.html [Ziyaret Tarihi: 4 Kasım 2002].
- Husain, M. A., Rehman, S. U., Ishqi, H. M., Sarwar, T., & Tabish, M. (2015). Spectroscopic and molecular docking evidence of aspirin and diflunisal binding to DNA: a comparative study. *RSC Advances*, 5(79), 64335-64345.
- Irie, K., Okada, A., Yamasaki, Y., Kokan, C., Hata, A., Kaji, R., & Fukushima, S. (2018). An LC-MS/MS method for absolute quantification of NIVO in human plasma: application to clinical therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 40(6), 716-724.
- Issaad, F. Z., Tomé, L. I., Marques, N. V., Mouats, C., Diculescu, V. C., & Oliveira-Brett, A. M. (2016). Bevacizumab anticancer monoclonal antibody: native and denatured redox behaviour. *Electrochimica Acta*, 206, 246-253.
- Iwamoto, N., Shimada, T., Terakado, H., & Hamada, A. (2016). Validated LC-MS/MS analysis of immune checkpoint inhibitor NIVO in human plasma using a Fab peptide-selective quantitation method: nano-surface and molecular-orientation limited (nSMOL) proteolysis. *Journal of Chromatography B*, 1023, 9-16.
- Jaccoulet, E., Schweitzer-Chaput, A., Toussaint, B., Prognon, P., & Caudron, E. (2018). Simple and ultra-fast recognition and quantitation of compounded monoclonal antibodies: Application to flow injection analysis combined to UV spectroscopy and matching method. *Talanta*, 187, 279-286.
- Johnston, D. H., & 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(32), 13837-13843.
- Karadeniz, H., Alparslan, L., Erdem, A., & Karasulu, E. (2007). Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 45(2), 322-326.

- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Introduction to biosensors. In *Biosensors and bioelectronics* (pp. 1-68). Elsevier.
- Kerman, K., Kobayashi, M., & Tamiya, E. (2003). Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Measurement Science and Technology*, 15(2), R1.
- Le Guyader, G., Vieillard, V., Mouraud, S., Do, B., Marabelle, A., & Paul, M. (2020). NIVOın intravenöz infüzyon için normal salın torbasında açıldıktan ve verildikten sonra orijinal flakonlarında stabilitesi. *Avrupa Kanser Dergisi*, 135, 192-202.
- Li, J., Liu, Q., Liu, Y., Liu, S., & Yao, S. (2005). DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. *Analytical biochemistry*, 346(1), 107-114.
- Lin, C. W., Wei, K. C., Liao, S. S., Huang, C. Y., Sun, C. L., Wu, P. J., & Ma, C. C. M. (2015). A reusable magnetic graphene oxide-modified biosensor for vascular endothelial growth factor detection in cancer diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 431-437.
- Luong, J. H., Male, K. B., & Glennon, J. D. (2008). Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology advances*, 26(5), 492-500.
- Machini, W. B., Marques, N. V., & Oliveira-Brett, A. M. (2019). In Situ Evaluation of Anticancer Monoclonal Antibody NIVO-DNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. *ChemElectroChem*, 6(17), 4608-4616.
- Martínez-Ortega, A., Herrera, A., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Cuadros-Rodríguez, L., & Navas, N. (2018). Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study. *International journal of biological macromolecules*, 116, 993-1003.
- Mehdinia, A., Kazemi, S. H., Bathaie, S. Z., Alizadeh, A., Shamsipur, M., & Mousavi, M. F. (2009). Electrochemical DNA nano-biosensor for the study of spermidine–DNA interaction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(3), 587-593.
- Millan, K. M., & Mikkelsen, S. R. (1993). Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Analytical Chemistry*, 65(17), 2317-2323.

- Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K., & Khalid, A. M. (2006). Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin–DNA interaction. *Analytical biochemistry*, 354(1), 28-34.
- Ölgen, S. (2002). Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar: angiogenesis and new aspects of cancer chemotherapy.
- Pividori, M. I., Merkoci, A., & Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 15(5-6), 291-303.
- Rahman, M. M., Li, X. B., Lopa, N. S., Ahn, S. J., & Lee, J. J. (2015). Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers. *Sensors*, 15(2), 3801-3829.
- Rahman, Y., Afrin, S., Husain, M. A., Sarwar, T., Ali, A., & Tabish, M. (2017). Unravelling the interaction of pirenzepine, a gastrointestinal disorder drug, with calf thymus DNA: An in vitro and molecular modelling study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 625, 1-12.
- Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., & Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(2), 205-217.
- Rehman, S. U., Sarwar, T., Ishqi, H. M., Husain, M. A., Hasan, Z., & Tabish, M. (2015). Deciphering the interactions between chlorambucil and calf thymus DNA: a multi-spectroscopic and molecular docking study. *Archives of biochemistry and biophysics*, p. 566, 7-14.
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 62(1).
- Shah, A., Nosheen, E., Munir, S., Badshah, A., Qureshi, R., Muhammad, N., & 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.

- Sirajuddin, M., Ali, S., & 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., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry. Brooks. *Cole, Belmont, CA, USA*.
- Sui, J., Zhang, L., & Peng, H. (2013). Label-free DNA sensor construction using self-assembled poly (o-methoxyaniline) hollow nanospheres. *European polymer journal*, 49(1), 139-146.
- Tajik, S., Taher, M. A., Beitollahi, H., & Torkzadeh-Mahani, M. (2015). Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a dsDNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor. *Talanta*, 134, 60-64.
- Temerk, Y., Ibrahim, M., Ibrahim, H., & Kotb, M. (2016). Interactions of an anticancer drug lomustine with single and double stranded DNA at physiological conditions analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 769, 62-71.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 34(5), 635-659.
- Tomé, L. I., Marques, N. V., Diclescu, V. C., & Oliveira-Brett, A. M. (2015). In situ dsDNA-bevacizumab anticancer monoclonal antibody interaction electrochemical evaluation. *Analytica Chimica Acta*, 898, 28-33.
- Vidal, J. C., Garcia-Ruiz, E., & Castillo, J. R. (2003). Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. *Microchimica Acta*, 143(2), 93-111.
- Wang, J. (2006). Analytical electrochemistry Third edition (Hoboken, New Jersey: A John Wiley & sons, inc.).
- Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D. H., & Paleček, E. (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 45(1), 33-40.
- Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J. R., Jiang, M., Paz, J. L. L., Waymire, R., & Getts, R. C. (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon

electrodes. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 10(8), 553-556.

Wang, J., Kawde, A.N., (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta*, 431, 219-224

Yang, R. (2018). *Analytical methods for polymer characterization*. CRC Press.

Zeybek, D. K., Doğancı, B. D., & Karaşallı, M. Ö. (2020). 2-Tiourasilin tayini için Poli (Bromokrezol moru) ile modifiye camsı karbon elektroda dayalı elektrokimyasal dna sensörü geliştirilmesi. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(100. Yıl Özel Sayı), 229-242.

Zhou, C., Dong, Y., Li, Z., Xu, X., & Liu, Z. (2010). Electrochemistry of magnolol and interaction with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 642(2), 115-119.

Zhu, F.-Y., 2014. 3D nanostructure reconstruction based on the SEM imaging principle, and applications. *25(18): p. 185705*

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad

ASLAN, Mehmet

Web sayfası

(Research Gate, Academia, vs.)

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Batman Üniversitesi	2019
Lisans	Dicle Üniversitesi	2003
Lise	Kulp lisesi/Diyarbakır	1997

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev
2007-2010	İçişleri bakanlığı	VHKİ
2011-...	MEB	Öğretmen

Yabancı Dil

Yayınlar

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Özel İlgiler

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ BENZERLİK BİLDİRİMİ FORMU

Öğrencinin Adı, Soyadı	Mehmet ASLAN		
Öğrenci No	19803501		
Ana Bilim Dalı	Kimya		
Program Türü	Proje ☐	Yüksek Lisans ☐	Doktora ☒
Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof.Dr.Fırat AYDIN		
(Varsa) II. Tez Danışmanı (Ünvanı, Adı, Soyadı)	Prof.Dr.Abdulkadir LEVENT		
Tez Başlığı	Antikanser Özellik Gösteren NIVO ve Bevasizumab'ın Kalem Grafit Elektrot Kullanarak Voltametrik Yöntemlerle Tayini ve dsDNA İle Etkileşimlerinin İncelenmesi		
RAPOR BİLGİLERİ			
Raporlama Aşaması	Tez Savunma Sınavı Sonrası		
Sayfa Sayısı	145		
Raporlama Tarihi	18/12/2023		
Benzerlik Oranı (%)	%24		

Yukarıda bilgileri verilen tez çalışmamın toplam 145 sayfalık kısmına ilişkin, 18/12/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin isimli intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 24 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐Başlangıç Bölümleri (Kabul ve Onay sayfası, Teşekkür sayfası, Özet/Abstract) hariç
☐Kaynaklar hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer (Doktora tezinden yayınlanan 3 uluslararası makale hariç tutulmuştur)

Tezimin benzerlik oranı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İntihal Raporu Uygulama Esaslarında belirtilen üst sınır benzerlik oranını aşmamaktadır. Tez benzerlik oranı üst sınır benzerlik oranının altında olsa dahi aksinin tespit edilmesi durumunda her türlü yasal sorumluluğu kabul ettiğimi ve hukuki sonuçlarına razı olduğumu bildirir, gereğini arz ederim.

Öğrencinin Adı, Soyadı: Mehmet ASLAN

Tarih: 18/12/2023

Danışman: Prof.Dr.Fırat AYDIN

İmza:

Tarih:18/12/2023

Ana Bilim Dalı Başkanı: Prof.Dr.Berrin ZİYADANOĞULLARI

İmza:

Tarih:18/12/2023