T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

# DOKTORA TEZİ

# BİYOMOLEKÜLLERDE OKSİDATİF HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

**Ayşe Nur ÖNEM**

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. M. Reşat APAK**

**II. DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya Programı**

**İSTANBUL-2022**

Bu çalışma, 26.05.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**

Prof. Dr. M. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Esma SEZER
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Ayşem ARDA
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Filiz KURALAY
Hacettepe Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. S. Esin ÇELİK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31690 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

# ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a doktora ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin her aşamasında çalışmalarıma özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen ve manevi olarak her daim yanımda olan çok değer verdiğim doktora ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a en içten dileklerimle tesekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını, her türlü desteğini esirgemeyen ve aynı zamanda tez izleme jürisinde yer alan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşem ARDA'ya en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma boyunca bilimsel anlamda katkıda bulunan, her daim desteğini esirgemeyen ve aynı zamanda tez izleme jürisinde yer alan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Esma SEZER'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca her daim katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen çok değer verdiğim hocam Sayın Doç. Dr. Filiz KURALAY'a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel kariyerimin her aşamasında deneyimlerini benimle paylaşan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren beni cesaretlendiren, bilimsel ve manevi açıdan yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her daim yanımda olduklarını hissettiğim çok kıymetli hocalarım Sayın Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK'e, Sayın Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER'e ve Doç. Dr. Mustafa BENER'e içtenlikle çok teşekkür ederim.

Hem iyi günümde hem de kötü günümde her daim yanımda olan, yeri geldi iyi bir öğrenci yeri geldi iyi bir kardeş olan kıymetli çalışma arkadaşım Dr. Kimyager Furkan Burak ŞEN'e, bu çalışma boyunca yardımlarını ve her türlü desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Esin AKYÜZ'e, Araş. Gör. Dr. Asiye Aslıhan AVAN ve Araş. Gör. Aslı Neslihan AVAN'a ve Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca vermiş olduğu maddi ve manevi destekle bu aşamaya gelmemde büyük emeği olan çok kıymetli annem İlknur ŞAHİN'e çok teşekkür ederim. İlk günden beri göstermiş olduğu sabır ve destek için sevgili eşim Çağlayan ÖNEM'e tüm kalbimle teşekkür ederim. Bu çalışmayı hayatıma anlam katan varlığına şükür ettiğim sevgili kızım Miray ÖNEM'e ithaf ediyorum.

Mayıs 2022 Ayşe Nur ÖNEM

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No**

**ÖNSÖZ** ..... **iv**
**İÇİNDEKİLER** ..... **v**
**ŞEKİL LİSTESİ** ..... **ix**
**TABLO LİSTESİ** ..... **xvi**
**SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ** ..... **xvii**
**ÖZET** ..... **xix**
**SUMMARY** ..... **xxi**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. GENEL KISIMLAR** ..... **7**
2.1. RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ ..... 7
2.2. OKSİDATİF STRES ..... 12
2.3. ANTİOKSİDANLAR VE OKSİDATİF STRESE ETKİSİ ..... 12
2.4. BİYOMOLEKÜLLER ..... 14
2.4.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA) ..... 15
*2.4.1.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu* ..... *15*
*2.4.1.2. DNA Tayin Yöntemleri* ..... *17*
2.4.2. Oksidatif DNA Hasarı ..... 17
2.4.3. Oksidatif DNA Hasarının Ölçülmesi ..... 21
2.4.4. Oksidatif DNA Hasarına Antioksidanların Etkisi ..... 22
2.5. BİYOSENSÖRLER ..... 23
2.6. ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİ ..... 25
2.7. ELEKTROKİMYA ..... 30
2.8. SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (SV) ..... 35
2.8.1. ANODİK-KATODİK SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (A-KSV) ..... 36
2.8.2. ADSORPTİF SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (AdSV) ..... 37
2.9. ELEKTROTLARIN MODİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU ..... 38
2.9.1. Modifiye Eletkrotların Hazırlanma Yöntemleri ..... 38
2.9.2. Modifiye Yüzeylerin Karakterizasyonu ..... 39
2.10. NANOTEKNOLOJİ ..... 39
2.10.1. Altın Nanopartiküller (AuNP'ler) ..... 41

2.10.2. Karbon Nanotüpler (CNT'ler) ..... 42
2.11. NAFYON ..... 44
2.12. OKSİDATİF DNA HASARINA KARŞI KORUMADA KULLANILAN BİTKİ ÇAYLARI ..... 44
2.13. LİTERATÜRDE MEVCUT ÇALIŞMALAR ..... 46
2.13.1. Oksidatif DNA Hasarı Tayini ..... 46
2.13.2. Oksidatif DNA Hasarı Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayini ..... 52
**3. MALZEME VE YÖNTEM ..... 59**
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR ..... 59
3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR ..... 59
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI ..... 60
3.4. ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜMLER ..... 62
3.5. CAMSI KARBON ELEKTRODUN TEMİZLENMESİ VE ÖN İŞLEMİ ..... 62
3.6. CAMSI KARBON MODİFİYE ELEKTRODUN HAZIRLANMASI İÇİN ÖN DENEMELER ..... 63
3.6.1. Farklı AuNP'ler ile GCE Yüzeyinin Modifikasyonu ..... 63
*3.6.1.1. Damlatma Tekniği Kullanılarak Yüzeyi (-) Yüklü AuNP'ler ile Modifikasyon ..... 63*
*3.6.1.2. Damlatma Tekniği Kullanılarak Yüzeyi (+) Yüklü AuNP'ler ile Modifikasyon ..... 63*
*3.6.1.3. Elektrodepozisyon Tekniği Kullanılarak AuNP'ler ile Modifikasyon ..... 63*
3.6.2. Farklı AuNP'ler ile Kaplanan GCE'lerin MWCNT ile Modifikasyonu ..... 64
3.6.3. GCE'nin MWCNT ile Modifikasyonu (GCE/MWCNT) ..... 64
3.6.4. Hazırlanan Modifiye Elektrotların Karşılaştırılması ..... 64
3.6.5. MWCNT-Nafyon ile Modifiye Elektrodun Hazırlanması ..... 64
3.6.6. Modifikasyon Malzemelerinin (AuNP ve MWCNT-Nafyon) Sıralamasının Etkisi ..... 64
3.7. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUNUN HAZIRLANMASI ..... 65
3.7.1. MWCNT-Nafyon Miktarının Belirlenmesi ..... 65
3.7.2. CV ile AuNP'lerin Elektrodepozisyonunda Döngü Sayısının Belirlenmesi ..... 65
3.8. PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU ..... 66
3.8.1. dsDNA'nın Konsantrasyonunun Optimizasyonu ..... 66
3.8.2. Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu ..... 66
3.8.3. DPSV Tekniğinin Parametrelerinin Optimizasyonu ..... 66
3.8.4. Bakır Katalizli DNA Hasarına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu ..... 66
*3.8.4.1. Cu(II) Çözeltisinin Konsantrasyon Optimizasyonu ..... 66*

*3.8.4.2. DNA'nın Cu(II) Çözeltisi ile Etkileşim Süresinin Optimizasyonu* ..... *67*
*3.8.4.3. Antioksidan İlavesinin Cu(II) Çözeltisi ile Etkileşim Öncesi ve Sonrasında İncelenmesi* ..... *67*
*3.8.4.4. Cu(II) Katalizli Oksidatif DNA Hasarının UV-GB Spektrofotometrisi ile Doğrulanması* ..... *67*
3.9. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN KARAKTERİZASYONU ..... 68
3.9.1. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniği ile Karakterizasyon ..... 68
3.9.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile Karakterizasyon ..... 68
3.9.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Karakterizasyonu ..... 68
3.10. DNA OKSİDATİF HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM ..... 68
3.10.1. DNA'nın Modifiye Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu ..... 68
3.10.2. Guanin, Adenin ve Sitozin Standartları Kullanılarak DNA'ya Ait Piklerin Doğrulanması ..... 69
3.10.3. Bakır Katalizli Oksidatif DNA Hasarı Yöntemi ..... 70
3.10.4. Oksidatif DNA Hasarını Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi ..... 71
3.11. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE BAZI BİTKİ ÇAYLARININ OKSİDATİF DNA HASARINI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ ..... 72
3.12. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN DOĞRULANMASI İÇİN UYGULANAN HPLC-PDA YÖNTEMİ ..... 72
3.13. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL (DPSV) VE REFERANS (HPLC-PDA) YÖNTEMLER İÇİN BAZI ANALİTİK PARAMETRELER ..... 73
3.14. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODU KULLANILARAK GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEME GİRİŞİMLERİN ETKİSİ ..... 73
**4. BULGULAR ..... 74**
4.1. HAZIRLANAN FARKLI AUNP'LER İLE MODİFİKASYON ÇALIŞMALARI ..... 74
4.2. MODİFİKASYONDA MWCNT-NAFYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ ..... 75
4.3. MODİFİKASYON MALZEMELERİNİN SIRALAMASININ ETKİSİ ..... 75
4.4. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN HAZIRLANMA KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU ..... 76
4.5. PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU ..... 79
4.5.1. dsDNA Konsantrasyonunun Optimizasyonu ..... 79
4.5.2. Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu ..... 79
4.5.3. DPSV Tekniğinin Ölçüm Parametrelerinin Optimizasyonu ..... 81
*4.5.3.1. Biriktirme Potansiyeli* ..... *81*
*4.5.3.2. Biriktirme Süresi* ..... *81*

*4.5.3.3. Puls Size (Puls Boyu)*.....*82*
*4.5.3.4. Step Size (Basamak Boyu)*.....*83*
4.5.4. Bakır Katalizli DNA Hasarına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu.....83
4.6. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN KARAKTERİZASYONU.....86
4.6.1. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniği ile Karakterizasyonu.....86
4.6.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile Karakterizasyonu.....87
4.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Karakterizasyonu.....88
4.7. OKSİDATİF DNA HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN SONUÇLARI.....89
4.7.1. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) Kullanılarak DNA'nın Tayini.....89
4.7.2. Modifiye Çalışma Elektrodu ile Guanin, Adenin ve Sitozin Standartları Kullanılarak DNA'ya Ait Piklerin Doğrulanması.....90
4.7.3. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile Cu(II) Katalizli Oksidatif DNA Hasarının Tayini.....92
4.7.4. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) Kullanılarak Geliştirilen Oksidatif DNA Hasarını Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi ile Bazı Antioksidanların İncelenmesi.....93
4.8. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE BAZI BİTKİ ÇAYLARININ OKSİDATİF DNA HASARINI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ.....101
4.9. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN HPLC-PDA YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI.....103
4.10. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL (DPSV) VE REFERANS (HPLC-PDA) YÖNTEMLERİ İÇİN ANALİTİK PARAMETRELERİN İNCELENMESİ.....105
4.11. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODU (GCE/AUNP/MWCNT-NAFYON) KULLANILARAK GELİŞTİRİLEN DPSV YÖNTEMİNE GİRİŞİMLERİN ETKİSİ.....106
**5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....108**
**KAYNAKLAR.....120**
**ÖZGEÇMİŞ.....140**

# ŞEKİL LİSTESİ

**Sayfa No**

**Şekil 2.1:** Reaktif oksijen türleri (ROS). ..... 9

**Şekil 2.2:** Oksidatif stresin yol açtığı hastalıklar. ..... 12

**Şekil 2.3:** Biyomoleküller. ..... 14

**Şekil 2.4:** Nükleik asitlerde (DNA ve RNA) mevcut pürin ve pirimidin bazları. ..... 16

**Şekil 2.5:** DNA çift sarmalı ve açık bir DNA molekülü modelleri. ..... 16

**Şekil 2.6:** Oksidatif DNA hasarı. ..... 18

**Şekil 2.7:** ROS/RNS'nin hücresel ortamda oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak kullanılan biyomoleküller (DNA, protein, lipit vb.) üzerindeki etkisi [6]. ..... 19

**Şekil 2.8:** Antioksidan aktivite tayini için elektrokimyasal yaklaşımın çalışma prensibi [16]. ..... 23

**Şekil 2.9:** Biyosensörün yapısı [125]. ..... 23

**Şekil 2.10:** Biyomolekkülerin immobilizasyon yöntemleri [125]. ..... 25

**Şekil 2.11:** (A) 175 µM UA, 50 µM G, 50 µM A, 250 µM T ve 250 µM C'yi saptamak için yalın GCE, GCE/CHT ve GCE/GO-MWCNT-CHT kullanılan CV karşılaştırması (0,2 M PBS, pH 7,0); (B) 15 µM UA, 15 µM G, 15 µM A, 35 µM T ve 35 µM C'yi saptamak için yalın GCE, GCE/CHT ve GCE/GO-MWCNT-CHT kullanılarak DPV'nin karşılaştırılması (0,2 M PBS, pH 7,0) [1]. ..... 29

**Şekil 2.12:** Elektrokimyasal hücre modeli. ..... 32

**Şekil 2.13:** Voltametride kullanılan çalışma elektrotların sınıflandırılması. ..... 32

**Şekil 2.14:** Camsı karbon elektrot şeması. ..... 33

**Şekil 2.15:** Referans elektrot (i) gümüş klorür (ii) kalomel elektrot. ..... 33

**Şekil 2.16:** Yardımcı elektrot, Pt tel. ..... 34

**Şekil 2.17:** Elektroanalitik yöntemlerin şematik gösterimi. Ölçülen büyüklükler parantez içinde verilmiştir (I=akım, E= potansiyel, R=direnç, G=iletkenlik, Q=yük miktarı, t=zaman, hacim=standart çözelti hacmi, ağırlık=elektrokimyasal olarak biriktirilen türün ağırlığı). ..... 34

**Şekil 2.18:** Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili ve akım potansiyel eğrileri. ..... 36

**Şekil 2.19:** Modifiye elektrotların hazırlanma yöntemleri. ..... 38

**Şekil 2.20:** Karbon nanotüplerin yapısı. ..... 43

**Şekil 2.21:** Nafyonun yapısı. ..... 44

**Şekil 2.22:** Yeşil çay (*Camellia sinensis*). ..... 45

**Şekil 2.23:** Ekinezya (*Echinacea angustifolia*). ..... 45

**Şekil 2.24:** Ihlamur (*Tilia Cordata*). ..... 46

**Şekil 2.25:** Elma çayı (*Malus domestica*). ..... 46

**Şekil 2.26:** DNA/GCE ve DNA/RGO-Nafyon/GCE'nin DPV voltamogramları (HAc–NaAc tamponunda; pH 4,4). ..... 48

**Şekil 2.27:** Guanin ve adenin anodik pik akımının düşüşü ile eklenen CLB konsantrasyonu arasındaki ilişki [85]. ..... 49

**Şekil 2.28:** Guo ve diğ. tarafından geliştirilen yöntemin şeması [214]. ..... 50

**Şekil 2.29:** Hájková ve diğ. tarafından geliştirilen sensörün şematik gösterimi [216]. ..... 51

**Şekil 2.30:** Lin ve diğ.'nin deney şeması [99]. ..... 52

**Şekil 2.31:** DNA-biyosensörünün SWV ile elde edilen voltamogramları (pH 4,75 asetat tamponunda); (a) DNA (blank); (b) Elektrodun Fenton çözeltisine daldırılması sonrası ($Fe^{2+}$:EDTA:$H_2O_2$ (1:2:40)); (c) Elektrodun Fenton çözeltisi + *B. Genistelloides* bitki ekstraktına daldırılması sonrası [218]. ..... 53

**Şekil 2.32:** Doğal antioksidanların DNA hasarına etkisi. (1) DNA (blank); (2) Fenton çözeltisi (1:2:40) $Fe^{2+}$:EDTA:$H_2O_2$; (3) Troloks = $1\times10^{-4}$ M); (4) Baccharis gen-stelloides; (5) *Peumus boldus*; (6) *Foeniculum vulgare*; (7) *Cymbopogom citratus*; (8) *Camellia sinensis*; (9) *Mentha piperita*. ..... 53

**Şekil 2.33:** Barroso ve diğ.'nin [19] geliştirdiği DNA-CPE'nin (a) 0,05, (b) 0,10, (c) 0,50, (d) 0,80 ve (e) 1,00 μmol/L AA varlığında Fenton çözeltisine daldırılması sonucu elde edilen diferansiyel puls voltamogramları. Küçük şekil: AA (askorbik asit) konsantrasyonu ve $I_a$ arasındaki ilişkiyi göstermektedir. ..... 56

**Şekil 2.34:** Antioksidanların hidroksil radikali süpürme etkilerinin karşılaştırılması: AA-askorbik asit; GA-gallik asit; CA-kafeik asit; RES-resveratrol [19]. ..... 56

**Şekil 2.35:** Qian ve diğ.'nin geliştirdiği [152] camsı karbon elektrodun modifikasyon şeması. ..... 57

**Şekil 2.36:** Mousavisani ve diğ. tarafından geliştirilen DNA sensörünün hazırlanışı ve DNA hasar tespiti prosedürünün şematik gösterimi [227]. ..... 58

**Şekil 3.1**: Modifiye çalışma elektrodunun hazırlanmasının şematik gösterimi. ..... 66

**Şekil 3.2:** DNA'nın hazırlanan modifiye çalışma elektroduna immobilizasyonunun şematik gösterimi.....69

**Şekil 3.3:** Cu(II) katalizli oksidatif DNA hasarının mekanizması. .....71

**Şekil 3.4:** Cu(II) katalizli oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktivite tayin yönteminin şematik gösterimi. .....72

**Şekil 4.1:** 250 ppm dsDNA varlığında farklı şekillerde hazırlanan modifiye elektrotların karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS). .....74

**Şekil 4.2:** 250 ppm dsDNA varlığında MWCNT ve MWCNT-Nafyon karışımının karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS) (G: Guanin; A: Adenin; C: Sitozin). .....75

**Şekil 4.3:** 250 ppm dsDNA varlığında farklı modifikasyon şekillerinin yalın elektrotla karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS). .....76

**Şekil 4.4:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için MWCNT-Nafyon karışımının miktarının optimizasyonu (A) DPS voltamogramı (B) Sonuçların grafiksel gösterimi (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS). .....77

**Şekil 4.5:** AuNP'lerin elektrodepozisyon ile elektrot yüzeyine kaplanmasında döngü sayısının optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS). .....78

**Şekil 4.6:** CV tekniği ile yalın elektrot yüzeyine (GCE) AuNP'lerin elektrodepozisyon ile kaplanması (2,5 mL % 0,04 (w/v) $HAuCl_4$ + 2,5 mL 0,1 M $H_2SO_4$; tarama hızı: 50 mV/s; döngü sayısı: 30; tarama aralığı: (−) 0,4 – (+) 0,4 V).....78

**Şekil 4.7:** dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için dsDNA konsantrasyonunun optimizasyonu (A) DPS voltamogramı (B) Sonuçların grafiksel gösterimi (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS; 125, 250, 500, 750 ve 1000 ppm dsDNA).....79

**Şekil 4.8:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için pH optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; pH 7,4, 8,5 PBS ve pH 4,8 ABS). .....80

**Şekil 4.9:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için destek elektrolit çözeltisinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 25, 50, 75 ve 100 mM pH 7,4 PBS).....80

**Şekil 4.10:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için biriktirme potansiyelinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: (–) 0,6 – (+) 1,0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).....81

**Şekil 4.11:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için biriktirme süresinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 30 – 420 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS). .....82

**Şekil 4.12:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için puls size optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 10 – 125 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS). .....82

**Şekil 4.13:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için step size optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 2,5 – 15 mV; puls size: 75 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS). .....83

**Şekil 4.14:** 250 ppm dsDNA'nın hasar tayini için Cu(II) çözeltisinin konsantrasyon (0,75, 1,5, 2,25 ve 3 mM) optimizasyonunun grafiksel gösterimi (n=3). .....84

**Şekil 4.15:** 250 ppm dsDNA'nın oksidatif hasar tayini için Cu(II) çözeltisi ile etkileşim süresi (5, 10, 20, 30 ve 40 dk) optimizasyonunun grafiksel gösterimi (n=3).....84

**Şekil 4.16:** dsDNA çözeltisinin Cu(II) ile etkileşim öncesi ve sonrası UV-GB spektrumları (10 kat seyreltilmiş).....86

**Şekil 4.17:** Sırasıyla yalın, AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotların, 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl'deki döngüsel voltametrik davranışları (tarama hızı: 50 mV/s).....87

**Şekil 4.18:** Yalın GCE, AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotların 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 0,1 M KCl çözeltisi içerisindeki Nyquist grafikleri (Frekans aralığı: $10^6$-$10^{-1}$ Hz, Genlik: 5 mV). .....88

**Şekil 4.19:** (a) GCE/AuNP, (b) GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon ve (c) GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA modifiye elektrotların SEM görüntüleri (Büyütme: 100,000x; AuNP'lerin boyutları: 30-150 nm; dsDNA: 250 ppm immobilize).....89

**Şekil 4.20:** 250 ppm dsDNA varlığında ve yokluğunda modifiye elektrodun DPS voltamogramları (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 10 mV; puls size: 75

mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS). .....90

**Şekil 4.21:** Farklı konsantrasyonlarda, G standart çözeltilerinin modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği. .....91

**Şekil 4.22:** Farklı konsantrasyonlarda, A standart çözeltilerinin modifiye elektrot ile (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği. .....91

**Şekil 4.23:** Farklı konsantrasyonlarda, C standart çözeltilerinin modifiye elektrot ile (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği. .....92

**Şekil 4.24:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; 75 mM pH 7,4 PBS).....93

**Şekil 4.25:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,125 mM EC varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.....94

**Şekil 4.26:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,1 mM NAC varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....94

**Şekil 4.27:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,25 mM GSH varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.....95

**Şekil 4.28:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM GA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.....95

**Şekil 4.29:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01-0,1 mM ECG varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....96

**Şekil 4.30:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM CT varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.....96

**Şekil 4.31:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,1 mM CA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....97

**Şekil 4.32:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,025 – 0,25 mM AA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....97

**Şekil 4.33:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,25 mM RA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....98

**Şekil 4.34:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM QR varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları. .....98

**Şekil 4.35:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM RT varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.....99

**Şekil 4.36:** Çeşitli antioksidan bileşiklerin (0,05 mM için) radikalleri süpürme etkinliklerinin (% antioksidan etki) karşılaştırılması: QR- kuersetin; CT- kateşin; RT- rutin; GA- gallik asit; ECG- epigallokateşin; EC- epikateşin; CA- klorojenik asit; NAC- N-asetil sistein; AA- askorbik asit; GSH- glutatyon; RA- rozmarinik asit (n=6). .....100

**Şekil 4.37:** GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,05 mL Yeşil çay, Elma çayı, Ekinezya ve Ihlamur varlığında 1,5 mM 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları (n=6). .....101

**Şekil 4.38:** Çeşitli bitki çaylarının (0,05 mL) geliştirilen elektrokimyasal yöntem ile elde edilen radikal süpürme etkinliklerinin (% antioksidan etki) karşılaştırılması (n=6).....102

**Şekil 4.39:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3). .....103

**Şekil 4.40:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 - 0,05 mM CT varlığında 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3)(şeklin içinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi verilmiştir).....103

**Şekil 4.41:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 - 0,05 mL yeşil çay varlığında 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3). .....104

**Şekil 4.42:** DPSV ve HPLC-PDA yöntemleri ile CT standardının (0,05 mM için) ve yeşil çay örneğinin (0,05 mL için) radikal süpürme etkinliklerinin karşılaştırılması. (CT standardı için: P = 0,05, $F_{deneysel}$ = 0,0901, $F_{kritik(tablo)}$ = 5,5914, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$ ; Yeşil çay örneği için: P = 0,05, $F_{deneysel}$ = 0,4882, $F_{kritik(tablo)}$ = 5,5914, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$).....104

**Şekil 4.43:** DPSV tekniği ile GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon kullanılarak; 250 ppm dsDNA, (A, G ve C) standart karışım (2'şer ppm) ve 250 ppm dsDNA üzerine 2'şer ppm (A, G ve C) katkısı yapılan karışım çözeltileri için elde edilen voltamogramlar (n=6). .....105

**Şekil 4.44:** HPLC-PDA yöntemi ile; 250 ppm dsDNA, (A, G ve C) standart karışım (2'şer ppm) ve 250 ppm dsDNA üzerine 2'şer ppm (A, G ve C) katkısı yapılan karışım çözeltileri için elde edilen kromatogramlar (n=6). .....106

**Şekil 4.45:** Farklı miktarlarda (0,01 - 0,05 mL) eklenen 1:1 seyreltik FBS çözeltisinin DNA tayinine etkisi (n=3). .....107

# TABLO LİSTESİ

**Sayfa No**

**Tablo 2.1:** Biyolojik sistemlerde üretilen serbest radikaller [41]. .....8

**Tablo 4.1:** Cu(II) ile etkileşim öncesi ve sonrasında antioksidan ilave edilmesinin DNA oksidatif hasarı üzerine etkisinin incelenmesi. .....85

**Tablo 4.2:** DNA'da bulunan G, A ve C bazları için elde edilen oksidasyon potansiyelleri ve pik akım değerleri. .....90

**Tablo 4.3:** DNA tayininde gözlemlenen G, A ve C bazlarının miktarları (ppm). .....92

**Tablo 4.4:** Çeşitli antioksidanların oksidatif hasarı engelleyici aktivitelerine bağlı olarak dsDNA'da bulunan A bazının korunmasına ait kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları, LOD, LOQ değerleri ve çalışma aralıkları (n=6). .....99

**Tablo 4.5:** Bitki örneklerinin geliştirilen DPSV yöntemi ile CT eşdeğeri cinsinden bulunan AOA değerleri (µmol CT/g ve mg CT/g). .....102

**Tablo 4.6:** Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yöntemi ile HPLC-PDA yönteminin karşılaştırılması sonucu elde edilen tekrarlanabilirlik (gün-içi ve günler-arası) ve geri kazanım sonuçları (n=6). ....106

**Tablo 4.7:** Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yöntemi ile 250 ppm dsDNA'nın tayininde adenin oksidasyon pik akımına interferan etkilerin incelenmesi (n=3). .....107

# SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| **Simgeler** | **Açıklama** |
|---|---|
| **dk** | **:** Dakika |
| **$H_2O_2$** | **:** Hidrojen peroksit |
| **M** | **:** Molar konsantrasyon |
| **mL** | **:** Mili litre |
| **mM** | **:** Milimolar konsantrasyon |
| **nm** | **:** Nanometre |
| **•OH** | **:** Hidroksil radikali |
| **$O_2^{\bullet-}$** | **:** Süperoksit anyon radikali |
| **$O_2^{2-}$** | **:** Peroksit iyonu |
| **$R_{ct}$** | **:** Yük transfer direnci |
| **s** | **:** Saniye |
| **V** | **:** Potansiyel |
| **µL** | **:** Mikrolitre |
| **Kısaltmalar** | **Açıklama** |
| **A** | **:** Adenin |
| **AA** | **:** Askorbik asit |
| **ABS** | **:** Asetat tampon çözeltisi |
| **ACW** | **:** Alternatif akım voltametrisi |
| **AdSV** | **:** Adsorptif sıyırma voltametrisi |
| **AO** | **:** Antioksidan |
| **ASV** | **:** Anodik sıyırma voltametrisi |
| **AuNP** | **:** Altın nanopartikül |
| **BSA** | **:** Bovin serum albümin |
| **C** | **:** Sitozin |
| **CA** | **:** Klorojenik asit |
| **CFA** | **:** Kafeik asit |
| **CT** | **:** Kateşin |
| **CNT** | **:** Karbon nanotüp |
| **CP** | **:** Karbon pasta |

**CV** : Döngüsel Voltametri
**dsDNA** : Çift sarmal DNA
**DA** : Dopamin
**DMF** : Dimetil formamid
**DNA** : Deoksiribonükleik asit
**DPV** : Diferansiyel puls voltametrisi
**DPSV** : Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi
**ECT** : Epikateşin
**ECG** : Epikateşin gallat
**EIS** : Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
**FBS** : Fetal bovin serum
**G** : Guanin
**GA** : Gallik asit
**GCE** : Camsı karbon elektrot
**GB** : Görünür bölge
**GSH** : Glutatyon
**HPLC** : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
**KSV** : Katodik sıyırma voltametrisi
**LOD** : Belirtme sınırı (Limit of Detection)
**LOQ** : Tayin sınırı (Limit of Quantitation)
**MWCNT** : Çok duvarlı karbon nanotüp
**NAC** : N-Asetil sistein
**PBS** : Fosfat tampon çözeltisi
**PGE** : Kalem grafit elektrot
**RA** : Rozmarinik asit
**REC** : Geri kazanım
**RNS** : Reaktif azot türleri
**ROS** : Reaktif oksijen türleri

# ÖZET

## DOKTORA TEZİ

### BİYOMOLEKÜLLERDE OKSİDATİF HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

**Ayşe Nur ÖNEM**

**İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. M. Reşat APAK**

**II. Danışman : Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN**

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal aerobik metabolizmanın bir sonucu olarak üretilir ve deoksiribonükleik asit (DNA) oksidatif hasarını indükleyebilir. Oksidatif DNA hasarının belirlenmesi, önemli bir genomik kararsızlık kaynağı oluşturduğu iyi bilindiği için büyük önem taşımaktadır. Elektrokimyasal teknikler kullanılarak antioksidanların koruyucu etkisinin değerlendirilmesi, DNA nükleobazlarındaki değişikliklerin incelenmesiyle gerçekleştirilebilir. Tez çalışmasında, oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için altın nanopartiküller (AuNP) ve çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT)-nafyon modifiye camsı karbon elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) geliştirildi ve hazırlanan modifiye çalışma elektrodu döngüsel voltametri (CV), elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) teknikleri ile karakterize edildi. Geliştirilen elektrokimyasal yöntem, bakır(II) varlığında çözünmüş oksijen tarafından üretilen radikallerin elektrot yüzeyine immobilize edilen DNA'yı kısmi olarak hasara uğratmasına ve antioksidan bileşiklerin oluşan radikalleri süpürerek hasarın oluşumunu engellemesine dayanmaktadır. DNA hasarı sonucu oluşan guanin, adenin ve sitozin oksidasyon sinyallerindeki değişiklikler, antioksidanların yokluğunda/varlığında, bakır(II) ile dsDNA etkileşimi öncesinde/sonrasında diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) kullanılarak ölçüldü. Oluşan radikallerin guanin ve adenin bazlarına yüksek oranda (% 90,9 ve 91,2), sitozine ise tamamen hasar verdiği görüldü. Belirli antioksidan bileşiklerin (askorbik asit, gallik asit, epikateşin, kateşin, epikateşin gallat, glutatyon, klorojenik asit, N-asetil sistein, rozmarinik asit, kuersetin ve rutin) aynı

konsantrasyon değerine (0,05 mM) denk gelen adenin pik akım değerleri kullanılarak, tüm bileşiklerin % antioksidan etkileri hesaplandı ve % 30,46-75,56 aralığında bir koruyucu etki olduğu gözlendi. Kuersetinin (QR) 0,005-0,05 mM lineer çalışma aralığında en yüksek antioksidan etkiyi gösterdiği bulundu (I (μA)=421,43[QR(mM)] + 11,14; r= 0,995, n=6) ve belirtme sınırı (LOD) 1 μM olarak tespit edildi. Geliştirilen biyosensör, bitki çaylarının antioksidan aktivitelerinin (AOA) belirlenmesi için uygulandı. Yeşil çay, ıhlamur, ekinezya ve elma çayı için AOA değerleri kateşin (CT) eşdeğeri cinsinden sırasıyla, 80,29, 75,79, 70,92 ve 62,04 μmol CT/g olarak bulundu. Antioksidan etkileri (%) ise sırasıyla, 66,16, 62,50, 58,44 ve 51,12 olarak bulundu. Geliştirilen yöntemin doğrulaması ve validasyonu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapıldı. HPLC yöntemi ile yeşil çay ve CT için antioksidan etkiler (%) sırasıyla; 61,99 ve 62,22 olarak hesaplandı. Son olarak, insan serumunda bulunan bazı bileşiklerin (dopamin, ürik asit, proteinler (temsili olarak sığır serum albümini, BSA), glukoz) ve fetal sığır serum (FBS) matriksinin (proteince zengin, hormon ve enzimler içeren sentetik serum örneği) hazırlanan elektrot ile DNA tespiti üzerine bozucu etkileri incelendi.

Mayıs 2022, 165 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Elektrokimya, DNA, Oksidatif DNA hasarı, Reaktif oksijen türleri, Antioksidan aktivite

# SUMMARY

## Ph.D. THESIS

### ELECTROCHEMICAL METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINING ANTIOXIDANT ACTIVITY PREVENTING OXIDATIVE HAZARD IN BIOMOLECULES

**Ayşe Nur ÖNEM**

**Istanbul University-Cerrahpasa**

**Institute of Graduate Studies**

**Department of Chemistry**

**Supervisor : Prof. Dr. M. Reşat APAK**

**Co-Supervisor : Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN**

Reactive oxygen species (ROS) are produced as a result of normal aerobic metabolism and can induce deoxyribonucleic acid (DNA) oxidative damage. The study of oxidative DNA damage is of great importance as it is well known to constitute an important source of genomic instability. Evaluation of the protective effect of antioxidants using electrochemical techniques can be performed by examining changes in DNA nucleobases. In the thesis study, gold nanoparticles (AuNP) and multi-walled carbon nanotube (MWCNT)-Nafion modified glassy carbon electrode (GCE/AuNP/MWCNT-Nafion) was developed to evaluate the antioxidant activity preventing oxidative DNA damage, and the prepared modified working electrode was characterized by cyclic voltametry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and scanning electron microscopy (SEM) techniques. The developed electrochemical method is based on the fact that the radicals produced by dissolved oxygen in the presence of copper(II) partially damage the DNA immobilized on the electrode surface and the antioxidant compounds prevent damage by scavenging the formed radicals. Changes in guanine, adenine and cytosine oxidation signals resulting from DNA damage were measured using differential pulse stripping voltametry (DPSV) before/after interaction of dsDNA with copper(II) in the absence/presence of antioxidants. It was observed that the formed radicals damaged guanine and adenine bases at a high rate (90.9% and 91.2%) and completely damaged cytosine. Using adenine peak current

values corresponding to the same concentration value (0.05 mM) of certain antioxidant compounds (ascorbic acid, gallic acid, epicatechin, catechin, epicatechin gallate, glutathione, chlorogenic acid, N-acetyl cysteine, rosmarinic acid, quercetin, and rutin), the % antioxidant effects of all compounds were calculated and a protective effect in the range of 30.46-75.56% was observed. Quercetin (QR) was found to show the highest antioxidant effect in the linear working range of 0.005-0.05 mM (I (μA)=421.43[QR(mM)] + 11.14; r= 0.995, n=6) and limit of detection (LOD) was determined as 1 μM. The developed biosensor was applied to determine the antioxidant activities (AOA) of herbal teas. AOA values for green tea, linden, echinacea and apple tea were found to be 80.29, 75.79, 70.92 and 62.04 μmol CT/g in terms of catechin (CT) equivalents, respectively. The antioxidant effects (%) were found to be 66.16, 62.50, 58.44 and 51.12, respectively. The developed method was verified and validated by high performance liquid chromatography (HPLC) method. Antioxidant effects (%) for green tea and CT by HPLC method were calculated as 61.99 and 62.22, respectively. Finally, the effects of some compounds in human serum (dopamine, uric acid, proteins (representatively bovine serum albümin, BSA), glucose) and fetal bovine serum (FBS) matrix (protein-rich synthetic serum sample containing hormones and enzymes) on DNA detection with the prepared electrode were examined.

May 2022, 165 pages.

**Keywords:** Electrochemistry, DNA, Oxidative DNA damage, Reactive oxygen species, Antioxidant activity

# 1. GİRİŞ

Biyolojik moleküller olarak da adlandırılan biyomoleküller, hücreler ve canlı organizmalar tarafından üretilen organik maddelerdir. Farklı boyut ve yapılarda olabilen ve çeşitli fonksiyonları bulunan biyomoleküller; karbonhidratlar, lipidler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere dört ana grupta yer alır. Bu maddelerden deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) en önemli biyomoleküllerdir. DNA, genetik bilginin depolanmasında ve biyolojik sistemlerin genel işleyişinde kritik bir rol oynayan önemli bir biyomoleküldür ve dört nükleobazdan oluşur: guanin (G), adenin (A), timin (T) ve sitozin (C). G ve A bazları pürinler, T ve C bazları pirimidinler olarak bilinir. G bazları tamamlayıcı C bazları ile ve A bazları tamamlayıcı T bazları ile bağlanarak üç boyutlu DNA çift sarmal yapısını oluştururlar. DNA'daki bazların sırası zorunludur, çünkü genetik bilginin replikasyonu (kopyalanması), transkripsiyonu (DNA'nın bir iplikçiğinde bulunan genetik bilgilerin kodlar halinde tek iplikçik RNA'ya transferi) yoluyla protein sentezi ve hücrenin coğaltılması gibi önemli süreçleri başlatır [1].

Biyolojik sistemlerdeki serbest radikaller (oksiradikaller, azot veya kükürt içeren radikaller gibi), normal hücresel aerobik metabolizmanın sonucu olduğu gibi bazı hastalık süreçleri ve ksenofil kullanımı kaynaklı anormal reaksiyonlar sonucunda da oluşabilmektedir [2]. Reaktif oksijen ve azot türleri (ROS/RNS) insan vücudunda önemli yararlı metabolik fonksiyonlara sahip olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda oluştuğu zaman canlı hücrelerin yaşam döngüsüne zarar veren oksidatif strese neden olabilir. Bu sorunun ortaya çıkmasının engellenmesinde antioksidan (AO) savunma sistemi önemli rol oynar [3]. Antioksidan savunma sistemlerinde, endojen antioksidanlar (küçük moleküllü plazma antioksidanları, proteinler ve antioksidatif enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi) ve/veya ekzojen antioksidanlar (C ve E vitaminleri, polifenoller, karotenoidler, vb.) görev alır [4]. AO maddeler ROS/RNS'yi belirli bir seviyede sınırlar ve faydalı biyolojik fonksiyonlarını minimum zararlı etkilerle korumalarına izin verir [5]. ROS/RNS ve AO maddeler arasında reaktif türler lehine oluşan dengesizlik, biyomoleküllere (DNA, proteinler, lipidler gibi) oksidatif saldırıya neden olabilir ve bunun sonucunda da mutajenik, kanserojenik değişiklikler, kardiyovasküler hastalıklar ve yaşlanma gibi sağlık riskleri ortaya çıkabilir. Merkezi sinir sisteminin (CNS) normal ve düzgün çalışması tamamen beynin kimyasal bütünlüğüne bağlıdır.

Beynin büyük miktarda oksijen tükettiği ve lipid içeriği bakımından zengin olduğu ve oksidatif strese eğilimli olduğu iyi bilinmektedir. Beyindeki biyomoleküler bileşenlerde, oksidatif strese bağlı biyokimyasal değişiklikler sonucu Parkinson hastalığı (PD), Alzheimer hastalığı (AD), Huntington hastalığı (HD) ve amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklar ortaya çıkabilmektedir [6].

Canlı organizmalarda, demir (Fe) ve bakır (Cu) iyonlarını içeren redoks reaksiyonlarının enzimatik aracılığı hayati öneme sahiptir. Hem demir hem de bakır, Fe (III ve II) ve Cu (II ve I) gibi değişken oksidasyon basamaklarında bulunabilen geçiş elementleridir [7]. Bakır ve demir, özellikle serbest (zayıf veya bağlanmamış) formda bulunduklarında zararlıdır, çünkü Haber-Weiss ve/veya Fenton reaksiyonlarını katalize ederek çözünmüş oksijenle veya hidrojen peroksitle etkileşime girebilirler. Bu reaksiyonlar, organizmanın antioksidatif savunmaları tarafından dengelenmediği zaman, biyomoleküllere (lipitler, proteinler ve DNA) hasar verebilecek olan ROS artışına neden olabilir [8,9]. Fe (III) ve Cu (II) iyonları ayrıca biyolojik süreçlerde RNS oluşumu üzerinde dolaylı bir etkiye de sahiptir [10].

Reaktif oksijen türleri arasında özellikle hidroksil radikalleri (•OH), çeşitli endojen/ekzojen kaynaklar yoluyla üretilen yüksek derecede reaktif türlerdir. Hidroksil radikali, heterosiklik DNA bazlarının çift bağlarına katılır ve T bazının metil grubundan ve 2'-deoksiribozun beş karbon atomunun herbirinden bir H atomu çeker. Hidrojen çekme reaksiyonları, timinin allil radikalini ve karbon merkezli şeker radikallerini oluştururken, hidroksil katılma reaksiyonları, DNA bazlarının hidroksilli radikallerini verir. Hidroksil radikalinin pürinlere katılması $C_4$-OH, $C_5$-OH ve $C_8$-OH katılma radikalleri oluşumuna yol açar. $C_4$-OH ve $C_5$-OH katılma radikalleri dehidrasyona uğrar ve indirgeme yoluyla pürinleri yeniden oluşturan yükseltgenmiş pürin radikallerini (-H)• verir. $C_8$-OH katılma radikalinin tek elektronlu oksidasyonu 8-hidroksipürinler (7,8-dihidro-8-oksopürinler) ve tek elektronlu indirgenmesi formamidopirimidinler oluşumuna yol açar. İndirgeyici türler, formamidopirimidinlerin verimini arttırırken, oksijen varlığı 8-hidroksipurinlerin oluşumuna neden olur. DNA bazlarından G, ROS saldırısına karşı daha hassastır ve oksidatif hasar sonucu 8-hidroksiguanin ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşur [11,12]. Hasara uğramış olan DNA sürekli olarak onarılır ve çıkarılmış deoksiribonükleozidler serum ve idrarla atılır. 8-OHdG, oksidatif hasarı değerlendirmek için en yaygın olarak kullanılan biyobelirteçlerden biridir ve

seviyelerindeki artışlar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve kronik inflamatuar durumlar dahil olmak üzere bir dizi bozuklukla ilişkilendirilmiştir [13].

Literatürde, oksidatif DNA hasarını ölçmek için geliştirilmiş çok sayıda farklı yöntem vardır, bunların içinde en yaygın kullanılanı, Comet testi (diğer adıyla, tek hücreli jel elektroforezi)dir. Bu yöntem, hücre düzeyinde DNA kırılma hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan, hızlı ve hassas bir floresan mikroskobik yöntemdir. Bu yöntemde, mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis (hücre zarı parçalanması) işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforezde, kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Teknikte kullanılan agaroz konsantrasyonu, uygulanan hücre miktarı, elektroforez süresi gibi uygulama aşamalarındaki bazı farklılıklar farklı sonuçlara yol açabilmektedir. Ayrıca, aynı protokolü uygulayan farklı laboratuvarların sonuçlarında da farklılık olabilmektedir ve bu farklılıklar büyük oranda ‘‘Comet’’ sayımı yapan kişiden kaynaklanmaktadır [14]. Son yıllarda, gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi (GC/MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC/MS) veya sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) hasarlı DNA'nın modifiye olmuş nükleozidlerini belirlemek için yüksek oranda kullanılmıştır. Kütle spektrometrisi, sayısız farklı oksidasyon ürünü arasında belirli bir molekülü saptamak için en uygun yöntemdir [15]. Bu yöntemler, genellikle karmaşık ön işlem adımları, pahalı ekipman veya kalifiye operatörler gerektirir. Bu doğal dezavantajların üstesinden gelmek için, hızlı tepki, üstün hassasiyet ve basit aparat nedeniyle alternatif bir elektroanalitik yöntem iyi bir seçenek oluşturmaktadır. Elektrokimyasal cihazların kullanımı, kısa algılama süresi, küçük numune hacmi, yüksek doğruluk, basitlik ve zaman alıcı ön işlemlere gerek olmaması, ayrıca renkli numunelerden kaynaklanan girişimlerden etkilenmemesi gibi çeşitli avantajlar sunar [16]. Biyomoleküllerin araştırılmasında kullanılan en yeni yöntemlerden biri olan biyosensör uygulamaları bu alandaki en önemli gelişmelerden sayılmaktadır. DNA'daki *in vivo* oksidatif hasarı algılamak için kullanılabilecek bir elektrokimyasal DNA biyosensörünün geliştirilmesi çok önemlidir. DNA'daki *in vivo* oksidatif hasarın tespiti, kanserojenler ve genel olarak oksitleyici maddeler tarafından DNA hasarına neden olan etkinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi için faydalı olabilir [15].

DNA, ROS/RNS için önemli bir hedef olduğundan elektrokimyasal dönüştürücülerde de kullanılabilir. Bu durumda ana fikir, DNA'nın pürin bazlarının (özellikle G ve A) elektroaktivitesidir. Reaksiyon sisteminde serbest radikaller mevcut olduğunda, G ve A oksidasyon sinyallerinde bir azalma olabilir. Oksidasyon sinyali, antioksidan (AO) bileşiklerin varlığında, bu bileşiklerin radikal süpürme aktiviteleri nedeniyle kısmen muhafaza edilebilir/geri kazanılabilir [16]. Bunun sonucu olarak, DNA bazlı sensörler toplam antioksidan (TAC) ölçümleri için kullanılabilir. Döngüsel voltametri (CV), kare dalga voltametrisi (SWV) ve diferansiyel puls voltametrisi (DPV) bu çalışmalar için en yaygın kullanılan elektrokimyasal tekniklerdir. Örneğin, Prieto-Simón ve diğ. çift sarmallı DNA immobilize edilmiş yüzey baskılı karbon elektrotlar kullanarak TAC ölçümleri için bir elektrokimyasal analiz yöntemi geliştirmişlerdir [17]. Wang ve diğ. poli L-glutamik asit katkılı gümüş hibridize membran üzerinde immobilize DNA'ya dayanan toplam antioksidan kapasite değerlendirmesi yapmıştır [18]. Bir diğer çalışma ise, Barroso ve arkadaşları tarafından DNA ile modifiye edilmiş bir karbon pasta elektrot (CPE) kullanarak toplam antioksidan kapasite ölçümü için dolaylı bir elektrokatalitik voltametrik yöntem geliştirilmesine dayanır [19].

Algılama sınırını düşürmek için sensörün kimyasal ve biyolojik modifikasyonu gerçekleştirilebilir. Bu modifiye edilmiş sensörleri kullanmanın avantajları çeşitlidir; örneğin redoks işlemi düşük potansiyelde gerçekleşir ve elektrokimyasal girişimler en aza indirilir [16]. Çeşitli biyomoleküllerin uygun şartlarda elektrotlara modifiye edilmesi sonucu alınan elektrokimyasal sinyallerin ölçümüne dayalı araştırmalar, günümüzde kabul edilen başarılı uygulamalardır [20–22]. Hassasiyet ve seçiciliğin yanı sıra elektrot reaksiyonunun hızını artırmak için elektrot yüzeyinin kimyasal modifikasyonu gerçekleştirilebilir. Elektrodun kimyasal modifikasyonunu gerçekleştirmek için bazı malzemeler kullanılabilir; en çok kullanılanlar altın nanopartiküller (AuNP), tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT'ler), çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler), grafen nanoplaka veya asetilen siyahı nanopartiküllerdir. Bu malzemeler, basit adsorpsiyon ile etkin bir şekilde, elektrot yüzeyinde sabitlenebilir [16].

Altın, platin ve gümüş gibi metal nanopartiküller geniş yüzey alanları ve bulundukları yüzeyin elektrik iletkenliğini arttırmaları nedeniyle elektrokimyasal sistemlerde ve optik sensörlerde tayin hassasiyetini yükseltmek amacıyla kullanılmaktadır [23]. Bunların bir diğer kullanım avantajı da, karbon bazlı materyallerle entegrasyonu sonucunda elektrokatalitik uygulamalarda

sinerjik etki göstermeleridir [24]. AuNP'ler, tüm metal nanopartiküller arasında biyoanalizde en sık kullanılanlardır ve karbonsu elektrot malzemeleriyle yüksek uyumluluk gösterirler. AuNP'lerin bu özellikleri sebebiyle tez çalışması kapsamında GCE'nin modifiye edilmesinde AuNP'lerin kullanımına karar verilmiştir.

Elektrokimyasal DNA sensör teknolojilerinde, nanopartiküller ve karbon nanotüpler (CNT) gibi farklı nanomalzemelerin kullanımına artan bir ilgi bulunmaktadır. Nanoteknoloji ile üretilen üstün fiziksel özelliklere sahip nanopartikül, nanotüp ve nanokablolar gibi nanomalzemelere dayanan sensör teknolojisi, biyomoleküler algılamaya yönelik olarak elektrokimyasal tekniklerin kullanıldığı yöntemler, daha seçimli, daha hassas ve gözlenebilme sınırı çok daha düşük DNA analizlerini mümkün kılmaktadır [25]. CNT'lere dayalı sensörler ile DNA analizlerine yönelik çalışmalarda yüksek duyarlığın elde edildiği saptanmıştır. MWCNT ve SWCNT kullanıldığı DNA analizine yönelik çalışmalarda düşük tayin sınırlı, seçimliliği ve duyarlılığı yüksek sonuçlar elde edilmektedir [25]. Elektrokimyasal DNA analizlerinde, karbon nanotüp ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrot (SPE) [26], camsı karbon elektrot (GCE) [27] ve kalem grafit elektrotların (PGE) [28–31] kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. Karbon nanotüplerin bu özellikleri sebebiyle tez çalışması kapsamında GCE'nin modifiye edilmesinde 2. aşama olarak MWCNT kullanımına karar verildi.

Nafyon, florokarbon omurgası üzerinde bulundurduğu sülfonat grupları ile iyon değişimi ve şişme özellikleri sergileyen önemli bir kopolimerdir. Nafyon polimerik membranı hem hidrofobik hem de hidrofilik moleküllerin bağlanması açısından önemli bir yapıya sahiptir ve bu özelliği onu elektromodifikasyon için en çekici malzeme haline getirmektedir [32]. Buradan yola çıkılarak çalışma elektrodunun modifiye edilmesinde MWCNT'yi yüzeye sabitlemek için çapraz bağlama maddesi olarak nafyon kullanımına karar verildi.

Elektrokimyasal biyosensörler, ucuz enstrümantasyonu, hızlı ve pratik analize imkan vermesi ve basit işlemlere dayanması sebebiyle güvenilir araçlardır. Bu çalışmada, insan sağlığı için önemli olan oksidatif hasarın belirlenmesi ve antioksidan aktivite tayini için, hızlı analize uygun, seçici ve yüksek duyarlılığa sahip yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi amaçlandı. Bu bağlamda, DNA'da oksidatif hasarın oluşturulması, tespiti ve antioksidan ilavesiyle oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktivite tayini için yeni bir elektroanalitik yöntem geliştirildi. Tez çalışması kapsamında, elektrokimyasal DNA hasar tayini için, Nafyon içeren çok duvarlı karbon nanotüp damlatılarak modifiye edilen altın

nanopartikül kaplı camsı karbon elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) hazırlandı. Hazırlanan modifiye elektrotlarla, çift sarmal DNA (dsDNA) çözeltisine çözünmüş oksijen varlığında Cu(II) iyonlarının ilave edilmesiyle oluşan metal katalizli oksidatif DNA hasarı tespit edildi. DNA hasarı sonucunda G, A ve C bazlarının oksidasyon sinyallerindeki değişiklikler, antioksidanların yokluğunda/varlığında dsDNA'nın Cu(II) ile etkileşimi öncesinde/sonrasında diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) tekniği kullanılarak ölçüldü (ölçümlerde, T bazı tespit edilemediğinden deneysel bulgularda yer almamaktadır). Geliştirilen elektrot, CV (döngüsel voltametri), EIS (elektrokimyasal empedans spektroskopisi) ve SEM (taramalı elektron mikroskopisi) teknikleri kullanılarak karakterize edildi. Geliştirilen elektrokimyasal yöntem ile çeşitli antioksidanların ve bitki örneklerinin oksidatif DNA hasarı engelleyici antioksidan aktiviteleri belirlenip yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile doğrulaması ve validasyonu yapıldı. Son olarak insan serumunda bulunabilen bazı interferanların geliştirilen elektrokimyasal yönteme etkileri incelendi.

# 2. GENEL KISIMLAR

## 2.1. RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Vücut hücreleri enerji üretim süreçlerinde sürekli olarak oksijenle reaksiyona girer. Bu kimyasal reaksiyonlar, moleküllerin oksidasyonunu ve indirgenmesini içerir. Alınan besinlerin yakılması sürecinde metabolik aktivitenin bir sonucu olarak oksijen çeşitli substratlardan basamaklı olarak elektron alır ve serbest radikaller olarak bilinen oldukça reaktif moleküller/iyonlar üretilir. Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan herhangi bir tür olarak tanımlanabilir. Bu geniş tanım, hidrojen atomunu (bir eşleşmemiş elektron), çoğu geçiş metalini ve oksijen molekülünün kendisini içerir. Biyolojik serbest radikaller, çeşitli organik substratlarla reaksiyona girecek elektronlara sahip, oldukça kararsız moleküllerdir. Bunlar, hücre içindeki diğer moleküllerle etkileşime girerek oksidatif hasara neden olabilir. Dış yörünge orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunması söz konusu radikalin reaktivitesini oldukça artırmaktadır [33]. Çesitli reaksiyonlar ile oluşan yüksek reaktiviteye sahip radikaller kontrol altında tutulmazlarsa lipidler [34,35], proteinler [36,37] ve nükleik asitler [38,39] gibi temel hücresel bileşenlere zarar verebilir. Serbest radikaller, ağırlıklı olarak hücresel solunum ve normal metabolizma sırasında üretilen oldukça reaktif moleküllerdir [40].

Son yirmi yılda, deneysel ve klinik tıpta daha genel olarak “reaktif oksijen türleri” (ROS) ve “reaktif azot türleri” (RNS) olarak bilinen oksijensiz radikallerin rolüne yönelik büyük bir ilgi olmuştur [41,42]. Biyolojik sistemlerde en çok görülen radikal türler oksijenden oluşan reaktif oksijen türleridir. ROS ifadesi sadece süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidroperoksil radikali ($HO_2\bullet$), hidroksil radikali ($OH\bullet$), peroksil radikali ($RO_2\bullet$) ve alkoksi radikali ($RO\bullet$) gibi serbest radikalleri kapsamaz, ayrıca radikalik olmayan hidrojen peroksit ($H_2O_2$), singlet oksijen ($^1O_2$), hipokloroz asit (HOCl) ve ozon ($O_3$) gibi reaktif moleküler türleri de içermektedir. ROS yaşam için gereklidir ve birçok farklı biyolojik fonksiyonlarda yer almaktadırlar. Bunun yanı sıra aşırı üretildiğinde veya antioksidan korunumu azaldığında bu reaktif türler biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olmaktadır ve bundan dolayı son derece zararlıdırlar. ROS’un zararlı etkileri, antioksidan enzimlere ek olarak enzimatik olmayan antioksidanların etkisi ile dengelenir [43].

ROS ve RNS:

(i) UV ışığı, X ışınları ve gama ışınları ile ışınlama sırasında üretilirler.

(ii) Metal katalizli reaksiyonların ürünleridir.

(iii) Atmosferde kirletici olarak bulunurlar.

(iv) İnflamasyon (iltihaplanma) sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilirler.

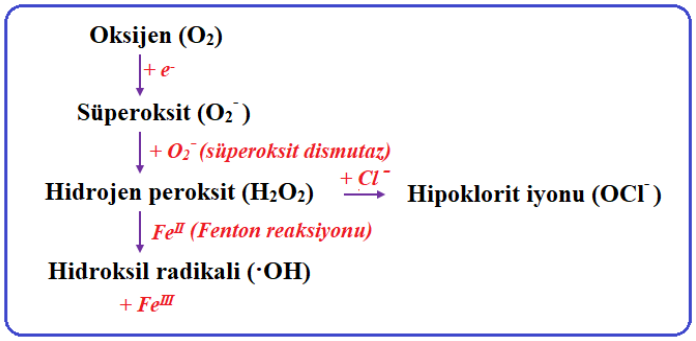
(v) Mitokondri katalizli elektron aktarım reaksiyonlarının ve diğer mekanizmaların yan ürünleridir.

**Tablo 2.1:** Biyolojik sistemlerde üretilen serbest radikaller [41].

| Tür | Kaynak | Fonksiyon |
|---|---|---|
| $O_2^{\bullet-}$ | Enzimatik prosesler, otoksidasyon reaksiyonu ve enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları | - Sitokrom-*c* gibi demir komplekslerinin indirgeyici ajanı<br>- Askorbik asit ve α-tokoferolü oksitlemek için oksitleyici ajan |
| $HO_2^{\bullet}$ | $O_2^{\bullet-}$'nin protonlanması | - $HO_2^{\bullet}$ yağ asidi peroksidasyonunu başlatır. |
| HO• | $H_2O_2$, metal katalizli Fenton reaksiyonu yoluyla $HO^{\bullet}$ üretir. | - DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar dahil organik ve inorganik moleküller ile reaksiyona girer |
| NO• | Bir elektron kaynağı olarak NADPH ve bir substrat olarak arginin kullanılarak nitrik oksit-sentezinin ürünü | - Guanilat siklaz ve protein kinazları uyarır.<br>- Kan damarlarında düz kas gevşemesine neden olur. |
| $NO_2^{\bullet}$ | $ONOO^-$'nin protonlanması veya $ONOOCO_2^-$'nin homolitik parçalanması | - Bu radikal, plazmada askorbat ve *α*-tokoferolü azaltan antioksidatif mekanizmaya etki eder. |
| $ONOO^{\bullet-}$ | $O_2$ ile $NO^{\bullet}$ arasındaki reaksiyon | - Proteinlerde metionin ve tirozin kalıntılarının güçlü bir oksitleyici ve nitratlayıcı türüdür ve nitroguanin oluşturmak için DNA'yı okside eder. |
| $CO_3^{\bullet-}$ | Süperoksit dismutaz (SOD)-$Cu^{2+}$-$OH^{\bullet}$ reaksiyonunun ara maddesi, $CO_3^{\bullet-}$ üretmek için bikarbonat ile reaksiyona girer. | - Proteinler ve nükleik asitler gibi biyomolekülleri oksitler. |
| $ONOOCO_2^-$ | Peroksinitrit-$CO_2$ katım ürünü $CO_2$ ile $ONOO^-$'nun reaksiyonu ile elde edilir. | - Serbest radikal yoluyla oksihemoglobinin tirozin parçalarının nitrasyonunu teşvik eder. |

Oksijen molekülü iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Bu elektronların herbiri farklı π* antibağ molekül orbitalinde bulunur ve aynı spin kuantum sayısına sahiptir [44]. Oksijen diradikal bir yapıda olmasına rağmen reaktivitesi çok düşüktür. Diradikal yapıya sahip olması nedeniyle herhangi bir molekül ile reaksiyona girebilmesi için, reaksiyona gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gerekir. Fakat oksijene elektron verecek olan moleküllere bakıldığında genellikle zıt spinli bir çift elektrona sahiptirler. Bu durum moleküler oksijenin söz konusu molekül ile reaksiyona girmesini kısıtlamaktadır. Bu durum "spin sınırlaması" olarak adlandırılmaktadır. Spin sınırlaması moleküler oksijene elektron veya enerji sağlanması ile

ortadan kalkabilir ve oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle diğer reaktif oksijen türleri oluşur (Şekil 2.1) [45].




**Şekil 2.1:** Reaktif oksijen türleri (ROS).

Oksijenin ardışık olarak indirgenmesiyle öncelikli olarak süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$) oluşmaktadır. Bu radikal, indirgeyici özellikteki biyomoleküllerin (hidrokinonlar, tiyoller, flavinler) oksijene tek elektron vermesiyle ve bazı enzimlerin (enerji metabolizmasında oksidasyon sırasında kullanılan oksidazlar gibi) aktivitesi sonucu oluşmaktadır.

$$\mathbf{O_2 + e^-_{aq} \longrightarrow O_2^{\bullet -} \xrightarrow{H^+} HO_2^{\bullet}} \qquad (2.1)$$

Süperoksit anyon radikaline ikinci elektronun eklenmesiyle bir peroksit iyonu ($O_2^{2-}$) oluşmaktadır. Bu iyon eşleşmemiş bir elektron içermez ve bu nedenle radikal bir tür değildir. Fizyolojik pH'ta oluşan herhangi bir $O_2^{2-}$, $H_2O_2$'in pKa'sı çok yüksek olduğu için hemen hidrojen peroksit verecek şekilde protonlanmaktadır [44].

$$\mathbf{O_2^{\bullet -} + e^-_{aq} \xrightarrow{2H^+} H_2O_2} \qquad (2.2)$$

Fizyolojik koşullar altında, hidrojen peroksit üretiminin organizma tarafından toplam oksijen alımının yaklaşık % 2'sini oluşturduğu tahmin edilmektedir [43]. Hidrojen peroksidin yükseltgen bir tür olarak kabul edilmesinin nedeni, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksite tekrar bir elektron katılması sonucunda •OH oluşmaktadır [44].

$$\mathbf{H_2O_2 + e^-_{aq} \longrightarrow OH^- + \bullet OH} \qquad (2.3)$$

En reaktif ROS ürünü olan •OH, hücre metabolizmasında moleküler oksijenin birbirini izleyen tek elektron transferleriyle indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. İndirgenmiş formdaki bazı geçiş metal iyonlarının hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi sonucu hidroksil radikali üretilebilir [46].

Örneğin;

$$\mathbf{Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + \bullet OH + OH^{-}} \quad (2.4)$$

$$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^{-}} \quad \mathbf{"Fenton\ Reaksiyonu"} \quad (2.5)$$

Fenton reaksiyonu dışında başka yöntemlerle de hidroksil radikali üretilebilir;

- Hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu [47]

$$\mathbf{O_2^{\bullet -} + H_2O_2 + H^{+} \longrightarrow O_2 + H_2O + \bullet OH} \quad \mathbf{"Haber-Weiss\ reaksiyonu"} \quad (2.6)$$

- Yüksek enerjili radyasyona maruz kalan suyun fotolizi [46]

$$\mathbf{H_2O \xrightarrow{X\ ışını} H\bullet + \bullet OH} \quad (2.7)$$

- UV ışığına maruz kalan hidrojen peroksitteki O-O bağının homolitik ayrılması [48]

$$\mathbf{H_2O_2 \xrightarrow{UV} 2HO\bullet} \quad (2.8)$$

- Hipokloroz asitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda hidroksil radikali üretilebilir [49]

$$\mathbf{HOCl + O_2^{\bullet -} \longrightarrow \bullet OH + O_2 + Cl^{-}} \quad (2.9)$$

$Ag^{+}$, $Cd^{2+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$ ve biyolojik sistemlerde oldukça önemli olan $Fe^{2+}$, $Fe^{2+}$- EDTA, ve $Cu^{2+}$ iyonları gibi bazı metal iyonları moleküler oksijenle reaksiyona girerek $O_2^{\bullet -}$ radikali oluşturmaktadır [50].

$$\mathbf{M^{+n} + O_2 \longrightarrow M^{+(n+1)} + O_2^{\bullet -}} \quad (2.10)$$

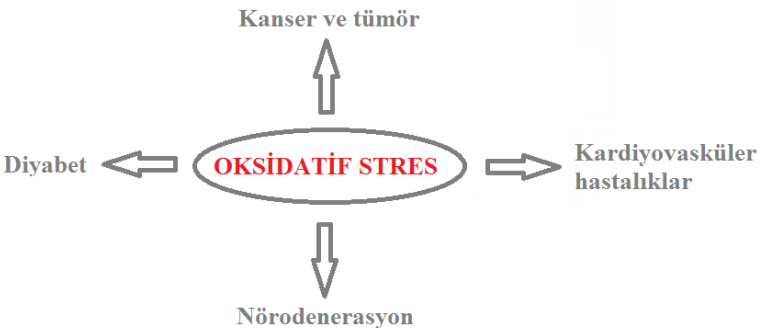
Demir ve bakır iyonları, bağlanmamış formlarında Haber-Weiss ve/veya Fenton reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olabilir. Demir ve bakır iyonlarının toksisitesinin pro-oksidan özellikleriyle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Bu iyonların karaciğer biyotransformasyon sistemleri üzerinde ortaya çıkardığı redoks etkilerine ilişkin çalışmalar, oksidatif hasarı teşvik eden $Cu^{2+}$ konsantrasyonlarının $Fe^{3+}$'nınkinden önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir [51–56]. Her ikisi de geçiş metalleri olmasına rağmen, koordinasyon kimyalarının yanı sıra farklı redoks potansiyelleri gösterirler. Bu tür farklılıklar, bu iyonların teşvik ettiği hasarın altında yatan farklı toksisite mekanizmalarına yol açabilir. Yapılan çalışmalar aynı *in vitro* analiz koşulları altında, $Cu^{2+}$'nın oksidatif hasar ve biyomoleküllere spesifik olmayan bağlanma açısından $Fe^{3+}$'dan daha kapsamlı toksik etkileri olduğunu göstermektedir [8].

Bu iyonların toksisitesini ve teşvik ettikleri hasarı önlemek veya tersine çevirmek için potansiyel araçları değerlendirirken, bu özellikler dikkate alınmalıdır. Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi demir ve/veya bakır aşırı yüklenmesi ve oksidatif stres ile ilişkili farklı patolojilerden muzdarip hastaların tedavisini desteklemek için antioksidanların kullanımı yaygın olarak kabul edilmektedir [57,58]. Yapılan çalışmalar, yalnızca ROS'u temizlemekle kalmayıp aynı zamanda bakır ve demir gibi iyonları kelatlayabilen antioksidan ilaçlara olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Polifenol bazlı antioksidanlar yerine tiyol bazlı antioksidanların kullanımının her iki şartı da karşılayabileceği düşünülmektedir [8].

Bakır, bir dizi hayati biyolojik süreçte yer alan birçok önemli enzimin ayrılmaz bir parçasıdır. Normalde proteinlere bağlı olmasına rağmen, salınabilir ve yüksek oranda reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize etmek için serbest hale gelebilir. *In vitro* ve hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, bakırın oksidatif hasarı başlatma ve önemli hücresel olaylara müdahale etme kapasitesini büyük ölçüde desteklemektedir. Oksidatif hasar, kronik Cu aşırı yüklenmesi ve/veya kazalar, mesleki tehlikeler ve çevresel kontaminasyondan kaynaklanan aşırı bakıra maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, bakır ile indüklenen oksidatif hasar, anormal bakır metabolizması ve nörodejeneratif değişiklikler ile ilişkili bozukluklarda rol oynar.

## 2.2. OKSİDATİF STRES

Biyolojik sistemlerde oksidatif stres, serbest radikallerin üretimi ile vücudun endojen ve ekzojen antioksidanlar kullanarak bu reaktif türleri elimine etmesi arasındaki dengesizlik ile karakterize edilen, karmaşık bir süreçtir [41]. Oksijen yaşam için önemli ve gerekli olmasına rağmen vücut üzerinde zararlı etkileri de mevcuttur. Reaktif oksijen türlerinin artışı organizmada bulunan veya gıda yoluyla alınan antioksidanlarla dengelenmediği taktirde "oksidatif stres" koşulları oluşmaktadır. Buna bağlı olarak kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bagışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir [59]. Oksidatif stres, oksidan/antioksidan arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur.




**Şekil 2.2:** Oksidatif stresin yol açtığı hastalıklar.

Oksidatif strese neden olan başlıca iki mekanizma vardır;

(1) Antioksidan miktarının azalması
(2) Aktif fagositlerden türeyen reaktif oksijen/azot/karbon türlerinin sayısının artmasıdır [60].

## 2.3. ANTİOKSİDANLAR VE OKSİDATİF STRESE ETKİSİ

Antioksidan, düşük konsantrasyonlarda bir substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen bir maddedir. Gıda biliminde antioksidan, gıdalarda oksitlenebilir bir substratınkiyle karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda ROS ve RNS gibi reaktif türlerin olumsuz etkilerini önemli ölçüde azaltan veya önleyen bir madde olarak tanımlanır [61]. Antioksidan bileşikler çeşitli kimyasal mekanizmalar yoluyla etki eder: hidrojen atomu transferi (HAT), tek elektron transferi (SET) ve geçiş metallerini kelatlama yeteneği.

Antioksidan molekülleri ya çoklu mekanizmalarla ya da baskın bir mekanizma ile reaksiyona girebilir. Antioksidan maddenin kimyasal yapısı, antioksidan reaksiyon mekanizmasının anlaşılmasını kolaylaştırır [41].

Bitki polifenolleri, sebzelerde, meyvelerde ve diyetimizin önemli bir bölümünü oluşturan birçok gıda kaynağında yaygın olarak bulunan, en güçlü ve terapötik açıdan yararlı biyoaktif maddeler arasında yer alan, aromatik hidroksillenmiş bileşiklerdir. Bu doğal ürünlerin insan sağlığına sağladığı faydaların bilinmesi, en çok tercih edilen örnekler arasında zeytin ve bitkisel yağlar, narenciye ve diğer meyve suları, çikolata, çay gibi bazı tipik bitki türevli yiyecek ve içeceklerin günlük diyetlere dahil edilmesini teşvik etmiştir. Sekiz binin üzerinde doğal olarak oluşan fenolik bileşik bilinmektedir. Bu maddeler, diğer sübstitüentlere ek olarak bir veya daha fazla eklenmiş –OH grubuna sahip en az bir aromatik halka içerir ve 15 ana yapısal sınıfa ayrılabilir. 'Karbon iskeleti tipi, sınıf adı (örnek)' formatına sahip başlıca bitki fenolik madde sınıfları: $C_6$, basit fenoller (resorsinol); $C_6$-$C_1$, fenolik asitler (p-hidroksibenzoik asit); $C_6$-$C_2$, asetofenonlar ve fenilasetik asitler; $C_6$-$C_3$, hidroksisinamik asitler (kafeik asit); $C_6$-$C_4$, hidroksiantrakinonlar (physcion); $C_6$-$C_2$-$C_6$, stilbenler (resveratrol); $C_6$-$C_3$-$C_6$, flavonoidler (kuersetin); $(C_6$-$C_3)_2$, lignanlar (matairesinol); $(C_6$-$C_3$-$C_6)_2$, biflavonoidler (agathisflavone); $(C_6$-$C_3)_n$, ligninler; $(C_6$-$C_3$-$C_6)_n$, polimerik tanenler (prosiyanidin) [62]. Moleküllerin oksidasyonu ve indirgenmesi dahil olmak üzere kimyasal reaksiyonlar, her hücrede meydana gelir. Bu reaksiyonlar serbest radikallerin üretimine yol açar ve oksidatif stres oluşur. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan anti-oksidasyon sistemi, oksidatif strese karşı koruma sağlar [60]. Bir organizma yüksek bir ROS konsantrasyonuna maruz kaldığında, endojen antioksidan sistem süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve katalaz (CAT) gibi enzimler) tehlikeye girer ve sonuç olarak organizmanın tam olarak korunmasını garanti edemez.

Bitki hücrelerinin aksine çoğu insan hücresi, oksidatif strese/hasara karşı koruma sağlamak için yeterli miktarda antioksidan üretmez. Bu antioksidan açığını telafi etmek için vücut, gıda, besin takviyeleri veya farmasötikler yoluyla sağlanan ekzojen antioksidanları kullanabilir. Bu nedenle, alternatif doğal ve daha güvenli antioksidan kaynakları aramaya artan bir ilgi vardır [63].

## 2.4. BİYOMOLEKÜLLER

Biyomoleküller, hücreler ve canlı organizmalar tarafından üretilen ve biyolojik moleküller olarak da bilinen organik maddelerdir. Bilinen bütün yaşam biçimleri sadece biyomoleküllerden oluşmuştur [64]. Canlılarda bulunan biyomoleküller olağanüstü bir çeşitlilik gösterirler. En küçük hücreler olan bakteriler bile binlerce farklı organik bileşiği yapısında bulundururlar. Bu derece çeşitliliğe rağmen protein ve nükleik asitler çok basit ve belli sayıda yapı taşlarından oluşmaktadır. Bütün organik biyomoleküller, çevreden sağlanan su, $CO_2$ ve $N_2$ gibi basit başlangıç maddelerinden yapılmaktadır. Bu başlangıç maddeleri, canlılar tarafından bir takım metabolik ara bileşikler yoluyla, molekül ağırlıkları 100 ile 350 arasında değişen ve makromoleküllerin yapı taşlarını teşkil eden biyomoleküllere dönüştürülürler. Bu moleküller kovalent bağlarla birleşerek makromolekülleri oluşturur. Proteinler, lipidler, DNA ve RNA en önemli biyomoleküllerdir. Daha yüksek seviyede düzenlenme, makromoleküllerin oluşturdukları "supramoleküller" adı da verilen büyük molekül komplekslerde olur. Lipoproteinler, lipid ve proteinlerin, ribozomlar ise nükleik asit ve proteinlerin kovalent olmayan bağlarla meydana getirdikleri supra-molekül örnekleridir. Bunlar iyonik, hidrofobik etkileşimler ile hidrojen bağları ve Van der Waals çekim kuvvetlerini içermektedirler. Bu bağlar çok kuvvetli olmamalarına rağmen oluşan kompleksler oldukça kararlıdır. Bu kararlılık, kompleks moleküllerin üç boyutlu yapılarının birbirine uygunluk göstermesinin bir sonucudur [65], çünkü zayıf bağlarla da olsa çeşitli nokta ve açılardan bağlanımı söz konusu olmaktadır.



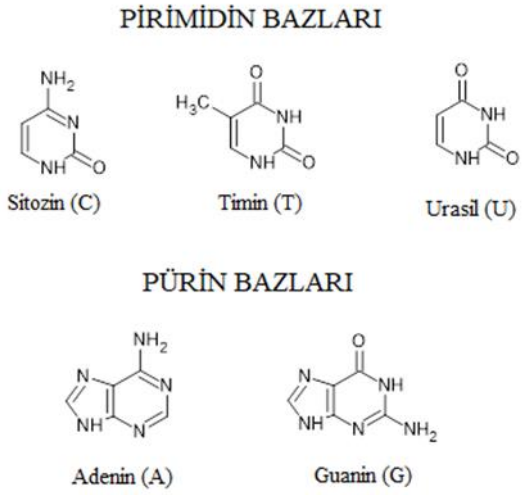

**Şekil 2.3:** Biyomoleküller.

### 2.4.1. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

#### *2.4.1.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu*

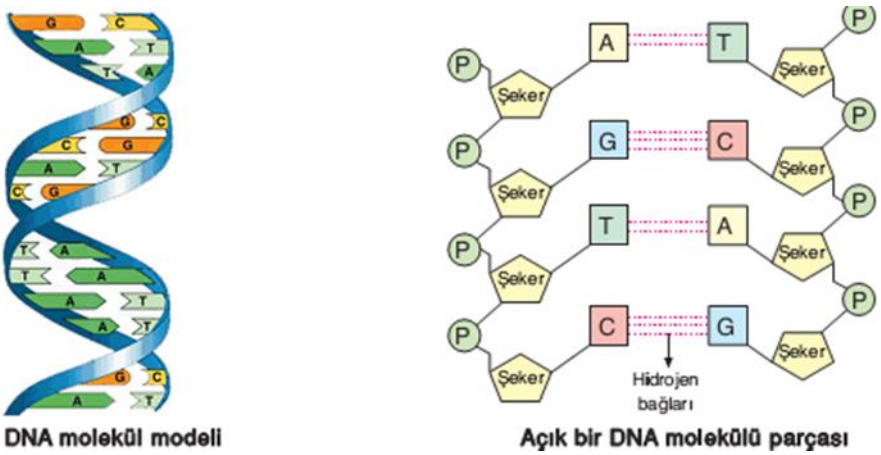
DNA, genetik bilginin depolanmasında ve biyolojik sistemlerin genel işleyişinde kritik bir rol oynayan yapısı aydınlatılmış önemli bir biyomoleküldür [66-70]. Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşımakta ve nesilden nesile aktarmaktadır. DNA çift sarmalının üç boyutlu yapısı, 40 yılı aşkın bir süre önce Watson ve Crick tarafından doğru bir şekilde aydınlatılmıştır. Nükleotitlerin polimerize olması sonucu meydana gelen DNA'nın ana omurgasını fosfodiester bağı ile bağlanan makromoleküler yapıdaki fosfat ve şeker birimleri oluşturmaktadır. Fosfodiester omurgası, DNA bazlarını taşımaya ve yönlendirmeye hizmet eden 2'-deoksiriboz kalıntıları içerir. Bir bütün olarak omurga, nötr pH'ta her fosfat diesterde taşınan negatif yük nedeniyle oldukça polardır [71]. Nötr yüklü nükleobazlar, sarmal eksene kabaca diktir ve birbirleriyle Van der Waals bağları ile bağlıdır. Genellikle kenarları boyunca oldukça polardırlar ve amino, imino ve karbonil grupları gibi çoklu sübstitüentleri taşırlar. DNA dört nükleobazdan oluşur: guanin (G), adenin (A), timin (T) ve sitozin (C). G ve A *pürinler* olarak sınıflandırılırken, T ve C *pirimidinler* olarak bilinir. Bu bazlar, G'nin C ile tamamlayıcı baz olduğu ve A'nın T ile tamamlayıcı baz olduğu üç boyutlu DNA çift sarmal (dsDNA) yapısının temel yapı taşlarıdır. Biyolojik sistemlerde, enerji iletimi, metabolik kofaktörler ve hücre sinyalizasyonu gibi farklı süreçlere katılırlar. DNA'daki bu bazların sırası zorunludur, çünkü genetik bilginin replikasyonu (kopyalanması), transkripsiyonu (DNA'nın bir iplikçiğinde bulunan genetik bilgilerin kodlar halinde tek iplikçik RNA'ya transferi) yoluyla protein sentezi ve hücrenin coğaltılması gibi önemli süreçleri başlatır [1,72].

DNA ve RNA'nın birincil yapısını oluşturan bazlar Şekil 2.4'te görülmektedir.




**Şekil 2.4:** Nükleik asitlerde (DNA ve RNA) mevcut pürin ve pirimidin bazları.

DNA'nın birincil işlevi, genetik bilginin depolanmasıdır; her insan hücresindeki üç milyar baz çifti, yaklaşık 100000 proteinin sentezini kodlar. Elbette bu proteinlerin sadece aslına uygun sentezlenmesi değil, aynı zamanda bu genetik bilginin bir organizma dizisinde nesilden nesile doğru bir şekilde aktarılması da çok önemlidir. Bu yeteneklerin merkezinde DNA'nın çift sarmal yapısı bulunur. Tamamlayıcı hidrojen bağlı baz çiftleri ile paralel olmayan, $C_2$-simetrik yapısı, kodlanmış mesajların depolanmasını ve aktarılmasını gerçekleştirmek için olağanüstü derecede etkili bir araç sağlar [71].




**Şekil 2.5:** DNA çift sarmalı ve açık bir DNA molekülü modelleri.

DNA'da bulunan nükleobazlar nicel olarak Edwin Chargaff tarafından araştırılmış olup A miktarı ile T'in, G miktarı ile ise C'nin eşit miktarlarda olduğu bulunmuştur. Chargaff kuralı olarak bilinen bu kural; kısaca A=T ve G=C olarak özetlenebilir. A ile T arasında iki, G ile C arasında ise üç adet hidrojen (H) bağı bulunmaktadır.

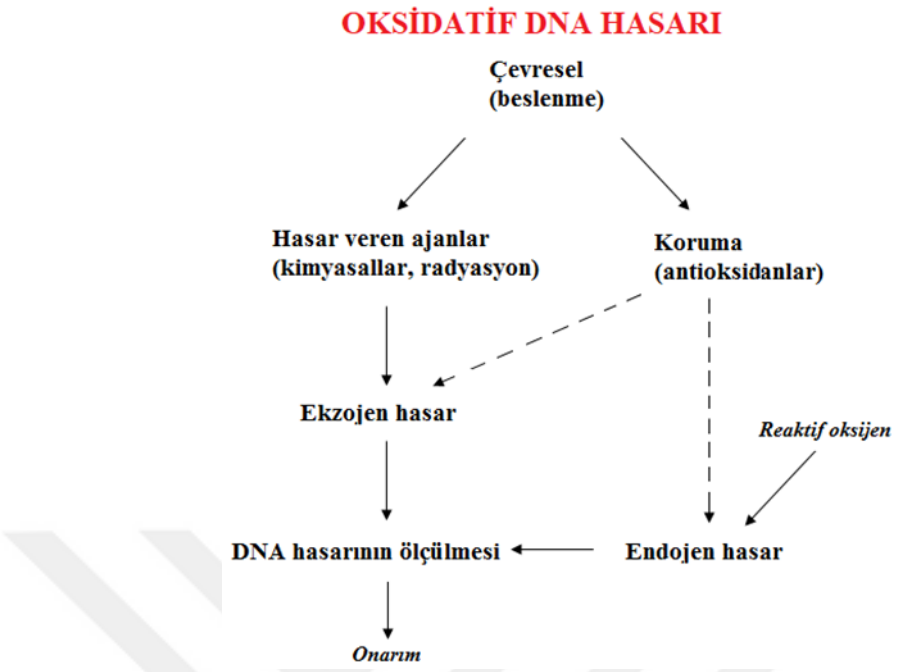
Normal fizyolojik koşullarda DNA yapısını korumaktadır ancak yüksek sıcaklık ve kuvvetli asit varlığında hidrojen bağları kırılıp çözülmektedir. Bunun sonucunda, heliks açılarak tek iplik haline geçmektedir. Bu olaya *denatürasyon* adı verilir. Ancak şeker ve fosfat arasında bulunan fosfodiester bağları etkilenmediği durumda şartların eski haline dönüştürülmesiyle tekrar hidrojen bağları kurulur ve DNA eski formunu alır. Bu olaya da *renatürasyon* adı verilir.

#### *2.4.1.2. DNA Tayin Yöntemleri*

Kapiler elektroforez (CE) [73], HPLC [74], elektrosprey iyonizasyon ve tandem spektroskopisi ile birleştirilmiş ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC-ESI-MS/MS) [75], GC [76], kimyasal lüminesans yöntemi [77], spektrofotometrik yöntem [78] ve Raman spektroskopisi [79] gibi nükleobazların tespiti için çeşitli analitik teknikler başarıyla kullanılmıştır. Bunlar, başarılı, çok güçlü yöntemler olmasına rağmen, yüksek maliyet, zaman alıcı prosedürler, karmaşık işlem ve numunelerin ön işleme tabi tutulması gibi bazı dezavantajları vardır. Bu zorlukların bazılarının üstesinden gelmek için araştırmacılar, DNA bazlarının analizi için elektrokimyasal sensörler geliştirmeye yönelmişlerdir. Elektrokimyasal yöntemler, düşük maliyetli, basit işlem, hızlı ve gerçek zamanlı algılama, yüksek hassasiyet ve taşınabilir bir cihaza minyatürleştirme kolaylığı gibi birçok avantaja sahiptir [1].

### 2.4.2. Oksidatif DNA Hasarı

DNA kimyasal olarak nispeten kararlı bir madde olmasına rağmen, çevrede meydana gelen veya hücresel metabolizmanın (yan) ürünleri olarak üretilen ve DNA moleküllerinde kimyasal değişikliklere neden olabilen bir dizi kimyasal veya fiziksel ajan tarafından kalıcı olarak hasara uğratılabilmektedir. Bu değişiklikler, DNA'nın şeker-fosfat omurgasındaki kimyasal bağların kesintiye uğramasını içerebilir. Bu durum tek veya çift zincirli kopmaların veya nükleobazları şekere bağlayan N-glikosidik bağların oluşmasıyla sonuçlanır. Bunun yanı sıra nükleobaz kalıntılarının kimyasal modifikasyonu (oksidasyonları, azot atomlarında alkilasyon, pirimidinlerin dimerizasyonuyla sonuçlanan fotokimyasal reaksiyonlar, metal kompleksleri ile katılımlar oluşumu vb.) söz konusu olabilir [80]. Bu oluşumlar topluca "DNA hasarı" olarak adlandırılabilir. Bu DNA molekülünün herhangi bir geri döndürülemez kovalent modifikasyonu anlamına gelir. Daha genel anlamda, "DNA hasarı" terimi, DNA'ya kovalent olmayan bir şekilde bağlanan maddelerle etkileşimlerin neden olduğu DNA yapısındaki değişiklikleri de ifade eder.

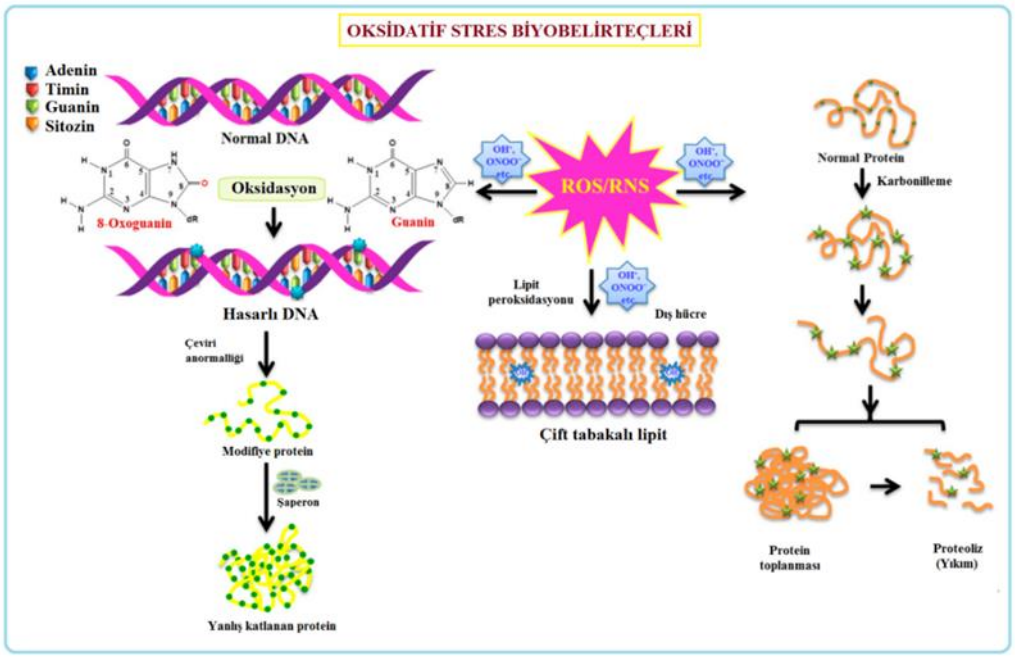



**Şekil 2.6:** Oksidatif DNA hasarı.

Oksijen, yaşam için çok önemli olmasına ve sinyal transdüksiyonu, gen transkripsiyonu ve diğer hücresel aktivitelerde yer almasına rağmen, serbest radikal ve ROS şeklinde, biyomoleküller (DNA, protein vb.) üzerinde zararlı bir etkiye sahip olabilir. Bir insan hücresinin, hidroksil radikallerinden ve bu tür diğer reaktif türlerden günde yaklaşık $1,5x10^5$ oksidatif darbeye maruz kaldığı tahmin edilmektedir [81]. Hidroksil radikalinin DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir: hem purin hem de pirimidin bazlarına ve ayrıca deoksiriboz omurgasına zarar verir [82]. Bu "oksidatif hasar" olaylarından kaynaklanan genetik materyalin kalıcı modifikasyonu, mutajenez, karsinojenez ve yaşlanma ile ilgili ilk adımı temsil eder. Aslında, iyi bilindiği gibi, çeşitli kanser dokularında serbest radikal aracılı DNA hasarı meydana gelmektedir. Bugüne kadar, DNA'nın oksidasyonundan açığa çıkan 100'den fazla ürün tanımlanmıştır. ROS kaynaklı DNA hasarı, tek veya çift sarmallı DNA kırılmalarını, pürin, pirimidin veya deoksiriboz modifikasyonlarını ve DNA çapraz bağlarını içerir. DNA hasarı, tümü karsinogenez ile ilişkili olan transkripsiyonun durdurulması veya uyarılması, sinyal iletim yollarının uyarılması, replikasyon hataları ve genomik kararsızlık ile sonuçlanabilir [43].

ROS'a ek olarak, peroksinitritler ($ONOO^-$, ROONO) ve azot oksitler ($NO^\bullet$, $NO_2^\bullet$) gibi reaktif azot türleri (RNS) de DNA hasarıyla ilişkilendirilmiştir. Guanin ile reaksiyon üzerine, peroksinitritin 8-nitroguanin oluşturduğu gösterilmiştir. Yapısı nedeniyle, bu eklenti G:C→T:A

transversiyonlarını indükleme potansiyeline sahiptir. Bu lezyonun DNA'daki stabilitesi düşükken, RNA'da bu azot eklentisi stabildir [43].




**Şekil 2.7:** ROS/RNS'nin hücresel ortamda oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak kullanılan biyomoleküller (DNA, protein, lipit vb.) üzerindeki etkisi [6].

"DNA hasarı" teriminin "mutasyon" terimi ile karıştırılmaması gerektiğini vurgulamak gerekir. DNA hasarı, DNA molekülündeki kimyasal ve/veya yapısal değişiklik(ler)i ifade eder (bu varlıklara genellikle "lezyonlar denir" ve sıklıkla nükleobaz yanlış eşleşmesini, "baz uyumsuzluklarını" içerir). Bunlar DNA onarım mekanizmalarından biri tarafından saptanabilir ve onarılabilir [83].

DNA'da oksidatif hasara neden olan başlıca etkenler:

- İyonize radyasyon
- Yüksek oksijen konsantrasyonu
- Otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, noradrenalin, adrenalin)
- Ksantin oksidaz ve substratlarıdır [84].

DNA molekülleri çeşitli koşullar altında, özellikle bazı küçük moleküllerle etkileşim yoluyla hasar görmeye eğilimlidir. Organik kirleticilerin çoğu doğrudan DNA hasarına neden

olmayabilir, ancak enzimatik reaksiyonlardan kaynaklanan oksidasyon ürünleri genotoksiktir ve DNA eklentilerinin oluşumu yoluyla DNA hasarına neden olabilir [85].

DNA bazlarının her birinin kimyasal modifikasyonu, genetik mekanizmada hücre arızasına ve ölüme yol açan moleküler bozulmaya neden olur. Örneğin, serbest radikaller tarafından oksidatif DNA hasarı ve iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma, çift sarmal içinde 8-oksoguanin, 2,8-oksoadenin, 5-formilurasil, 5-hidroksisitozin vb. gibi mutajenik olan birkaç ürün üretir. DNA bazlarının oksidasyon ürünlerinin mutajenez, karsinojenez, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklarda önemli roller oynadığına dair kanıtlar bulunduğundan, DNA oksidasyonunun önemli bir genomik kararsızlık kaynağı olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle, tüm DNA bazlarının oksidatif hasarında yer alan mekanizmaların hassas belirlenmesi ve tam karakterizasyonuna büyük ilgi vardır [72].

Pürinler, pirimidinlerden daha düşük pozitif potansiyellerde oksitlenirler. Pirimidinlerin oksidasyonu yüksek pozitif potansiyellerde gerçekleştiğinden tespit edilmesi daha zordur. Ayrıca, aynı konsantrasyonlar için, pirimidin bazları için gözlenen oksidasyon akımları, pürin bazları için gözlenenlerden çok daha küçüktür. Sonuç olarak, DNA'da meydana gelen oksidatif değişikliklerin elektrokimyasal tespiti, pürin baz oksidasyon piklerinin veya oksidatif stresin bir biyobelirteçi olan ana oksidasyon ürünü 8-oksoguaninin (8-oxoGua) tespitine dayanmaktadır [86].

Vücut sıvılarında metal iyonları bulunur ve nükleik asitler ve nükleotidler bu iyonlarla koordineli kompleksler halinde oluşur. Bu iki değerlikli iyonların bazıları kanserojenlikleri ile tanınırlar. Çünkü DNA'ya zarar verirler ve DNA sentezinin aslına uygunluğunu değiştirirler. Fenton reaksiyonu gibi metal katalizli redoks reaksiyonları hidrojen peroksitin, $Fe^{2+}$ veya diğer geçiş elementleri (Cu, Zn Mn, Cr, Ni, Mo, Co) varlığında indirgenerek •OH oluşturduğu reaksiyonlardır. Metallerin sadece kanserojen olarak değil, aynı zamanda kanserojen kimyasalları aktive ettiği kabul edilir. Bir dizi aromatik bileşik, metal katalizli ROS üretimi yoluyla oksidatif DNA hasarına neden olur. *In vivo* üretilen ROS, DNA ve öncüleri ile reaksiyona girerek onları modifiye eder ve oksidatif strese yol açar. Sonuç olarak, bu tür oksidan maddeler kimyasal zincir reaksiyonları başlatarak hücrelere zarar verebilir [87,88].

### 2.4.3. Oksidatif DNA Hasarının Ölçülmesi

Oksidatif DNA hasarını ölçmek için çok sayıda yöntem mevcuttur ve bunlardan en popüler olanı DNA'nın enzimatik sindirimini kullanır [89]. Başka bir yöntem, glikozidik bağlar asit tarafından parçalandığından bazları serbest bırakan, DNA'nın asidik hidrolizini kullanır. Tayin, HPLC yoluyla veya uçucu türevlere dönüştürüldükten sonra GC–MS ile yapılır [43]. Genel olarak elektroforez [90–92], spektroskopik yöntemler [93,94], moleküler prob teknolojileri [95,96] ve elektrokimyasal yöntemleri [97–108] içeren, DNA hasarının tespiti için geliştirilen çeşitli analitik yöntemler literatürde mevcuttur.

DNA hasarının elektrokimyasal olarak tayini, çeşitli yönleriyle (ilaçlarla DNA etkileşimleri, çevresel kirleticiler ve diğer potansiyel genotoksik türlerin incelenmesi), farklı yazarlar tarafından birçok kez araştırılmıştır [16,109–114].

DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan, basit olmaları, nispeten ucuz olmaları ve oldukça hassas olmaları nedeniyle özellikle ilgi çeken elektrokimyasal tespit yöntemleri, genellikle DNA'nın bir elektrot yüzeyinde hareketsiz hale getirilmesini gerektirir. DNA ile modifiye edilmiş elektrotları oluşturmak için adsorpsiyon, damlatma, kovalent bağlanma ve katman katman (layer-by-layer) birleştirme gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal yöntemlerin DNA yapısındaki değişikliklere karşı duyarlılığı, örneğin çift sarmallı DNA'nın interkalatif (sarmallar arasına giren) redoks göstergelerine veya hasarlı DNA'nın yapıya duyarlı etiketlemesine dayalı, dolaylı yöntemlerin uygulanması yoluyla geliştirilebilir [115,116]. Nükleobaz lezyonlarının tespitinin duyarlılığını arttırmanın bir başka yolu, hasarlı DNA'nın DNA onarım enzimleri tarafından işlenmesidir [117,118]. Ayrıca, elektrokimyasal DNA sensörlerinin duyarlılığı, elektroaktif yüzey alanını arttıran ve dönüştürücü ile elektroaktif türler arasındaki yük transferini kuvvetlendiren çeşitli nanomalzemelerin (örneğin, karbon nanotüpler, grafen) kullanılmasıyla da son zamanlarda arttırılmıştır [119,120]. Bu deney düzenekleri, en sık olarak voltametrik (özellikle; CV, DPV, SWV, ACV (alternatif akım voltametrisi)) ve kronopotansiyometrik olmak üzere çeşitli elektrokimyasal algılama teknikleri ile birleştirilmiştir; ayrıca EIS son zamanlarda DNA biyosensörlerinde popüler hale gelmiştir [114].

Oksidatif DNA hasarının derecesini izlemek için geliştirilmiş olan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin çoğu, esas olarak G piki olmak üzere, pürin bazlarının oksidasyon piklerinin

belirlenmesine dayanır [72]. Bunun temel nedeni, pürin bazlarının pirimidin bazlarına göre daha düşük oksidasyon potansiyellerine sahip olmasıdır. Bu bazlara hidroksil radikalleri eklendiğinde $C_4$-OH-, $C_5$-OH- ve $C_8$-OH- katılma radikalleri oluşur. Bunların dışında $C_4$-OH- ve $C_5$-OH- katılma radikalleri dehidrasyona uğrayabilir ve bunun sonucunda oksitlenmiş pürin radikalleri oluşur. Bu radikaller yine indirgeme yoluyla pürinlere dönüştürülebilir. $C_8$-OH- katılma ürünü radikali tek elektronlu oksidasyon-indirgeme reaksiyonuna girer ve sırasıyla 8-hidroksipruinler ve formamidopirimidinler oluşturur. Adenin hem oksidasyon hem de indirgeme reaksiyonlarına girdiğinde sırasıyla 8-hidroksiadenin ve 4-6-diamino-5-formamidopirimidin oluşur. Guaninin başlıca oksidasyon ürünü ise 8-okso-7,8-dihidroguanindir (8-oxoGua). Bu ürünlerin oksijen varlığında ve yokluğunda oluştuğu bulunmuştur. Oksidatif DNA hasarının bir sonucu olarak en yaygın iki değişiklik, 8-hidroksiguanin ve 2,6-diamino-4-formamidopirimidin oluşumudur.

### 2.4.4. Oksidatif DNA Hasarına Antioksidanların Etkisi

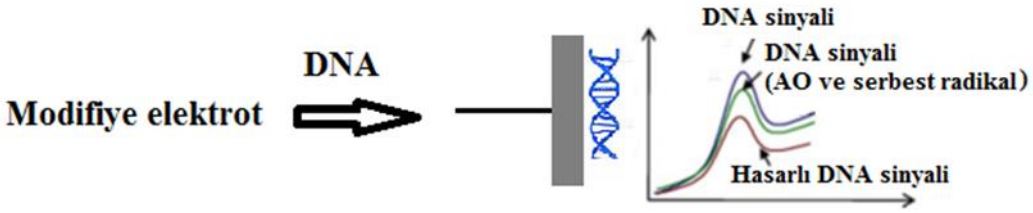
İnsan vücudu, sağlıklı hücre zarlarını reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin zararlarından korumak için çeşitli AO savunma sistemlerine sahiptir [121–123]. Doğuştan gelen savunma sistemleri gıda, kozmetik ürünleri ve ilaç şeklinde alınan AO bileşiklerle desteklenebilir. Bu nedenle diyet tarafından sağlanan AO bileşikler, canlı hücrelerin antioksidan durumunu zenginleştirebilir ve hasarı azaltabilir.

Pek çok doğal ve sentetik AO'nın, reaktif oksijen ve diğer türlerin neden olduğu DNA hasarına karşı etkili bir koruma sergilediği bilinmektedir [16,124]. Polifenolik yapıları nedeniyle, tüm kara bitkilerinde zengin bollukta bulunan bileşikler olan flavonoidler, genellikle güçlü antioksidan özellikler sergiler. Bazı flavonoidlerin, yüksek oranda oksitleyici •OH'in oluştuğu ve dolayısıyla DNA'ya zarar verebileceği bir süreç olan geçiş metalleri tepkimelerini azaltabildiği gösterilmiştir [112].

G veya A oksidasyon akımı, doğal elektroaktiviteleriyle karşılaştırıldığında radikallerin varlığında önemli ölçüde azalır. Radikal içeren çözeltiye bir AO eklendiğinde, akım kısmen geri kazanılır, bu da bu bileşiklerin reaktif türleri süpürme aktivitesine atfedilir. CV, SWV ve DPV, bu çalışmalar için en yaygın kullanılan elektrokimyasal tekniklerdir.

Bu tekniklerde öncelikle çift veya tek zincirli DNA bir elektrot üzerine immobilize edilir. DNA ile modifiye edilmiş elektrodun Fenton çözeltisi ya da başka bir ROS çözeltisine daldırılması

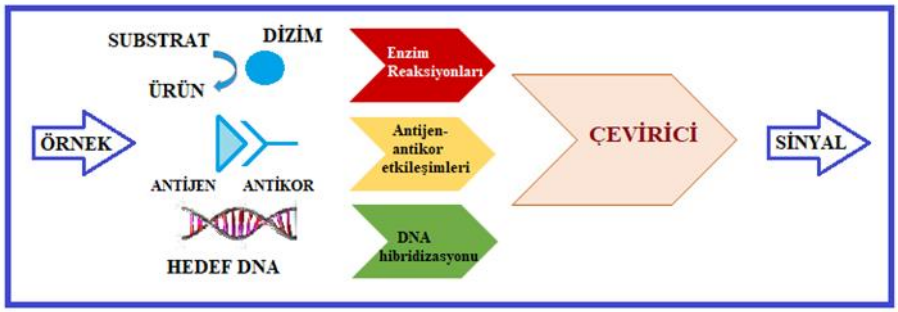
sonucunda DNA bazlarının pik akım yoğunluğunda bir sinyal düşüşü gözlenir. Ortama AO'ların eklenmesi ile •OH/ROS uzaklaştırılır ve sonuç olarak, elektrodun bu çözeltiye daldırılmasından sonra, pik akım yoğunluğu, DNA bütünlüğünü gösteren orijinaline çok yakın olur (Şekil 2.8). Sinyalin geri kazanım derecesi, test edilen antioksidanın koruma işlevini yansıtır.




**Şekil 2.8:** Antioksidan aktivite tayini için elektrokimyasal yaklaşımın çalışma prensibi [16].

## 2.5. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, bir dönüştürücü elemanı ile birlikte biyolojik tanıma elemanlarını kullanabilen ve kantitatif veya yarı kantitatif analize dayalı bilgi sağlama kabiliyetine sahip cihazlardır. Biyosensör, biyolojik bir tanıma elemanını bir dedektör sistemiyle birleştirir. Biyosensörün üç temel parçası, tanıma materyali, dönüştürücü veya dedektör sistemi ve sinyal işlemcisidir (Şekil 2.9). Bir biyosensör, tayini gerçekleştirilecek olan analitle spesifik olarak etkileşime giren bir biyomolekül varlığında etkileşim sonucunu elektriksel bir sinyale dönüştürür. Biyosensörler tıp, gıda, çevre, proses endüstrileri, güvenlik, savunma ve teşhis gibi çok çeşitli analitik araçlarda kullanılmıştır [125].




**Şekil 2.9:** Biyosensörün yapısı [125].

Biyosensör küçük, taşınabilir, ucuz ve yarı vasıflı kişiler tarafından kullanılabilecek nitelikte olmalıdır. Başarılı bir biyosensör oluşturmak için bir dizi koşulun karşılanması gerekir:

- ✓ Analiz amaçlı testler arasında düşük bir varyasyon gösterebilen, normal saklama koşulları altında oldukça spesifik ve kararlı bir biyokatalizör olmalıdır.
- ✓ Reaksiyon, sıcaklık, pH vb. gibi fiziksel parametrelerden bağımsız ve pratik olmalıdır.
- ✓ Tepki, seyreltme veya derişiklendirme olmaksızın, ilgili konsantrasyon aralığında doğru, tekrarlanabilir, kesin ve doğrusal olmalıdır.
- ✓ Klinik durumların izlenmesi için prob, toksik olmayan, küçük ve biyouyumlu olmalıdır.
- ✓ Biyosensör, kolayca inaktive veya proteolize olmamalıdır.
- ✓ Sensör, insan numunelerinden alınan analitlerin hızlı ölçümlerini sağlamalıdır.

Biyosensörler, seçici, duyarlı ve güvenilir analiz sistemleri olmaları nedeniyle günümüzde tayin amaçlı olarak oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Biyosensörler, diğer zaman alıcı klasik analiz sistemlerine göre birçok avantajlar sağlamaktadır. Biyosensör çalışmaları ve uygulamaları, özellikle son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmelerin sisteme dahil olmasıyla oldukça önem kazanmıştır [126–128].

Biyosensörün biyolojik bileşeni, katalitik ve katalitik olmayan olmak üzere iki farklı gruba ayrılabilir. Katalitik grup enzimleri, mikroorganizmaları ve dokuları içerirken, katalitik olmayanlar antikorlar, reseptörler ve nükleik asit vb.'den oluşur. Analitlerin tespiti için elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik), optik, kolorimetrik ve akustik gibi çeşitli biyosensör türleri mevcuttur.

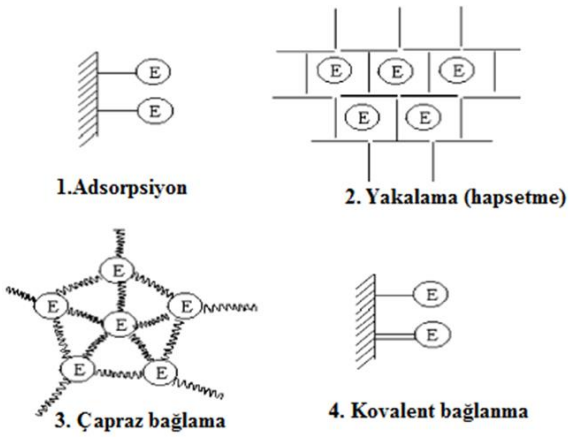
Biyosensör çeşitlerinin kullanım alanlarına göre farklı dezavantajları vardır. Örneğin, optik sensörler, bulanık ortamlarda kullanıma uygun değildir. Termal biyosensörler, küçük ısı değişimlerinin meydana geldiği sistemlerde yüksek hassasiyette kullanılamazlar. Piezoelektrik biyosensörlerin ise kullanım alanı dardır. Elektrokimyasal biyosensörlerde bu dezavantajların çoğu mevcut değildir. Özellikle, tek kullanımlık elektrot teknolojisi kullanım kolaylığını oldukça artırmaktadır. Bu elektrotlar düşük maliyet ve seri analiz sistemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca, elektrokimyasal ölçüm sistemleri küçük boyutlarda, taşınabilir ve ekonomiktir. Bulanık ortamlarda çalışılabilme elektrokimyasal sensörlerin en önemli avantajlarından biridir [129]. Bu sebeplerden dolayı elektrokimyasal biyosensörler oldukça ilgi çekmektedir [130].

Biyomoleküllerin tayini için bir biyosensör hazırlanırken öncelikle biyomolekülün immobilizasyonu yapılmalıdır. Bunun için çeşitli yöntemler mevcuttur. Spesifik sensörlerin

tasarımı ve geliştirilmesi için en yaygın olarak kullanılan biyo-materyal immobilizasyon teknikleri, fiziksel adsorpsiyon, yakalama, moleküler çapraz bağlama ve kovalent bağlanmadır:

1. Adsorpsiyon: Selüloz, silika jel, cam, hidroksiapatit ve kollajen gibi birçok substratın enzimleri adsorbe ettiği iyi bilinmektedir. Bağlanma kuvvetleri esas olarak hidrojen bağları, elektrostatik kuvvetler, Van der Waals kuvvetleri ve elektron aktarım komplekslerinin oluşumundan kaynaklanmaktadır.
2. Yakalama: Biyomoleküller içeren bir çözelti içinde bir polimerik jel hazırlanırsa, biyomoleküller jel matrisi içinde tutulur. Biyomoleküllerin tutulması için poliakrilamid, nişasta, naylon ve silyastik jel kullanılabilir.
3. Çapraz bağlama: Glutaraldehit, heksametilen di-izosiyanat, 1,5-difloro 2,4-dinitrobenzen ve bis-diazobenzidin-2 gibi iki işlevli veya çok işlevli reaktifler kullanılarak biyomoleküllerin moleküller arası çapraz bağlanmasıdır. Bu reaktifler, biyomolekülleri katı desteklere bağlayabilir.
4. Kovalent bağlanma: Enzimdeki, katalitik aktivite için gerekli olmayan, fonksiyonel grup aracılığıyla gerçekleştirilir. Genellikle proteinlerin amino asit yan zincirlerinde bulunan amino, karboksilik, imidazol, tiyol, hidroksil gibi nükleofilik fonksiyonel gruplar, bağlanma için kullanılır.

Moleküllerin immobilizasyonunda kullanılan çeşitli yöntemler, Şekil 2.10'da gösterilmektedir.




**Şekil 2.10:** Biyomolekkülerin immobilizasyon yöntemleri [125].

## 2.6. ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİ

1960'ların başında nükleik asit elektroaktivitesinin keşfinden sonra nükleik asitlerin analizi için çeşitli elektrokimyasal yaklaşımlar gerçekleştirilmiştir. Analitik ilgi konusu olan birçok

bileşiğin nükleik asitler kullanılarak saptanması ve incelenmesi son on yılda artmıştır. Doğrudan DNA elektrokimyası, DNA'ya özgü redoks raportör elektrokimyası, nanopartiküller kullanılarak elektrokimyasal amplifikasyonlar, polimer modifiye elektrotlar, elektrokimyasal DNA tayini için geliştirilmiş farklı yaklaşımlardır. DNA biyosensörlerinin moleküler teşhis [131,132], farmakogenomik [111,133], tıbbi teşhis [134,135], ilaç taraması [136–138], gıda analizi [139,140], biyoterörizm [141,142], çevresel izleme [106,140,143], kirlilik [144–146] vb. alanlarda uygulamaları vardır.

1987'de Downs ve diğ. [147] Biyolojik sistemlerin yüksek hassasiyetli, uygun maliyetli ve kantitatif özelliklere sahip ucuz ve hızlı tespitine odaklanarak, DNA'nın sıyırma voltametrisi ile elektrokimyasal tayinini gerçekleştirmişlerdir [148]. E. Palecek daha sonra 1988'de yaptığı bir çalışmada nükleik asitlerin elektrokimyasal davranışını detaylı olarak incelemiştir [149]. Nükleik asitlerin cıva elektrodunda voltametrik pikler üreten elektroaktif türler olduğunu göstermişlerdir. Nükleik asit modifiye elektrot, cıva elektrotlarının DNA çözeltisine daldırılmasıyla basitçe hazırlanmıştır. Bu, hazırlanan ilk nükleik asitle modifiye edilmiş elektrotlar, analiz için gerekli DNA miktarlarını büyük ölçüde azaltmıştır. Çift sarmal DNA'da küçük bir hasar da hassas bir şekilde tespit edilmiştir. O zamandan beri, nükleik asitlerin doğrudan incelenmesi, hibridizasyonun saptanması ve DNA hasarının değerlendirilmesi için birkaç polarografik ve voltametrik yöntem önerilmiştir [150].

Ektrokimyasal DNA biyosensörleri, hızlı tepkileri, yüksek hassasiyetleri, seçicilik ve deneysel kolaylık nedeniyle daha fazla ilgi görmektedir. Gelişmiş teknoloji ve cihazların minyatürleştirilmesi, elektrokimyasal DNA biyosensörlerini DNA tayini için olağanüstü bir araç haline getirmektedir. Modern elektrokimyasal yöntemleri uygulamak için nükleik asit analizi alanında çeşitli çalışmalar yapılmıştır [151]. Bu sensörler, kanser karşıtı bileşiklerin, biyomoleküllerin, toksinlerin, hibridizasyonun vb. tespiti için çok faydalıdır. Son birkaç yılda, DNA'nın spesifik sekansının ve bütünlüğünün tespiti amacıyla elektroaktif ve elektroaktif olmayan bileşiklerin belirlenmesi için çeşitli elektrokimyasal olarak immobilize edilmiş DNA biyosensörleri bildirilmiştir [125,148].

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin hazırlanmasındaki en kritik adım, bir elektrot yüzeyinde DNA sarmallarının (tek sarmallı DNA veya çift sarmallı DNA) immobilizasyonudur. Hareketsizleştirilmiş DNA dizisi miktarı, DNA elektrokimyasal sensörlerinin doğruluğunu, hassasiyetini, seçiciliğini ve ömrünü doğrudan etkiler [152].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, genellikle ilaç ve DNA arasındaki olası etkileşimi belirlemek amacıyla veya farklı elektrokimyasal tekniklerden {(diferansiyel puls voltametrisi (DPV), potansiyometrik sıyırma analizi (PSA), kare dalga voltametrisi (SWV), katodik sıyırma voltametrisi (CSV), adsorptif transfer sıyırma voltametrisi (AdSTV), doğrusal voltametri (LV) ve doğrusal kare voltametri (LSV), vb.)} yararlanarak, çeşitli ortamlarda [153–157] enfeksiyöz (bulaşıcı) ajanların erken ve kesin tanıları için kullanılabilir.

Farklı elektrokimyasal dönüştürücülerle birleştirilmiş DNA algılama stratejilerinde kullanılan çalışmalar karbon pasta elektrot (CPE), asılı cıva damla elektrot (HMDE), perde baskılı elektrot (SPE), kurşun kalem grafit elektrot (PGE), pirolitik grafit elektrot (PrGE), cıva film elektrot (MFE) , altın elektrot (AuE) ve platin elektrot (PtE) kullanılarak yapılmıştır. Özellikle kurşun kalem elektrodunun (PGE) Wang ve diğ. tarafından tanıtılmasından sonra [158] tek kullanımlık bir nükleik asit sensör teknolojisi geliştirme ilkeleri altında, çok sayıda elektrokimyasal DNA tayin yöntemleri oluşturulmuş ve daha sonra tek kullanımlık grafit elektrotlar kullanılarak ilerlemiştir.

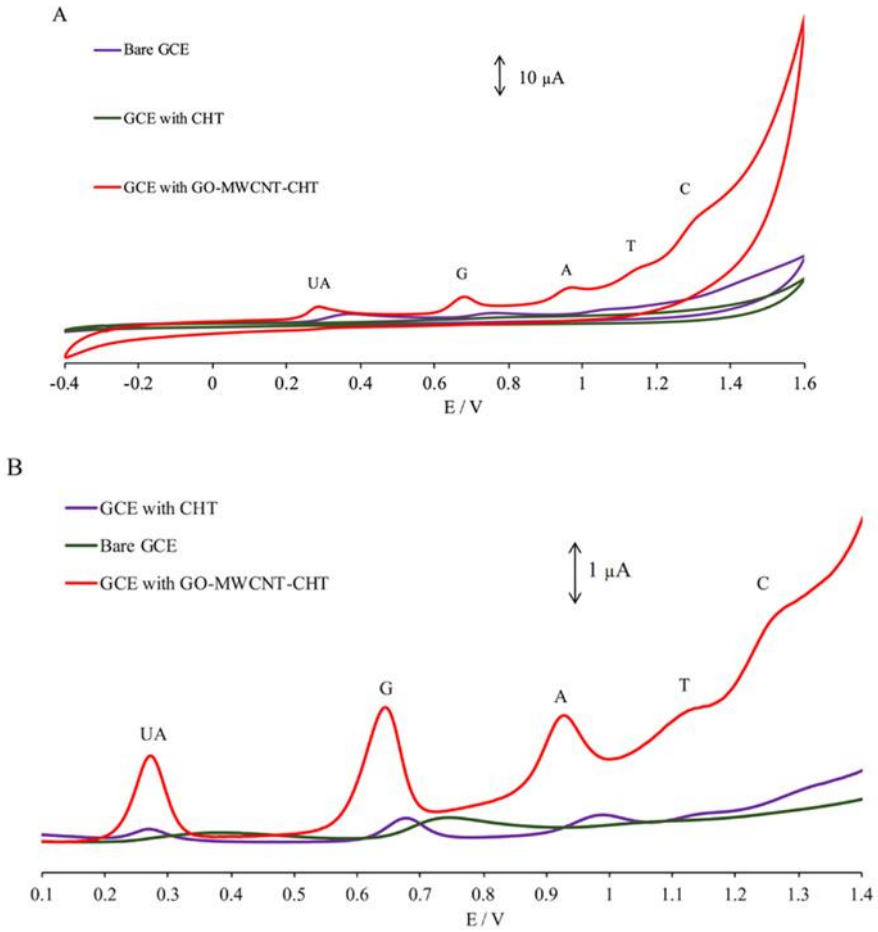
DNA'daki pürin bazları, yani G ve A, pozitif bir potansiyelin uygulanması sırasında çalışma elektrodunda oksidasyona uğrar. Başlangıçta bu, DNA moleküllerinin immobilizasyonunu sağlayan metal [159] ve karbon bazlı [160] elektrodun kullanımı ile mümkün olmuştur. Pirimidin türevi bileşiklerin katı elektrotlardaki elektroaktivitesi de literatürde gösterilmiştir [161]. Ancak dört DNA bazının eşzamanlı sono-voltametrik (ultrasonik dalgalar kullanılan) tespiti, yalnızca pürin baz konsantrasyonundan 10 kat daha yüksek bir konsantrasyona sahip pirimidin bazları içeren, alkali elektrolit çözeltilerinde sağlanmıştır [161–163]. Pürinler ve pirimidin bileşikleri yüzeylerde güçlü bir şekilde adsorbe olma eğiliminde olduklarından T ve C bazlarını oksitlemek için yüksek enerji gerekmektedir ve bu durum DNA bazlarının aynı anda elektrokimyasal tespitini zorlaştırmaktadır. İlk zamanlar T ve C'nin yavaş elektron transfer kinetiklerinden dolayı karbon bazlı elektrotlarda elektrokimyasal aktivite göstermediği varsayılmıştır. Örneğin, Xiao ve diğ. [164] iyonik sıvı, çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler) ve altın nanopartiküller (AuNPs) kullanarak modifiye edilmiş bir camsı karbon elektrodu (GCE) hazırlamış, ancak yalnızca G ve A tespitini başarmıştır. Hasoň ve diğ. [165] mekanik olarak pürüzlendirilmiş kenar planlı bir pirolitik grafit elektrot geliştirmiş ve yine sadece pürin nükleobazlarını tespit edebilmişlerdir. Benzer bir girişim Zhang ve diğ. tarafından yapılmıştır [166]. Burada karmaşık bir üç boyutlu WS2 nano-tabaka/grafit mikrofiber hibrit

elektrot kullanılmış, ancak pirimidin nükleobazlarının tespiti mümkün olmamıştır. Lin ve diğ. G ve A bazlarının grafen ve nafyon kompozit film modifiye camsı karbon elektrot (Grafen-Nafyon/GCE) üzerindeki elektrokimyasal davranışını DPV ile araştırmışlardır. Sonuçlar, modifiye elektrodun, artan oksidasyon pik akımı ve azalan oksidasyon potansiyeli ile kanıtlanan, G ve A oksidasyonuna karşı mükemmel bir elektrokatalitik aktivite sergilediğini göstermiştir. Optimize edilen deney koşulları altında iki oksidasyon pikinin ayrılması, 0,1 M pH 4,4 asetat tampon çözeltisi (ABS) içinde gerçekleştirilmiş ve 0,58 μM (G) ve 0,75 μM (A) saptama limiti ile G ve A bazlarını aynı anda belirlemek mümkün olmuştur [167]. Oliveira-Brett ve diğ. [72] DNA monofosfat nükleotitlerinin voltametrik oksidasyonunu, GCE'li DPV ile geniş bir pH aralığında ilk kez incelemiştir. Bu çalışmada GCE'nin elektrokimyasal ön koşullandırması, daha iyi bir pik ayrımının elde edilmesini ve oksidasyon piklerinin akımının arttırılmasını sağlamıştır. Böylelikle fizyolojik pH'ta nanomolar aralıkta eşit molar karışımlarda dört DNA bazının hepsinin eş zamanlı voltametrik tayini ve tespit limitlerini belirlemek mümkün olmuştur. Çözelti içinde, serbest veya tek sarmallı DNA'da, monomerler olarak pürin ve pirimidin nükleotitlerinin her birinin oksidasyonunu ilk kez saptamak da mümkün olmuştur. Çözelti içinde sırasıyla pürin ve pirimidin bazları için nano ve mikromolar aralıklarda tespit limitleri elde edilmiştir. Fakat yöntemlerinde, tüm nükleobazları saptamak için doğrusal aralıklar oldukça dardır; pürinler için 0,2 ila 10 μM ve pirimidinler için 1 ila 20 μM. Sunulan sonuçlar ilk kez pirimidin nükleozitlerinin ve nükleotitlerinin camsı karbon elektrotları üzerinde elektroaktif olduğunu ve pürinlerin kolay saptanmasına ek olarak, ssDNA'da pirimidin kalıntılarının oksidasyonunun eş zamanlı olarak saptanmasının da mümkün olduğunu göstermiştir [72].

Hassas bir DNA biosensörü oluşturmak için, altın nanopartiküller [168], karbon nanotüpler [169] ve polimerler [170,171] gibi çeşitli nanomalzemeler, sinyal amplifikasyon (nükleik asitlerin (DNA/RNA) veya spesifik sekanslarının in vitro koşullarda enzimatik olarak çoğaltılması) ortamı ve bir prob-hareketsizleştirme membranı olarak yaygın şekilde kullanılmıştır.

CNT keşfi, DNA analizi için elektrokimyasal DNA biyosensörünün geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir. CNT'ler DNA'nın immobilizasyonunu kolaylaştırır ve ayrıca hibridizasyonun transdüksiyon sinyalini yükselterek güçlü amplifikatör olarak yardımcı olur. Dizili CNT'ye sahip DNA sensörü, az miktarda numuneye ihtiyaç duyar ve DNA tabanlı tayin için biyosensör

geliştirmede önemli bir rol sunar. Wang ve diğ. tarafından yapılan çalışmada [1], dahili bir standart olarak ürik asit (ÜA) ile birlikte DNA nükleobazlarının eş zamanlı tespiti için grafen oksit ve kitosanda MWCNT hibrit nanokompozit ile modifiye edilmiş GCE geliştirilmiştir. Bu çalışmada, dahili bir standart olarak ÜA ile birlikte DNA nükleobazlarının eş zamanlı tespiti için uygun maliyetli ve hassas nanokompozit modifiye bir sensör geliştirilmiştir. Yalın bir GCE ile karşılaştırıldığında, nanokompozit modifiye edilmesiyle elektrokimyasal aktif yüzey alanının büyük oranda geliştirildiği (~% 36.6) belirlenmiştir (Şekil 2.11).




**Şekil 2.11:** (A) 175 µM UA, 50 µM G, 50 µM A, 250 µM T ve 250 µM C'yi saptamak için yalın GCE, GCE/CHT ve GCE/GO-MWCNT-CHT kullanılan CV karşılaştırması (0,2 M PBS, pH 7,0); (B) 15 µM UA, 15 µM G, 15 µM A, 35 µM T ve 35 µM C'yi saptamak için yalın GCE, GCE/CHT ve GCE/GO-MWCNT-CHT kullanılarak DPV'nin karşılaştırılması (0,2 M PBS, pH 7,0) [1].

AuNP'lerle kombinasyon halinde CNT'ler, yüksek yüzey alanının yanı sıra CNT'nin iyi iletkenliğinden ve AuNP'lerin DNA'nın AuNP üzerinde stabil immobilizasyon olasılığından yararlanarak DNA algılaması için kullanılabilir. DNA'nın hassas tayini için geliştirilen bir sensörde, aminobenzoik asit (ABA), GCE üzerinde immobilize edilen fonksiyonelleştirilmiş

MWCNT'nin yüzeyinde elektropolimerize edilmiş ve daha sonra yüzey AuNP'ler ile modifiye edilmiştir [172]. Prob DNA, AuNP'lerin yüzeyinde Au-S bağı yoluyla immobilize edilmiştir ve DNA hibridizasyonunun tespiti, DPV kullanılarak yapılmıştır.

## 2.7. ELEKTROKİMYA

Elektrokimya, kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini ve aynı zamanda maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri inceleyen kimyanın bir alt bilim dalıdır. Elektrokimyasal reaksiyonlar, yükseltgenme-indirgenme (redox) türü reaksiyonlardır.

Elektrokimya bilimi, çözelti/elektrot arayüzünde elektron transferi ile ilgilenir. Tüm elektrokimyasal süreçler için ortak olay, kimyasal türler (veya bir elektrot ile elektrodun yakınında bulunan bir kimyasal tür) arasında elektron aktarımıdır. Elektrokimyada elektron transfer reaksiyonlarının gerçekleştiği yer çok önemlidir çünkü çoğu elektrokimyasal sistemin davranışını düzenler. Fiziksel elektrokimya, bu süreçlerin termodinamiği ve kinetiği (oranlar ve mekanizmalar) ile ilgilenir. Birçok araştırma konusu, reaktan ve arayüzey yapısının detayları ve elektron transfer reaksiyonları için kinetik parametreleri nasıl etkiledikleri ile ilgilidir. Analitik Elektrokimya ise ilgilenilen bir türün miktarını ölçmek için elektrokimyasal süreçlerin uygulanmasıdır. Bilim ve teknolojinin birçok alanında önemli rol oynayan elektrokimyasal sistem ve cihazlara bazı örnekler arasında elektro-organik sentez, piller ve yakıt hücreleri, fotoelektrokimyasal hücreler, elektrokaplama hücreleri, elektrodiyaliz, korozyon sistemleri, sensörler, tıp, biyoloji ve birçok alanda ölçüm cihazları sayılabilir.

Elektrodun yüzeyine ulaşmak için dikkate alınması gereken üç taşıma mekanizması vardır:

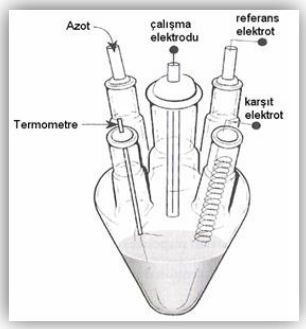
1. Difüzyon, rastgele termal hareketler nedeniyle tek tek taneciklerin birbirlerine momentum/enerji aktarımı biçiminde ortaya çıkan taşınımdır.
2. Konveksiyon, çözeltinin uyumlu yığın akışı nedeniyle ısı/madde taşınımıdır. Bu süreçte, ilgili redoks türleri, çözelti akışı ile birlikte taşınır.
3. Göç (migrasyon), potansiyel bir değişime tepki olarak yüklü türlerin taşınımıdır [173].

Elektrokimya, araçsal basitlik, orta düzeyde maliyet ve taşınabilirlik avantajlarını kapsayan güçlü analitik tekniklere olanak sağlar. Modern elektrokimyasal yöntemler, biyomedikal

alanlara ve aslında analitik kimyanın çoğu alanına uygulanabilen hassas, seçici, hızlı ve kolay tekniklerdir.

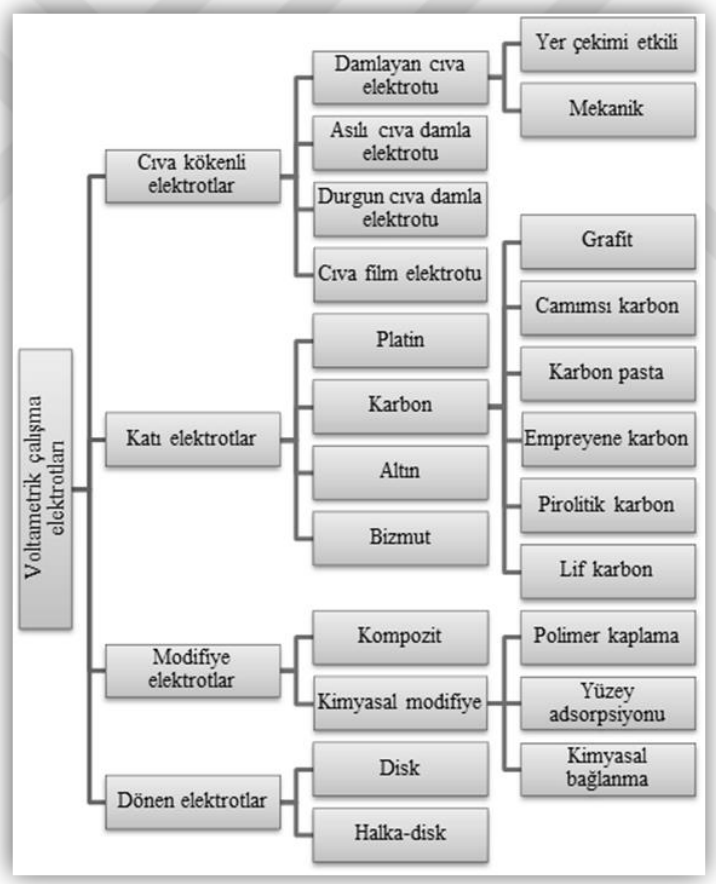
Voltametrik teknikler, özellikle kromatografik yöntemlerle birleştiğinde, düşük dozları takiben ilaçların kan seviyelerini, metabolitlerini ve idrarla atılımını ölçmede son derece faydalı olmuştur. CV ve LSV elektrot proseslerinin ve redoks mekanizmalarının aydınlatılması için kullanılabildikleri için büyük ilgi görmüştür. DPV ve SWV özellikle farmasötikler ve biyolojik sıvılardaki eser miktarlardaki elektroaktif bileşiklerin belirlenmesinde etkilidir. Sıyırma voltametrisi, ultrahassas algılama için analitleri önceden deriştirme yeteneğinden dolayı da yaygın olarak kullanılmaktadır. Amperometri, elektrokimyasal sensörlerde ve biyosensörlerde yaygın olarak kullanılan bir başka yaygın elektrokimyasal tekniktir. Elektrokemilüminesan (ECL) ve fotoelektrokimyasal testler, hem optik hem de elektrokimyasal algılamayı mümkün kılma avantajına sahip oldukları için umut verici teknolojilerdir. Farklı elektrokimyasal yöntemlerle birleştirilmiş fonksiyonel nanomalzemelere dayalı çeşitli sinyal amplifikasyon stratejileri, klinik ve çevresel uygulamalarda DNA ve mikro RNA deneyleri dahil olmak üzere çok çeşitli analitlerin eser miktarlarının ultrahassas tespiti için yüksek performanslı analitik araçların ortaya çıkmasına yönelik olarak son zamanlarda büyük ilgi görmüştür [174].

Elektrokimyasal özelliklere dayanan bir takım kantitatif (nicel) ve kalitatif (nitel) analitik yöntemleri kapsayan elektrokimyasal reaksiyonlar, elektrokimyasal hücre adı verilen bir sistemde gerçekleşir. Bu hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşmaktadır. Hücreler cam, teflon, kuartz vb. malzemelerden yapılabilir. Elektrokimyasal hücrede, iyon veya molekül halindeki maddenin indirgendiği elektroda katot adı verilirken, ortaya çıkan yükseltgenme reaksiyonu sırasında iyon veya molekül halindeki madde ya da elektrot malzemesinin kendisinin elektron verdiği elektroda ise anot adı verilir. Hücrede elektrotların birbirine göre konumu önemlidir.




**Şekil 2.12:** Elektrokimyasal hücre modeli.

Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen ve üzerinde analitin yükseltgenme veya indirgenmeye uğradığı elektroda çalışma elektrodu denir.

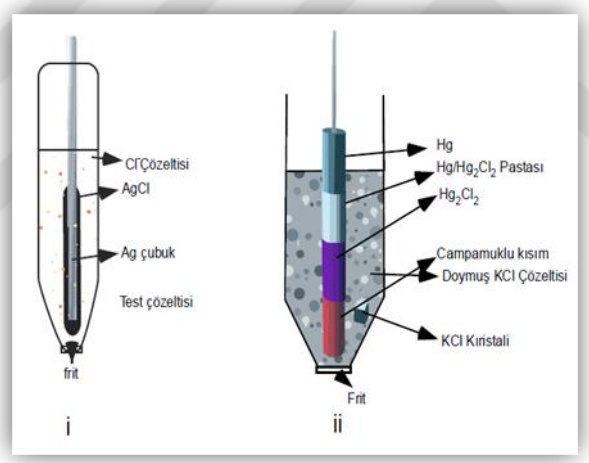



**Şekil 2.13:** Voltametride kullanılan çalışma elektrotların sınıflandırılması.




**Şekil 2.14:** Camsı karbon elektrot şeması.

Potansiyeli deney süresince sabit kalan ikinci elektrot ise referans elektrottur. Elektrokimyasal çalışmalar sırasında, daldırıldığı çözeltiden etkilenmez ve potansiyeli dış ortamdan bağımsızdır.



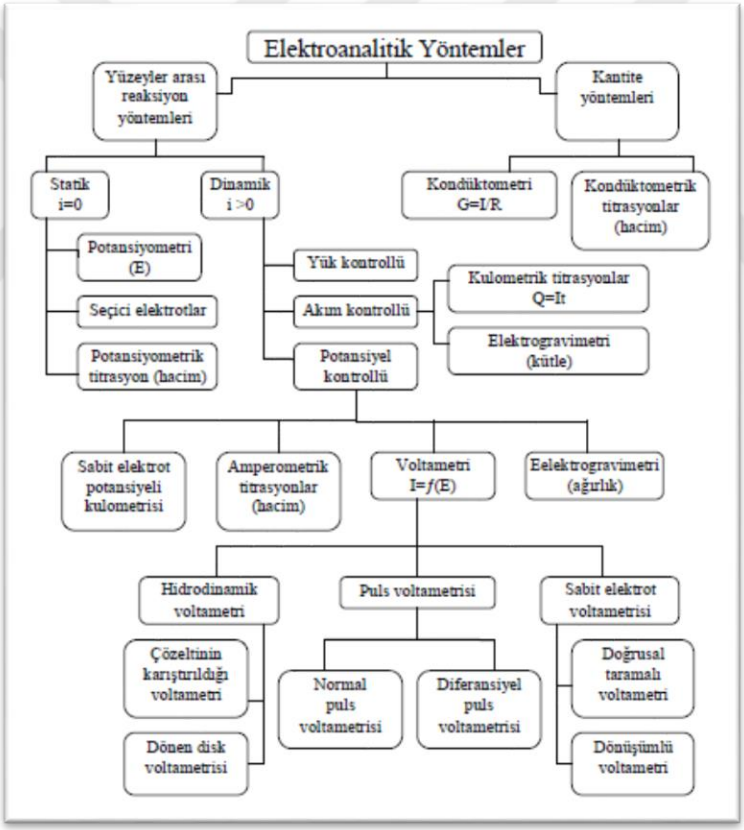

**Şekil 2.15:** Referans elektrot (i) gümüş klorür (ii) kalomel elektrot.

Hücrede bulunan 3. elektrot ise yardımcı (karşıt) elektrottur. Yardımcı elektrot olarak platin ve altın elektrot gibi kolay polarize olan ve geniş yüzey alanına sahip elektrotlar kullanılır.



**Şekil 2.16:** Yardımcı elektrot, Pt tel.

Elektroanalitik yöntemler ile çok düşük tayin sınırlarında tayin yapılabilir. Elektroanalitik kimya, çözeltideki bir elektroaktif analitin elektriksel özelliklerini araştıran çok çeşitli teknikleri kapsayan genel bir terimdir.




**Şekil 2.17:** Elektroanalitik yöntemlerin şematik gösterimi. Ölçülen büyüklükler parantez içinde verilmiştir (I=akım, E= potansiyel, R=direnç, G=iletkenlik, Q=yük miktarı, t=zaman, hacim=standart çözelti hacmi, ağırlık=elektrokimyasal olarak biriktirilen türün ağırlığı).

## 2.8. SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (SV)

Elektrokimyasal sıyırma, bir elektrot yüzeyinden (veya çözünmüş metalli sıvı cıva elektrotlarında olduğu gibi elektrot gövdesinden) atomların, iyonların veya bileşiklerin oksidatif veya indirgeyici olarak ayrılması anlamına gelir. Genel olarak, bu atomlar, iyonlar veya bileşikler, bir ön-deriştirme aşamasının sonucu olarak, bir elektrodun yüzeyinde (veya içinde) hareketsiz hale getirilirken, elektrokimyasal sıyırma ürünleri elektrolit çözelti içinde çözülür. Genellikle elektrokimyasal sıyırma ürünü, ön-deriştirmeden önceki analit ile aynıdır. Sıyırma voltametrisi karışım analizlerine uygulanabilirliği, cihazların ucuzluğu ve ölçüm kolaylığı vb. avantajlar sunmaktadır. Elektroanalitik yöntemler içerisinde genellikle en duyarlı olanlar sıyırma yöntemleridir. Elektroanalitik sıyırma yöntemleri iki adımdan oluşur: birincisi, çalışma elektrodu yüzeyinde çözünmüş bir analitin birikmesi ve ikincisi, birikmiş maddenin bir voltametrik, potansiyometrik veya kulometrik teknik ile sıyrılması.

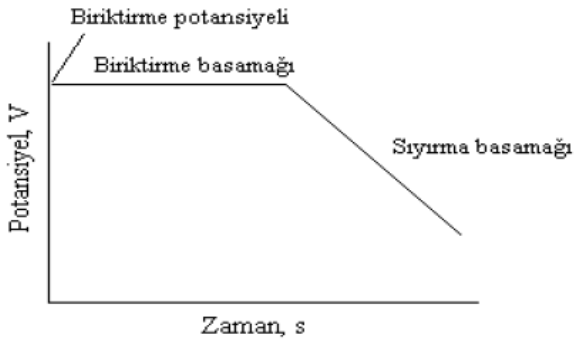
Ön-deriştirme, yani elektrot yüzeyinde birikim, aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilebilir:

(a) Metal atomlarının inert, katı bir elektrot üzerinde elektrodepozisyonu,
(b) Bir cıva elektrodunda metal iyonlarının indirgenmesi ve metal atomlarının cıva içinde çözünmesi,
(c) Cıva veya gümüş yüzeyinde az çözünür cıva veya gümüş tuzlarının çökeltilmesi,
(d) Metal elektrot yüzeylerinde metal oksitlerin, hidroksitlerin veya diğer çözünmeyen tuzların çökeltilmesi,
(e) Bir elektrot malzemesi ile bileşiklerin kimyasal reaksiyonları,
(f) Cıva yüzeyinde elektroaktif organik maddelerin adsorpsiyonu,
(g) Metal iyonlarının komplekslerinin organik ligandlarla adsorpsiyonu,
(h) Komplekslerin sinerjik adsorpsiyonu,
(i) Metal iyonlarının anyon kaynaklı adsorpsiyonu,
(j) Metal iyonlarının yüzey kompleksleşmesi,
(k) Yüzeyi değiştirilmiş elektrotlarda iyon değişimi reaksiyonları ve
(l) Karışmayan iki elektrolit çözeltisinin arayüzü boyunca iyon transferi ile ekstraksiyon.

Sıyırma adımında uygulanabilecek voltametrik teknikler merdiven, puls, diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisidir. Diferansiyel puls voltametrisi, en titiz ayırıcı kapasitif akıma sahipken, kare dalga voltametrisi en hızlı sıyırma tekniğidir.

Dört tekniğin tümü, hem reaktanın hem de ürünün elektrot yüzeyinde hareketsiz olduğu hızlı ve tersinir yüzey reaksiyonlarına karşı duyarsızdır. Bahsedilen tüm tekniklerde, maksimum yanıt veya pik akımı, biriken maddenin yüzeyine veya hacmine ve konsantrasyonuna doğrusal olarak bağlıdır. Bu lineer orantılılığın faktörü, voltametrik tekniğin amperometrik sabitidir. Bu sabit yöntemin hassasiyetini belirler.

Sıyırma sırasında kullanılan voltametrik yönteme göre sıyırma voltametrisi, doğrusal taramalı sıyırma voltametrisi veya diferansiyel puls sıyırma voltametrisi vb. gibi isimlendirilir. Sıyırma voltametrisinde potansiyel-zaman profili şematik olarak Şekil 2.18'de verilmiş ve her basamakta yapılan işlemler kısaca özetlenmiştir.




**Şekil 2.18:** Sıyırma tekniklerinde potansiyel-zaman profili ve akım potansiyel eğrileri.

Sıyırma voltametrisinin uygulanması, çeşitli kimyasal, çevresel, metalurjik, jeolojik, biyolojik, biyokimyasal, farmasötik ve klinik materyallerdeki metal iyonlarının ve organik bileşiklerin ölçümlerini içerir. Suların rutin eser metal analizinde kullanılırlar ve atomik absorpsiyon spektroskopisi veya bazı kromatografik teknikler ile elde edilen sonuçların doğrulanması için güvenilir, hassas ve kesin yöntemler olarak hizmet edebilirler [175].

### 2.8.1. ANODİK-KATODİK SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (A-KSV)

Sıyırma yöntemi iki farklı şekilde uygulanır. Birincisinde, elektrot yüzeyine analizi yapılacak madde seyreltik çözeltiden indirgenme veya yükseltgenme yoluyla biriktirilir. Bu aşamaya *elektrokimyasal ön-deriştirme* işlemi denir. Sabit potansiyel altında çözeltideki madde indirgenerek elektrot yüzeyinde çözünmez hale dönüştürülür. Sonrasında elektroda pozitif (anodik) veya negatif (katodik) yönde potansiyel taraması uygulanır. Bu şekilde elektrot yüzeyinde biriken madde indirgenme veya yükseltgenme ile elektrot yüzeyinden sıyrılarak

tekrar çözeltiye alınır. Bu basamak dolayısıyla yönteme sıyırma voltametrisi adı verilmektedir. Bu sırada oluşan akım ölçülerek madde miktarı tayin edilir.

Potansiyel taraması anodik yönde yapılırsa yöntem anodik sıyırma voltametrisi (ASV), katodik yönde yapılırsa katodik sıyırma voltametrisi (KSV) olarak adlandırılır. Yaygın olarak kullanılmasına rağmen, anodik ve katodik sıyırma voltametrisi arasında önemli bir fark yoktur. Elektrot polarizasyonunun yönü, biriken maddenin özelliklerine bağlıdır. Anodik polarizasyon, amalgamlara, metal tortularına ve çalışma elektrodunun yüzeyinde yükseltgenebilen bazı adsorbe edilmiş organik bileşiklere uygulanır. Katodik polarizasyon oksitler, cıva ve cıva tuzları, adsorbe edilmiş metal iyon kompleksleri ve indirgenebilir organik moleküller için uygundur.

Bu alanda damlayan cıva, cıva filmi, soy metaller, parafin emdirilmiş grafit, camsı karbon ve karbon pasta elektrotlarının uygulamaları mevcuttur. Bu elektrotların çalışma penceresi geniş ve yüzeyleri yenilenebilir, dolayısıyla hem indirgenebilir hem de yükseltgenebilir maddelerin birikimi için kullanılabilirler. Sıyırma tekniğinde hidrodinamik koşullar elektrot yüzeyinde biriktirilen maddenin konsantrasyonuna bağlıdır. Bundan dolayı damlayan cıva elektrot, sıyırma voltametrisinde tercih edilmez. Çünkü cıvayla birlikte biriktirilen madde de çözeltiye geri taşınmış olur. Bunun için sıyırma yöntemlerinde bir katı elektrot veya sabit bir cıva damlası kullanılır. Katodik ve anodik sıyırma voltametrisinde hem indirgenme hem de yükseltgenme olduğundan dolayı elektrot reaksiyonlarının tersinir olması gereklidir. Genellikle, çözelti sıyırma aşamasında değil biriktirme sırasında karıştırılır, bu nedenle arada 5-15 saniyelik bir bekleme periyoduna ihtiyaç duyulur.

### 2.8.2. ADSORPTİF SIYIRMA VOLTAMETRİSİ (AdSV)

İkinci sıyırma tekniği, adsorptif sıyırma voltametrisidir (AdSV). Bu teknikte çözeltide bulunan madde sabit potansiyelde herhangi bir kimyasal değişikliğe uğratılmadan direkt elektrot yüzeyine fiziksel adsorpsiyonla biriktirilir. Yine indirgenme veya yükseltgenme yönünde bir potansiyel taraması ile oluşan akım ölçülür. Son yıllarda geliştirilen bu teknik ile voltametride genelde dezavantaj olarak bilinen adsorpsiyon olayı bir avantaj haline dönüştürülürek duyarlı bir analitik yöntem elde edilmiştir.

Tez kapsamında da kullanılan AdSV ile DNA tayininde, önce DNA elektrot yüzeyine adsorbe edilir, sonra elektrot yıkanıp DNA içermeyen ortama (adsorbe edilmiş tabaka ile) aktarılır ve

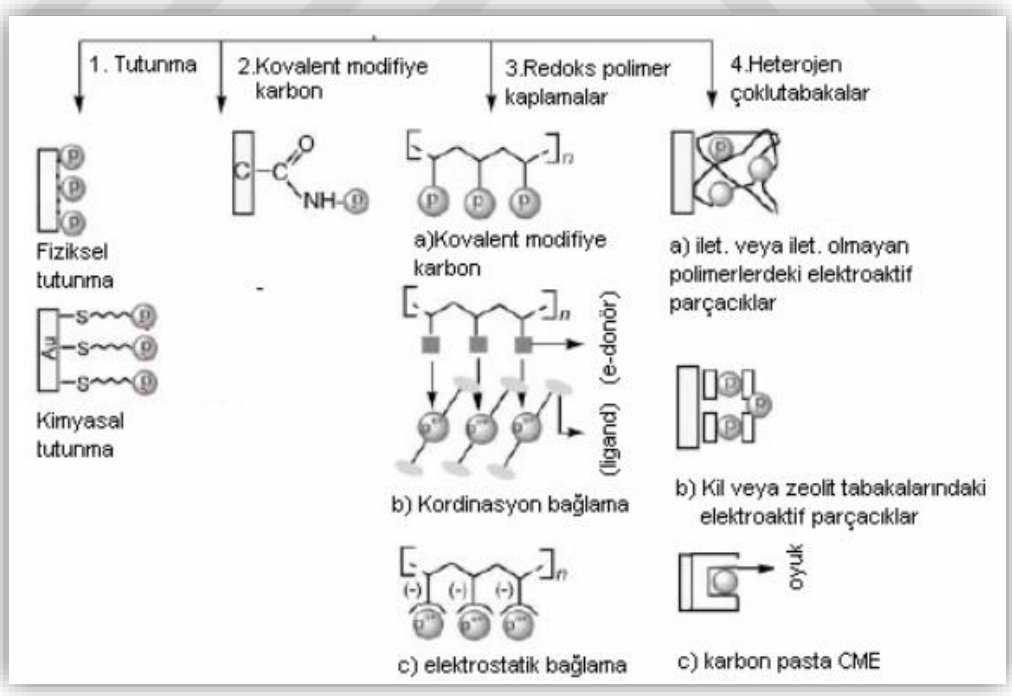
bu ortamda voltametrik analizi yapılır. Adsorpsiyon bir damla DNA çözeltisinden bile gerçekleştirilebilir, bu da geleneksel voltametriye kıyasla analiz edilen numunenin hacmini iki ondalık mertebesi kadar azaltmayı mümkün kılar [149].

## 2.9. ELEKTROTLARIN MODİFİKASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Kimyasal maddeler elektrot yüzeyine tutununca burada bir tabaka oluştururlar. Bu şekilde yeni bir elektrot elde etme yöntemine modifikasyon denir. Oluşan elektroda ise, modifiye elektrot denir. Modifiye edici maddeler organik veya inorganik maddeler olabilirler. Organik maddeler olarak genelde polimerler kullanılmasına karşılık inorganik madde olarak tuz yapısındaki ligandlar, kompleksler veya metal oksitleri kullanılır.

### 2.9.1. Modifiye Eletkrotların Hazırlanma Yöntemleri

Modifiye elektrotların hazırlanmasında kimyasal modifikasyon (kimyasal bağlanma), fiziksel tutunma, adsorpsiyon, elektroadsorpsiyon (adsorpsiyonun, belirli bir elektrot potansiyeliyle yapılması) ve plazma gibi çeşitli teknikler söz konusudur.




**Şekil 2.19:** Modifiye elektrotların hazırlanma yöntemleri.

### 2.9.2. Modifiye Yüzeylerin Karakterizasyonu

Modifiye edilmiş yüzeyler modifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra spektroskopik veya elektrokimyasal yöntemler ile karakterize edilirler:

- Spektroskopik yöntemlerle;
  - X–ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)
  - Raman Spektroskopisi
  - Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)
  - Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)
  - Taramalı geçirimli elektron mikroskopisi (STEM)
  - Elipsometri
  - Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)
  - Taramalı elektrokimyasal mikroskopi (SECM)
  - Infrared (kızıl ötesi) spektroskopisi (IR)
  - Taramalı tünelleme mikroskopisi (STM)
- Elektrokimyasal yöntemlerle;
  - Döngüsel voltametri
  - Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
  - Temas açısı
  - Kronoamperometri
  - Kronokulometri

## 2.10. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji, atomik, moleküler ve makromoleküler ölçekte araştırma ve teknoloji geliştirme anlamına gelir ve 1 ila 100 nm aralığında uzunluk ölçeklerine sahip yapıların ve cihazların kontrollü manipülasyonuna ve çalışmasına yol açar [176]. Nanoteknoloji, muadillerine kıyasla benzersiz fiziksel, kimyasal, optik ve katalitik özellikleri nedeniyle giderek daha popüler hale gelmiştir. Birçok teknolojik ve endüstriyel sektörde ve tıbbi enstrümantasyonda, yurt güvenliğinde ve diğer birçok alanda devrim yaratmaktadır [160].

Nanoteknoloji biyosensör alanına girdikten sonra, biyosensörlerin duyarlılığı ve diğer analitik özellikleri büyük ölçüde geliştirilmiştir. Bu amaçla kullanılan nanomalzemeler, analitik kimya için önemli olanaklar sunan benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir.

Tüm nanomalzemeler arasında AuNP'ler, CNT'ler, grafen (GR) ve fotonik kristaller (PC'ler) benzersiz özellikleriyle öne çıkmaktadır. Yüksek stabilite, üstün biyouyumluluk, yüksek yüzey enerjisi, sinyaller üzerinde güçlü amplifikasyon etkisi vb. avantajları onları biyosensör uygulamaları için mükemmel seçimler haline getirmektedir [177].

Nanopartiküller, darbeli lazer biriktirme, kimyasal indirgeme, alevli metal yakma, elektroliz, elektrokimyasal indirgeme, foto-indirgeme, sono-elektrokimyasal, mikro dalga kaynaklı, yeşil yöntem, aerosol akış reaktörü, sprey pirolizi, kimyasal sıvı biriktirme, fotokimyasal azalma ve kıvılcım deşarjı gibi çok çeşitli tekniklerle sentezlenmektedir [160].

Nanoyapılar, biyomoleküllerle benzer boyutlara sahiptir; beraber kullanımları sonucu, özellik ve etkinliklerindeki sinerjiyle bu alanda güzel sonuçlara ulaşılmaktadır [20]. Bu amaçla, biyoanalitik uygulamalarda sıklıkla kullanılan nanomateryaller ayrıca biyosensör (biyosensör üretimi için biyomoleküllerin immobilizasyonunda önemli bir rol oynarlar), biyoanalizler (örneğin enzimlerde), biyoelektronik ve biyomedikal uygulamalarda da uzun süredir kullanılmaktadır [21,178,179].

Nanomalzemelerin iki büyük avantajı, müdahalesiz tayin araçları olarak kullanılma potansiyelleri ve tek bir prob içinde birden fazla yöntemi birleştirme kapasitesidir. Bu durum, çok daha yüksek hassasiyetlerin elde edilmesini sağlar, bu da *in vivo* süreçlere ilişkin daha fazla netlik ve daha derin kavrayışlara yol açar.

Karbon bazlı nanomalzemeler (örneğin, karbon nanotüpler, fullerenler, grafen), elektroanalitik ve elektrokatalitik algılama uygulamalarında en yaygın olarak kullanılanlardır. Elektroanalitik uygulamalar için karbon bazlı nanomalzemelerin kullanım başarısı, büyük olasılıkla elektrokimyasal reaksiyonlarda elektron transferini teşvik etme yetenekleriyle ilgilidir. Soy metal nanopartiküllerin, diğer biyomedikal uygulamalarda olduğu gibi biyosensör yaklaşımları için önemli nanomalzemelerden biri olduğu bilinmektedir. Metalik nanopartiküllerin fiziksel boyutları, nanobiyoteknoloji alanında vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Daha küçük numune hacimleri, azaltılmış güç tüketimi ve iyileştirilmiş performans gerektiren analitik cihazlara

yönelik artan ihtiyaç, nanomalzeme araştırmalarındaki hızlı büyümenin arkasındaki güçlü teşvikler olmuştur [174].

Elektrokimyasal DNA sensör teknolojilerinde, nanopartiküller ve karbon nanotüpler gibi farklı malzemelerin kullanımına artan bir ilgi bulunmaktadır. Nanoteknoloji ile üretilen üstün fiziksel özelliklere sahip nanomalzemelere (nanopartikül, nanotüp, nanokablolar vb.) dayanan sensör teknolojisi, biyomolekülerin algılanmasına yönelik elektrokimyasal tekniklerin kullanıldığı yöntemlerde daha seçimli, daha hassas ve gözlenebilme sınırı çok daha düşük DNA analizlerini mümkün kılmaktadır [25].

### 2.10.1. Altın Nanopartiküller (AuNP'ler)

Altın, platin ve gümüş gibi soy metal nanopartikülleri geniş yüzey alanları ve bulundukları yüzeyin elektrik iletkenliğini arttırmaları nedeniyle elektrokimyasal sistemlerde ve optik sensörlerde tayin hassasiyetini arttırmada kullanılmaktadır. Bunların bir diğer kullanım avantajı da karbon bazlı materyallerle entegrasyon sonucunda elektrokatalitik uygulamalarda sinerjik etki göstermeleridir [24].

AuNP'ler, tüm metal NP'ler arasında biyoanalizde en sık kullanılanlardır. AuNP'lerin boyutu ve özellikleri, büyük ölçüde hazırlama koşullarına bağlıdır [180]. Gösterilen biyouyumluluk [181] AuNP'leri genel olarak çeşitli biyoanalitik uygulamalar ve özellikle biyosensör uygulamaları için çok ilginç kılmaktadır. AuNP'lerin benzersiz özellikleri nedeniyle optik ve elektrokimyasal biyosensörlerin geliştirilmesi çok popüler hale gelmiştir. AuNP'leri biyosensörlerde kullanmanın önemli bir avantajı, özellikle düşük konsantrasyonlu analitler için algılama sinyalindeki veya yanıtındaki artıştır [177].

Kolloidal altın veya AuNP'ler, genellikle su olan bir çözücü içinde mikrometre altı boyutlu altın parçacıklarının bir süspansiyonudur. AuNP süspansiyonu genellikle ya yoğun bir kırmızı renge (100 nm'den küçük parçacıklar için) ya da kirli sarımsı bir renge (daha büyük parçacıklar için) sahiptir [182]. Michael Faraday, kolloidal altının kırmızı rengini ince bölünmüş durumuna bağlayan ilk bilim insanıydı ve kolloidal altının modern bilimsel değerlendirmesi onun çalışması [183] ve daha sonra Turkevich [184] ve Frens'in diğer öncü çalışmaları ile başladı [185]. Benzersiz özelliklere sahip yeni AuNP'lerin sentezi, tıp, elektronik, nanoteknoloji dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda uygulamalarla önemli araştırmaların konusudur [182].

Biyokimyasal redoks proseslerinde üstün kararlılıkları ve tam geri kazanımları sayesinde, altın nanopartiküller sayısız biyomedikal uygulamada katalizör olarak kullanılmıştır. Ek olarak, altın nanopartiküller redoks aktiftir, bu da algılama cihazlarının nano ölçeğe minyatürleştirilmesi olasılığını artırır ve kimyasal-biyolojik algılama için mükemmel beklentiler sunar. Altın nanopartiküllerin hem makro hem de nano ölçekli tıpta uygulanması, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri iletmek için muazzam bir potansiyele sahip, hızla gelişen bir alandır [174].

AuNP'ler iyi iletkenliğe ve yüksek elektrokimyasal katalitik aktiviteye sahiptir. Altın nanopartiküllerin bu üstün elektrokimyasal özellikleri, DNA etiketleri olarak yaygın kullanıma neden olmuştur [176]. Karbon nanotüpler, grafen ve grafen türevleri gibi farklı türde nanomalzemeler, AuNP esaslı sensörün algılama sınırını ve kararlılığını iyileştirmek için bu elektrotların modifikasyonunda kullanılmaktadır [186–189].

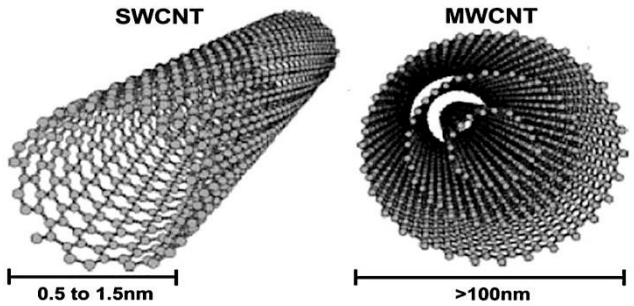
### 2.10.2. Karbon Nanotüpler (CNT'ler)

CNT'ler, elektrokimyasal sensörlerin üretilmesi için ideal bir destek olarak yaygın olarak kabul edilen yeni nanomalzemelerdir. CNT tabanlı sensörler iyi bir hassasiyet ve seçicilik göstermektedir. Son zamanlarda, CNT'lerin ve polimerlerin entegrasyonuna dayanan kompozit malzemeler, sinerjik bir etkiye sahip her bileşenin özelliklerine sahip oldukları için artan bir ilgi kazanmıştır [172]. Bu dikkate değer ilgi, CNT'nin olağanüstü elektriksel, kimyasal, mekanik ve yapısal özellikleri dahil benzersiz davranışını yansıtır [127].

CNT'ler (SWCNT ve MWCNT'ler); kimyasal buhar biriktirme, karbon ark yöntemleri veya lazer buharlaştırma ile yapılabilir. SWCNT, tek bir grafit levhanın bir tüp içine yuvarlanmasıyla oluşturulan silindirik bir nano yapıya (yüksek en-boy oranına sahip) sahiptir [127] (Şekil 2.20). Çapları 0,4 ila 2,5 nm arasında olan silindirik tüplere kusursuz bir şekilde sarılmış tek grafen levhalardan oluşan SWNT'ler, çok çeşitli biyomedikal uygulamaları mümkün kılan mükemmel fiziksel ve kimyasal özellikler sunar. Küçük boyutlarıyla bağlantılı olarak yüksek elektriksel iletkenlikleri, onları ayrı nanoelektrotlar olarak uygun hale getirir. Birçok çalışma, SWNT'lerin elektron transfer reaksiyonlarını verimli bir şekilde teşvik etme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Bu yetenek, pahalı elektronik cihazların gerekliliğini ortadan kaldırır ve sinyal-gürültü oranını (S/N) iyileştirmesi muhtemeldir; bu da kimyasal ve biyolojik analitlerin tespiti için ultra hassas elektrokimyasal sensörlere yol açar [174]. MWCNT'ler ise, bir ağaç

gövdesinin halkaları gibi eşmerkezli olarak iç içe yerleştirilmiş birkaç grafit silindir katmanından oluşur [127].

MWNT'ler, 100 nm'ye kadar değişken çaplara sahip çoklu iç içe grafen levhalardan oluşur. Bu nanotüplerin uzunlukları birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişebilir. Geniş yüzey alanlarına, benzersiz fiziksel özelliklere ve ayarlanabilir uzunluklara sahip kimyasal olarak değiştirilebilir yüzeyler ile MWNT'ler biyomedikal uygulamalar için güçlü adaylardır [174].




**Şekil 2.20:** Karbon nanotüplerin yapısı.

Yüksek yüzey alanı ve içi boş geometri, CNT'lerin elektronik iletkenlikleri ve elektron transfer reaksiyonlarını destekleme yetenekleri ile bir araya gelen faydalı mekanik özellikleri, biyomoleküllerin ve inorganik bileşiklerin analizi için yeni güçlü biyosensörler sağlar [190]. Karbon nanotüplerin benzersiz özellikleri, onları kimyasal sensörler ve özellikle elektrokimyasal algılama görevi için son derece çekici kılmaktadır [127].

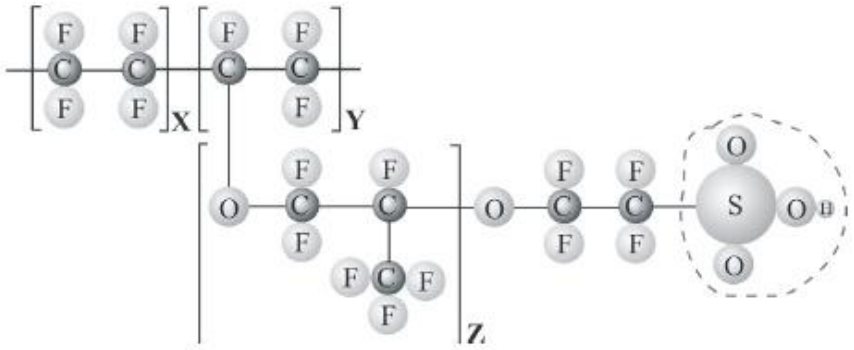
Literatürde CNT'lere dayalı elektrokimyasal DNA algılama için birçok farklı şema sunulmuştur [27,191–195]. DNA analizlerine yönelik, CNT ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrot (SPE) [26], camsı karbon elektrot (GCE) [27] ve kalem grafit elektrotların (PGE) [28–31] kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur. MWCNT ve SWCNT'lerin kullanıldığı DNA analizine yönelik çalışmalarda düşük tayin sınırlı, seçimliliği ve duyarlılığı yüksek sonuçlar elde edilmektedir. Örneğin MWCNT ile modifiye edilmiş GCE ile DNA elektroaktif bazlarının (G ve A) doğrudan tayininde, modifiye edilmemiş yalın GCE'ye kıyasla önemli ölçüde geliştirilmiş voltametrik sinyaller (100 fmol meme kanseri BRCA1 geni olarak hesaplanan saptama sınırı ile) elde edilmiştir [27]. Pedano ve diğerleri tarafından yapılan bir diğer çalışmada CNT ile zenginleştirilmiş CPE hazırlanmış [191] ve nükleik asitlerin adsorpsiyonu ve elektrokimyasal oksidasyonu için kullanılmıştır. MWCNT'lerin karbon pasta matriksine

dahil edilmesi, tek sarmallı DNA (ssDNA) ve kısa oligonükleotit için yalın bir karbon pasta elektrodundan elde edilenlerden 29 ve 61 kat daha büyük akım değerleri sağlamıştır.

## 2.11. NAFYON

Nafyon, iyon değişimi ve şişme özelliklerinden sorumlu olan sülfonat ana gruplarıyla sonlandırılan asılı zincirlere sahip bir florokarbon omurgası içeren benzersiz bir katı matriks sağlar. Hem hidrofobik hem de hidrofilik moleküller için bağlanma bölgeleri sağlayan Nafyon polimer membranın benzersiz çok alanlı yapısı, onu elektromodifikasyon için en çekici malzeme haline getirmektedir [32]. Nafyon, yakıt hücreleri, elektrokimyasal cihazlar, piller, sensörler, ilaç salımı ve ince kimyasalların üretimi için süperasit katalizindeki geniş uygulamalar için oldukça uygundur [85].

Tetrafloroetilenin sülfolanmasıyla oluşturulmuş bir sentetik polimer olan Nafyon ($C_7HF_{13}O_5S.C_2F_4$) (Şekil 2.21), iyonik özelliğe sahiptir. Nanopartiküllerin ve polimerin kombinasyonu çok pratiktir, çünkü bu nanopartiküllerin yığılmasını ve yeniden kristalleşmesini azaltır ve bunların elektrot yüzeyine sabitlenmesine neden olur, böylece sensörün stabilitesini arttırır [196].




**Şekil 2.21:** Nafyonun yapısı.

## 2.12. OKSİDATİF DNA HASARINA KARŞI KORUMADA KULLANILAN BİTKİ ÇAYLARI

Yeşil çay, ıhlamur, elma ve ekinezya gibi bitkilerden hazırlanan çayların antioksidan bileşenlerinin ve antioksidan kapasitelerinin incelendiği çalışmalar literatürde mevcuttur [197–206].

Yeşil çay polifenolleri arasında, özellikle kateşinler (CT) ve gallik asit (GA), insan sağlığı üzerindeki faydalı etkilerde birincil değerde kabul edilmektedir. Başlıca yeşil çay kateşinleri (-) epigallokateşin gallat (EGCG), (-) epigallokateşin (EGC), (-) epikateşin gallat (ECG) ve (-) epikateşin (EC)'dir [197].



**Şekil 2.22:** Yeşil çay (*Camellia sinensis*).

Ekinezya, hem Kuzey Amerika'da hem de Avrupa'da yerli bir bitkidir ve bağışıklığı uyarıcı tıbbi kullanımı için yaygın olarak kabul edilmektedir. Ekinezya türlerinin ana aktif bileşikleri; alkamitler ve poliasetilenler, kafeik asit türevleri (klorojenik asit, kaftarik asit, sinarin, kikorik asit, ekinakozid), polisakkaritler ve glikoproteinlerdir [198,201].



**Şekil 2.23:** Ekinezya (*Echinacea angustifolia*).

Bir fenolik bileşik kaynağı olan ıhlamurun kalitatif ve kantitatif analizleri bugüne kadar çeşitli teknikler kullanılarak yapılmıştır. Ihlamurun başta kuersetin glikozitler (rutin, kersitrin ve izokersitrin) olmak üzere flavonoidler, kaemferol glikozitler ve fenolik asitler (kafeik, *p*-kumarik ve klorojenik asitler) [199,202] içerdiği bildirilmiştir. Ek olarak, polisakkaritler, tanenler ve terpenoidler de tanımlanmıştır [203,204].



**Şekil 2.24:** Ihlamur (*Tilia Cordata*).

Elma, yüksek fenolik içeriğe sahiptir [205]. Özellikle elma kabukları, soyulmuş meyvelerden daha yüksek fenolik içeriğe sahiptir [206]. Elmadaki polifenoller arasında kafeik, *p*-kumarik, ferulik ve klorojenik asitler gibi hidroksisinnamik asitler, kuersetin glikozitler (kuersetin-3-arabinoz, kuersetin-3-galaktosidaz, kuersetin-3-glukozit, kuersetin-3-ramnozit gibi), flovonoller ve (+) kateşin, (-) epikateşin gibi flavanoller bulunur. Bunlar arasında kuersetin (% 34,7), epikateşin (% 19,9) ve prosiyanidin $B_2$ (% 19) elmanın toplam antioksidan aktivitesine önemli ölçüde katkıda bulunur [200].



**Şekil 2.25:** Elma çayı (*Malus domestica*).

## 2.13. LİTERATÜRDE MEVCUT ÇALIŞMALAR

### 2.13.1. Oksidatif DNA Hasarı Tayini

Elektrokimyasal DNA hasarı çalışmaları genel olarak DNA immobilizasyonu sonrası DNA bazlarının veya redoks aktif prob olarak kullanılan türün sinyallerinin ölçümünü ve sonrasında ise DNA'yla hasar verici türlerin kovalent veya kovalent olmayan etkileşiminden sonra başlangıçtaki türlere veya ortaya çıkan yeni elektroaktif türlere ait elektrokimyasal sinyallerin ölçülmesi temeline dayanır [207]. Klasik bir elektrokimyasal DNA biyosensörü kolaylıkla DNA hasar tayini biyosensörlerinin hazırlanmasında kullanılabilir.

Son yıllarda elektrokimyasal DNA hasar tayini çalışmaları önem kazanmaya ve özellikle son 10 yıldır nanomalzemelerin de kullanımıyla oldukça ses getirmeye başlamıştır. Bununla birlikte

farklı nanomalzemelere dayalı daha hassas, ucuz ve pratik ölçüm sistemlerinin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde, birçok elektrokimyasal DNA hasar tayini çalışmaları bulunmaktadır.

Oliveria-Brett ve diğ. tarafından antrasiklin ailesine ait bir antibiyotik olan adriamisinin dsDNA'ya verdiği oksidatif hasar DPV ile GCE kullanılarak tayin edilmiştir [15]. Sonuçlar, çift sarmal DNA'ya sarmal arası eklenen (interkale) adriamisinin oksidasyona veya indirgenmeye maruz kalabileceğini ve spesifik olarak G bazı ile reaksiyona girdiğini ve dolayısıyla mutajenik 8-oxoG kalıntılarının oluşumuna yol açtığını göstermektedir. Çift-sarmal DNA'ya interkale olmuş adriamisinin doğrudan *in vivo* oksidatif hasara neden olabileceği gösterilmiştir.

Tang ve diğ. [208] polianilin/kitosan (PANI/CTS) modifiye GCE'ler üzerine dsDNA immobilize ederek, hidrokinonun DNA'ya verdiği zararı DPV ile tayin etmişlerdir. Çalışmada G yükseltgenme sinyallerinde azalma gözlenirken hidrokinon yükseltgenme sinyalinde artış gözlenmiştir. Böylelikle hidrokinonun biyosensör üzerindeki elektrokimyasal davranışı ve DNA'ya zarar verme mekanizmaları araştırılmıştır. Sonuçlar, GCE'nin PANI/CTS tarafından modifiye edilmesinden sonra redoks pik akımının önemli ölçüde arttığını göstermiştir. DNA hasarında, konsantrasyona bağlı olarak G oksidasyon pik akımının azalmasıyla birlikte hidrokinon oksidasyon pik akımı artmıştır.

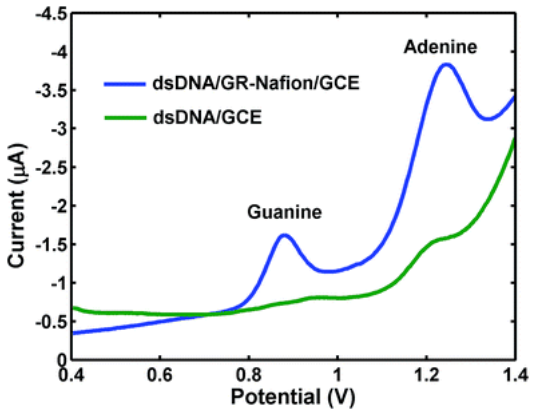
Yine Tang ve diğ. [209] yaptığı başka bir çalışmada, çok duvarlı karbon nanotüpler/kitosan (MWCNTs/CTS) modifiye camsı karbon elektrotlar üzerine dsDNA immobilize ederek 6-merkaptopürinin DNA'ya verdiği zarar, DPV ile incelenmiştir. Deneysel sonuçlar, modifiye edildikten sonra, MWNT/CTS/GCE'nin aktif alanının önemli ölçüde arttığını ve $K_3[Fe(CN)_6]$'ya yanıt olarak oksidasyon pik akımının dikkate değer bir artış sergilediğini göstermiştir. A bazındaki hasarın G bazına oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

Lu ve diğ. [210] perflorooktan sülfonattan (PFOS) kaynaklanan DNA hasarını nano gözenekli bir biyonik arayüz üzerinde DPV ve elektrokimyasal empedans yöntemleri ile incelemişlerdir. Arayüz, nano gözenekli bir aşırı oksitlenmiş polipirol film (OPPy) içine gömülmüş AuNP'ler üzerinde DNA'nın birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. PFOS'a bağlı DNA hasarı, elektrokimya ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak tespit edilmiş ve sistemde elektroaktif

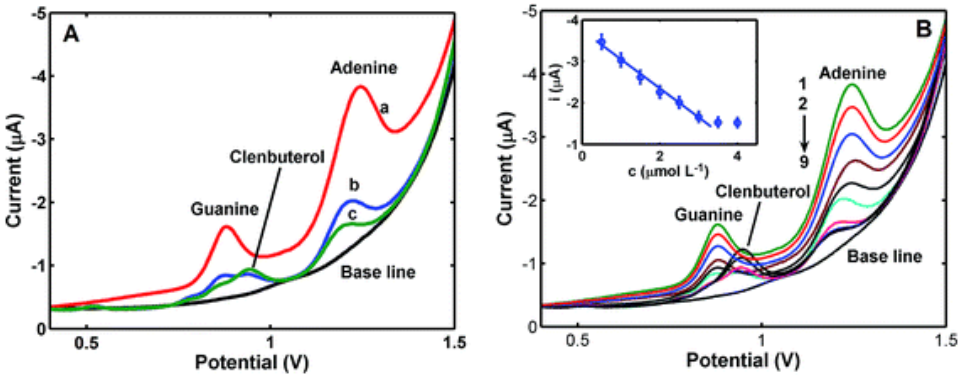
indikatör olarak kullanılan metilen mavisinin (MB) DPV tepkisi saptanarak araştırılmıştır. MB akımının, DNA'nın PFOS içinde inkübasyonundan sonra açık bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Ensafi ve diğ. [211] tarafından geliştirilen MWCNTs/poli(diallildimetilamonyum klorür) modifiye PGE'ler ile elektroaktif bir prob olarak MB'nin kullanıldığı krom/glutatyon/$H_2O_2$ sistemi ile indüklenmiş DNA hasarı diferansiyel puls voltamogramlarının incelenmesiyle araştırılmıştır. Bu çalışmada, öncelikle MWCNT'ler ile modifiye poli(diallildimetilamonyum klorür) (MWCNTs-PDDA) nanopartikülleri hazırlanmıştır. Daha sonra PGE, hazırlanan bu MWCNTs-PDDA nanopartiküller ile modifiye edilmiştir. Son olarak, modifiye elektrodun yüzeyine çift sarmal DNA (dsDNA) immobilize edilmiştir.

Lin ve diğ. [85] tarafından Clenbuterol (CLB) tarafından indüklenen DNA hasarını doğrudan tespit edebilen bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. GCE, bir dsDNA/RGO-Nafyon/GCE sensörü geliştirmek için indirgenmiş grafen oksit (RGO)-Nafyon ve dsDNA kullanılarak modifiye edilmiştir. Elektrottaki (dsDNA/RGO-Nafyon/GCE) G ve A elektrokimyasal oksidasyon pik akımlarının, modifiye edilmemiş elektrottaki (dsDNA/GCE) ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir (Şekil 2.26). Buna dayanarak geliştirilen sensör, hasarsız ve hasarlı dsDNA arasındaki guanin ve adenin için oksidasyon pik akımlarının değişimini ölçmek için kullanılmış ve sonuç olarak DNA hasarı başarıyla tespit edilmiştir (Şekil 2.27).




**Şekil 2.26:** DNA/GCE ve DNA/RGO-Nafyon/GCE'nin DPV voltamogramları (HAc–NaAc tamponunda; pH 4,4).

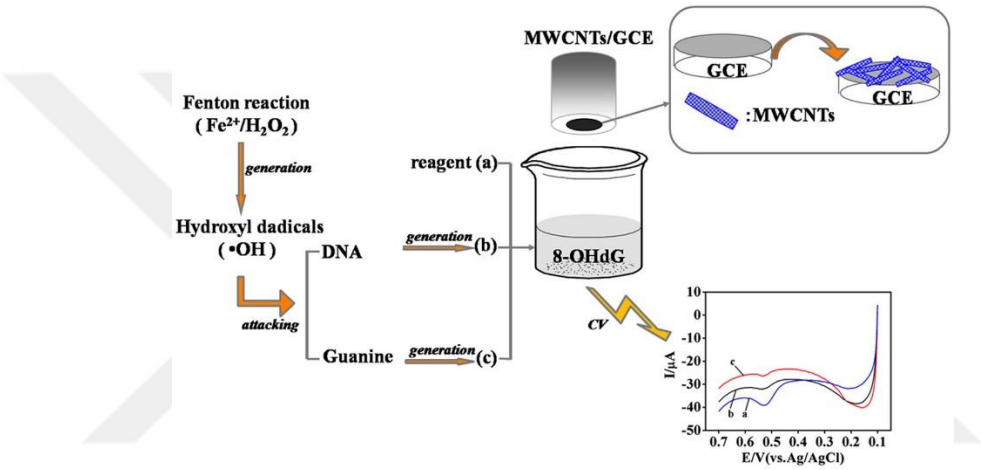



**Şekil 2.27:** Guanin ve adenin anodik pik akımının düşüşü ile eklenen CLB konsantrasyonu arasındaki ilişki [85].

Canavar ve diğ. [212] SWCNT/poli(vinilferrosenyum) ($PVF^+$) üzerine immobilize dsDNA ile modifiye edilmiş PGE geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu elektrot ile mitomisin (MC) (antikanser ilacı) arasındaki etkileşimi incelemişlerdir. Modifiye edilmiş PGE yüzeyine DNA immobilizasyonu, elektrotların asetat tampon çözeltisinde (ABS) hazırlanan 200 mg/mL ctdsDNA içeren çözeltiye daldırılıp 60 dk bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Modifiye elektrot üzerine DNA immobilizasyonun elektrokimyasal davranışları incelenmiş ve EIS ve CV tekniklerini kullanarak elektrot karakterize edilmiştir. Bu çalışmada MC ve DNA arasındaki etkileşimin öncesinde ve sonrasında G oksidasyon pik akımları gözlenmiştir. Ölçümler DPV tekniği kullanılarak yapılmıştır. Dana timüs çift sarmallı DNA'sı kullanılarak hazırlanan modifiye elektrot ile G tayininde dedeksiyon limiti 625 ng/mL olarak bulunmuştur.

Heydari-Bafrooei ve diğ. [213] Bleomycin'in (BLM) biyokimyasal etkisini incelemek için yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirmişlerdir. Burada Fe(II), Fe(III), Cu(I), Cu(II), Zn(II), Mn(II) ve Co(II) gibi bazı metal iyonlarının BLM'nin çalışması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, ön işleme tabi tutulmuş bir PGE AuNP'ler ile modifiye edilmiş ve dsDNA ile bezenmiş bir çinko(II)-Schiff baz kompleksi (ZnSB) varlığında metal iyonlarını içeren BLM tarafından indüklenen DNA hasarını tanımlamak için kullanılmıştır. DNA biyosensörünün BLM çözeltisine daldırılmasından sonra DPV yönteminde 8-Oxo guanin (8-OxoG) pikinin görülmesinin yanı sıra EIS yöntemi kullanılarak yük transfer direncindeki ($R_{ct}$) değişiklik DNA hasarının göstergesi olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, BLM'nin tek başına DNA'ya hasar veremediğini ve diğer bir deyişle BLM'nin ds-DNA ile herhangi bir etkileşimi olmadığını, ancak bazı metal iyonlarının varlığında BLM'nin DNA'ya hasar verdiğini göstermiştir.

Voltametrik elektrot yüzeyinde immobilize edilen DNA'nın, ROS tarafından oksidatif hasar için bir substrat olduğu bilinmektedir. Aerobik koşullar altında, geçiş metal iyonları, reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla (sıklıkla Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla) DNA hasarına neden olur. Guo ve diğ. [214] MWCNT'ler ile modifiye edilmiş bir camsı karbon elektrodunu kullanarak yeni ve kolay bir 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) sensörü geliştirmiştir. Bu çalışmada oksidatif DNA hasarı, Fenton reaksiyonu ($Fe^{2+}$ + $H_2O_2$) sonucu oluşan •OH ile elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensör ile hasar ürünü olarak oluşan ve oksidatif DNA hasarının biyobelirteci olarak tanımlanan 8-OHdG'nin (LOD= $1{,}88\times10^{-8}$ M) tayini yapılmıştır.

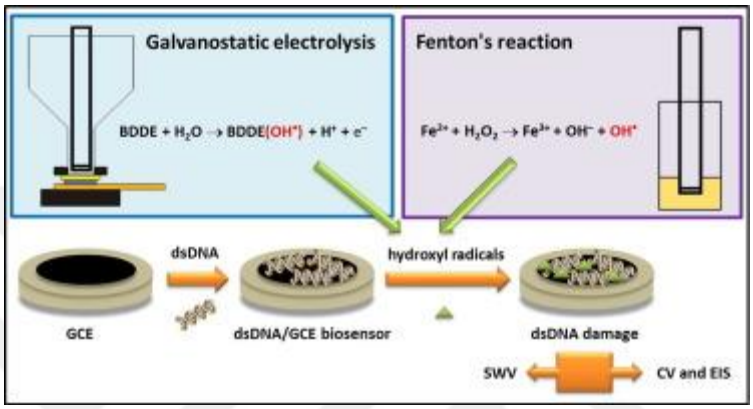



**Şekil 2.28:** Guo ve diğ. tarafından geliştirilen yöntemin şeması [214].

Wang ve Jiao tarafından [215] metal aracılı DNA hasar yolunu taklit etmek için poli(dimetildiallilamonyum klorür) (PDDA) ve hasar görmemiş DNA içeren bir zara MWCNT'ler ve Fe@$Fe_2O_3$ karışımı dahil edilerek yeni bir DNA hasarı elektrokimyasal biyosensörü geliştirilmiştir. DNA hasarı için Fenton reaktifleri ($H_2O_2$ ve demir iyonu), kullanılmıştır. $H_2O_2$ ve demir iyonu, filmdeki DNA'ya saldıran hidroksil radikalini vermek üzere daha fazla reaksiyona girmiştir. DNA hasarı, bir elektrokimyasal indikatör olan $Co(phen)_3^{3+}$'nın DPV sinyali izlenerek saptanmıştır. Bir başka elektrokimyasal gösterge olan $Ru(NH_3)_6^{3+}$'da tamamlayıcı bir araç olarak DNA hasarını izlemek için kullanılmış ve minimum saptanabilir DNA hasarı miktarı, 0,16 µg olarak bulunmuştur. İyi bir tekrarlanabilirliğe sahip olan bu biyosensör 11 kez kullanıldıktan sonra ilk tespit sinyalinin % 90'ı elde edilmiştir.

Hájková ve diğ. [216] çift sarmallı DNA'nın GCE yüzeyine adsorbe edilmesiyle basit bir elektrokimyasal DNA biyosensörü hazırlamıştır ve ardından hidroksil radikalleri tarafından indüklenen dsDNA hasarının tespiti için kullanmışlardır. Hidroksil radikalleri ve dsDNA

arasındaki karşılıklı etkileşimin araştırılması, birkaç elektrokimyasal saptama tekniğinin bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir: dsDNA bazlarının oksidasyonunun doğrudan izlenmesi için SWV ve dolaylı elektrokimyasal yöntemler olarak, CV ve EIS kullanılmıştır. Hidroksil radikalleri, bor katkılı bir elmas elektrodun yüzeyinde elektrokimyasal olarak ve kimyasal olarak (Fenton reaksiyonu veya Fe(II)'nın oto-oksidasyonu yoluyla) üretilmiştir. Guanozin ve adenozinin pik akımı, hidroksil radikalleri oluşumuna bağlı olarak azalmıştır.

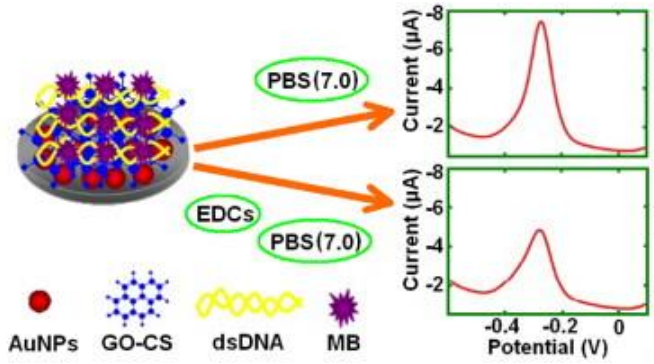



**Şekil 2.29:** Hájková ve diğ. tarafından geliştirilen sensörün şematik gösterimi [216].

Lu ve diğ. [217] poli(dimetildiallilamonyum klorür (PDDA) ve buzağı timus çift sarmallı DNA'nın (CT-dsDNA) katman katman filmlerinin bir GCE'nin yüzeyinde birleştirilmesiyle bir DNA elektrokimyasal sensörü ((PDDA/DNA)$_3$/GCE) hazırlamıştır. Ru(bpy)$_3^{2+}$, membrandaki DNA'nın oksidatif hasarını tespit etmek için elektrokimyasal katalizör olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin ve Fenton reaktifinin konsantrasyonunun DNA hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak, Fenton reaktifinde 15 dk inkübe edildiğinde büyük ölçüde hasarın oluştuğu bulunmuştur.

Lin ve diğ. [99] bisfenol A (BPA), 4-nonilfenol (NP) ve 4-t-oktilfenol (OP) olmak üzere üç endokrin bozucu bileşikten (EDC'ler) herhangi birinin neden olduğu DNA hasarını dolaylı olarak tespit edebilen bir elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. Redoks göstergesi olarak MB boyası kullanıldığı yöntemde GCE, bir dsDNA/GO-CS/AuNPs/GCE sensörü üretmek için birleştirilmiş, dsDNA/grafen oksit-kitosan/altın nanopartikülleri tarafından modifiye edilmiştir. Geliştirilen sensör EIS, CV ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniklerinin kullanımı ile karakterize edilmiştir. MB boyasının dsDNA/GO-CS/AuNPs filmi tarafından yüklenmesi/bırakılması araştırılmış ve sonuçlar işlemin tersinebilir olduğunu göstermiştir. Buradan yola çıkılarak geliştirilen sensör, filmlerdeki sağlam ve hasarlı dsDNA'nın yükleme

yetenekleri arasındaki farkı ölçmek için kullanılmıştır. Daha sonra DNA hasarını elektrokimyasal olarak tespit etmek için DPV yöntemi kullanılarak başarıyla uygulanmıştır.

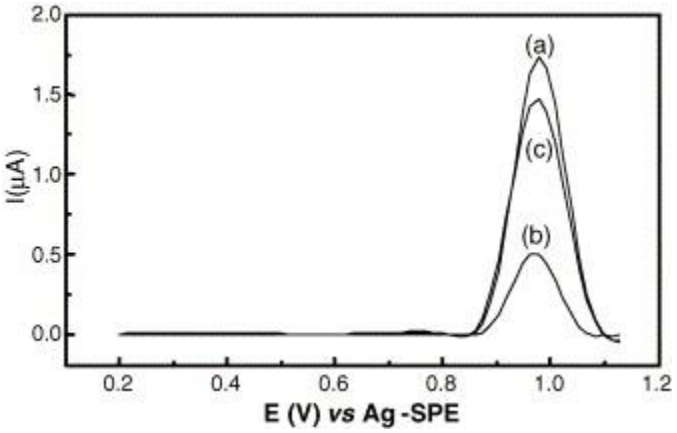



**Şekil 2.30:** Lin ve diğ.'nin deney şeması [99].

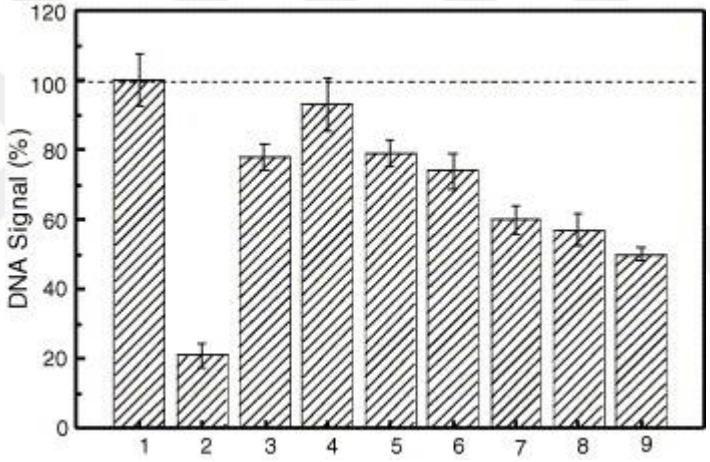
### 2.13.2. Oksidatif DNA Hasarı Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayini

Son yıllarda, antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için elektrokimyasal DNA tabanlı sensörler geliştirilmeye başlamıştır. Katı elektrotlar üzerindeki DNA nükleobazların, özellikle G ve daha az ölçüde A üzerindeki oksidasyonu, karbon elektrotlarına verilen hasarın ardından azalan oksidasyon akımının kullanılmasına izin vermektedir [152,218].

Mello ve diğ. [218] in vitro DNA hasarını tespit etmek ve bitki ekstraktlarının hasarı engelleyici antioksidan özelliklerini değerlendirmek için elektrokimyasal biyosensöre dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen biyosensör, SPE üzerinde hareketsiz hale getirilmiş bir dsDNA'dan oluşmaktadır. DNA hasarı, Fenton tipi reaksiyon yoluyla •OH radikallerinin üretilmesiyle desteklenmiştir. Radikal türlerin, antioksidanların yokluğunda ve varlığında immobilize DNA ile etkileşimi, SWV ile elde edilen G oksidasyon pikindeki değişiklikler vasıtasıyla değerlendirilmiştir. Elektrot yüzeyinde hareketsiz hale getirilen DNA tabakasının bölünmesi, elektrodun önce demir/EDTA iyonları içeren bir reaktif çözeltisine daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, çözeltiye $H_2O_2$ eklenerek başlatılmıştır. Bu adımda, reaksiyon ortamında •OH üretilmiş ve DNA katmanına saldırı, radikallerin dönüştürücünün yüzeyine difüzyonu yoluyla olmuştur. Kısa bir süre sonra, elektrot yıkanıp asetat tamponuna daldırılmıştır (Ag referans elektroduna karşı yaklaşık (+) 1,0 V) ve G oksidasyon piki ölçülmüştür (~% 80 hasar). Antioksidanların etkisi, troloksun ve numunelerin alikotlarının (küçük hacimlerinin) sisteme eklenmesiyle değerlendirilmiş ve koruyucu etkisi doğrulanmıştır (~% 37,5-75 koruyucu etki) (Şekil 2.31 ve 2.32).




**Şekil 2.31:** DNA-biyosensörünün SWV ile elde edilen voltamogramları (pH 4,75 asetat tamponunda); (a) DNA (blank); (b) Elektrodun Fenton çözeltisine daldırılması sonrası ($Fe^{2+}$:EDTA:$H_2O_2$ (1:2:40)); (c) Elektrodun Fenton çözeltisi + *B. Genistelloides* bitki ekstraktına daldırılması sonrası [218].




**Şekil 2.32:** Doğal antioksidanların DNA hasarına etkisi. (1) DNA (blank); (2) Fenton çözeltisi (1:2:40) $Fe^{2+}$:EDTA:$H_2O_2$; (3) Troloks = $1\times10^{-4}$ M); (4) Baccharis gen- stelloides; (5) *Peumus boldus*; (6) *Foeniculum vulgare*; (7) *Cymbopogom citratus*; (8) *Camellia sinensis*; (9) *Mentha piperita*.

Ziyatdinova ve Labuda [219] yüksek moleküler ağırlıklı maddelerin girişimlerine karşı bir dış küre membranı ile korunan bir DNA biyosensörü hazırlamak amacıyla, bir karbon film elektrodunu (CFE) dsDNA ve kitosan (CTS) ile modifiye etmişlerdir. Fenton tipi reaktifler kullanarak DNA hasar tayini gerçekleştirmişlerdir. CV, SWV ve EIS teknikleri kullanılarak, DNA'nın •OH ve $O_2^{\bullet-}$ radikalleri tarafından gerçekleştirilen oksidatif hasarını ve sarmal yapının açılmasını tespit etmişlerdir. Beş dakikalık inkübasyondan sonra, derin DNA bozunma süreci nedeniyle G ve A pik akımlarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Böylece, CTS/DNA/CFE biyosensörünün, incelenen ROS tarafından DNA hasarını tespit edebildiği

bulunmuştur. Son olarak ticari elma ve portakal sularında bulunan antioksidanların DNA'daki oksidatif hasara etkisi geliştirilen biyosensör ile incelenmiştir.

Ziyatdinova ve diğ. [220] ayrıca MWCNT'ler ve dsDNA'nın SPCE yüzeyinde biriktirilmesiyle yeni impedimetrik nanoyapılı tek kullanımlık DNA biyosensörü (DNA/MWCNT/SPCE) geliştirmişlerdir. DNA/MWCNT/SPCE sensörü ile reaktif oksijen türlerinin neden olduğu derin DNA hasarının değerlendirilmesi yapılmıştr. DNA hasarı üzerine, rutin bileşiği ve çay ekstraktlarının antioksidatif etkilerine bakılmıştır. Sensörün çeşitli rutin konsantrasyonları varlığında hasara maruz kalmasından sonra redoks probunun elektron transfer direncinde ve CV yanıtında değişiklikler bulunmuştur. Beklendiği gibi, artan rutin konsantrasyonu ile hasara uğramadan kalan DNA kısmı artmış ve böylece rutinin yüzeyle sınırlı DNA katmanına karşı koruyucu etkisi doğrulanmıştır.

Labuda ve diğ. [221] DNA ile modifiye edilmiş karbon bazlı SPE yüzeyindeki DNA hasarını önlemeye dayalı olarak, bitki ekstraktlarının antioksidatif aktivitesinin voltametrik tespiti için basit bir prosedür geliştirmişlerdir. Bir dsDNA elektrokimyasal etiketi olarak $[Co(phen)_3]^{3+}$ kompleks iyonu kullanılmıştır. DNA hasarı demir atomunun elektrokimyasal indirgenmesi altında $H_2O_2$'li [Fe(EDTA)]-kompleksi varlığında gerçekleştirilmiştir. DNA tabakasına bağlanan $[Co(phen)_3]^{3+}$ miktarı, hasar sırasında orijinal dsDNA kısmındaki bir azalma ile azalmıştır. Antioksidan standardı olarak rozmarinik ve kafeik asitler gibi fenolik antioksidanların ve melisa, kekik vb. bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri bulunmuştur. Antioksidan aktiviteler, % 10 (v/v) metanol ile hasar karışımına eklenerek incelenmiştir. Bu metanol içeriğinin DNA/SPE sensörü ve dolayısıyla redoks işaretleyici sinyali üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı boş bir deneyde test edilmiştir. Test edilen tüm numunelerin yüzeye bağlı DNA'yı hasardan güçlü bir şekilde koruduğu gösterilmiştir. Antioksidanların etkisi konsantrasyonları ile artmış ve yüksek konsantrasyonlarda koruma sabitlenmiştir.

Kuzin ve ark tarafından adsorbe edilmiş pillararen molekülleri ve karbon siyahı ile kaplanmış camsı karbon elektrot platformunda voltametrik bir DNA sensörü önerilmiştir. Doğal veya oksidatif olarak hasar görmüş DNA varlığında gerçekleştirilen nötral kırmızının elektropolimerizasyonu, aktivitesi DNA koşullarına bağlı olan hibrit materyalin oluşumuyla sonuçlanmıştır. DNA ve pillararen polimerik boyanın redoks aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmış ve $Cu^{2+}/H_2O_2$ karışımı ile üretilen reaktif oksijen türleri tarafından hasar gören

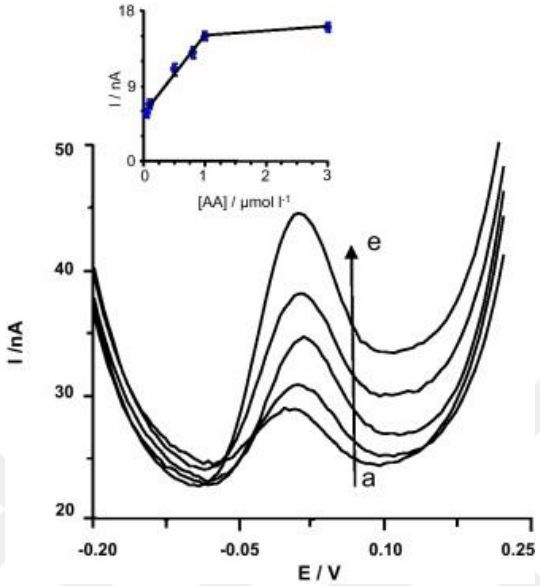
DNA için pik akımlarında önemli bir artış bulunmuştur. Geliştirilen DNA sensörünün uygulanabilirliği, antioksidan olarak askorbik asit örneği üzerinde gösterilmiştir [222].

Uzunboy ve diğ. DNA üzerinde Fenton oksidasyonu tarafından oluşturulan ortalama toplam hasarı belirlemek için modifiye edilmiş bir CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgemeye dayalı antioksidan kapasite) kolorimetrik ölçüm yöntemi geliştirmişlerdir. Suda çözünür antioksidanların DNA koruyucu etkileri, yapay problar kullanan yöntemlerden fizyolojik olarak daha gerçekçi olduğu düşünülen yeni bir antioksidan aktivite analizi tasarlamak için kullanılmıştır. Ayrıca, Fenton reaksiyonu yoluyla DNA bozunması, DNA immobilize PGE'ye dayanan bir elektrokimyasal biyosensör teknolojisi ile araştırılmıştır. G'nin oksidasyon sinyalindeki değişiklikler, antioksidanların yokluğunda/varlığında Fenton reaktifleri ile DNA etkileşiminden önce/sonra ölçülmüştür [11].

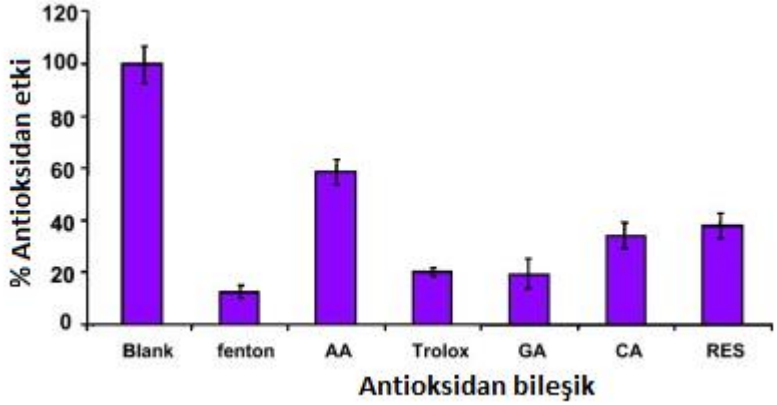
Chen ve diğ. [223] dopaminin Fenton reaktifleri varlığında yükseltgenmesi ile ortaya çıkan •OH radikalinin sebep olduğu DNA hasarını $[Co(bpy)_3]^{3+}$ redoks probu varlığında incelemişlerdir. GCE üzerine modifiye edilen dsDNA ve ssDNA'daki hasar, dopamin/$Fe^{3+}$ reaksiyonu ve DPV ile araştırılmıştır. DNA hasarı üzerinde inkübasyon süresi ve dopamin/$Fe_2(SO_4)_3$ molar oranının etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, deney sonuçları hem askorbik asit hem de rutinin DNA'yı oksidatif hasardan verimli bir şekilde koruyabildiğini kanıtlamıştır.

Barroso ve diğ. [19] antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için CPE üzerine adsorbe edilen A açısından zengin bir oligonükleotidin ($dA_{21}$) kullanılmasını önermişlerdir. Yöntem, Fenton reaksiyonu ile üretilen •OH radikalleri tarafından elektrot yüzeyinde adsorbe edilen bir DNA tabakasının kısmi hasarına ve ardından NADH'nin oksidasyonunu katalize edebilen bir oksidasyon ürünü oluşturmak için bozulmamış A bazlarının elektrokimyasal oksidasyonuna dayanmaktadır. Hem A hem de G homopolinükleotitlerinin nötr veya alkali koşullarda elektrokimyasal oksidasyonunun, NADH'nin oksidasyonunu katalize eden ortak bir oksitlenmiş ürünün oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir [224]. Bu nedenle, DNA-CPE'nin Fenton karışımına daldırılmasından sonra üretilen oksidatif lezyonlar, elektrot yüzeyinde oksitlenmeden kalan A'nın elektrokimyasal oksidasyonundan sonra dolaylı olarak ölçülmüştür. Test edilen koşullar altında, her iki radikal de DNA'da yaklaşık % 87,6'lik bir hasar üretmiştir. Antioksidan bileşiklerin (askorbik asit, troloks, gallik asit, kafeik asit ve resveratrol) varlığı, •OH radikallerini süpürerek DPV ile ölçülen NADH'nin elektrokatalitik akımını arttırmıştır. Koruma etkinliği (% 19 - 59), çeşitli antioksidan bileşikler için değerlendirilmiştir. Geliştirilen

biyosensör, çeşitli içeceklerde toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde uygulanmış ve sonuçlar, antioksidan profilinin genel bir resmini elde etmek için diğer metodolojiler kullanılarak elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.



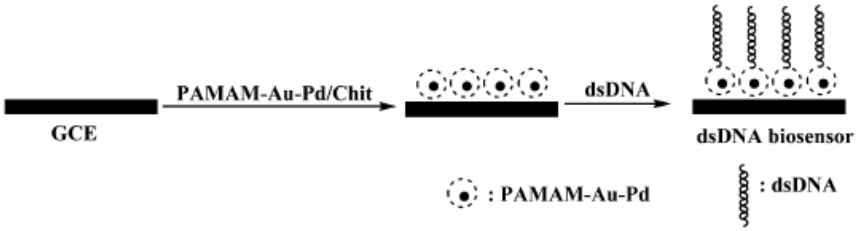

**Şekil 2.33:** Barroso ve diğ.'nin [19] geliştirdiği DNA-CPE'nin (a) 0,05, (b) 0,10, (c) 0,50, (d) 0,80 ve (e) 1,00 µmol/L AA varlığında Fenton çözeltisine daldırılması sonucu elde edilen diferansiyel puls voltamogramları. Küçük şekil: AA (askorbik asit) konsantrasyonu ve $I_a$ arasındaki ilişkiyi göstermektedir.




**Şekil 2.34:** Antioksidanların hidroksil radikali süpürme etkilerinin karşılaştırılması: AA-askorbik asit; GA-gallik asit; CA-kafeik asit; RES-resveratrol [19].

Qian ve diğ. [152] bir poli(amidoamin) maddesinin amin ile bitirilmiş bir dendrimerin varlığında (PAMAM) altın-palladyum (Au-Pd) bimetalik nanopartikülleri hazırlamışlardır. GCE üzerine bir kitosan kompoziti içinde dendrimer-enkapsüle bimetalik nanopartiküllerin ince bir tabakası üzerine dsDNA'nın immobilize edilmesiyle yeni bir elektrot üretmişlerdir.

Hazırlanan biyosensör kullanılarak, immobilize DNA'nın oksidatif hasarı ve Serisin proteinin ve TR'nin % antioksidan etkileri (% 70 ve 89) SWV tekniği kullanılarak tayini edilmiştir.

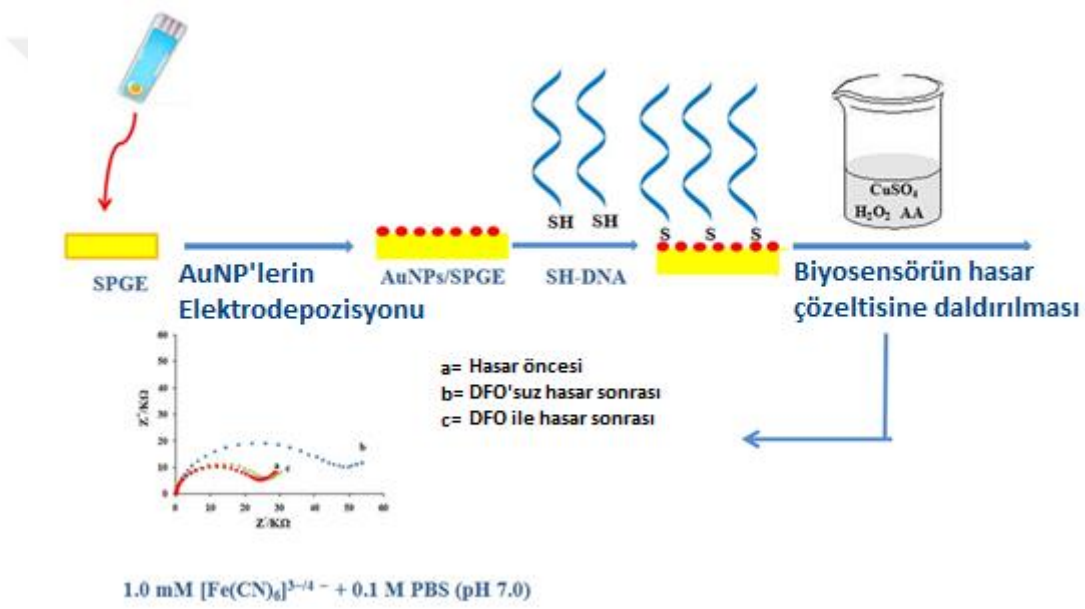



**Şekil 2.35:** Qian ve diğ.'nin geliştirdiği [152] camsı karbon elektrodun modifikasyon şeması.

Xiong ve diğ. [225] DNA hasarının hızlı tespitini araştırmak için bir ksantin oksidaz (XOD)-modifiye GCE üzerinde hareketsiz hale getirilmiş dsDNA'ya dayalı hassas bir elektrokimyasal biyosensör (DNA–XOD/GCE) geliştirmiştir. $Co(bpy)_3^{3+}$, ksantin/$FeSO_4$ sisteminde XOD katalizli bir Fenton reaksiyonu tarafından üretilen reaktif bir oksijen türü olan •OH tarafından indüklenen DNA hasarını izlemek için bir redoks göstergesi olarak kullanılmıştır. Elektrotların elektrokimyasal davranışı, SWV ve EIS ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, DNA'nın askorbik asit, aloe-emodin ve rutin gibi antioksidanlar tarafından hasara karşı korunması araştırılmıştır. Sonuçlar, önerilen elektrokimyasal yöntemin DNA hasar çalışmaları için daha sonraki uygulamalarda kullanılmasının beklendiğini göstermektedir.

Hashkavayi ve diğ. [226] Acanthophora kırmızı makro-alglerinin (Bushehr-İran'ın Basra Körfezi kıyılarından toplanan) antioksidan aktivitesini ölçmek için hızlı ve hassas bir elektrokimyasal yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, Acanthophora alg özütünün Fenton reaksiyonunun ($Cu(II)+H_2O_2$) neden olduğu DNA hasarını önleme yeteneğini araştırmak için, yeşil yöntem ile sentezlenen altın nanopartiküller (elektrokimyasal sinyali iyileştirmek için) modifiye edilmiş SPE yüzeyinde tiyollenmiş DNA (insan interlökin-2 (IL-2) gen) probunun immobilizasyonuna dayalı bir elektrokimyasal biyosensör tasarlanmıştır. Bu sensör yosun ekstraktının fenolik ve antioksidan içeriği, spektrofotometrik antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinde kullanılan, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) ($ABTS^{\bullet+}$) reaktifleri ile ölçülmüştür. Ekstraktın ABTS ve DPPH radikalleri üzerindeki inhibitör etkisini araştırmak için DPV tekniği kullanılmıştır. Daha sonra alg ekstraktının koruyucu etkisi EIS ile incelenmiştir. Sonuçlar, ekstraktın 0,20 mg/mL konsantrasyonunda, DNA bozunma miktarının minimum düzeyde olduğunu göstermiştir.

Mousavisani ve diğ. [227] DNA hasar sürecini araştırmak ve ayrıca deferoksaminin (DFO) bir antioksidan olarak koruyucu davranışını incelemek için DNA/AuNP'ler modifiye perde baskılı altın elektrota (DNA/AuNPs/SPGE) dayalı yeni ve hassas bir elektrokimyasal biyosensörü geliştirmişlerdir. Önerilen biyosensör, AuNP'lerin SPGE üzerine elektrodepozisyonu ve ardından tiyollenmiş DNA'nın kimyasal immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. DNA hasarı Fenton reaksiyonu ($Cu(II)+H_2O_2$) sırasında üretilen •OH ile oluşturulmuştur. DNA hasarını izlemek için EIS tekniği uygulanmış ve DNA hasarını takiben yük transfer direncindeki ($R_{ct}$) artış bir gösterge olarak kabul edilmiştir.




**Şekil 2.36:** Mousavisani ve diğ. tarafından geliştirilen DNA sensörünün hazırlanışı ve DNA hasar tespiti prosedürünün şematik gösterimi [227].

# 3. MALZEME VE YÖNTEM

## 3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal madde ve örnekleri tartmak için Radwag WAS 220/X hassas terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Sonorex marka ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Velp marka girdap karıştırıcı, 1-10, 10-100 ve 100-1000 µL'lik Eppendorf Marka mikropipet, distile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 marka su sistemi, Varian Cary 100 Bio model UV-GB spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, elektrokimyasal analizler için GAMRY INSTRUMENTS Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA model voltametre cihazı, voltametre cihazında ölçümler yapabilmek için kullanılacak olan elektrotlardan çalışma elektrodu olarak, BASI MF-2012 model camsı karbon elektrodu, BASI MF-2052 model Ag/AgCl (3 M KCl) referans elektrodu, BASI MF-2013 model platin karşıt elektrot, kromatografik çalışmalar için Waters marka HPLC sistemi, elektotların yüzey karakterizasyonu için kullanılan FEI QUANTA FEG SEM 450 marka SEM görüntüleme cihazı ve bitki örneklerinin ekstraksiyonu için Milestone ETHOS One marka Mikrodalga sistemi kullanıldı.

## 3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Kullanılan kimyasal maddeler; çift sarmal DNA (dsDNA, fish sperm), bakır(II) sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$), sodyum asetat ($CH_3COONa$), asetik asit ($CH_3COOH$), nitrik asit ($HNO_3$), disodyum monohidrojen fosfat ($Na_2HPO_4$), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4$), hidroklorik asit (HCl), sodyum klorür (NaCl), karbon nanotüp (saflık>95% D×L 6.9×5 µm), % 17'lik (v/v) tetrakloro aurat asit ($HAuCl_4$) çözeltisi, % 5 (v/v) perflorlanmış nafyon çözeltisi, etanol (EtOH), metanol (MeOH), sodyum hidroksit (NaOH), glutatyon (GSH), askorbik asit (AA), rozmarinik asit (RA), klorojenik asit (CA), kuersetin (QR), rutin (RT), kateşin (CT), epikateşin (EC), epikateşin gallat (ECG), N-asetil sistein (NAC), gallik asit (GA), adenin, sitozin, guanin, bovin serum albümin (BSA), ürik asit (ÜA), dopamin (DA, 3,4-dihidroksi fenetilamin), glukoz, fetal bovin serum (FBS) (sentetik serum), alümina ($Al_2O_3$), potasyum ferrisiyanür ($K_3[Fe(CN)_6]$), potasyum ferrosiyanür ($K_4[Fe(CN)_6]$), potasyum klorür (KCl), sülfirik asit ($H_2SO_4$), trisodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7$), sisteamin, sodyum bor hidrür ($NaBH_4$), dimetil formamid (DMF).

## 3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler deney öncesinde oksijen gazının girişimini engellemek için % 99,99 saflıkta azot gazı ile 2 dk doyuruldu. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

**50 mM Asetat Tampon Çözeltisinin (ABS) Hazırlanması:** 50 mM olacak şekilde sodyum asetat ve asetik asitten hazırlandı (bidistile su ile). Çözeltinin pH'sı 4,8 olacak şekilde gerekli pH ayarlamaları NaOH ile gerçekleştirildi. Elektrokimyasal ölçümlerde iyonik şiddeti dengelemek amacıyla, son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde, NaCl ilave edildi.

**50 mM Fosfat Tamponu Çözeltisinin (PBS) Hazırlanması:** 50 mM olacak şekilde sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat çözeltilerinden hazırlandı (bidistile su ile). Çözeltinin pH'ı 8,5 olacak şekilde gerekli pH ayarlamaları NaOH ile gerçekleştirildi. Elektrokimyasal ölçümlerde iyonik kuvveti dengelemek amacıyla, son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde, NaCl ilave edildi.

**Guanin, Adenin ve Sitozin Standartlarının Hazırlanması:** 1000 ppm olacak şekilde tartılan standartlar öncelikle 1 mL 0,1 M HCl ile çözüldü ve ardından 20 mM NaCl içeren 50 mM pH 4,8 asetat tamponu ile tamamlanarak hazırlandı.

**dsDNA Çözeltisinin Hazırlanması:** 1000 ppm stok dsDNA çözeltisi iyonik kuvveti dengelemek amacıyla 20 mM NaCl içeren 50 mM pH 4,8 asetat tamponunda hazırlandı.

**Çok Duvarlı Karbon Nanotüpün (MWCNT) Hazırlanması:** 0,05 g karbon nanotüp ultrasonik çalkalama (30 dk) yardımıyla 60 mL 2,2 M $HNO_3$ içinde 20 saat boyunca oda sıcaklığında disperse edildi (karboksilik asit grupları oluşturularak fonksiyonalize edildi). Daha sonra bidistile su ile yıkanıp etüvde 37 °C'de kurutuldu [228]. Kurutulan MWCNT, dimetil formamid (DMF) çözücüsü ile konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 30 dk ultrasonik su banyosunda bekletildi.

**MWCNT-Nafyon Çözeltisinin Hazırlanması:** Hazırlanan MWCNT (10 mL) içerisine % 0,01 (v/v) içerecek şekilde Nafyon çözeltisi (DMF ile seyreltilen sıvı nafyon) ilave edildi ve modifikasyonda kullanıldı. Her modifikasyon öncesi 5 dk ultrasonik su banyosunda bekletildi.

Antioksidan Çözeltilerinin Hazırlanması: Stok çözeltileri 10 mM olacak şekilde bidistile su ile hazırlandı. Kuersetin ve rutin standartları % 10 (v/v) EtOH içerecek şekilde hazırlandı.

**$CuSO_4.5H_2O$ çözeltisinin hazırlanması:** Stok çözelti 6 mM olacak şekilde bidistile su ile hazırlandı.

**Ferri-ferrosiyanür $[Fe(CN)_6^{3-/4-}]$ Çözeltisinin Hazırlanması:** Potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür 5 mM olacak şekilde tartıldı ve 1 mL 0,1 M HCl ile çözüldü. Sonrasında 0,1 M KCl içeren bidistile su ile tamamlandı.

**Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması:** Bitki örneklerinin ekstraksiyonu mikrodalga ekstraksiyon sistemi kullanılarak teflon (PTFE) kaplarda, fiber optik sıcaklık kontrol sistemi ve kapalı fırın sistemi kullanılarak gerçekleştirildi [229]. Bitki çayı olarak satılan ticari ürünler marketten temin edildi ve öğütüldü. Öğütülmüş hale getirilen bitki örneklerinden (yeşil çay, elma çayı, ekinzeya ve ıhlamur) 1 g tartım alınarak üzerine 15 mL distile su (antioksidan standartları su ile hazırlandığından literatürden farklı olarak ekstraksiyon işlemleri sadece bidistile su kullanılarak yapıldı) ilave edildi. Teflon kaplara hazırlanan bu karışımın içerisine manyetik karıştırıcı konulup simetrik olarak cihaz içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sırasında 500 W güç uygulanarak 3 dk'da çalışma sıcaklığı olan 80 °C'ye ulaşıldı. Bunu takip eden 3 dk içerisinde sıcaklık 80 °C'de sabit tutuldu ve son 5 dk içerisinde soğumaya bırakılarak ekstraksiyon işlemi 11 dakikada tamamlandı. Elde edilen tüm bitki çayı ekstraktları 0,45 µm membran filtreden süzülüp analize kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

**Bovin Serum Albümin, Ürik Asit, Dopamin, Glukoz ve Fetal Bovin Serum (Sentetik Serum) Çözeltilerinin Hazırlanması:** Ürik asit 0,01 M NaOH çözeltisi içerisinde ve bazın aşırısı 0,01 M HCl çözeltisi ile nötralleştirilerek hazırlandı. Dopamin, glukoz ve bovin serum albümin ise bidistile su ile hazırlandı. Fetal bovin serum ise su ile seyreltilerek kullanıldı.

**Altın Çözeltisinin Hazırlanması [230]:** % 0,04 (v/v)'lük altın çözeltisinin hazırlanması için % 17'lik (v/v) Tetrakloro aurat asit ($HAuCl_4$) stok çözeltisinden 118 µL alındı ve üzerine son hacmi 50 mL'ye tamamlanacak şekilde bidistile su ilave edildi.

**Yüzeyi (-) Yüklü Altın Nanopartiküllerin Hazırlanması:** Turkevich ve Frens yöntemlerine göre trisodyum sitrat varlığında indirgeme yapılarak hazırlandı [184,185]. Tetrakloro aurat asidi ($HAuCl_4$) çözeltisi, 250 mL hacimde, son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde bidistile

suyla seyreltilerek hazırlandı ve 500 mL'lik iki boyunlu balona aktarıldı. Balona manyetik bar atıldıktan sonra geri soğutucu altında karıştırılarak ısıtılmaya başlandı. Altın (III) çözeltisi kaynamaya başladıktan sonra içerisine 3,8 mM olacak şekilde trisodyum sitrat çözeltisi hızlıca eklendi. Karışım 15 dk geri soğutucu altında ısıtılmaya devam edildi (90 ˚C). Bu süre zarfında altın çözeltisi ayva sarısı renkten kırmızı renge dönüşmeye başladı ve bu şekilde AuNP'lerin oluştuğu gözlemlendi. Oda sıcaklığında soğuyana kadar karıştırılmaya devam edildi.

**Yüzeyi (+) Yüklü AuNP'lerin [231]:** AuNP'ler sisteamin varlığında, tetrakloro aurat asidinin sodyum bor hidrür ($NaBH_4$) çözeltisi ile indirgenmesiyle hazırlandı. Tetrakloro aurat asidi ($HAuCl_4$) çözeltisi, 40 mL hacimde, son konsantrasyonu 1,42 mM olacak şekilde bidistile suyla seyreltilerek hazırlandı ve üzerine 400 µL 213 mM sisteamin çözeltisi ilave edildi ve 20 dk oda sıcaklığında karıştırıldı. Ardından ortama 10 µL 10 mM $NaBH_4$ ilave edildi ve 10 dk daha karanlıkta güçlü bir şekilde karıştırıldı. Koyu kırmızı renkli AuNP çözeltisi +4 °C'de saklanarak kullanıldı.

## 3.4. ELEKTROKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Elektrokimyasal ölçümler, 20 mL'lik hücreler kullanılarak yapıldı. Her çalışmada pH'sı ayarlanmış olan 4 mL tampon çözeltisi hücreye konuldu ve çözeltiden ölçümler öncesinde 2 dk azot gazı geçirilip çözünmüş oksijen ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre içerisine çalışma elektrodu, referans elektrot Ag/AgCl ve karşıt elektrot Pt elektrot daldırıldı ve elektrot bağlantıları yapıldı. Her ölçüm öncesinde tanık ortam olarak elektrokimyasal ölçümler alınıp zemin sinyali olarak kaydedildi.

## 3.5. CAMSI KARBON ELEKTRODUN TEMİZLENMESİ VE ÖN İŞLEMİ

**Temizlenmesi:** Tekrar edilebilir yüzey oluşturabilmek amacıyla çalışma elektrodu olarak seçilen camsı karbona mekanik yoldan parlatma ön işlemi uygulandı. Bu amaçla camsı karbon elektrot için yumuşak bir temizleme keçesi ve alümina ($Al_2O_3$) kullanıldı. Keçe suyla ıslatıldıktan sonra üzerine alümina çözeltisinden (0,05 µm) az miktarda döküldü. Elektrot yüzeyi bu süspansiyon üzerinde dairesel hareketler yapılarak birkaç dakika parlatıldı. Ön işlem gören elektrot, suyla yıkandıktan sonra elektrot yüzeyini tamamen temizlemek amacıyla önce su ve ardından EtOH ile 10 dk süreyle ultrasonik su banyosunda bekletildi. Son olarak elektrotlara 300 s açık devre potansiyeli uygulanarak elektrotlar kullanıma hazır hale getirildi.

**Ön işlem (Elektroaktif hale getirme):** Temiz halde olan camsı karbon elektrotlar öncelikle tampon ortamında elektroaktif hale getirildiler. Bunun için öncelikle 300 s 1,75 V kronoamperometri uygulandı. Son olarak dengeye getirmek için 0,3 V – 1,25 V, 5 döngü, CV uygulandı [232].

## 3.6. CAMSI KARBON MODİFİYE ELEKTRODUN HAZIRLANMASI İÇİN ÖN DENEMELER

### 3.6.1. Farklı AuNP'ler ile GCE Yüzeyinin Modifikasyonu

Çalışma elektrodunun (GCE) modifikasyonunda ilk aşama olarak AuNP'ler üç farklı şekilde hazırlandı. İlk iki uygulamada, hazırlanan (–) yüklü ve (+) yüklü AuNP'ler elektrot yüzeyinin damlatma tekniği ile kaplanması için kullanıldı. Son olarak da döngüsel voltametri (CV) ile elektrodepozisyon tekniği kullanılarak elektrot yüzeyinin AuNP'ler ile kaplanması sağlandı.

#### *3.6.1.1. Damlatma Tekniği Kullanılarak Yüzeyi (-) Yüklü AuNP'ler ile Modifikasyon*

Elektroaktif hale getirilen camsı karbon elektrot yüzeyine (–) yüklü AuNP çözeltisinden 5 µL damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

#### *3.6.1.2. Damlatma Tekniği Kullanılarak Yüzeyi (+) Yüklü AuNP'ler ile Modifikasyon*

Elektroaktif hale getirilen camsı karbon elektrot yüzeyine (+) yüklü AuNP çözeltisinden 5 µL damlatılıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

#### *3.6.1.3. Elektrodepozisyon Tekniği Kullanılarak AuNP'ler ile Modifikasyon*

Elektroaktif hale getirilen camsı karbon elektrot yüzeyinde, CV tekniği kullanılarak elektrodepozisyon ile AuNP'ler oluşturuldu [230]. Bunun için çalışma hücresine 2,5 mL % 0,04 (w/v) $HAuCl_4$ çözeltisi ve 2,5 mL 0,1 M $H_2SO_4$ çözeltisi ilave edildi. Çözeltiden 5 dk $N_2$ geçirildikten sonra elektrotlar hücreye daldırıldı ve (−) 0,4 – (+) 0,4 V aralığında, 50 mV/s tarama hızıyla, 30 döngü CV ile kaplama yapıldı. Bu işlem sonucunda elektrot yüzeyinin sarı renkli altın nanopartüküllerle kaplandığı görüldü.

### 3.6.2. Farklı AuNP'ler ile Kaplanan GCE'lerin MWCNT ile Modifikasyonu

DNA bazlarının yüzeye immobilizasyonunu artırmak amacıyla AuNP kaplanmış GCE'ler MWCNT ile modifiye edildi. Bu amaçla Bölüm 3.6.1'de belirtildiği şekilde farklı AuNP'ler ile kaplanan camsı karbon elektrot yüzeylerine mikropipet yardımıyla 2,5 µL MWCNT damlatılıp etüvde 35 ˚C'de kurutularak modifikasyon işlemi tamamlandı.

### 3.6.3. GCE'nin MWCNT ile Modifikasyonu (GCE/MWCNT)

Elektroaktif hale getirilen GCE üzerine 2,5 µL MWCNT damlatılıp etüvde 35 ˚C'de kurutulmasıyla MWCNT ile modifiye (AuNP olmadan) elektrot hazırlandı.

### 3.6.4. Hazırlanan Modifiye Elektrotların Karşılaştırılması

AuNP'lerin tayine etkisi ve uygun olan AuNP hazırlama yönteminin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.6.2 ve 3.6.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan aşağıda belirtilen modifiye elektrotlar 250 ppm DNA varlığında karşılaştırıldı;

i. GCE/(+)AuNP/MWCNT
ii. GCE/(–)AuNP/MWCNT
iii. GCE/30CVAuNP/MWCNT
iv. GCE/MWCNT

### 3.6.5. MWCNT-Nafyon ile Modifiye Elektrodun Hazırlanması

Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan MWCNT-Nafyon çözeltisinden mikropipet yardımıyla 2,5 µL alınarak elektrodepozisyon tekniği ile AuNP kaplanan (30 döngü) camsı karbon elektrot yüzeyine damlatıldı (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon). Etüvde 35 ˚C'de kurutulmasının ardından 250 ppm dsDNA immobilize edilerek analize hazır hale getirildi.

### 3.6.6. Modifikasyon Malzemelerinin (AuNP ve MWCNT-Nafyon) Sıralamasının Etkisi

Modifikasyonun ve kullanılan malzemelerin sıralamasının DNA bazlarının oksidasyon akım sinyallerine etkisini incelemek amacıyla aşağıda belirtildiği şekilde 5 farklı elektrot hazırlandı;

i. GCE: Elektroaktif hale getirilen yalın (modifiye olmayan) GCE.
ii. GCE/AuNP: Elektroaktif hale getirilen GCE yüzeyi CV tekniği ile 30 döngü alınarak AuNP ile kaplandı.
iii. GCE/MWCNT-Nafyon: Elektroaktif hale getirilen GCE yüzeyine 2,5 µL MWCNT-Nafyon damlatıldı ve kurutuldu.
iv. GCE/MWCNT-Nafyon/AuNP: Elektroaktif hale getirilen GCE yüzeyine 2,5 µL MWCNT-Nafyon damlatıldı ve kurutuldu. Ardından CV tekniği ile 30 döngü alınarak AuNP ile kaplandı.
v. GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon: Elektroaktif hale getirilen GCE yüzeyi CV tekniği ile 30 döngü alınarak AuNP ile kaplandı. Sonra üzerine 2,5 µL MWCNT-Nafyon damlatıldı ve kurutuldu.

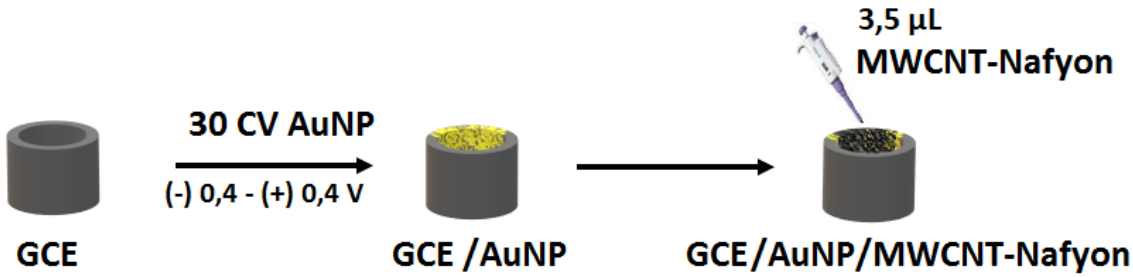
## 3.7. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUNUN HAZIRLANMASI

### 3.7.1. MWCNT-Nafyon Miktarının Belirlenmesi

Modifiye elektrodun hazırlanmasında en uygun MWCNT-Nafyon miktarının belirlenmesi için elektrodepozisyon tekniği ile 30 döngü alınarak AuNP modifiye edilmiş GCE (elektroaktif hale getirilen) yüzeyine 2, 2,5, 3, 3,5 ve 4 µL miktarlarında MWCNT-Nafyon damlatıldı ve etüvde 35 ˚C'de kurutuldu.

### 3.7.2. CV ile AuNP'lerin Elektrodepozisyonunda Döngü Sayısının Belirlenmesi

Modifiye elektrodun hazırlanmasında en uygun döngü sayısının belirlenmesi için elektroaktif hale getirilen yalın GCE yüzeyi sırasıyla; 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 döngü alınarak AuNP ile kaplandı. Üzerine mikropipet yardımıyla 3,5 µL MWCNT-Nafyon damlatıldı ve etüvde 35 ˚C'de kurutuldu.




**Şekil 3.1**: Modifiye çalışma elektrodunun hazırlanmasının şematik gösterimi.

## 3.8. PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU

### 3.8.1. dsDNA'nın Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Öncelikli olarak elektrot yüzeyine immobilize olabilen ve en yüksek oksidasyon akımlarının elde edildiği dsDNA konsantrasyonu belirlendi. Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot ile 125, 250, 500, 750 ve 1000 ppm olarak hazırlanan dsDNA çözeltileri kullanılarak tayin yapıldı.

### 3.8.2. Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu

Bölüm 3.7.'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot ile 250 ppm dsDNA varlığında, destek elektrolit çözeltisinin farklı pH (4,8, 7,4 ve 8,5) ve farklı konsantrasyonda (25, 50, 75 ve 100 mM) hazırlanan çözeltileri kullanılarak denemeler yapıldı.

### 3.8.3. DPSV Tekniğinin Parametrelerinin Optimizasyonu

Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot ile 250 ppm dsDNA varlığında DPSV tekniğinin parametreleri (biriktirme potansiyeli, biriktirme süresi, puls size ve step size) incelendi ve optimize edildi. Bu amaçla biriktirme potansiyeli için (–) 0,6 – (+) 1 V, biriktime süresi için 30 – 420 s, puls size için 10 – 120 mV ve step size için 2,5 – 15 mV aralığında denemeler yapıldı.

### 3.8.4. Bakır Katalizli DNA Hasarına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu

#### *3.8.4.1. Cu(II) Çözeltisinin Konsantrasyon Optimizasyonu*

Bu amaçla, 1 mL 1000 ppm dsDNA çözeltisine, 2 mL 75 mM pH 7,4 PBS ve 3 – 12 mM konsantrasyon aralığında hazırlanan Cu(II) çözeltilerinden 1'er mL eklendi. Bölüm 3.7'de

belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot kullanılarak DPSV yöntemiyle tayinler gerçekleştirildi.

#### *3.8.4.2. DNA'nın Cu(II) Çözeltisi ile Etkileşim Süresinin Optimizasyonu*

Bu amaçla, 1 mL 1000 ppm dsDNA çözeltisine, 2 mL pH 7,4 75 mM PBS ve 1 mL 6 mM Cu(II) çözeltisi eklendi. Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot kullanılarak DPSV ile 5 – 40 dk aralığında etkileşim süreleri incelendi.

#### *3.8.4.3. Antioksidan İlavesinin Cu(II) Çözeltisi ile Etkileşim Öncesi ve Sonrasında İncelenmesi*

Bu amaçla Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye çalışma elektrotlar kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde çalışıldı;

i. 250 ppm dsDNA
ii. (i) + 1,5 mM Cu(II) → 30 dk inkübasyon
iii. (i) + 0,05 mM AO (RA, GA ve CT) + 1,5 mM Cu(II) → 30 dk inkübasyon
iv. (i) + 1,5 mM Cu(II) → 30 dk inkübasyon → + 0,05 mM AO (RA, GA ve CT) → 30 dk inkübasyon

#### *3.8.4.4. Cu(II) Katalizli Oksidatif DNA Hasarının UV-GB Spektrofotometrisi ile Doğrulanması*

Son olarak çözelti ortamında Cu(II) ile hasara uğratılan dsDNA'ya ait UV-GB spektrumları incelendi. Bunun için aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltilerin 200 – 500 nm aralığında UV–GB spektrumları alındı:

i. 1 mL 1000 ppm dsDNA ve 3 mL 75 mM pH 7,4 PBS
ii. 1 mL 1000 ppm dsDNA + 2 mL 75 mM pH 7,4 PBS + 1 mL 6 mM Cu(II) → 30 dk inkübasyon

DNA'ya ait karakteristik 260 nm dalgaboyundaki absorbans değerleri incelendi.

## 3.9. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN KARAKTERİZASYONU

### 3.9.1. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniği ile Karakterizasyon

Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) CV yöntemi ile 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde karakterize edildi. CV ölçümleri (–) 0,3 V ile (+) 0,6 V arasında, Ag/AgCl referans elektroda karşı, 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirildi. Deneylerde karşıt elektrot olarak platin (Pt) tel kullanıldı. Döngüsel voltamogramlar yalın (modifiye olmayan), AuNP modifiye ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye GCE varlığında alındı.

### 3.9.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile Karakterizasyon

Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon), yalın (modifiye olmayan) ve AuNP modifiye (GCE/AuNP) GCE'ler ile EIS tekniği kullanılarak, 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde, karakterize edildi. Bu şekilde elektrotların Nyquist eğrileri elde edildi ve bulgular karşılaştırıldı.

### 3.9.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Karakterizasyonu

AuNP modifiye (GCE/AuNP), Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ve Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye GCE üzerine DNA immobilize edilmiş (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) elektrotların SEM kullanılarak yüzey topografileri incelendi.

## 3.10. DNA OKSİDATİF HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM

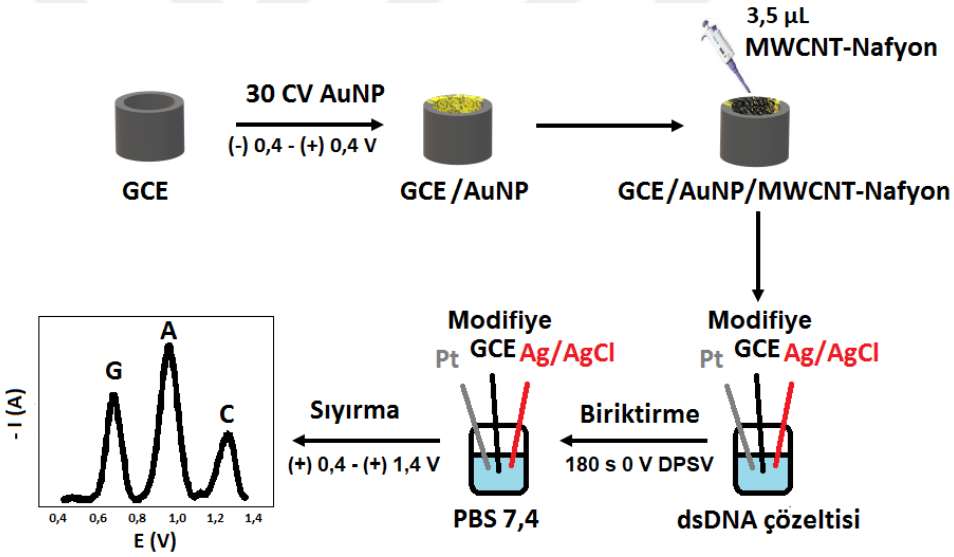
### 3.10.1. DNA'nın Modifiye Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonu

Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) tekniği [233] kullanılarak modifiye elektrot yüzeyine DNA'nın immobilizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) 1 mL 1000 ppm dsDNA ve 3 mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltilerinin bulunduğu hücreye daldırıldı. 0 V potansiyelde 180 s boyunca DNA'nın elektrot yüzeyine biriktirme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elektrotlar

bidistile su ile yıkandı ve 4 mL 75 mM, pH 7,4 PBS çözeltisinin bulunduğu temiz bir hücreye daldırılıp elektrot yüzeyine immobilize olan dsDNA'nın sıyırma işlemi gerçekleştirildi.

Bölüm 3.8.3'te belirtildiği şekilde optimize edilen DPSV Yöntemi;

- Tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V
- Biriktirme potansiyeli: 0 V
- Biriktirme süresi: 180 s
- Step size: 10 mV
- Puls size: 75 mV
- Sample period: 0,5 s
- Puls time: 0,1 s




**Şekil 3.2:** DNA'nın hazırlanan modifiye çalışma elektroduna immobilizasyonunun şematik gösterimi.

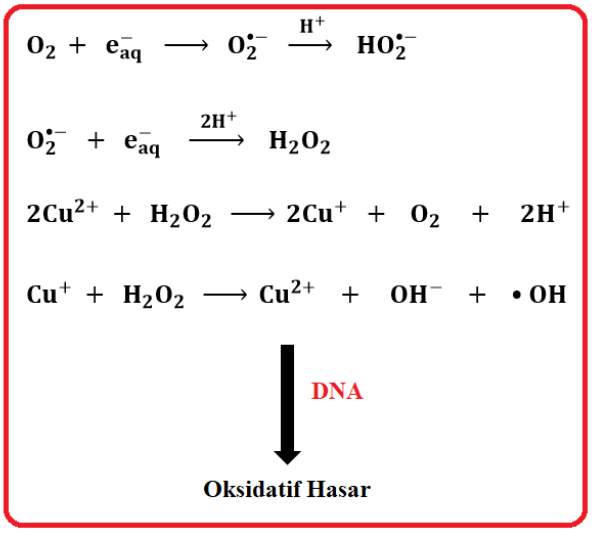
### 3.10.2. Guanin, Adenin ve Sitozin Standartları Kullanılarak DNA'ya Ait Piklerin Doğrulanması

Geliştirilen modifiye çalışma elektrodu kullanılarak dsDNA için belirlenmiş olan en uygun analiz koşulları altında, adenin (A), guanin (G) ve sitozin (C) bazlarının standartlarının 12,5 – 125 ppm aralığında hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri ile denemeler yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon), 1 mL x ppm baz standart çözeltisi (ayrı ayrı A, G ve C) ve 3

mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltilerinin bulunduğu hücreye daldırıldı. 0 V potansiyelde 180 s boyunca bazların elektrot yüzeyine biriktirme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elektrotlar bidistile su ile yıkandı ve 4 mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltisinin bulunduğu temiz bir hücreye daldırılıp elektrot yüzeyine immobilize olan bazların sıyırma işlemi gerçekleştirildi. Her bir baz standardı için kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

### 3.10.3. Bakır Katalizli Oksidatif DNA Hasarı Yöntemi

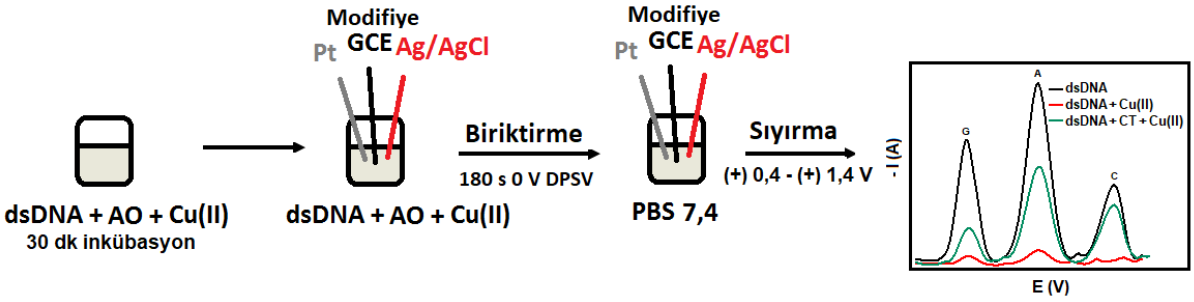
DNA'nın oksidatif hasarı için literatürde mevcut Cu(II) katalizli hasar yöntemi modifiye edilerek uygulandı [222]. Bunun için bir elektrokimyasal hücre içerisine 1 mL 1000 ppm dsDNA, 2 mL 75 mM pH 7,4 PBS ve 1 mL 6 mM Cu(II) çözeltileri ilave edildi. Ardından 30 dk laboratuvar ortamında, havaya açık bırakılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) hasar oluşturma çözeltisine daldırıldı ve 0 V potansiyelde, 180 s boyunca hasara uğramadan kalan dsDNA'nın elektrot yüzeyine biriktirme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elektrotlar bidistile su ile yıkandı ve 4 mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltisinin bulunduğu temiz bir hücreye daldırılıp sıyırma işlemi gerçekleştirildi. Çözelti ortamında gerçekleşen olası hasar mekanizması Şekil 3.3'te gösterilmiştir.




**Şekil 3.3:** Cu(II) katalizli oksidatif DNA hasarının mekanizması.

### 3.10.4. Oksidatif DNA Hasarını Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen kuersetin (QR), rutin (RT), askorbik asit (AA), gallik asit (GA), klorojenik asit (CA), kateşin (CT), epikateşin (EC), epikateşin gallat (ECG), rozmarinik asit, glutatyon (GSH) ve N-asetil sistein (NAC)'in DNA hasarı oluşumunu engelleyici etkileri incelendi. Bu amaçla bir elektrokimyasal hücre içerisine 1 mL 1000 ppm dsDNA, 0,5 mL, x mM AO, 1,5 mL 75 mM pH 7,4 PBS ve 1 mL 6 mM Cu(II) çözeltileri ilave edildi. Ardından 30 dk, laboratuvar ortamında, havaya açık bırakılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) AO içeren hasar oluşturma çözeltisine daldırıldı ve 0 V potansiyelde, 180 s boyunca hasara uğramadan kalan dsDNA'nın (AO tarafından korunan) elektrot yüzeyine biriktirme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elektrotlar bidistile su ile yıkandı ve 4 mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltisinin bulunduğu temiz bir hücreye daldırılıp sıyırma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.4).




**Şekil 3.4:** Cu(II) katalizli oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktivite tayin yönteminin şematik gösterimi.

Farklı konsantrasyonlarda (0,005 – 1,5 mM) hazırlanmış olan AO çözeltileri kullanılarak her bir AO için koruyucu etki gösterdikleri lineer çalışma aralıkları belirlendi.

## 3.11. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE BAZI BİTKİ ÇAYLARININ OKSİDATİF DNA HASARINI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan bitki ekstraktlarından farklı hacimlerde (0,01, 0,025 ve 0,05 mL) alınarak oksidatif DNA hasarını engelleyici aktiviteleri incelendi. Bu amaçla bir elektrokimyasal hücre içerisine 1 mL 1000 ppm dsDNA, x mL bitki ekstraktı, (2-x) mL 75 mM pH 7,4 PBS ve 1 mL 6 mM Cu(II) çözeltileri ilave edildi. Ardından 30 dk, laboratuvar ortamında, havaya açık bırakılarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Bölüm 3.7'de belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) bitki ekstraktlarından ilave edilmiş olan hasar oluşturma çözeltisine daldırıldı ve 0 V potansiyelde, 180 s boyunca hasara uğramadan kalan dsDNA'nın elektrot yüzeyine biriktirme işlemi gerçekleştirildi. Ardından elektrotlar bidistile su ile yıkandı ve 4 mL 75 mM pH 7,4 PBS çözeltisinin bulunduğu temiz bir hücreye daldırılıp sıyırma işlemi gerçekleştirildi.

## 3.12. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN DOĞRULANMASI İÇİN UYGULANAN HPLC-PDA YÖNTEMİ

Oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktivite tayini için geliştirilen elektrokimyasal yöntem literatürde mevcut HPLC yöntemi [234] ile PDA dedektörü kullanılarak doğrulandı. Elektrokimyasal yöntemle eş zamanlı olarak 0,005 – 0,05 mM CT ve 0,01 – 0,05 mL yeşil çay ekstraktı içeren çözeltiler ayrı ayrı HPLC sistemine enjekte edildi.

Uygulanan HPLC yöntemi;

- Analitik kolon: Synergy marka $C_{18}$ kolonu (250x4,6 mm, 5 µm)
- Sıcaklık: 25 ˚C
- Akış hızı: 0,8 mL/dk (deneysel bulgulara göre belirlendi)
- Elüsyon programı: İzokratik
- Mobil Faz: 0,01 M Fosfat Tamponu (pH 7,0) – MeOH (85:15, v/v)
- Dedeksiyon dalga boyu: 254 nm

## 3.13. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL (DPSV) VE REFERANS (HPLC-PDA) YÖNTEMLER İÇİN BAZI ANALİTİK PARAMETRELER

Aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan dsDNA (a), DNA bazlarının standartlarının karışım (b) ve dsDNA'ya bazların standart karışım çözeltisinin katkısı ile elde edilen karışım (c) çözeltisine her iki yöntem eş zamanlı uygulanarak % geri kazanım (REC) değerleri hesaplandı.

Hazırlanan çözeltilerin son konsantrasyonları:

a) 250 ppm dsDNA
b) A, G ve C içeren standart karışım (her biri 2 ppm)
c) 250 ppm dsDNA + A, G ve C içeren standart karışım (her biri 2 ppm)

Ayrıca her iki yöntem ile 250 ppm dsDNA'da bulunan bazların (a) gün içi ve günler arası % bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplandı.

## 3.14. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODU KULLANILARAK GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEME GİRİŞİMLERİN ETKİSİ

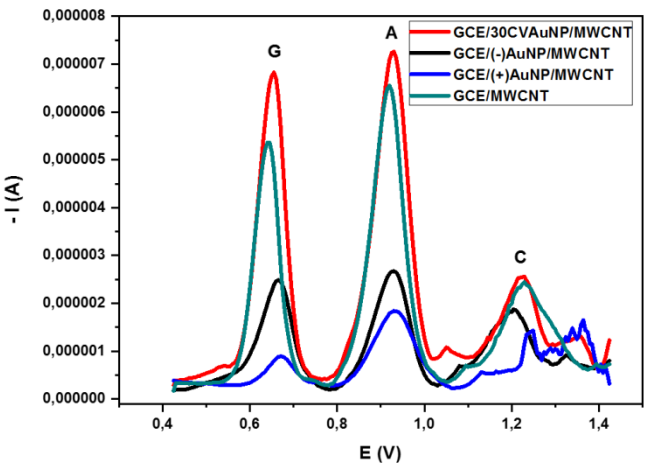
İnsan vücudu sıvılarında bulunabilen; ÜA, glukoz, DA ve proteinler (temsilen BSA kullanıldı) ile sentetik serumun (FBS), DNA bazlarının oksidasyonuna etkileri incelendi. DNA'nın Cu(II) ile etkileşim öncesi (tek başına dsDNA) ve DNA'nın Cu(II) ile etkileşim sonrası (AO varlığında ve yokluğunda) DNA bazlarının oksidasyonu üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla Bölüm 3.10'da belirtildiği şekilde uygulanan elektrokimyasal yöntem ile 41 ppm BSA, 44 ppm ÜA, 790 ppm Glukoz, 8 ppm DA ve 1:1 seyreltik FBS (0,01-0,05 mL) çözeltileri kullanılarak % hata değerleri hesaplandı.

# 4. BULGULAR

## 4.1. HAZIRLANAN FARKLI AUNP'LER İLE MODİFİKASYON ÇALIŞMALARI

Bölüm 3.6.4'te belirtildiği şekilde hazırlanan modifiye elektrotlara DPSV tekniği ile 250 ppm dsDNA immobilize edildi ve yüzeyden pH 7,4 PBS tampon ortamına sıyrılmasıyla elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldı (Şekil 4.1).

i. GCE/(+)AuNP/MWCNT/DNA
ii. GCE/(–)AuNP/MWCNT/DNA
iii. GCE/30CVAuNP/MWCNT/DNA
iv. GCE/MWCNT/DNA

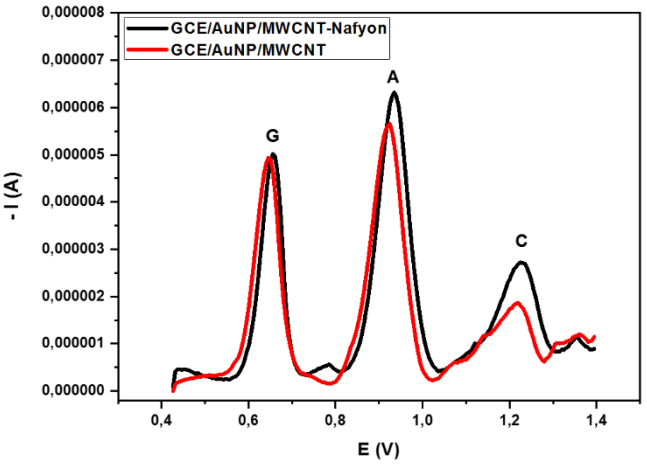



**Şekil 4.1:** 250 ppm dsDNA varlığında farklı şekillerde hazırlanan modifiye elektrotların karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS).

Şekilde görüldüğü gibi DNA'ya ait üç baz (G, A ve C) hemen hemen bütün modifikasyonlarda belirlenebildi. Fakat timin (T) bazına ait oksidasyon piki belirlenemedi. Bu yüzden üç bazın (G, A ve C) incelenmesi üzerine çalışmaya devam edildi. Şekil 4.1'de, en yüksek akım değerlerinin GCE/30CVAuNP/MWCNT elektrodu ile elde edildiği görülmektedir. Sonuç olarak, GCE'nin AuNP ile kaplanmasında, CV ile elektrodepozisyon tekniğinin kullanılmasına karar verildi.

## 4.2. MODİFİKASYONDA MWCNT-NAFYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

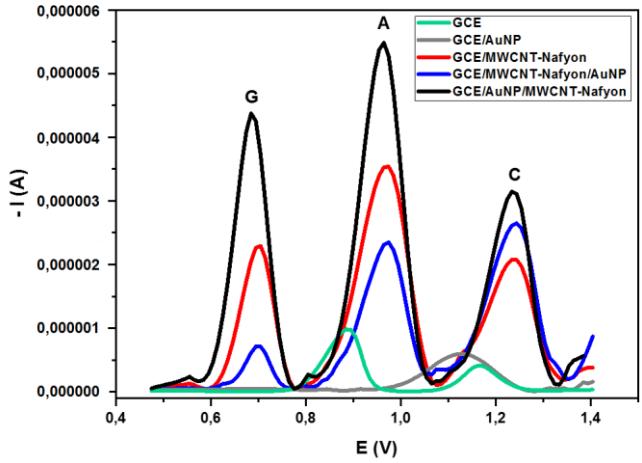
Bölüm 3.6.4 (iii) ve 3.6.5'te belirtildiği şekilde AuNP üzerine MWCNT ve MWCNT-Nafyon damlatılarak hazırlanan modifiye elektrotların, 250 ppm dsDNA varlığındaki voltamogramları Şekil 4.2'de görülmektedir. Özellikle adenin (A) ve sitozin (C) bazlarına ait piklerde Nafyonla birlikte artış olduğu görülmektedir. Bu yüzden modifikasyon işleminde Nafyon kullanımına karar verildi.




**Şekil 4.2:** 250 ppm dsDNA varlığında MWCNT ve MWCNT-Nafyon karışımının karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS) (G: Guanin; A: Adenin; C: Sitozin).

## 4.3. MODİFİKASYON MALZEMELERİNİN SIRALAMASININ ETKİSİ

Bölüm 3.6.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan [(i) GCE; (ii) GCE/AuNP; (iii) GCE/MWCNT-Nafyon; (iv) GCE/MWCNT-Nafyon/AuNP ve (v) GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon] hazırlanan 5 farklı elektroda, ayrı ayrı 250 ppm dsDNA immobilize edildi ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı (Şekil 4.3). Şekilde görüldüğü üzere, üç DNA bazı (G, A ve C), AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrot varlığında kolaylıkla ayrıldı ve yüksek oksidasyon akım değerleri elde edildi.

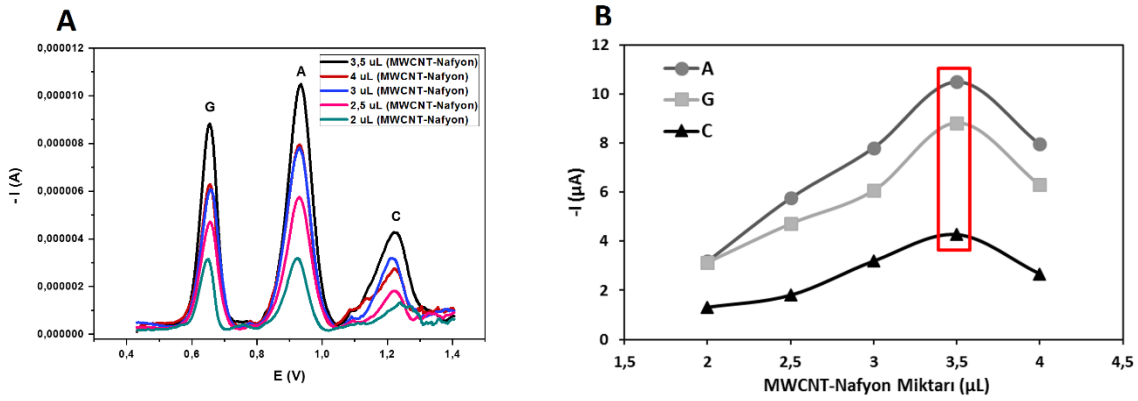



**Şekil 4.3:** 250 ppm dsDNA varlığında farklı modifikasyon şekillerinin yalın elektrotla karşılaştırılması (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS).

Ag/AgCl referans elektroda karşı yapılan bu deneylerde, G yükseltgenme piki (+) 0,68 V'de, A yükseltgenme piki (+) 0,96 V'de ve C yükseltgenme piki ise (+) 1,24 V'de elde edildi.

## 4.4. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN HAZIRLANMA KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

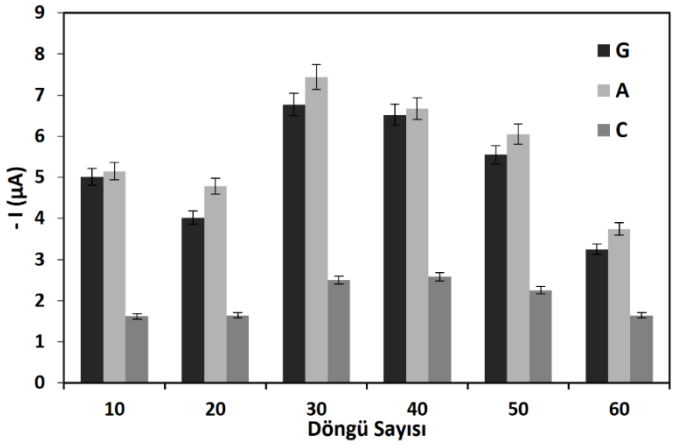
Öncelikli olarak farklı miktarlarda MWCNT-Nafyon karışımı elektrot yüzeyine damlatılarak karşılaştırma yapıldı ve en uygun MWCNT-Nafyon miktarı belirlendi. Bunun için 30 döngü AuNP modifiye edilmiş GCE yüzeyine 2, 2,5, 3, 3,5 ve 4 µL miktarlarında MWCNT-Nafyon damlatıldı ve kurutuldu. Elde edilen voltamogramlar karşılaştırıldı (Şekil 4.4A) ve en uygun MWCNT-Nafyon miktarı olarak 3,5 µL belirlendi. Sonuçların grafiksel gösterimi Şekil 4.4B'de verildi.




**Şekil 4.4:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için MWCNT-Nafyon karışımının miktarının optimizasyonu (A) DPS voltamogramı (B) Sonuçların grafiksel gösterimi (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS).

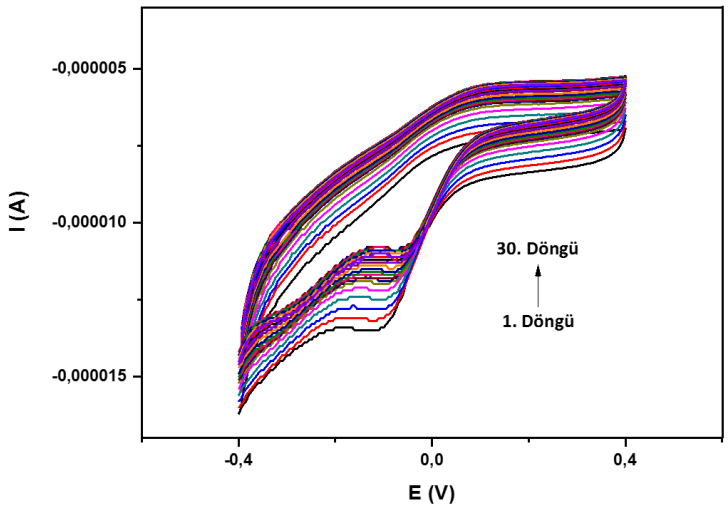
İkinci olarak CV ile AuNP'lerin elektrodepozisyonunda en uygun döngü sayısının belirlenmesi için denemeler yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.6.1.3'te belirtildiği şekilde, GCE yüzeyine AuNP kaplama işlemi CV ile elektrodepozisyon tekniği uygulanarak (–) 0,4 V – (+) 0,4 V aralığında, 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirildi. Bu işlem sonucunda elektrot yüzeyi sarı renkli altın nanopartiküllerle kaplandı.

Yüzeyde biriken AuNP'lerin miktarı ve ölçülen sinyallere etkisi, döngü sayısının optimize edilmesiyle belirlendi. En uygun döngü sayısını belirlemek için sırasıyla; 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 döngü sayıları uygulandı. Bu şekilde ayrı ayrı hazırlanan elektrotların üzerine 3,5 µL MWCNT-Nafyon damlatıldı ve kurutuldu. Ölçüme hazır hale getirilen elektrotlara dsDNA immobilize edildi. Farklı döngü sayılarına karşılık elde edilen G, A ve C bazlarının akım değerleri grafiksel olarak Şekil 4.5'de gösterildi. Sonuç olarak modifikasyon için en uygun olan döngü sayısı 30 olarak belirlendi.




**Şekil 4.5:** AuNP'lerin elektrodepozisyon ile elektrot yüzeyine kaplanmasında döngü sayısının optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS).

Yalın camsı karbon elektrot yüzeyinin 30 döngü AuNP ile kaplanmasına ait döngüsel voltamogram ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.




**Şekil 4.6:** CV tekniği ile yalın elektrot yüzeyine (GCE) AuNP'lerin elektrodepozisyon ile kaplanması (2,5 mL % 0,04 (w/v) $HAuCl_4$ + 2,5 mL 0,1 M $H_2SO_4$; tarama hızı: 50 mV/s; döngü sayısı: 30; tarama aralığı: (−) 0,4 – (+) 0,4 V).

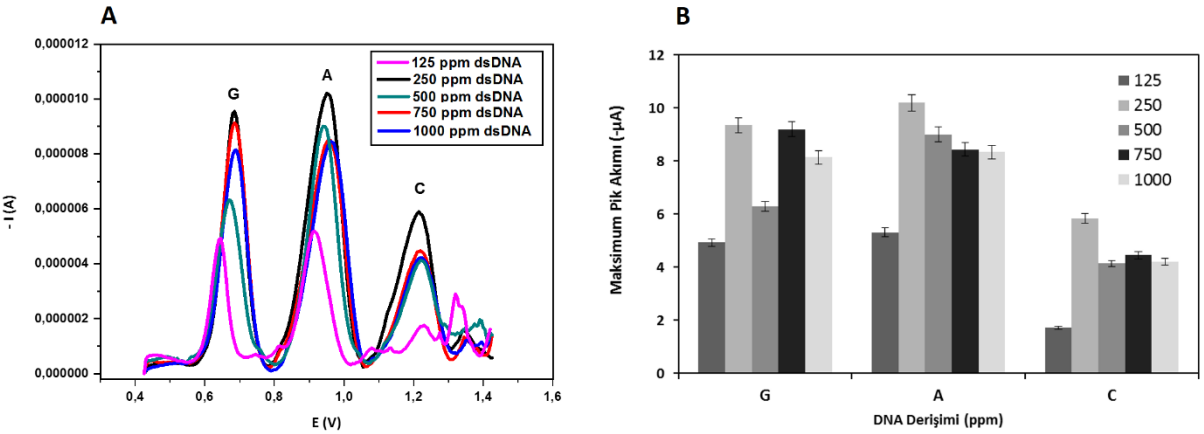
Şekil 4.6'da görüldüğü gibi GCE yüzeyinde AuNP biriktirme işleminin ilk döngüsünde, (−) 0,1 V civarında bir indirgenme piki gözlendi. Bu pik ortamdaki $Au^{3+}$ iyonlarının miktarına karşılık gelen akım değeridir. Döngü sayısı arttıkça $Au^{3+}$ iyonları $Au^0$'a indirgenip elektrot yüzeyinde biriktirildiği için ortamda kalan $Au^{3+}$ iyonlarının akım değeri azalmaktadır. Yapılan tüm denemeler sonucunda, modifiye çalışma elektrodu olarak "GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon"

kullanımının daha iyi sonuçlar verdiği görüldü ve bundan sonraki analizler bu elektrot kullanılarak yapıldı.

## 4.5. PARAMETRELERİN OPTİMİZASYONU

### 4.5.1. dsDNA Konsantrasyonunun Optimizasyonu

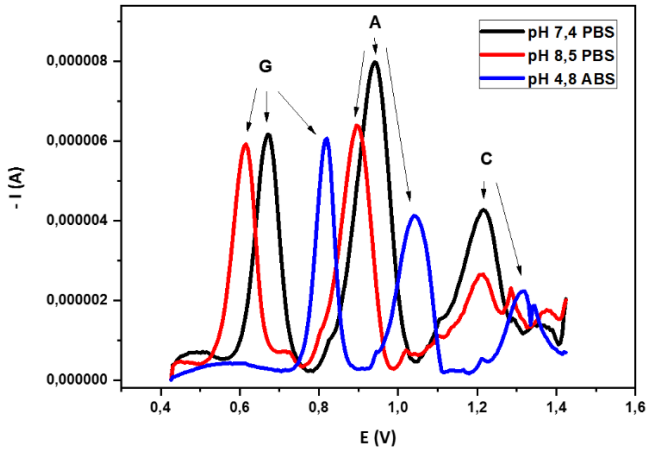
Şekil 4.7A'da farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dsDNA çözeltilerine (125 − 1000 ppm) ait DPS voltamogramları verildi. Hazırlanan GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon elektrot ile 250 ppm DNA kullanıldığında, bazların kolaylıkla ve yüksek hassasiyette birbirinden ayrıldığı görülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (500, 750 ve 1000 ppm), bu hassasiyetin düştüğü tespit edildi. Sonuçların grafiksel gösterimi Şekil 4.7B'de verildi.




**Şekil 4.7:** dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için dsDNA konsantrasyonunun optimizasyonu (A) DPS voltamogramı (B) Sonuçların grafiksel gösterimi (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 50 mM pH 7,4 PBS; 125, 250, 500, 750 ve 1000 ppm dsDNA).

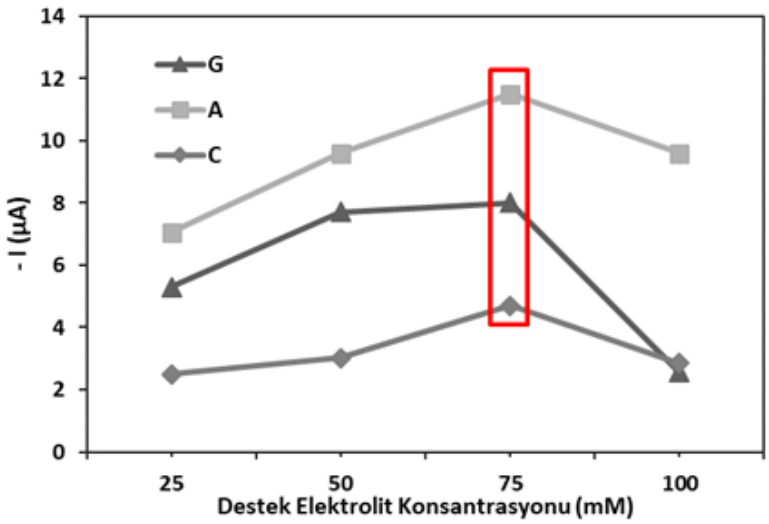
### 4.5.2. Destek Elektrolit Çözeltisinin Optimizasyonu

Sıyırma çözeltisi olarak kullanılan destek elektrolit çözeltisinde ilk olarak pH optimizasyonu yapıldı. pH 4,8 ABS, pH 7,4 ve 8,5 PBS ortamlarında, 250 ppm dsDNA'nın immobilizasyonu incelendi (Şekil 4.8). Şekilde DNA'ya ait bazların en yüksek akım değerlerinin pH 7,4'te elde edildiği görülmektedir. Bu sebepten sıyırma işleminin pH 7,4 PBS tamponunda yapılamasına karar verildi.




**Şekil 4.8:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için pH optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; pH 7,4, 8,5 PBS ve pH 4,8 ABS).

İkinci olarak ise destek elektrolit çözeltisinin konsantrasyonu optimize edildi. Bunun için 25, 50, 75 ve 100 mM pH 7,4 PBS ortamlarında 250 ppm dsDNA tayin edildi. DNA'ya ait bazların en yüksek oksidasyon pik akım değerlerine, 75 mM'da ulaştığı belirlendi. Sonuçların grafiksel gösterimi Şekil 4.9'da verildi.



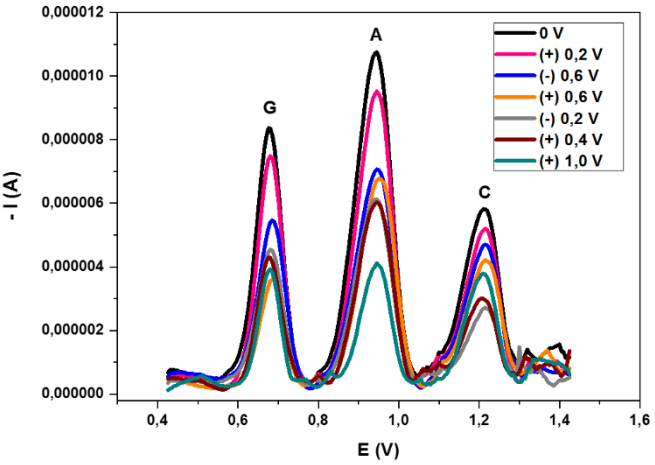

**Şekil 4.9:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için destek elektrolit çözeltisinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 25, 50, 75 ve 100 mM pH 7,4 PBS).

### 4.5.3. DPSV Tekniğinin Ölçüm Parametrelerinin Optimizasyonu

Diferansiyel puls sıyırma voltametrisi (DPSV) tekniğinin ölçüm parametreleri optimize edildi.

#### *4.5.3.1. Biriktirme Potansiyeli*

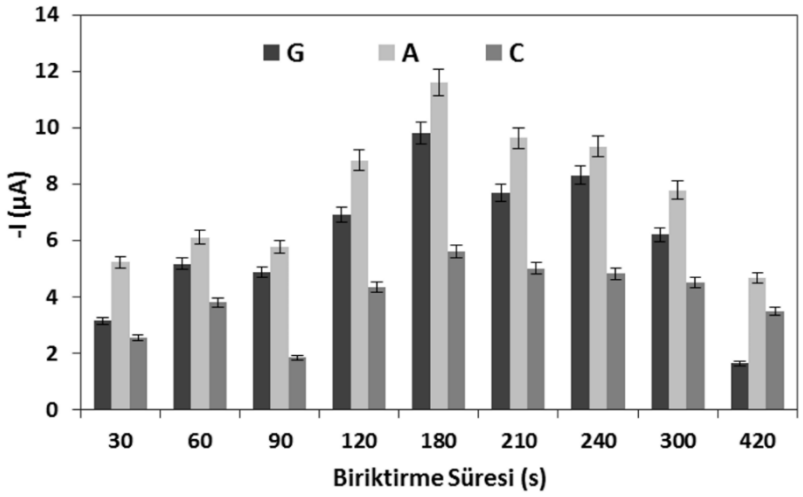
DNA'nın modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonunda farklı biriktirme potansiyelleri (BP) denendi. (–) 0,6 – (+) 1,0 V aralığında yapılan biriktirme işleminde DNA bazlarına ait maksimum akım değerlerinin 0 V'da elde edildiği görüldü (Şekil 4.10).




**Şekil 4.10:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için biriktirme potansiyelinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: (–) 0,6 – (+) 1,0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

#### *4.5.3.2. Biriktirme Süresi*

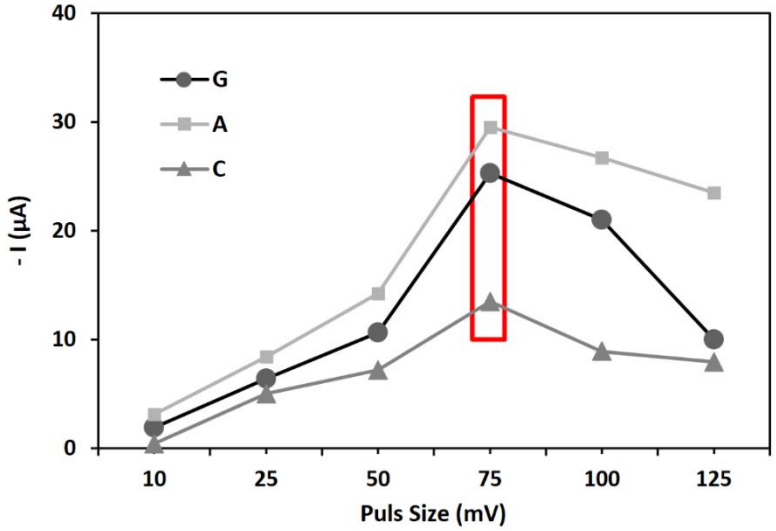
DNA'nın modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonunda farklı biriktirme süreleri denendi. 30 – 420 s aralığında yapılan immobilizasyon işleminde, DNA bazlarına ait maksimum akım değerlerinin 180 s'de elde edildiği görüldü (Şekil 4.11).




**Şekil 4.11:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için biriktirme süresinin optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 25 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 30 – 420 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

### *4.5.3.3. Puls Size (Puls Boyu)*

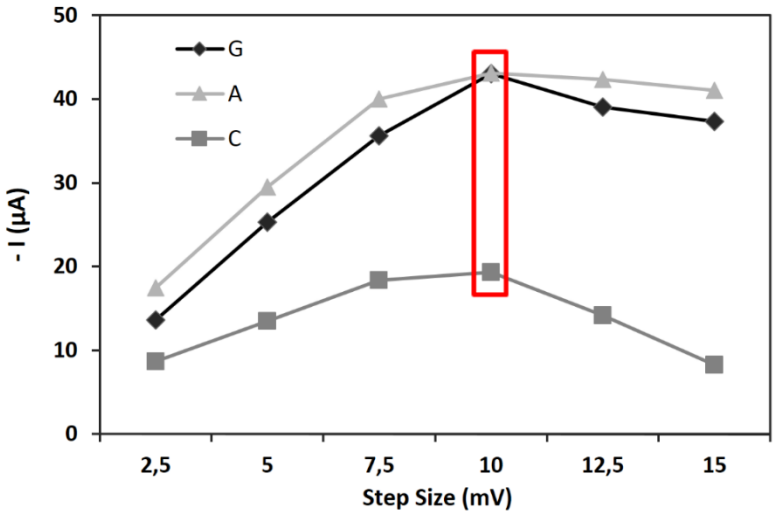
DNA'nın modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonunda farklı puls size (puls boyu) voltajları denendi. 10 – 120 mV aralığında yapılan immobilizasyon işleminde DNA bazlarına ait maksimum oksidasyon pik akım değerlerinin 75 mV'da elde edildiği görüldü (Şekil 4.12).




**Şekil 4.12:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için puls size optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 5 mV; puls size: 10 – 125 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

#### *4.5.3.4. Step Size (Basamak Boyu)*

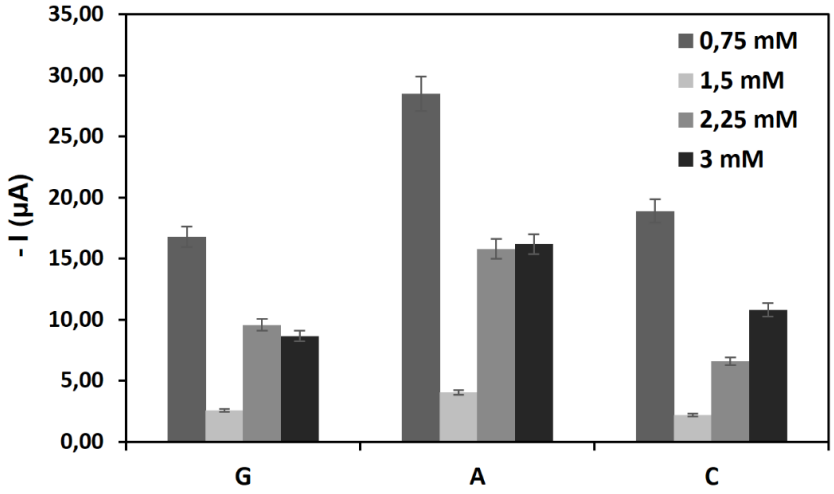
DNA'nın modifiye elektrot yüzeyine immobilizasyonunda farklı step size (basamak boyu) voltajları denendi. 2,5 – 15 mV aralığında yapılan optimizasyon işleminde DNA bazlarına ait maksimum akım değerlerinin 10 mV'da elde edildiği görüldü (Şekil 4.13).




**Şekil 4.13:** 250 ppm dsDNA immobilize modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA) için step size optimizasyonu (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 2,5 – 15 mV; puls size: 75 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

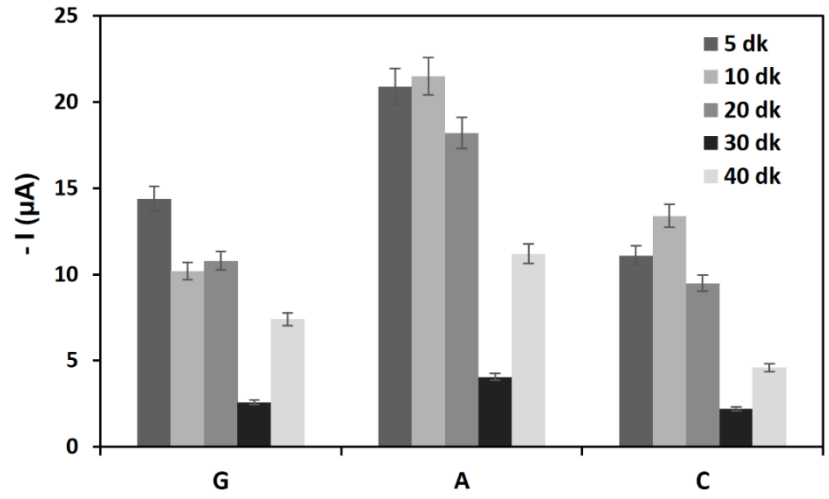
### 4.5.4. Bakır Katalizli DNA Hasarına Etki Eden Parametrelerin Optimizasyonu

GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon elektrot kullanılarak, DNA'nın Cu(II) katalizli oksidatif hasarını ölçme amaçlı geliştirilen yönteme etki eden parametrelerin optimizasyonu yapıldı. Bu kapsamda öncelikli olarak Cu(II) çözeltisin konsantrasyonu optimize edildi. Farklı konsantrasyonlar (0,75 – 3,0 mM) ile 250 ppm dsDNA'nın oksidatif hasar tayini yapıldı (Şekil 4.14). Şekilde görüldüğü üzere DNA'ya ait bazlarda en yüksek hasar (bazlara ait pik akımlarında en fazla düşüş) 1,5 mM Cu(II) ile elde edildiğinden, oksidatif hasar oluşturmak için bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.




**Şekil 4.14:** 250 ppm dsDNA'nın hasar tayini için Cu(II) çözeltisinin konsantrasyon (0,75, 1,5, 2,25 ve 3 mM) optimizasyonunun grafiksel gösterimi (n=3).

İkinci olarak, DNA'nın Cu(II) çözeltisi ile etkileşim süresinin optimizasyonu yapıldı. Bunun için 1,5 mM Cu(II) ile farklı sürelerde (5 – 40 dk) oksidatif DNA hasar tayini yapıldı. Sonuç olarak, en yüksek hasarın 30 dk sonunda oluştuğu görüldü (Şekil 4.15).




**Şekil 4.15:** 250 ppm dsDNA'nın oksidatif hasar tayini için Cu(II) çözeltisi ile etkileşim süresi (5, 10, 20, 30 ve 40 dk) optimizasyonunun grafiksel gösterimi (n=3).

Optimizasyonlar kapsamında bir diğer çalışma, DNA'nın Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve sonrasında AO ilavesinin incelenmesidir. Bunun için hazırlanan ayrı ayrı modifiye çalışma elektrotları kullanılarak Bölüm 3.8.4.3'te belirtildiği şekilde çalışıldı. Bazı antioksidanlar (RA, GA ve CT) için denemeler yapıldığında AO varlığında hasar oluşumunu engelleme (koruma) yönünde etkinin daha iyi sonuç verdiği görüldü. Dolayısıyla AO ilavesinin Cu(II) ile etkileşim

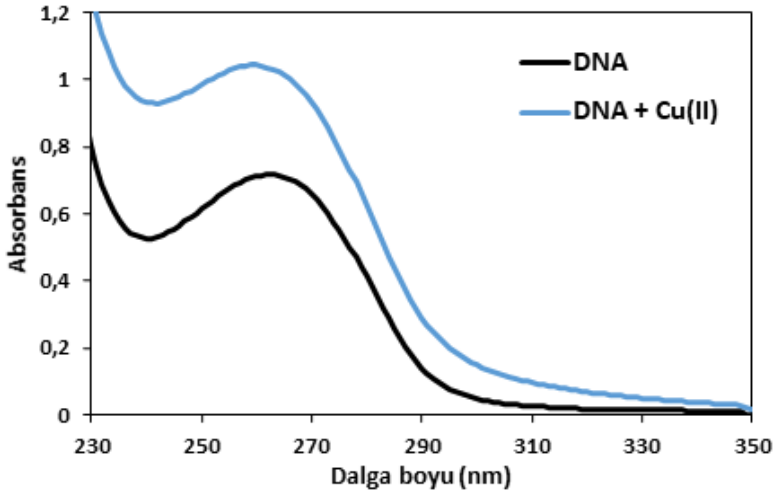
öncesi yapılmasına karar verildi. A bazına ait oksidasyon pik akım değerleri karşılaştırılarak Tablo 4.1'de verildi.

**Tablo 4.1:** Cu(II) ile etkileşim öncesi ve sonrasında antioksidan ilave edilmesinin DNA oksidatif hasarı üzerine etkisinin incelenmesi.

| **Analiz ortamı** | **- $I_A$ (µA)*** |
|---|---|
| dsDNA | 47,1 |
| dsDNA + Cu(II) → 30 dk | 4,6 |
| dsDNA + RA + Cu(II) → 30 dk | 17,0 |
| dsDNA + GA + Cu(II) → 30 dk | 29,2 |
| dsDNA + CT + Cu(II) → 30 dk | 33,2 |
| dsDNA + Cu(II) → 30 dk → + RA → 30 dk | 15,8 |
| dsDNA + Cu(II) → 30 dk → + GA → 30 dk | 25,5 |
| dsDNA + Cu(II) → 30 dk → + CT → 30 dk | 28,4 |

*Adenin bazına ait oksidasyon pik akım değerleri

Son olarak Cu(II) çözeltisi varlığında DNA'nın oksidatif hasara uğradığı, UV-Görünür bölge spektrofotometrisi kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla, 250 ppm dsDNA çözeltisine 1,5 mM Cu(II) çözeltisi eklendi ve 30 dk bekletildi; elde edilen spektrumlar Şekil 4.16'da verildi. Cu(II) ile etkileşim sonrasında DNA'ya ait karakteristik dalgaboyundaki (260 nm) absorbans değerlerinde farklılaşma olduğu gözlendi. Bu spektrumlar, UV spektroskopisinin karakteri gereği elektrokimyasal bulgular kadar ayrıntıya inemese de deney sonuçlarımızı desteklemektedir.



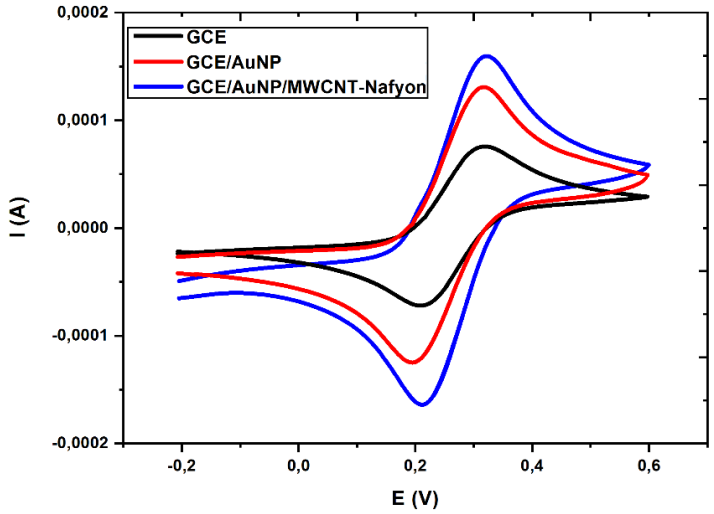

**Şekil 4.16:** dsDNA çözeltisinin Cu(II) ile etkileşim öncesi ve sonrası UV-GB spektrumları (10 kat seyreltilmiş).

## 4.6. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODUN KARAKTERİZASYONU

### 4.6.1. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniği ile Karakterizasyonu

Yalın (modifiye olmayan) GCE ile AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotların tersinirliği döngüsel voltametri (CV) yöntemi ile 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde test edildi. CV ölçümleri, (–) 0,2 V ile (+) 0,6 V arasında Ag/AgCl referans elektroda karşı 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirildi. Deneylerde karşıt elektrot olarak, platin (Pt) tel kullanıldı.

Şekil 4.17'de söz konusu elektrotlara ait döngüsel voltamogramlar görülmektedir. (+) 318 mV'da (Ag/AgCl referans elektroda karşı) gözlenen yükseltgenme piki redoks probunun ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$) yapısında bulunan Fe(II)'nin Fe(III)'e yükseltgenmesini göstermektedir. (+) 220 mV civarında görülen indirgenme piki ise Fe(III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesine aittir (oksidasyon-indirgeme tepe potansiyeli ayrımı ($AE_p$) 98 mV). Bu redoks çiftine ait yükseltgenme ve indirgenme pik akımlarının modifiye elektrot ile daha yüksek çıktığı görülmektedir. Anodik ve katodik tepe akım değerleri, modifiye elektrot için sırasıyla 159 ve -165 µA olarak bulundu. Yalın, yani modifiye olmayan, GCE'nin elektrokimyasal cevabı nanomalzeme modifiye elektrodun cevabı ile örtüştürüldüğünde (Şekil 4.17), oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. Tüm bu gözlemler, GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon elektrot reaksiyonunun tersinirliğini göstermektedir [235]. Ayrıca bu voltamogram, elektrot malzemesinin bu aralıkta başka herhangi bir elektroaktivite göstermediğini ortaya koymaktadır.




**Şekil 4.17:** Sırasıyla yalın, AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotların, 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl'deki döngüsel voltametrik davranışları (tarama hızı: 50 mV/s).

Yalın GCE, GCE/AuNP ve GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon elektrotlarının iletkenliğini değerlendirmek için "Randles-Sevcik" denklemi kullanıldı [236]. GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon, GCE/AuNP ve GCE elektrotunun aktif yüzey alanı denklem kullanılarak hesaplandı;

$$I = 2.69 \times 10^5 \, n^{3/2} \, A \, D^{1/2} \, C \, v^{1/2} \qquad (4.1)$$

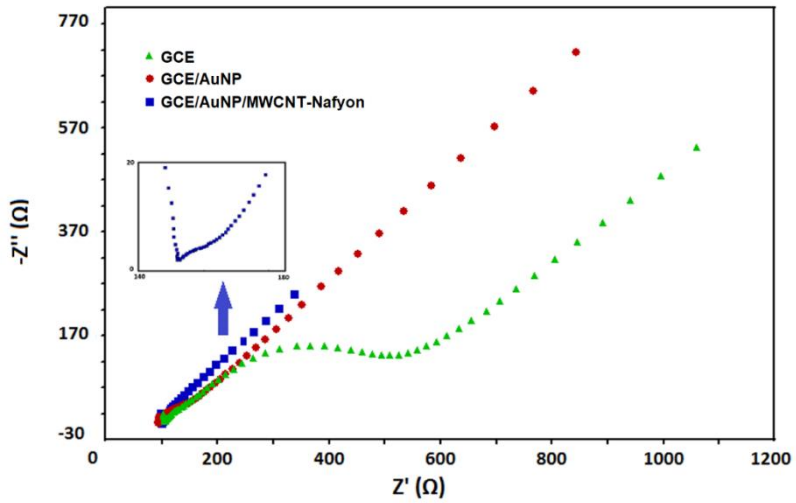
burada *I* tepe akımı (μA), A sensörün aktif yüzey alanını ($cm^2$), n elektron sayısını, *D* difüzyon katsayısını ($cm^2$ $s^{-1}$), *v* tarama hızını (mV $s^{-1}$) ve C analit konsantrasyonunu (mM) temsil eder. GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon, GCE/AuNP ve GCE elektrotlarının aktif yüzey alanı sırasıyla 0,0315, 0,023 ve 0,0145 $cm^2$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon elektrotunun yüzeyinin, arttırılmış aktif yüzey alanından kaynaklanan potansiyel katalitik aktivitesi nedeniyle hassas belirlemeler için diğer elektrotlarınkinden daha uygun olduğunu göstermiştir.

### 4.6.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) ile Karakterizasyonu

Elektrot yüzeyindeki farklı modifikasyonları karakterize edebilme yöntemlerinden biri de elektrokimyasal empedans spektroskopisidir. Yalın (modifiye olmayan) GCE ile AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotlar EIS ile 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde karakterize edildi. Şekil 4.18'de, elektrotların elde edilen Nyquist eğrileri ile elektrot cinsine bağlı olarak ortaya çıkan empedans spektrumları gösterildi.

Modifikasyon sonucu elde edilen modifiye elektrotlarda $R_{ct}$ değerlerinin yalın camsı karbon elektroda ($R_{ct}$= 403,1 Ω) göre daha az olduğu görüldü. Bu değer AuNP modifikasyonu için $R_{ct}$= 50,1 Ω olarak bulundu. AuNP/MWCNT-Nafyon modifikasyonu için ise küçük şekil olarak verilen yarım dairenin çapından $R_{ct}$= 10,2 Ω olarak hesaplandı. Sonuç olarak yalın GCE, yüzeyi AuNP ve MWCNT-Nafyon ile modifiye edildiğinde AuNP ve MWCNT'nin yüksek iletkenlikleri sayesinde elektron transfer hızlarının iyileştiği ve $R_{ct}$ değerlerinin azaldığı gözlendi.

Yalın GCE yüzeyinde elektron transfer işlemine karşı önemli direnç gösteren düşük frekans bölgesinde bir yarım daire sergiledi. AuNP ile modifiye edilmiş GCE yüzeyinde ise düşük empedansını gösteren çok küçük bir yarım daire bölgesi görüldü. Bu iki elektroda karşılık, AuNP ve MWCNT-Nafyon ile modifiye edilen GCE'nin neredeyse hiç yarım daire göstermediği görüldü.



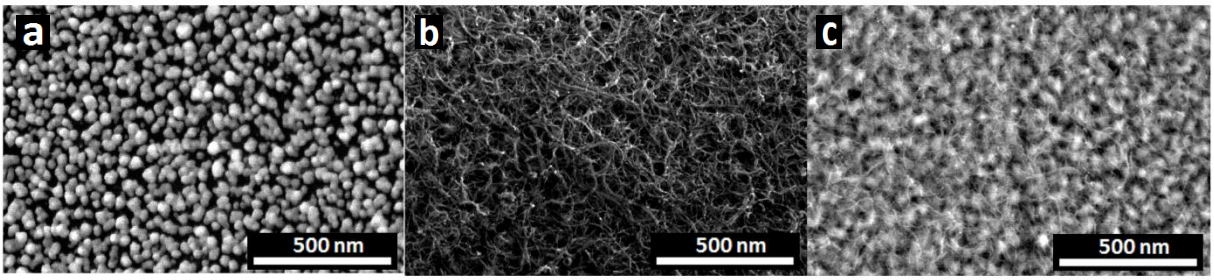

**Şekil 4.18:** Yalın GCE, AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotların 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 0,1 M KCl çözeltisi içerisindeki Nyquist grafikleri (Frekans aralığı: $10^6$-$10^{-1}$ Hz, Genlik: 5 mV).

Bu sonuçlar, CV yöntemi ile elde edilen bulguları desteklemektedir. Nanomalzeme, yalın elektrodun iletkenliğini artırmakta ve elektrokimyasal özelliklerini iyileştirmektedir.

### 4.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Karakterizasyonu

Modifiye edilmiş yüzeylerin elektrokimyasal olarak karşılaştırılmasından sonra elektrot yüzeylerindeki değişimleri izlemek için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yüzey topografileri incelendi. Bu amaçla AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotlar

(DNA immobilize edilmemiş halde) ile DNA immobilize edilmiş AuNP/MWCNT-Nafyon ile modifiye elektrodun SEM görüntüleri incelendi. Yüzey topografilerine bakıldığında, 30 döngü AuNP (Şekil 4.19a) ve AuNP/MWCNT-Nafyon (Şekil 4.19b) modifikasyonundan sonra değişiklik olduğu görüldü. AuNP/MWCNT-Nafyon ile modifiye GCE'nin taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde, polimerik ağda MWCNT'lerin net ve homojen dağılımı, başarılı bir şekilde görüldü. Son olarak AuNP/MWCNT-Nafyon ile modifiye edilen elektrot yüzeyine 250 ppm dsDNA immobilize edildi (biriktirme) ve Şekil 4.19c'de SEM görüntüsü verildi.

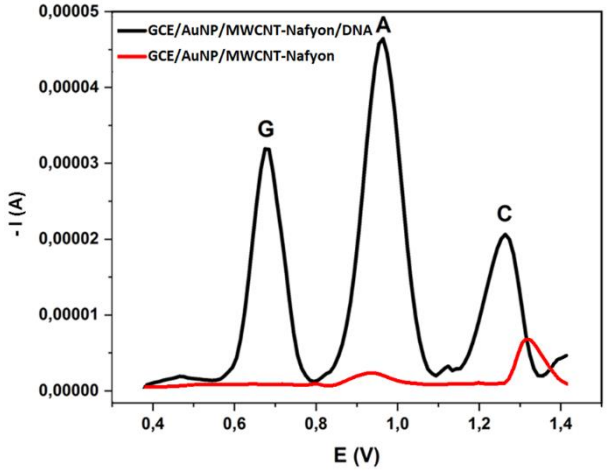



**Şekil 4.19:** (a) GCE/AuNP, (b) GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon ve (c) GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon/DNA modifiye elektrotların SEM görüntüleri (Büyütme: 100,000x; AuNP'lerin boyutları: 30-150 nm; dsDNA: 250 ppm immobilize).

## 4.7. OKSİDATİF DNA HASARI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN SONUÇLARI

### 4.7.1. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) Kullanılarak DNA'nın Tayini

Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak 250 ppm dsDNA çözeltisi varlığında ve yokluğunda alınan DPS voltamogramları karşılaştırıldı. Bu şekilde DNA'ya ait 3 bazın (G, A ve C) oksidasyon sinyalleri gözlemlendi (Şekil 4.20). Bu denemeler sonucunda modifiye elektrodun boş PBS ortamındaki (DNA yokluğunda) davranışında herhangi bir elektroaktif türe rastlanmadığı da görüldü.




**Şekil 4.20:** 250 ppm dsDNA varlığında ve yokluğunda modifiye elektrodun DPS voltamogramları (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; step size: 10 mV; puls size: 75 mV; sample period: 0,5 s; puls time: 0,1 s; biriktirme süresi: 180 s; biriktirme potansiyeli: 0 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

DNA'da bulunan bazlar için elde edilen oksidasyon pik akım değerleri Tablo 4.2'de verildi.

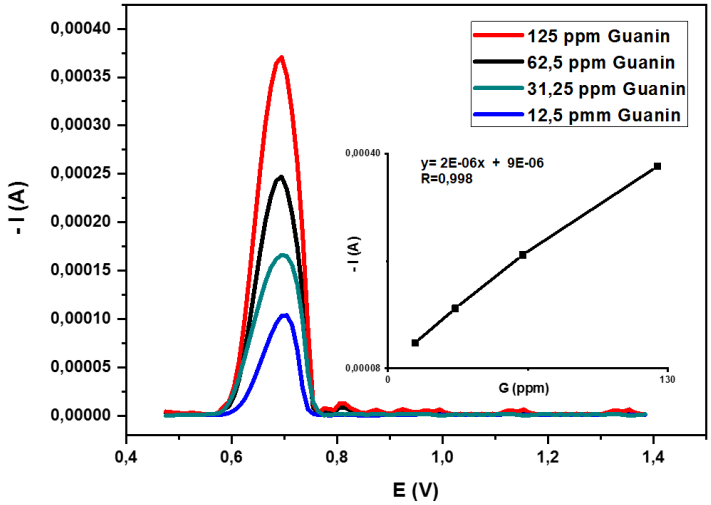
**Tablo 4.2:** DNA'da bulunan G, A ve C bazları için elde edilen oksidasyon potansiyelleri ve pik akım değerleri.

| DNA Bazı | Oksidasyon Potansiyeli (V) | Oksidasyon Pik Akımı (-*I*)(µA) |
|---|---|---|
| Guanin | (+) 0,68 | 32±1,2 |
| Adenin | (+) 0,96 | 46±2,1 |
| Sitozin | (+) 1,24 | 21±0,9 |

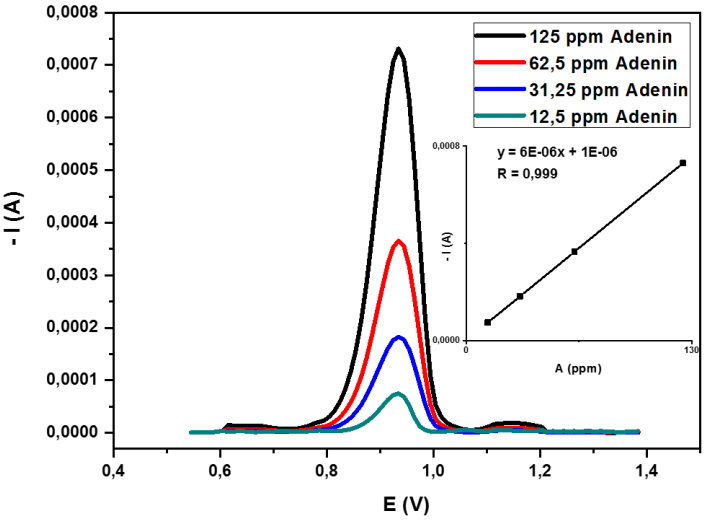
± Standart sapma (n=6).

### 4.7.2. Modifiye Çalışma Elektrodu ile Guanin, Adenin ve Sitozin Standartları Kullanılarak DNA'ya Ait Piklerin Doğrulanması

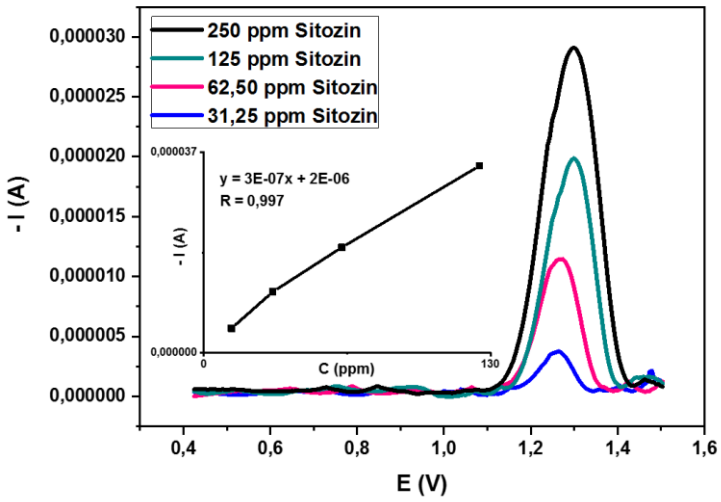
Bölüm 3.10.2'de belirtildiği şekilde, G, A ve C bazlarının farklı konsantrasyonlarda standartları kullanılarak, modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile DNA çözeltisinde belirlenmiş olan yükseltgenme potansiyelleri doğrulandı ve her bir standart için kalibrasyon grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.21 – 23).




**Şekil 4.21:** Farklı konsantrasyonlarda, G standart çözeltilerinin modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği.




**Şekil 4.22:** Farklı konsantrasyonlarda, A standart çözeltilerinin modifiye elektrot ile (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği.




**Şekil 4.23:** Farklı konsantrasyonlarda, C standart çözeltilerinin modifiye elektrot ile (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) elde edilen DPS voltamogramı ve kalibrasyon grafiği.

dsDNA'da bulunan G, A ve C için elde edilen oksidasyon pik akım değerlerinin (Tablo 4.2) söz konusu bazların standartlarıyla elde edilen kalibrasyon denklemlerinde yerine konmasıyla DNA tayininde gözlemlenen bazların miktarları hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te gösterildi.

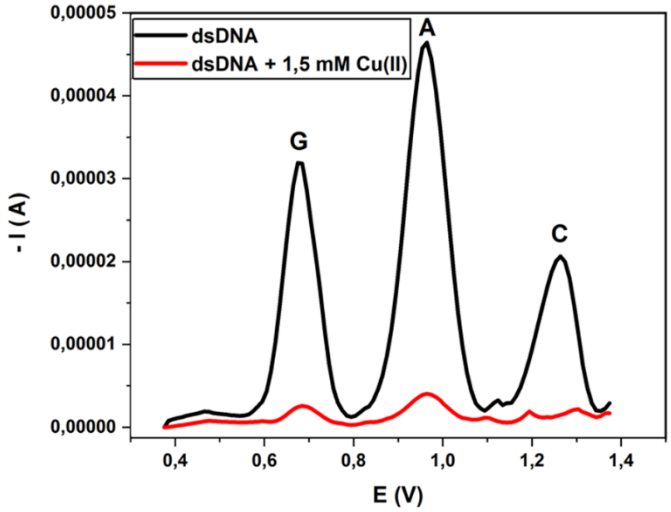
**Tablo 4.3:** DNA tayininde gözlemlenen G, A ve C bazlarının miktarları (ppm).

| DNA Bazı | Miktar (ppm) |
|---|---|
| Guanin | 20,5±0,9 |
| Adenin | 7,8±0,3 |
| Sitozin | 76,6±2,5 |

± Standart sapma (n=6).

### 4.7.3. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile Cu(II) Katalizli Oksidatif DNA Hasarının Tayini

Bölüm 3.10.3'te belirtildiği şekilde uygulanan Cu(II) katalizli hasar yöntemi ile oksidatif DNA hasarı incelendi ve hasarlı-hasarsız DNA'ya ait diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.24'te gösterildi.




**Şekil 4.24:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları (tarama aralığı: (+) 0,4 – (+) 1,4 V; 75 mM pH 7,4 PBS).

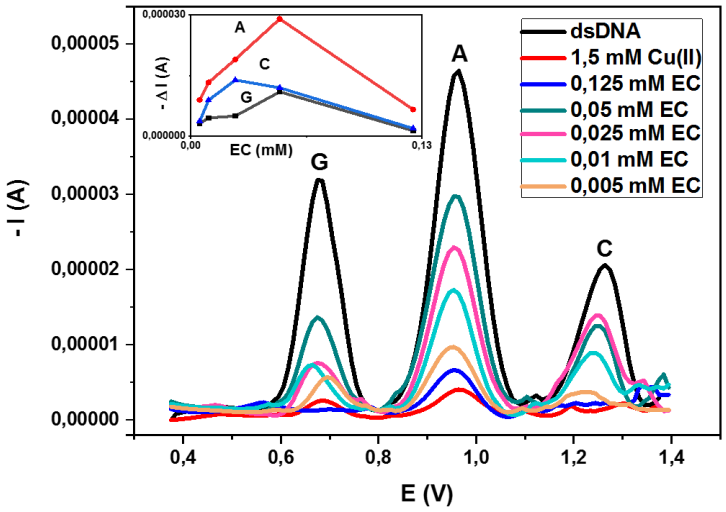
Eşitlik 4.2'ye göre radikallerin DNA'ya verdiği % hasar miktarı hesaplandı. Oluşan radikallerin G ve A bazı üzerinde sırasıyla % 90,9 ve 91,2'lik bir hasar oluşturma yeteneğine sahip olduğu görüldü.

$$\% \textbf{ Hasar} = \left(\frac{I_a - I_b}{I_a}\right) \textbf{x } 100 \qquad (4.2)$$

- $I_a$: dsDNA'da bulunan bazların oksidasyon pik akımı
- $I_b$: Hasar sonrasında dsDNA'da bulunan bazların oksidasyon pik akımı

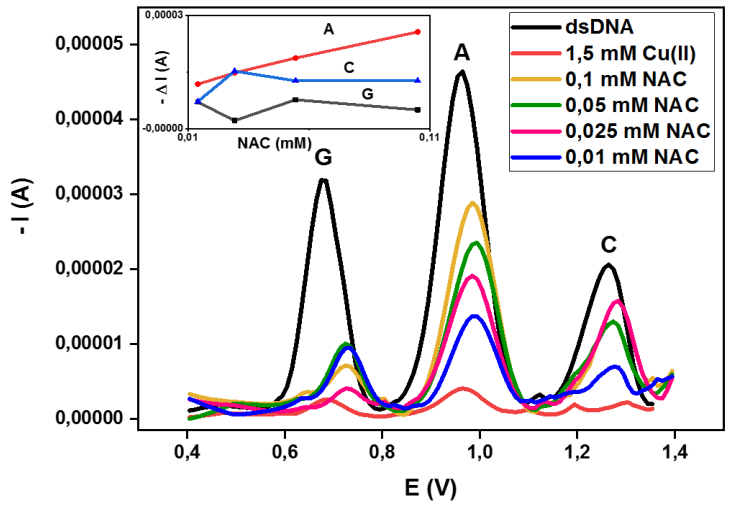
### 4.7.4. Modifiye Çalışma Elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) Kullanılarak Geliştirilen Oksidatif DNA Hasarını Engelleyici Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi ile Bazı Antioksidanların İncelenmesi

Çeşitli antioksidanlar (AA, GA, EC, CT, ECG, GSH, CA, NAC, RA, QR ve RT) varlığında, hazırlanan modifiye elektrodun DNA'nın oksidatif hasarına cevabı Bölüm 3.10.4'te belirtildiği şekilde incelendi. Bu kapsamda etkileşim öncesinde (hasar öncesi dsDNA), etkileşim sonrasında (dsDNA ile Cu(II)'ın etkileşimi sonrasında ortamda hasara uğramadan kalan dsDNA) ve AO varlığında etkileşim sonrasında (dsDNA ve AO karışımı ile Cu(II)'ın etkileşimi sonrasında ortamda hasara uğramadan kalan dsDNA) elde edilen voltamogramlar incelenerek her bir antioksidanın oksidatif DNA hasarını engelleyici aktivite gösterdiği lineer çalışma aralıkları belirlendi.

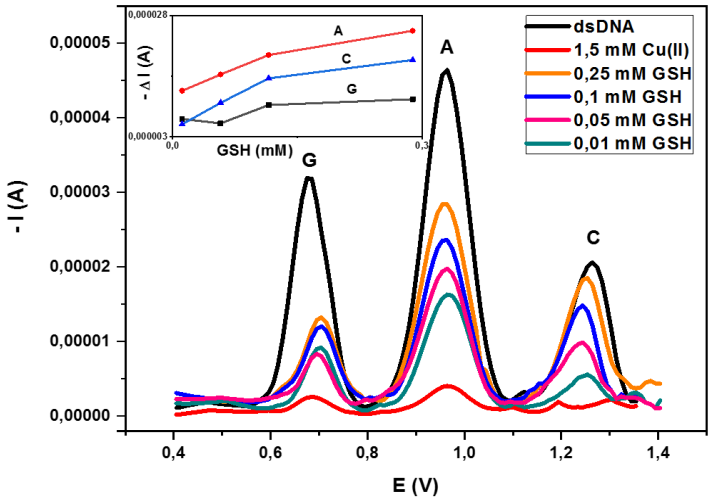



**Şekil 4.25:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,125 mM EC varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.

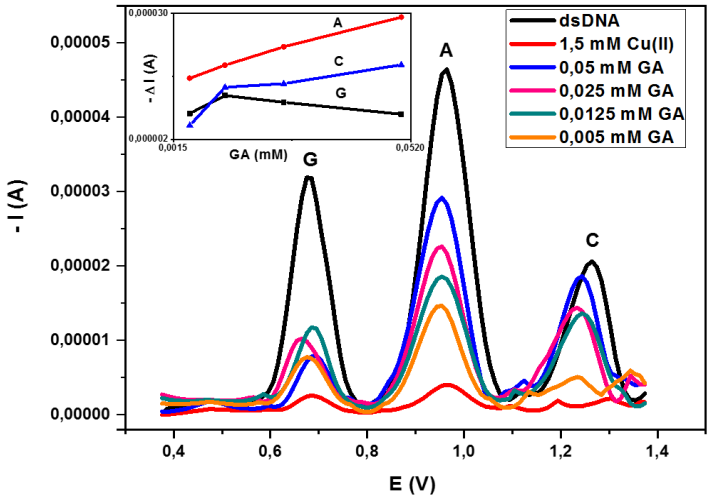
Antioksidanların belirli bir konsantrasyonun üstünde ve altında etkili olarak koruma sağlayamadığı tespit edildi. Örneğin 0,125 mM EC ilavesinde DNA bazlarına ait pik akımlarında düşüş görüldü. Bu sebepten diğer antioksidanlar için de üst konsantrasyon limitler belirlendi ve bunların sadece lineer artışın elde edildiği (antioksidan etkinin görüldüğü) konsantrasyon aralıklarına ait voltamogramları gösterildi.



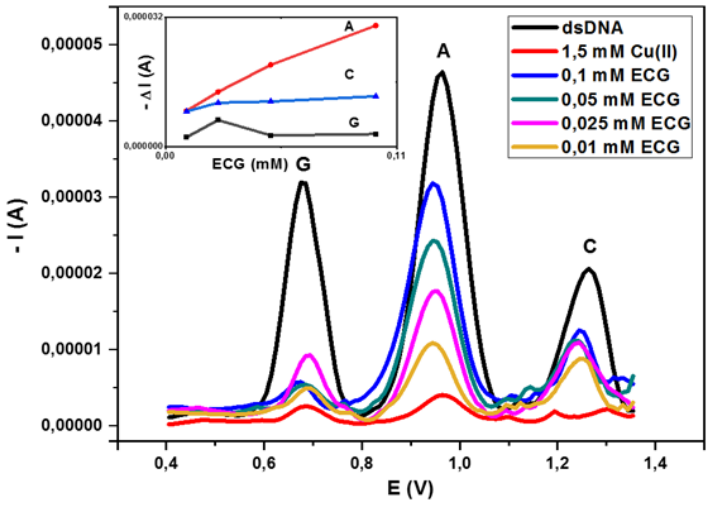

**Şekil 4.26:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,1 mM NAC varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



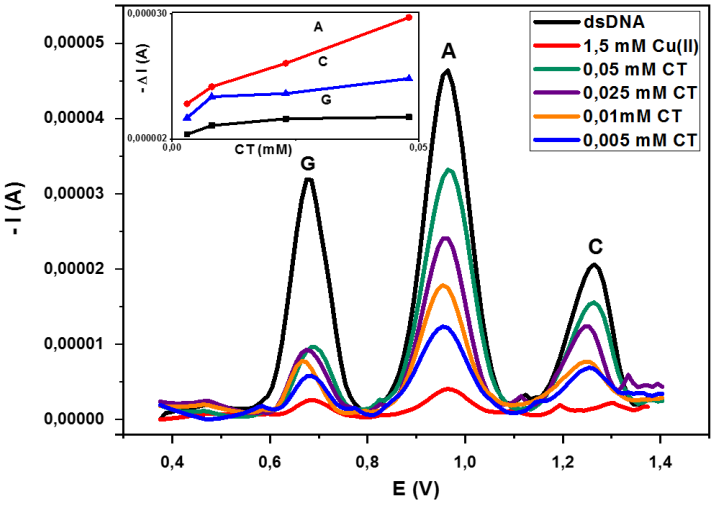

**Şekil 4.27:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,25 mM GSH varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



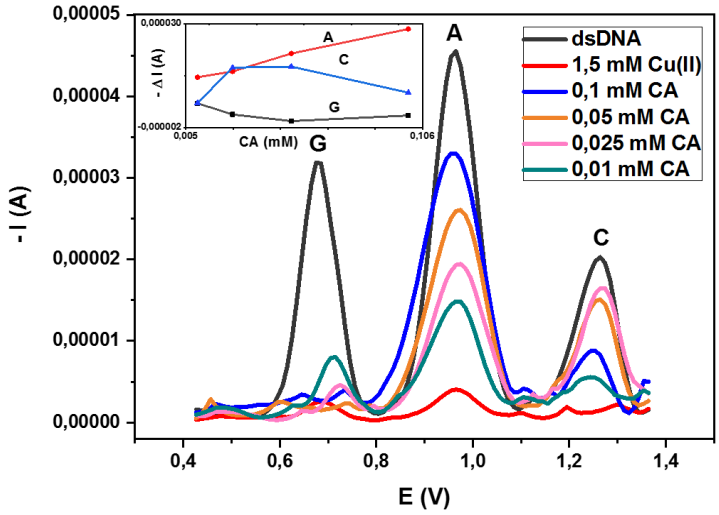

**Şekil 4.28:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM GA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



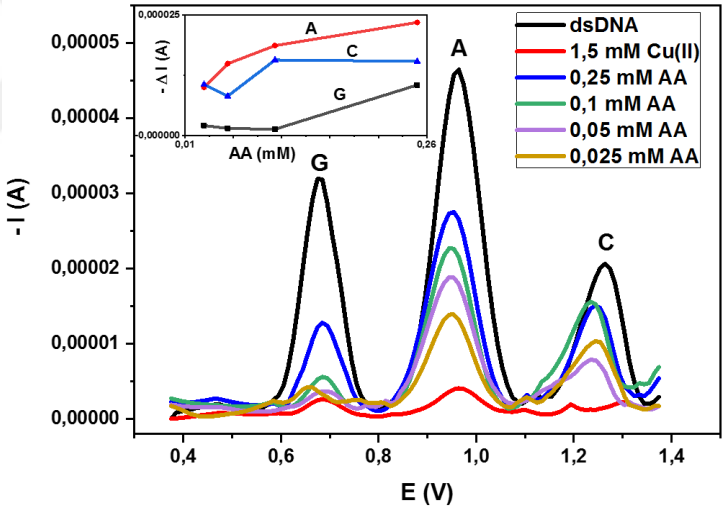

**Şekil 4.29:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01-0,1 mM ECG varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



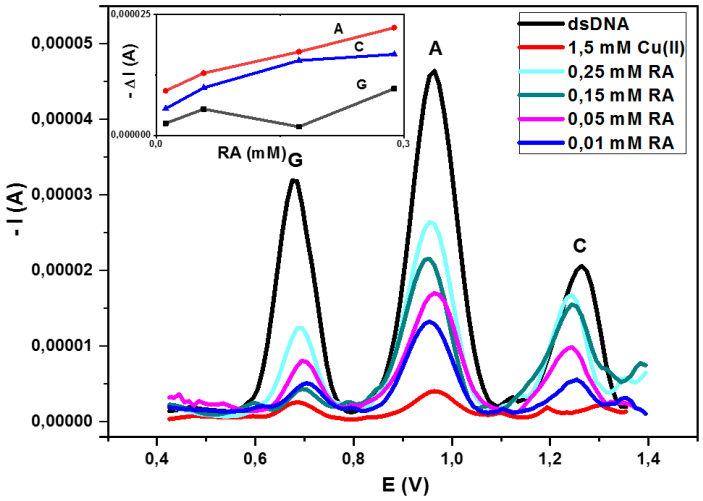

**Şekil 4.30:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM CT varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



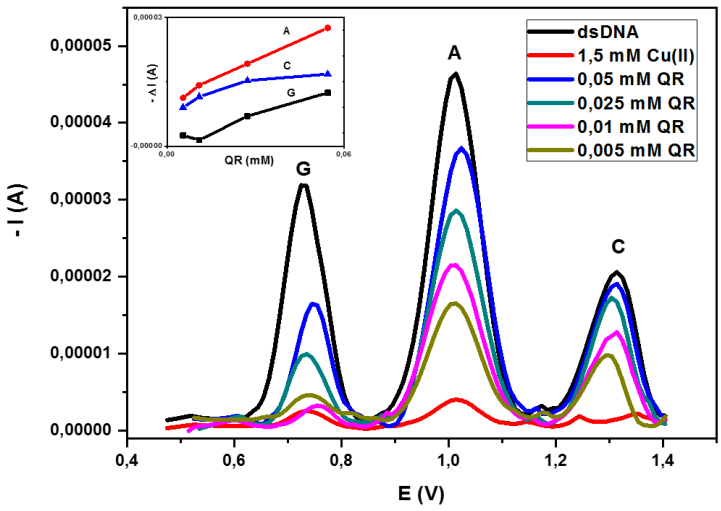

**Şekil 4.31:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,1 mM CA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.



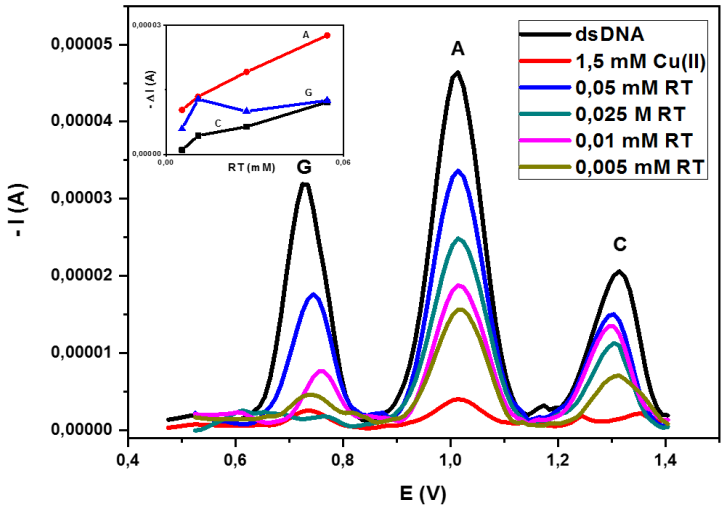

**Şekil 4.32:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,025 – 0,25 mM AA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.




**Şekil 4.33:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,25 mM RA varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.




**Şekil 4.34:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM QR varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.




**Şekil 4.35:** Modifiye elektrot (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM RT varlığında 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları.

AO yokluğunda ($I_b$) ve varlığında ölçülen pik akımları ($I_c$) kullanılarak, Cu(II) ile hasar sonrası dsDNA'da bulunan bazlara ait oksidasyon pik akımları arasındaki fark ($\Delta I = I_c - I_b$) her bir konsantrasyon için hesaplandı ve antioksidanların kalibrasyon doğruları elde edildi.

**Tablo 4.4:** Çeşitli antioksidanların oksidatif hasarı engelleyici aktivitelerine bağlı olarak dsDNA'da bulunan A bazının korunmasına ait kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları, LOD, LOQ değerleri ve çalışma aralıkları (n=6).

| Antioksidan | Çalışma Aralığı (mM) | Kalibrasyon Denklemi[a] | Korelasyon Katsayısı (r) | LOD[b] (mM) | LOQ[c] (mM) |
|---|---|---|---|---|---|
| QR | 0,005-0,05 | y= 421,43x + 11,14 | 0,995 | 0,001 | 0,003 |
| CT | 0,005-0,05 | y= 418,78x + 8,38 | 0,999 | 0,001 | 0,003 |
| RT | 0,005-0,05 | y= 387,27x + 10,46 | 0,994 | 0,001 | 0,003 |
| GA | 0,005-0,05 | y= 313,90x + 9,95 | 0,995 | 0,001 | 0,004 |
| ECG | 0,01-0,1 | y= 231,22x + 7,45 | 0,992 | 0,004 | 0,013 |
| EC | 0,005-0,05 | y= 209,11x + 8,21 | 0,999 | 0,002 | 0,006 |
| CA | 0,01-0,10 | y= 169,21x + 11,67 | 0,996 | 0,004 | 0,013 |
| NAC | 0,01-0,1 | y= 165,80x + 10,87 | 0,998 | 0,005 | 0,017 |
| AA | 0,025-0,25 | y= 63,67x + 11,63 | 0,999 | 0,004 | 0,014 |
| GSH | 0,01-0,25 | y= 58,76x + 12,93 | 0,998 | 0,004 | 0,013 |
| RA | 0,01-0,25 | y= 52,05x + 9,45 | 0,993 | 0,005 | 0,017 |

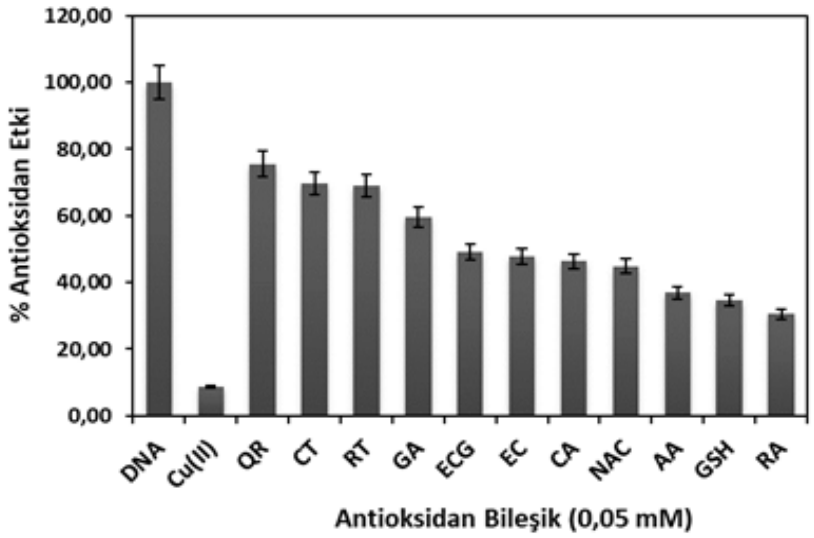
[a]y= - ΔI (μA) ve x= mmol/L
[b]LOD = 3sbl/m (burada m, kalibrasyon doğrusunun eğimidir ve sbl, boşluğun standart sapmasıdır).
[c]LOQ = 10sbl/m.

Tablo 4.4'te çeşitli antioksidanların oksidatif DNA hasarı engelleyici aktivitelerine bağlı olarak dsDNA'da bulunan A bazınının korunmasına ait kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları, LOD, LOQ değerleri ve çalışma aralıkları verildi. Söz konusu standartların, Eşitlik 4.3 [152] kullanılarak % AO etkileri hesaplandı ve bulgular Şekil 4.36'da görülen bar grafiği şeklinde karşılaştırıldı.

$$\% \textbf{ Antioksidan Etki} = \left(\frac{I_c - I_b}{I_a - I_b}\right) \textbf{x } 100 \qquad (4.3)$$

- $I_a$: dsDNA'da bulunan A bazının oksidasyon pik akımı
- $I_b$: Hasar sonrasında dsDNA'da bulunan A bazının oksidasyon pik akımı
- $I_c$: Antioksidan varlığında hasar sonrası dsDNA'da bulunan A bazının oksidasyon pik akımı

Her bir AO bileşik için, aynı konsantrasyon değerine (0,05 mM) denk gelen A bazının oksidasyon pik akım değerleri kullanılarak, tüm bileşiklerin % antioksidan etkileri hesaplandı. Sonuçların bar grafiği olarak karşılaştırılması Şekil 4.36'da gösterilmektedir.

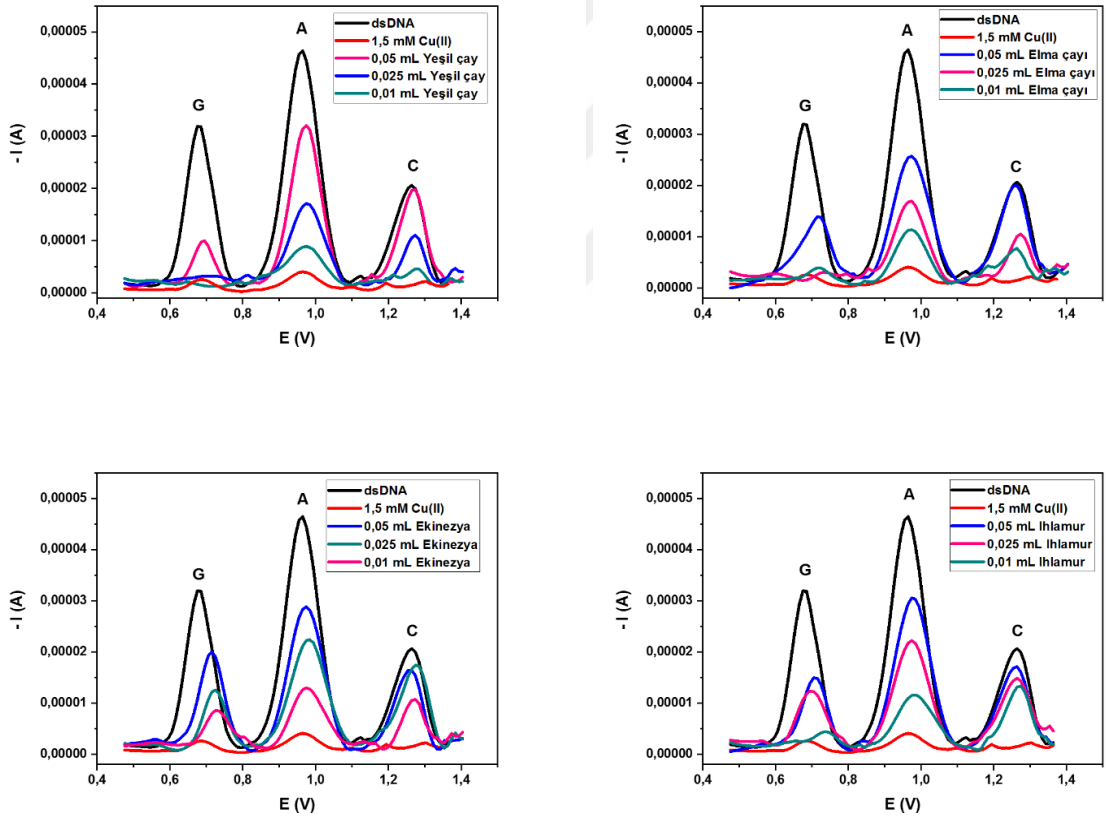



**Şekil 4.36:** Çeşitli antioksidan bileşiklerin (0,05 mM için) radikalleri süpürme etkinliklerinin (% antioksidan etki) karşılaştırılması: QR- kuersetin; CT- kateşin; RT- rutin; GA- gallik asit; ECG- epigallokateşin; EC- epikateşin; CA- klorojenik asit; NAC- N-asetil sistein; AA- askorbik asit; GSH- glutatyon; RA- rozmarinik asit (n=6).

QR, CT ve RT bileşiklerinin test edilen tüm bileşikler arasında en yüksek antioksidan etki (sırasıyla, % 75,56, 69,66 ve 68,95) gösterdiği bulundu. En düşük antioksidan etki ise GSH ve RA için sırasıyla, % 34,71 ve % 30,46 olarak bulundu.

## 4.8. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEM İLE BAZI BİTKİ ÇAYLARININ OKSİDATİF DNA HASARINI ENGELLEYİCİ ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN TAYİNİ

Hazırlanan modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak bazı bitki çaylarının (yeşil çay, ıhlamur, elma çayı ve ekinezya çayı), oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktiviteleri (AOA) incelendi. Bölüm 3.3'te belirtildiği şekilde bitki çaylarının ekstraksiyonları yapıldı. Mikrodalga ekstraksiyon sistemi kullanılarak elde edilen bitki ekstraktlarından farklı hacimlerde (0,01, 0,025 ve 0,05 mL) alınarak oksidatif hasarı engelleyici etkileri incelendi (Şekil 4.37).




**Şekil 4.37:** GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon ile 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 – 0,05 mL Yeşil çay, Elma çayı, Ekinezya ve Ihlamur varlığında 1,5 mM 30 dk etkileşim sonrası elde edilen DPS voltamogramları (n=6).

Gerçek örneklerin 0,05 mL hacmi için bulunan $\Delta I$ akım değerleri kullanılarak aşağıda belirtilen eşitliğe göre AOA değerleri CT eşdeğeri cinsinden hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.5'te µmol CT/g ve mg CT/g olarak verildi.

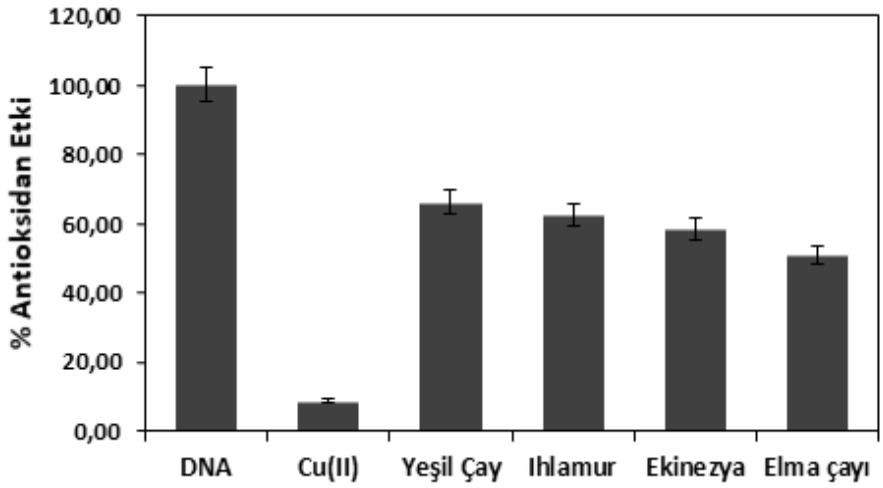
$$\mathbf{AOA\ (\mu mol\ CT\ g^{-1})} = \frac{\Delta I}{\mathbf{Eğim\ (CT)}}\ x\ \frac{\mathbf{V_{ekstre}}}{\mathbf{m\ (g)}}\ \mathbf{x}\ \frac{\mathbf{V_{son}}}{\mathbf{V_{örnek}}} \qquad (4.4)$$

**Tablo 4.5:** Bitki örneklerinin geliştirilen DPSV yöntemi ile CT eşdeğeri cinsinden bulunan AOA değerleri (µmol CT/g ve mg CT/g).

| Örnekler | AOA | |
|---|---|---|
| | µmol CT/g | mg CT/g |
| Yeşil çay | 80,29 ± 2,4 | 23,30 ± 0,3 |
| Ihlamur | 75,79 ± 1,5 | 21,10 ± 0,4 |
| Ekinezya | 70,92 ± 1,8 | 20,59 ± 0,2 |
| Elma çayı | 62,04 ± 0,9 | 18,01 ± 0,1 |

± : Standart sapma değerleri (n=6).

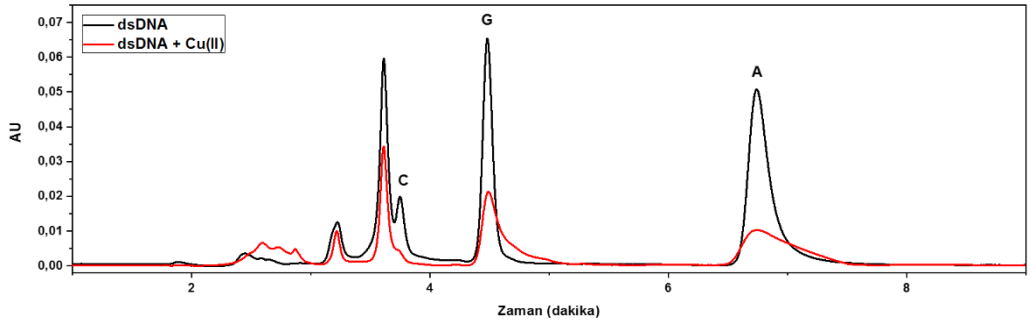
Sonuçlara bakıldığında, AOA değerleri sırasıyla yeşil çay > ıhlamur > ekinezya > elma çayı şeklindedir. Söz konusu bitki çaylarının 0,05 mL hacmi için bulunan akım değerleri kullanılarak Eşitlik 4.3'e göre % antioksidan etkileri hesaplandı ve Şekil 4.38'de bar diyagramı ile karşılaştırılmış sonuçlar verildi. Yeşil çay, ıhlamur, ekinezya ve elma çayı için % antioksidan etkiler sırasıyla, 66,16, 62,50, 58,44 ve 51,12 olarak bulundu.




**Şekil 4.38:** Çeşitli bitki çaylarının (0,05 mL) geliştirilen elektrokimyasal yöntem ile elde edilen radikal süpürme etkinliklerinin (% antioksidan etki) karşılaştırılması (n=6).

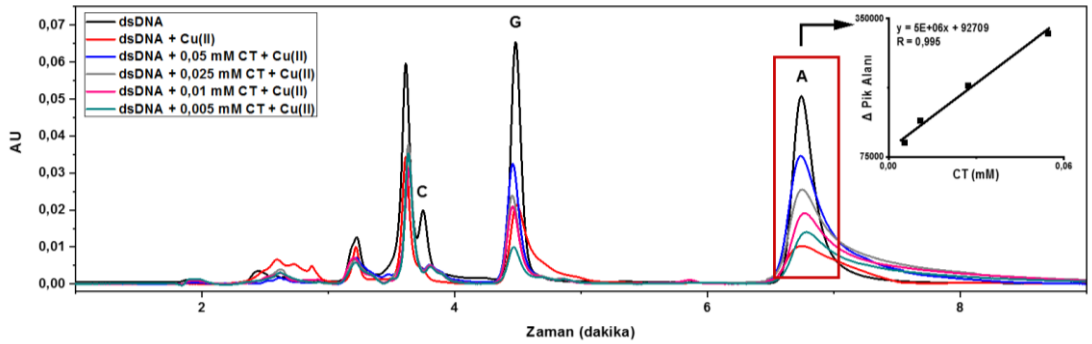
## 4.9. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMİN HPLC-PDA YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI

Geliştirilen DPSV yöntemi Bölüm 3.12'de parametreleri verilen, HPLC yöntemi [234] ile doğrulandı. Şekil 4.39'da 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramları verilmektedir.



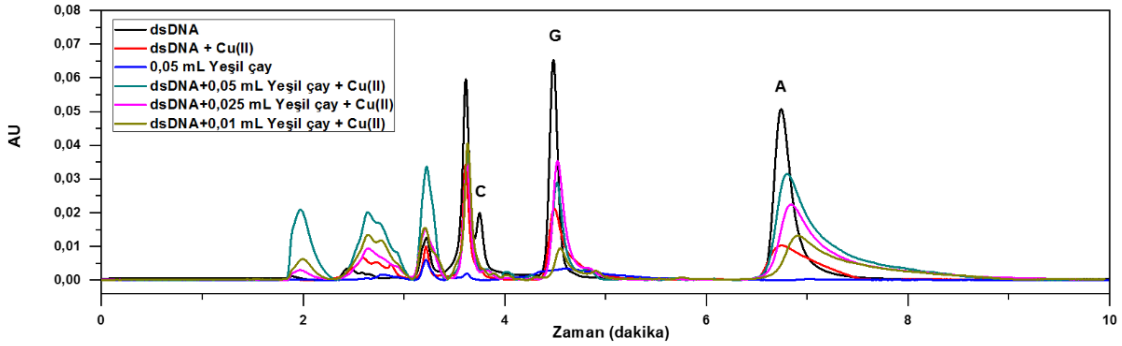

**Şekil 4.39:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi ve 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3).

Şekil 4.40'da 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası ve 0,005 - 0,05 mM CT varlığında 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramları verilmektedir.




**Şekil 4.40:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 - 0,05 mM CT varlığında 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3)(şeklin içinde kalibrasyon doğrusu ve denklemi verilmiştir).

Şekil 4.41'de ise 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası ve 0,01 - 0,05 mL yeşil çay varlığında, 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramları verilmektedir.



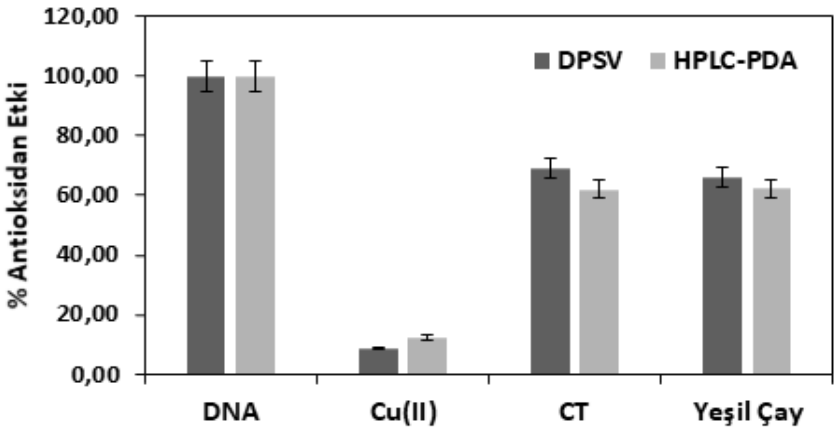

**Şekil 4.41:** 250 ppm dsDNA'nın; 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası, 0,01 - 0,05 mL yeşil çay varlığında 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar (λ= 254 nm) (n=3).

HPLC-PDA yöntemi ile yeşil çay (0,05 mL) ve CT (0,05 mM) için % antioksidan etkiler aşağıda belirtilen eşitliğe göre (Eşitlik 4.5) hesaplandı.

$$\% \textbf{ Antioksidan Etki} = \left(\frac{\mathbf{A_c - A_b}}{\mathbf{A_a - A_b}}\right) \times \mathbf{100} \qquad (4.5)$$

- $A_a$: dsDNA'da bulunan A bazının pik alanı
- $A_b$: Hasar sonrasında dsDNA'da bulunan A bazının pik alanı
- $A_c$: Antioksidan varlığında hasar sonrası dsDNA'da bulunan A bazının pik alanı

Sonuçlar DPSV yöntemi ile Eşitlik 4.3'e göre hesaplanan sonuçlarla karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında iki yöntemin bulgularının birbiriyle uyumlu olduğu görüldü.

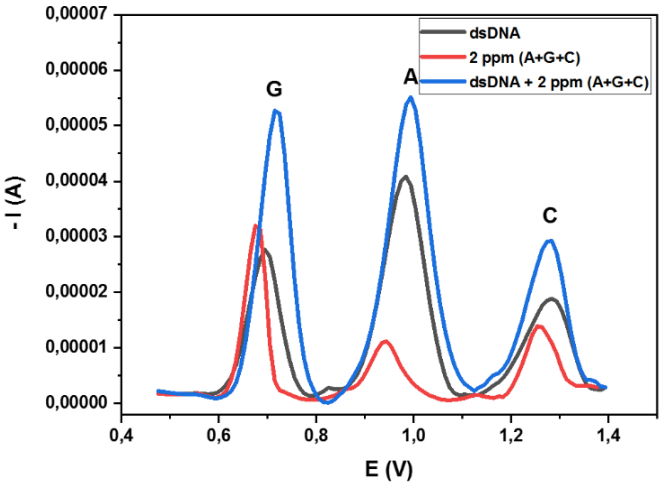



**Şekil 4.42:** DPSV ve HPLC-PDA yöntemleri ile CT standardının (0,05 mM için) ve yeşil çay örneğinin (0,05 mL için) radikal süpürme etkinliklerinin karşılaştırılması. (CT standardı için: P = 0,05, $F_{deneysel}$ = 0,0901, $F_{kritik(tablo)}$ = 5,5914, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$ ; Yeşil çay örneği için: P = 0,05, $F_{deneysel}$ = 0,4882, $F_{kritik(tablo)}$ = 5,5914, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$).

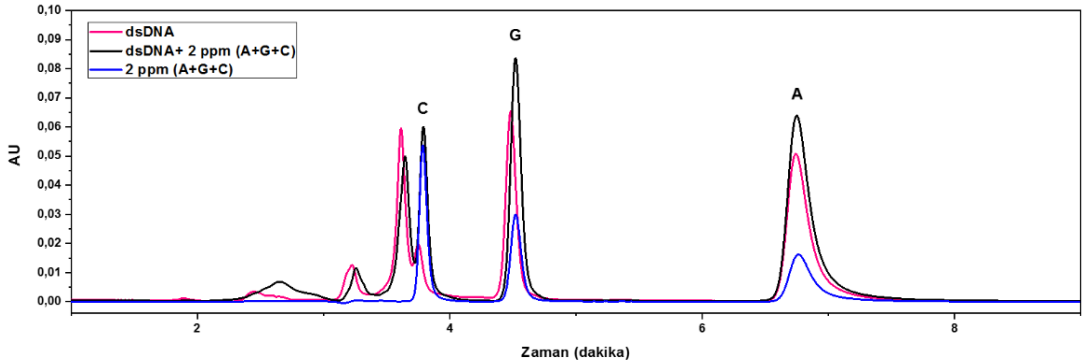
0,05 mM CT standardı ve 0,05 mL yeşil çay örneğinin *F*-testi karşılaştırması için hem geliştirilen yöntem hem de HPLC yöntemi beş tekrar olacak şekilde uygulandı. İstatistiksel olarak *F*-testinin uygulanması sonucunda kesinlik açısından sonuçlar arasında % 95 güvenilirlik düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı gözlendi (Şekil 4.42).

## 4.10. GELİŞTİRİLEN ELEKTROKİMYASAL (DPSV) VE REFERANS (HPLC-PDA) YÖNTEMLERİ İÇİN ANALİTİK PARAMETRELERİN İNCELENMESİ

Bölüm 3.13'te belirtildiği şekilde hazırlanan çözeltilere, geliştirilen DPSV yöntemi ve HPLC-PDA yöntemi ayrı ayrı uygulandı. Elde edilen voltamogramlar ve kromatogramlar Şekil 4.43 ve 4.44'te görülmektedir. Standart baz karışımı sonuçlarına bakıldığında oksidasyon pik potansiyellerinde kaymalar söz konusu olmaktadır. DNA'da ise bu nükleobazlar bağlı formda bulunduklarından tamamen aynı potansiyelde çıkması beklenmemektedir.




**Şekil 4.43:** DPSV tekniği ile GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon kullanılarak; 250 ppm dsDNA, (A, G ve C) standart karışım (2'şer ppm) ve 250 ppm dsDNA üzerine 2'şer ppm (A, G ve C) katkısı yapılan karışım çözeltileri için elde edilen voltamogramlar (n=6).




**Şekil 4.44:** HPLC-PDA yöntemi ile; 250 ppm dsDNA, (A, G ve C) standart karışım (2'şer ppm) ve 250 ppm dsDNA üzerine 2'şer ppm (A, G ve C) katkısı yapılan karışım çözeltileri için elde edilen kromatogramlar (n=6).

Geliştirilen DPSV ve literatürde mevcut HPLC-PDA yöntemi ile 250 ppm dsDNA tayininin tekrarlanabilirlik ve geri kazanım çalışmaları yapıldı. Gün içi ve günler arası, % bağıl standart sapma (RSD) ve % geri kazanım (REC) değerlerinin karşılaştırılması, Tablo 4.6'da verildi.

**Tablo 4.6:** Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yöntemi ile HPLC-PDA yönteminin karşılaştırılması sonucu elde edilen tekrarlanabilirlik (gün-içi ve günler-arası) ve geri kazanım sonuçları (n=6).

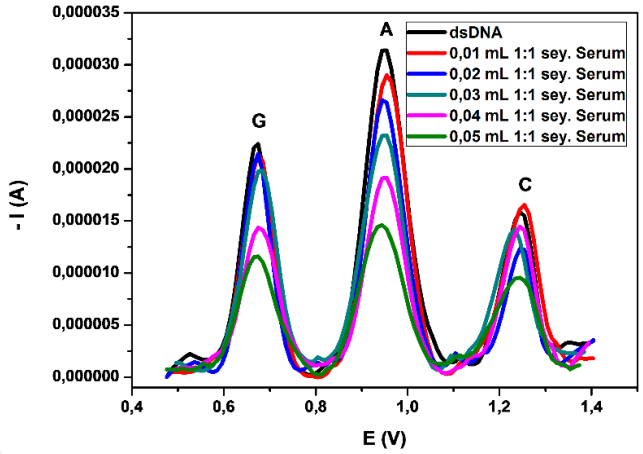
| Yöntem | % REC[a] | % RSD[b] (gün içi) | % RSD (günler arası) |
|---|---|---|---|
| *DPSV* | | | |
| Guanin | 98,9 | 4,6 | 3,5 |
| Adenin | 98,3 | 3,4 | 1,9 |
| Sitozin | 97,3 | 4,2 | 4,8 |
| *HPLC* | | | |
| Guanin | 99,2 | 1,7 | 3,5 |
| Adenin | 101,1 | 1,1 | 2,4 |
| Sitozin | 102,5 | 4,0 | 5,8 |

[a] Geri kazanım
[b] Bağıl standart sapma

## 4.11. MODİFİYE ÇALIŞMA ELEKTRODU (GCE/AUNP/MWCNT-NAFYON) KULLANILARAK GELİŞTİRİLEN DPSV YÖNTEMİNE GİRİŞİMLERİN ETKİSİ

Hazırlanan modifiye elektrot ile yapılan DNA tayinine, DA, ÜA, BSA, glukoz ve FBS (sentetik serumun) etkileri incelendi. Söz konusu interferanların Cu(II) ile etkileşim öncesi, 30 dk etkileşim sonrası ve 0,05 mM GA varlığında, 30 dk etkileşim sonrası DNA'da bulunan A bazının oksidasyon pik akımına etkileri incelendi. Bu amaçla öncelikli olarak FBS çözeltisi 250

ppm dsDNA ortamına 1:1 (v/v) seyreltilerek, farklı hacimlerde eklendi ve en düşük bozucu etki gösterdiği miktar, 0,01 mL olarak belirlendi (Şekil 4.45).




**Şekil 4.45:** Farklı miktarlarda (0,01 - 0,05 mL) eklenen 1:1 seyreltik FBS çözeltisinin DNA tayinine etkisi (n=3).

Ek olarak, ticari olarak satılan sentetik insan serumu örneğinde [237], belirtilen miktarlarda BSA (41 ppm), ÜA (44 ppm) ve glukoz 790 ppm) içeren ve literatürde yer alan miktarda DA (8 ppm) [233] içeren çözeltilerinin interferan etkileri incelendi.

Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yöntemi ile 250 ppm dsDNA'nın tayininde A bazına ait oksidasyon pik akımına FBS ve diğer interferan maddelerin etkileri % hata değerleri olarak hesaplandı ve sonuçlar Tablo 4.7'de verildi.

**Tablo 4.7:** Modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yöntemi ile 250 ppm dsDNA'nın tayininde adenin oksidasyon pik akımına interferan etkilerin incelenmesi (n=3).

| **İnterferan** | **İnterferan miktarı** | **İnterferan Varlığında % Hata** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **Etkileşim Öncesi[a]** | **Etkileşim Sonrası** | |
| | | | **Cu(II)[b]** | **GA + Cu(II)[c]** |
| Dopamin (DA) | 8 ppm | + 2,6 | + 3,2 | + 1,2 |
| Ürik Asit (ÜA) | 44 ppm | - 3,6 | + 9,2 | + 8,9 |
| BSA | 41 ppm | - 1,2 | + 1,0 | + 1,3 |
| Glukoz | 790 ppm | - 1,1 | + 3,1 | - 1,4 |
| Sentetik Serum (FBS) | 1:1 sey. 0,01 mL | - 2,4 | + 3,9 | - 0,8 |

[a]Sadece dsDNA varlığında
[b]dsDNA ve Cu(II) varlığında
[c]dsDNA, 0,05 mM GA ve Cu(II) varlığında

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidatif DNA hasarında meydana gelen olaylar, DNA şeker-fosfat omurgasındaki kimyasal bağların kesintiye uğramasını içerebilir. Bu durum tek veya çift zincirli kopmaların veya nükleobazları şekere bağlayan N-glikozidik bağların oluşmasıyla sonuçlanır. Bunun yanı sıra, nükleobaz kalıntılarının kimyasal modifikasyonu söz konusu olabilir. DNA oksidatif hasarının incelenmesi, bu durumun önemli bir genomik kararsızlık kaynağı oluşturduğu iyi bilindiği için büyük önem taşımaktadır.

Canlı hücrelerde, metabolik olaylar süresince, doğal olarak oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), kararlı olmayan yapıları nedeniyle oldukça aktiftirler. Bu nedenle, lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküllere zarar vererek oksidatif hasara sebep olurlar [12]. Hidroksil radikalinin (•OH), DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir: hem purin hem de pirimidin bazlarına ve ayrıca deoksiriboz omurgasına zarar verir [82]. Bu radikal farklı şekillerde üretilmesinin yanı sıra, yaygın olarak Fenton reaksiyonu ile üretilir [238]. Hem demir hem de bakır, Fe(III ve II) ve Cu(II ve I) gibi değişken oksidasyon durumları sergileyen geçiş elementleridir. Bakır ve demir, oksijenle Haber-Weiss ve/veya Fenton reaksiyonlarını katalize ederek etkileşime girebildikleri için özellikle serbest halde bulunduklarında zararlıdırlar. Bu reaksiyonlar, organizmanın antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmediğinde, hayati öneme sahip biyomoleküllerde (lipidler, proteinler, DNA ve RNA) oksidatif hasara neden olabilen aşırı ROS üretimine neden olabilirler [8,9]. Agresif reaktif oksijen türleri, biyolojik sistemde, ferritinden demir, plazma proteinlerinden bakır salınımına neden olabilir ve bu da reaktif türlerin sürekli oluşmasına neden olabilir [239]. Biyolojik sistemlerde oldukça önemli olan Fe(II) ve Cu(I) iyonları gibi bazı metal iyonları, $O_2$ ile reaksiyona girerek süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşturmaktadır [50]. Bu radikale ikinci elektronun eklenmesiyle bir peroksit iyonu ($O_2^{2-}$) oluşmaktadır. Fizyolojik pH'ta oluşan herhangi bir $O_2^{2-}$, hidrojen peroksit ($H_2O_2$) verecek şekilde protonlanmaktadır. Hidrojen peroksit, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında, •OH radikalinin öncülü olarak davranmakta ve $H_2O_2$'ye tekrar bir elektron katılması sonucunda bu radikal oluşmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkılarak, tez çalışmasında DNA hasarı oluşturmak amacıyla Cu(II) kullanıldı. Uygulanan Cu(II) katalizli hasar yönteminde, Cu(II) varlığında, laboratuvar ortamında havaya açık bekletme sonucunda, çözünmüş $O_2$ ile iki radikal türün ($O_2^{\bullet-}$ ve •OH) oluştuğu düşünülmektedir. Bu radikaller, DNA'da hasar oluşumuna neden olduğundan elektrokimyasal

ölçümlerde G, A ve C bazlarına ait oksidasyon piklerinde azalma görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, DNA bazlarının oksidasyon akımı, doğal elektroaktiviteleriyle karşılaştırıldığında radikallerin varlığında önemli ölçüde azalmaktadır. Diğer taraftan, pek çok doğal ve sentetik AO'ların DNA hasarına karşı etkili bir koruma sergilediği bilinmektedir [16,124]. Nitekim, radikal türleri içeren bir çözeltiye AO eklendiğinde bu bileşiklerin süpürme aktivitesine karşılık gelen akım kısmen geri kazanılmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler, ucuz enstrümentasyonu, hızlı ve pratik analize imkan vermesi, basit işlemlere dayanması ve güvenilir sonuçlar vermesi gibi avantajları sebebiyle günümüzde büyük ilgi gören ve araştırmalara konu olan analiz araçlarıdır. Buradan yola çıkılarak, tez çalışmasında, insan sağlığı için önemli olan oksidatif DNA hasarının ölçülmesi ve hasarı engelleyen antioksidan aktivite tayini için hızlı, seçici ve yüksek duyarlılığa sahip yeni bir elektrokimyasal sensör ve yöntem geliştirilmesi amaçlandı. Voltametrik yöntemler, DNA oksidasyonunu incelemek için uygundur ve çokça tercih edilmektedir. Ancak önceki çalışmalara bakıldığında, büyük bir çoğunluğunun sadece pürin türevi bileşiklerin oksidasyonuna odaklanmış olduğu görülmektedir [72]. Bu çalışmada sunduğumuz voltametrik sonuçlar, daha önce DNA hasarını inceleme amaçlı yapılmış voltametrik çalışmaların bulgularıyla kıyaslandığında, DNA'nın üç bazının (A, G ve C) eş zamanlı tayinini olanaklı kılacak şekilde genişletildiği söylenebilir. Sonuçta, çalışmanın amacına uygun olarak, DNA'da Cu(II) katalizli oksidatif hasar oluşturulması, hasarın tayini ve AO ilavesiyle hasar oluşumunun büyük ölçüde engellenmesi sonucunda, *in vitro* DNA hasarı engelleyici antioksidan aktivite tayini için yeni bir elektroanalitik yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem DNA analizi ve AO aktivite ölçümü için pratik, hızlı, kolay ve güvenilir bir elektrokimyasal yöntem olarak önerilebilir.

Kepley ve Bard'ın [240] bir araştırmasında, GCE'nin aktivasyonu sonucunda, elektrot yüzeyinde önemli miktarda mikrokristalik ve grafit oksit içeren yeni bir faz oluştuğu belirlenmiştir. Yeni faz, çok gözenekli, sulu ve iletken olmayıp, aromatik moleküllerle oldukça iyi bir şekilde birleşmektedir. Bu da GCE'ye uygulanacak ön işlemin, DNA bazlarının kalıntılarının yük transferini değil, öncelikle birikim sürecini etkileyeceği anlamına gelmektedir. Bu sebepten, yalın GCE'lere modifikasyon öncesinde bir ön işlem (aktivasyon) uygulandı. Bu ön işlem, fizyolojik pH'a yakın ortamda (elektroliti destekleyen pH 7,4 fosfat tamponunda), üç DNA bazının (A, G ve C) tümü için daha iyi bir pik ayrımının elde edilmesini

ve aynı zamanda elektrodun modifiye edilmesi sonucunda oksidasyon pik akımı değerlerinin arttırılmasını sağlamıştır.

Yalın GCE kullanıldığında, elde edilen ölçüm verileri çok düşük olduğundan, sinyalleri iyileştirmek amacıyla elektrodun modifiye edilmesine karar verildi ve GCE yüzeyi farklı malzemelerle kaplanarak elektrotlar hazırlandı. CNT'ler, AuNP'lerle kombinasyon halinde, yüksek yüzey alanının yanı sıra CNT'nin iyi iletkenliğinden yararlanılarak DNA tayini için kullanılabilmektedir [172]. Ayrıca, fonksiyonelleştirilmiş CNT'lerin elektrokimyasal DNA sensörlerinde substrat malzemesi olarak kullanıldığı da literatürde bildirilmektedir [241]. Yüzeyle sınırlı çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT), nükleobazların adsorptif birikimini kolaylaştırır ve oksidasyon sinyalini büyük ölçüde artırır [27]. Nafyon ise nanopartiküllerin yığılmasını ve yeniden kristalleşmesini azaltarak bunların elektrot yüzeyinde sabitlenmesine neden olur ve böylece sensörün kararlılığını arttırır [196]. Bu bilgiler esas alınarak, GCE'nin modifikasyonunda, AuNP ve MWCNT-Nafyon kullanımına karar verildi. Sonuçta, Nafyon içeren, MWCNT damlatılarak modifiye edilen, AuNP kaplı GCE (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) hazırlandı ve DNA hasar tayini için kullanılabilecek yeni bir elektrot geliştirilmiş oldu. Geliştirilen tek kullanımlık modifiye elektrotlar kullanılarak oksidatif DNA hasarı tespit edildi. DNA hasarı sonucu oluşan G, A ve C bazlarının oksidasyon sinyallerindeki değişiklikler, dsDNA'nın Cu(II) ile etkileşimi öncesinde/sonrasında ve AO'ların yokluğunda/varlığında DPSV tekniği [233] kullanılarak ölçüldü (T bazı tespit edilemediğinden deneysel bulgularda yer almamaktadır). Geliştirilen elektrot, çeşitli AO'lara ve AO bileşikler içerdiği bilinen gerçek örneklere (yeşil çay, ıhlamur, elma çayı ve ekinezya çayı ekstraktları) uygulanarak söz konusu antioksidanların ve örneklerin oksidatif DNA hasarını engelleyici antioksidan aktiviteleri belirlendi. Bulgular, literatürde mevcut olan HPLC-PDA yöntemi [234] ile elde edilen bulgularla ile karşılaştırıldı. Ayrıca, hasarlı ve hasarsız DNA örneklerinin UV-GB spektrumları alınarak hasar oluşumunun spektrofotometrik olarak tespiti yapıldı. Son olarak, insan serumunda bulunabilen bazı interferanların (DA, ÜA, glükoz, proteinler) geliştirilen elektrokimyasal yönteme etkisi incelendi.

DNA hasarını ve antioksidan aktiviteyi ölçmek amacıyla kullanılması hedeflenen biyosensörün geliştirilmesinde, öncelikli olarak bazı ön denemeler yapıldı. GCE'nin AuNP'ler ile modifikasyonu çalışmalarında, farklı şekilde hazırlanan AuNP'ler ile denemeler yapıldı. Sisteamin kullanılarak hazırlanan yüzeyi (+) yüklü AuNP'ler (sisteaminin $–NH_3^+$ grubu

nedeniyle, oluşan sisteamin kaplı AuNP'lerin yüzeyi (+) yüklü olur [242]), sitrat ile hazırlanan yüzeyi (–) yüklü AuNP'ler (sitratın adsorbe edilmesi sonucu oluşan AuNP'lerin yüzeyi (–) yüklü olur) ve elektrodepozisyon ile yüzeyde oluşturulan AuNP'ler kullanılarak modifiye edilen elektrotlarla elde edilen sinyaller AuNP yokluğunda elde edilenlerle karşılaştırıldı (Şekil 4.1). DNA'ya ait üç baz (G, A ve C) hemen hemen bütün modifikasyonlarda belirlenebilmesine rağmen timin (T) bazına ait oksidasyon piki belirlenemedi. Bu yüzden, sadece üç bazın (G, A ve C) sinyalleri esas alınarak çalışmaya devam edildi. Bu sonuç, literatürde mevcut çalışmalarda, GCE'lerde tüm DNA bazlarının oksidasyonunun voltametrik olarak saptandığını, hatta özellikle pürin bazlarının (G ve A), pirimidin bazlarından (T ve C) daha kolay saptandığını doğrulamaktadır [72]. Ayrıca yine literatürde yer alan bilgiye göre [86], DNA'da meydana gelen oksidatif değişikliklerin elektrokimyasal tespiti, pürin bazlarının oksidasyon piklerinin tespitine dayanmaktadır. Hazırlanan modifiye GCE'ler kullanılarak alınan ölçümler neticesinde, en yüksek akım değerlerinin GCE/30CVAuNP/MWCNT elektrodu ile elde edildiği görüldü (Şekil 4.1) ve GCE'nin AuNP ile kaplanmasında CV ile elektrodepozisyon tekniğinin kullanılmasına karar verildi. Yüzeyde biriken AuNP'lerin miktarı ve ölçülen sinyallere etkisi, döngü sayısının optimize edilmesiyle belirlendi. Farklı döngü sayılarında (10, 20, 30, 40, 50 ve 60) AuNP ile kaplanan elektrotlarla elde edilen pik akım değerleri karşılaştırıldı ve en uygun döngü sayısının 30 olduğu görüldü (Şekil 4.5). GCE yüzeyinde AuNP biriktirme işleminin ilk döngüsünde, (−) 0,1 V civarında bir indirgenme piki gözlendi. Bu pik ortamdaki $Au^{3+}$ iyonlarının miktarına karşılık gelen akım değeridir. Artan döngü sayısıyla birlikte çözeltide bulunan $Au^{3+}$ iyonları $Au^{0}$'a indirgenerek yüzeyde AuNP'leri oluşturmaktadır. Fakat döngü sayısının fazla olması (>30) yüzey kalınlığının artması sebebiyle oksidasyon akımlarında düşüşe neden olmaktadır. Modifikasyonun son aşamasında, % 0,01 (v/v) Nafyon çözeltisi içerecek şekilde MWCNT çözeltisi hazırlandı ve elektrot yüzeyine damlatıldı. Bu aşamada Nafyon miktarının fazla olması sonucunda oluşabilecek elektrostatik itme etkisi sebebiyle az miktarda Nafyon çözeltisi kullanıldı. Böylece homojen ve tekrarlanabilir bir MWCNT yüzeyi elde edildi. Ek olarak sadece MWCNT ve MWCNT-Nafyon damlatılarak hazırlanan elektrotların dsDNA varlığındaki voltamogramları incelendiğinde, özellikle A ve C bazlarına ait piklerde, Nafyonla birlikte artış olduğu görüldü (Şekil 4.2). Bu yüzden modifikasyon işleminde Nafyon kullanımının uygun olduğuna karar verildi. Ardından farklı miktarlarda MWCNT-Nafyon karışımı yüzeye damlatılarak karşılaştırma yapıldı ve en uygun MWCNT-Nafyon miktarı belirlendi (3,5 μL) (Şekil 4.4).

DNA varlığında modifikasyon malzemelerinin (AuNP ve MWCNT-Nafyon) farklı sırada kullanılmasıyla hazırlanan elektrotların yalın elektrot ile karşılaştırılması yapılarak modifikasyon malzemelerinin sıralaması ve modifikasyonun etkisi belirlendi. Sonuçta üç DNA bazının (G, A ve C), GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrot varlığında kolaylıkla ayrılarak yüksek oksidasyon akım değerlerinde ölçülebildiği görüldü. Yalın elektrot kullanıldığında, baz sinyalleri birbiri ile örtüşmüş bir şekilde ve çok düşük bir hassasiyette elde edildiğinden doğrudan kullanımının uygun olmadığına karar verilmişti. Ayrıca diğer modifikasyon şekilleri de incelendiğinde benzer şekilde düşük akım değerlerinin elde edildiği görülmektedir. Bu sonuç, hazırlanan modifiye elektrodun üstün performansını açıkça ortaya koymaktadır. Ag/AgCl referans elektroda karşı yapılan bu ölçümlerde, G, A ve C bazlarına ait yükseltgenme piklerinin sırasıyla; (+) 0,68, (+) 0,96 ve (+) 1,24 V'de elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.3). Belirlenen bu potansiyel değerleri, Wang ve diğ.'lerinin modifiye GCE ile buldukları değerler ile uyuşmaktadır ((+) 0,65, (+) 0,93 ve (+) 1,27 V) [1]. Yapılan tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde, modifiye çalışma elektrodunun yapısı, "GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon" olarak belirlendi ve bundan sonraki analizler bu elektrot kullanılarak yapıldı.

İkinci aşamada, DNA immobilizasyonuna etki eden parametreler (DNA'nın konsantrasyonu, destek elektrolit çözeltisinin pH'sı ve konsantrasyonu, DPSV yöntemi parametreleri) incelendi. İlk olarak, denemelerde kullanılacak olan dsDNA çözeltisinin konsantrasyonu (125 − 1000 ppm) optimize edildi. En uygun konsantrasyon olarak, 250 ppm belirlendi (Şekil 4.7). Daha yüksek konsantrasyonlarda (500, 750 ve 1000 ppm) çalışıldığında, bu hassasiyetin düştüğü tespit edildi. Bu durum, elektrot yüzeyine difüzyon kontrollü olarak taşınan DNA'nın yüzeyde doygunluğa ulaşması ile açıklanabilir. Ardından, destek elektrolit çözeltisinin pH (4,8, 7,4 ve 8,5) ve konsantrasyon (25 − 100 mM) optimizasyonları yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda destek elektrolit çözeltisi için en uygun pH 7,4 ve en uygun konsantrasyon 75 mM olarak belirlendi (Şekil 4.8 ve 4.9). Son olarak geliştirilen DPSV tekniğinin parametreleri (biriktirme potansiyeli; (–) 0,6 – (+) 1,0 V, biriktirme süresi; 30 – 420 s, puls size; 10 – 120 mV ve step size; 2,5 – 15 mV) optimize edildi. Denemeler sonucunda, en uygun biriktirme potansiyeli 0 V, biriktirme süresi 180 s, puls size 75 mV ve step size 10 mV olarak belirlendi (Şekil 4.10 − 4.13).

Çalışmada temel amaç, DNA hasarını belirlemek olduğundan önce hasarın oluşturulması için denemeler yapıldı. Bu amaçla, 250 ppm DNA çözeltisine Cu(II) iyonları ilave edilerek

laboratuvar ortamında havaya açık şekilde bekletildi. Bu uygulamalarda önce, farklı Cu(II) iyonları konsantrasyonlarının (0,75 – 3,0 mM) etkisi, daha sonra da bekletme sürelerinin (5 – 40 dk) etkisi araştırıldı. Belirlenen optimum çalışma koşullarında, modifiye GCE elektrotla alınan ölçümler sonucunda, DNA'da hasar oluşumu açısından en uygun Cu(II) konsantrasyonu 1,5 mM olarak en uygun süre ise 30 dk olarak belirlendi (Şekil 4.14 ve 4.15).

Çalışmanın diğer önemli amacı, DNA'da hasar oluşumunu engelleyici AO aktiviteyi belirlemek olduğundan Cu(II) katalizli DNA hasarı oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra AO ilavesi yapılarak, her iki durumda koruyucu etkilerinin olup olmadığı, diğer bir ifadeyle AO aktivite gösterip göstermedikleri incelendi. Bunun için RA, GA ve CT standart çözeltileri ile denemeler gerçekleştirildi. İlk denemede, 250 ppm DNA çözeltisine, her bir AO bileşiğinden 0,05 mM olacak şekilde ilaveler yapıldı ve 1,5 mM olacak şekilde Cu(II) çözeltisi eklendikten sonra 30 dk bekletildi. İkinci denemede ise, 250 ppm DNA çözeltisine 1,5 mM olacak şekilde Cu(II) çözeltisi eklendikten sonra yukarıda adı geçen AO bileşikleri aynı konsantrasyonlarda olacak şekilde ilave edildi ve 30 dk bekletildi. A bazına ait oksidasyon pik akım değerleri esas alınarak yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler; AO ilavesi, Cu(II) ile etkileşim öncesi yapıldığı zaman koruyucu etkilerinin, yani AO aktivitelerinin, daha yüksek olduğunu gösterdi (Tablo 4.1).

Son olarak, DNA'nın oksidatif hasara uğradığının diğer bir kanıtı olarak, 250 ppm DNA çözeltisinin doğrudan ve 1,5 mM Cu(II) çözeltisi eklenip 30 dk bekletilmesinden sonra UV-Görünür bölge spektrumları alındı. Nitekim, Cu(II) ile etkileşim sonrasında, DNA'ya ait karakteristik dalga boyundaki (260 nm) absorbans değerlerinde artış olduğu gözlendi (Şekil 4.16). Bu durum DNA'nın parçalanmasına ve bozunmasına bağlı olarak DNA'nın hasara uğradığını doğrulamaktadır [243].

GCE'nin modifikasyonu ile hazırlanan çalışma elektrodu, CV, EIS ve SEM teknikleri ile karakterize edildi. CV ile yapılan karakterizasyon çalışmasında, modifiye elektrotta Fe(III)/Fe(II) redoks çiftine ait yükseltgenme ve indirgenme pik akımlarının daha yüksek çıktığı görüldü. Yalın GCE'nin cevabı, nanomalzemeler ile modifiye edilmiş elektrotların cevabı ile karşılaştırıldığında elektrokimyasal cevabın oldukça düşük olduğu gözlendi (Şekil 4.17). Sonuç olarak, nanomalzeme (AuNP ve MWCNT-Nafyon) varlığında artan elektriksel iletkenlik ve kolay elektron aktarım hızına bağlı olarak, döngüsel voltamogramların daha tersinir ve daha yüksek pik akımlarına sahip olduğu görüldü. Elektrot yüzeyindeki farklı modifikasyonları

karakterize edebilme yöntemlerinden biri de elektrokimyasal empedans spektroskopisidir (EIS). Bu yöntem elektrot-çözelti arayüzeyinde elektron aktarımının hızı hakkında bilgi verir [244]. Nyquist eğrisinde yarı halka çapı, elektrot yüzeyindeki elektron transferine karşı oluşan direnci ($R_{ct}$) göstermektedir. Daha iletken bir yüzey varlığında elektron transfer hızı ($R_{ct}$) değerlerinde azalmalar meydana gelir. Yalın GCE ile AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotlar, EIS ile 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0,1 M KCl çözeltisi içerisinde karakterize edildi. Elektrotların elde edilen Nyquist eğrileri ile elektrot cinsine bağlı olarak ortaya çıkan empedans spektrumları incelendiğinde, modifiye elektrotlarda $R_{ct}$ değerlerinin yalın GCE'ye ($R_{ct}$= 403,1 Ω) göre daha az olduğu görüldü. Bu değer AuNP modifikasyonu için $R_{ct}$= 50,1 Ω ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifikasyonu için ise yarım dairenin çapından $R_{ct}$= 10,2 Ω olarak hesaplandı (Şekil 4.18). Sonuç olarak yalın GCE yüzeyi AuNP ve MWCNT-Nafyon ile modifiye edildiğinde bu nano malzemelerin yüksek iletkenlikleri sayesinde elektron transfer hızlarının iyileştiği ve $R_{ct}$ değerlerinin azaldığı gözlendi. Yalın GCE, yüzeyinde elektron transfer işlemine karşı önemli direnç gösteren düşük frekans bölgesinde bir yarım daire sergilemiştir. AuNP ile modifiye edilmiş GCE yüzeyinde ise düşük empedansını gösteren çok küçük bir yarım daire bölgesi sergilemiştir. Bu iki elektroda karşılık AuNP ve MWCNT-Nafyon ile modifiye edilen GCE'nin neredeyse hiç yarım daire göstermediği görülmüştür. Bu düşük empedans, MWCNT'nin yüksek iletken doğasından kaynaklanmaktadır [245]. Modifiye edilmiş yüzeylerin elektrokimyasal olarak karşılaştırılmasından sonra, elektrotların yüzey topografilerindeki değişimleri izlemek için SEM görüntüleri alındı. Bu amaçla AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrotlar (DNA immobilize edilmemiş halde) ile DNA immobilize edilmiş AuNP/MWCNT-Nafyon elektrodun SEM görüntüleri incelendi. Yüzey topografilerine bakıldığında, 30 döngü AuNP ve AuNP/MWCNT-Nafyon modifikasyonundan sonra değişiklik olduğu görüldü. AuNP/MWCNT-Nafyon ile modifiye GCE'nin SEM görüntülerinde, polimerik ağda çok duvarlı karbon nanotüplerin net ve homojen dağılımı başarılı bir şekilde görüldü. Son olarak, 250 ppm dsDNA immobilize edilen (DPSV ile biriktirme) AuNP/MWCNT-Nafyon modifiye elektrodun SEM görüntüsü incelendiğinde, MWCNT üzerine DNA bazlarının immobilize olduğu görüldü (Şekil 4.19).

DNA oksidatif hasarı engelleyici antioksidan aktivite tayini için geliştirilen ve deneysel parametreleri optimize edilen elektrokimyasal yöntem, öncelikli olarak hasarsız DNA'nın tayini için kullanıldı. Modifiye elektrot kullanılarak, 250 ppm dsDNA çözeltisi varlığında ve

yokluğunda (sadece PBS) alınan DPS voltamogramları karşılaştırıldı. DNA varlığında voltamogramda, 3 bazın (G, A ve C) oksidasyon sinyalleri görülürken, yokluğunda herhangi bir elektroaktif türe rastlanmadığı görüldü (Şekil 4.20). DNA'nın G, A ve C bazlarına ait oksidasyon pik akımları sırasıyla; 32±1,2, 46±2,1 ve 21±0,9 µA olarak ölçüldü. Ardından, G, A ve C bazlarının standartları kullanılarak, yükseltgenme potansiyelleri doğrulandı. Yani, dsDNA tayininde (+) 0,68, (+) 0,96 ve (+) 1,24 V'da görülen piklerin sırasıyla; G, A ve C bazlarına ait olduğu kesinleştirildi (Tablo 4.2). DNA'da bulunan G, A ve C için ölçülen pik akım değerlerinin, ilgili bazların farklı konsantrasyonlardaki standartlarıyla elde edilen kalibrasyon denklemlerinde (Şekil 4.21 – 4.23) yerine konmasıyla, DNA tayininde gözlemlenen bazların miktarları hesaplandı. Sonuçta DNA'da bulunan G, A ve C miktarları sırasıyla; 20,5±0,9, 7,8±0,3 ve 76,6±2,5 ppm olarak belirlendi (Tablo 4.3).

Geliştirilen modifiye çalışma elektrodu kullanılarak Cu(II) katalizli oksidatif DNA hasarı incelendi. 250 ppm DNA çözeltilerinin, Cu(II) yokluğunda ve 1,5 mM Cu(II) ile 30 dk inkübasyonu sonrasında diferansiyel puls voltamogramları alındı ve hasar oluştuğu görüldü (Şekil 4.24). Voltamogramda görüldüğü gibi, çözelti ortamında Cu(II) varlığında oluşan radikaller, DNA'daki G ve A bazlarına yüksek oranda, C bazına ise neredeyse tamamen hasar vermiştir. Bu durum, ortamda az miktarda hasara uğramadan kalan DNA'nın varlığı anlamına gelmektedir. Voltamogramlardan ölçülen pik akım değerleriyle hesap yapıldığında (Eşitlik 4.2), Cu(II) ve çözünmüş $O_2$ varlığında oluştuğu düşünülen radikallerin G ve A bazlarını, sırasıyla % 90,9 ve 91,2 oranlarında hasara uğrattığı belirlendi. Burada çeşitli radikalleri içeren bir çözelti ortamı oluştuğundan çok tekrar yaparak yaklaşık aynı hasarın verilmesi güvence altına alındı. Bu sonucun Barroso ve diğ.'lerinin bulduğu sonuca (% 87,6) yakın olduğu görülmektedir [19].

AOA ölçümü amaçlı yapılan denemeler ile bazı antioksidan standartları (QR, CT, RT, GA, ECG, EC, CA, NAC, AA, GSH ve RA) kullanılarak oksidatif DNA hasarını engelleyici etkileri belirlendi. Burada belirlenen koruyucu (antioksidan) etki, AO'ların Cu(II) ve çözünmüş oksijen varlığında oluşan radikalleri süpürmesinden kaynaklanmaktadır. Sonuçlar Cu(II) ile etkileşim öncesi (dsDNA immobilize), etkileşim sonrası (dsDNA ile Cu(II)'nin etkileşimi sonrasında ortamda hasara uğramadan kalan dsDNA immobilize) ve AO varlığında, etkileşim sonrası (dsDNA ve AO karışımı ile Cu(II)'nin etkileşimi sonrasında ortamda hasara uğramadan kalan dsDNA immobilize) olarak karşılaştırıldı. Antioksidanların belirli bir konsantrasyonun üstünde

ve altında etkili bir koruma sağlayamadığı tespit edildi. Örneğin 0,125 mM epikateşin ilavesinde, DNA bazlarına ait pik akımlarında düşüş görüldü. Bu durum, prooksidan etki olarak izah edilebilir. Nitekim, literatürde antioksidanların belirli konsantrasyon aralığında antioksidan etki gösterdiği belirtilmektedir (örneğin AA için 0,5 – 1,5 mM ve 1,5 – 2,5 mM) [246]. Çalışılan AO standartlarının koruyucu etkilerini belirlemek için A bazı sinyali esas alındı ve voltamogramlarda A bazına ait oksidasyon pik akımlarında lineer artışın gözlendiği (antioksidan etkinin görüldüğü) konsantrasyon aralıkları belirlendi (Şekil 4.25-4.35).

QR ve RT standartlarının suda çözünürlükleri az olduğundan, % 10 EtOH (v/v) ortamında çalışıldı. Bunun öncesinde, optimizasyonu yapılan deney koşullarında, organik çözücü EtOH'ın, ölçüm değerlerine etkisi olup olmadığı incelendi ve anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü. Bu durum, Labuda ve diğ.'lerinin yaptıkları bir çalışmada çözücü içeriğinin hazırladıkları sensör üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığını belirtmesiyle desteklenmektedir [221]. AO çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak yükseltgenme pik akımları artmaktadır. Literatürde, bazların salınımına ve radikaller tarafından indüklenen fosfodiester bağlarının kesintiye uğramasına bu AO'ların direnç gösterdiği belirtilmiştir [247]. Ayrıca yapılan deneysel çalışmalara bakıldığında, AO'ların her bir DNA bazına aynı oranda etkisi söz konusu olmamaktadır. A bazı için daha lineer bir koruma elde edildiği görülmektedir. Literatürde de DNA'da meydana gelen oksidatif değişikliklerin elektrokimyasal tespitinin daha çok pürin baz oksidasyon piklerinin tespitine dayandığı bilgisi yer almaktadır [86]. Bu sebepten lineer çalışma aralıkları, özellikle A bazındaki etkileşimler dikkate alınarak belirlendi. Bu şekilde her bir AO'nın oksidatif hasarı engelleyici aktiviteleri incelendi. Her bir antioksidan bileşik için aynı konsantrasyon değerine (0,05 mM) denk gelen pik akım şiddetleri kullanılarak, çalışılan tüm bileşiklerin % antioksidan etkileri hesaplandı (Eşitlik 4.3) ve elde edilen bulgular Şekil 4.36'da görülen bar diyagramı şeklinde karşılaştırıldı. Adı geçen AO'ların % antioksidan etkileri bakımından büyükten küçüğe doğru sıralaması; QR > CT > RT > GA > ECG > EC > CA > NAC > AA > GSH > RA olarak belirlendi. Test edilen tüm bileşikler arasında, QR, CT ve RT'nin en yüksek antioksidan etki gösterdiği (sırasıyla, % 75,56, 69,66 ve 68,95) gözlendi. Literatürde QR ve RT'in sahip olduğu 3-OH grubunun, muhtemelen düzlemsellik üzerindeki etkiler yoluyla antioksidan aktiviteyi güçlü bir şekilde etkilediği belirtilmiştir [248]. Bu durumda, daha düzlemsel ve halkalar arası konjugasyona olanak veren kuersetin ve rutin daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip gibi görünmektedir. Kuersetinin serbest 3-OH grubu, daha kararlı bir flavonoid radikalinin oluşumuna izin verebilir ve serbest 3-OH'nin olmadığı diğer

antioksidanlarla karşılaştırıldığında daha güçlü antioksidan aktivite ile sonuçlanabilir. En düşük % AO etki ise GSH ve RA için sırasıyla, 34,71 ve 30,46 olarak bulundu. Genel olarak sonuçlar değerlendirildiğinde antioksidan etkinlik sırası literatürde mevcut CUPRAC yönteminkiyle ile kısmen uyumlu çıkmıştır [249,250]. CUPRAC yönteminde etkinliği yüksek bulunan rosmarinik asidin DNA hasar koruyucu etkisinin az oluşu, bu fenolik asidin $pK_a$ değerinin 2,92 olması nedeniyle nötral çalışma pH'ında negatif yüklü olmasına, dolayısıyla elektrot yüzeyinde adsorplanmış negatif yüklü DNA tarafından itilmesine bağlanabilir. Bütün çalışmalar neticesinde elde edilen bulgular göstermektedir ki; hazırlanan modifiye elektrot ve geliştirilen yöntem, % antioksidan etkinin ölçümünde başarılı sonuçlar vermiştir ve AO'ların belirli konsantrasyon aralıklarında DNA hasarını engelleyici, yani koruyucu etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Gıda maddeleri, ROS'un zararlı etkilerine karşı koymak ve önlemek için mükemmel bir eksojen doğal antioksidan kaynağı oluşturur. Bu koruyucu etki analitik olarak antioksidan aktivite şeklinde tanımlanır [19]. Hazırlanan modifiye elektrot ile bazı bitki çaylarının (yeşil çay, ıhlamur, elma çayı ve ekinezya çayı) oksidatif hasarı engelleyici antioksidan aktiviteleri incelendi. Bu kapsamda öncelikle mikrodalga ekstraksiyon tekniği ile bitki çaylarının ekstraksiyonları yapıldı. Mikrodalga ekstraksiyon tekniği, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha etkili yeni bir tekniktir. Üstünlükleri olarak ekstraksiyon süresinin azaltılması, daha iyi ekstraksiyon verimliği ve daha az çözücü kullanımı gösterilebilir [251]. Gerçek örneklerin 0,05 mL hacmi için bulunan $\Delta I$ akım değerleri (Şekil 4.37) kullanılarak AOA değerleri CT eşdeğeri cinsinden hesaplandı (Eşitlik 4.4). AOA değerleri yeşil çay, ıhlamur, ekinezya ve elma çayı için sırasıyla; 80,29, 75,79, 70,92 ve 62,04 µmol CT/g olarak bulundu (Tablo 4.5). Çalışılan örneklerin hesaplanan AOA değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralaması; yeşil çay > ıhlamur > ekinezya > elma çayı şeklindedir. Yeşil çay, biyoaktif bir üründür ve polifenoller (CT, ECT, EGCT) ve vitaminler gibi [252,253] antioksidan aktiviteye sahip çok sayıda bileşen içermektedir. Bu durum, yüksek AOA değerini açıklayabilir. Söz konusu bitki çaylarının % antioksidan etkileri hesaplandığında (0,05 mL ekstrakt için), yeşil çay, ıhlamur, ekinezya ve elma çayı için sırasıyla; 66,16, 62,50, 58,44 ve 51,12 olarak bulundu (Şekil 4.38).

Tez kapsamında, modifiye çalışma elektrodu (GCE/AuNP/MWCNT-Nafyon) kullanılarak geliştirilen DPSV yönteminin HPLC ile doğrulanması yapıldı. Bu amaçla literatürde mevcut [234] HPLC yöntemi PDA dedektörü ile kullanıldı. Doğrulama çalışması, eş zamanlı olarak CT

standardının ve yeşil çay örneğinin HPLC-PDA sistemine verilmesi ile yapıldı. DNA'nın; etkileşim öncesi ve 1,5 mM Cu(II) çözeltisi ile 30 dk etkileşim sonrası HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramları incelendiğinde geliştirdiğimiz yöntemle benzer bir şekilde DNA bazlarında etkili bir hasar oluştuğu görüldü (Şekil 4.39). Ayrıca DNA'nın; etkileşim öncesi, Cu(II) çözeltisi ile 30 dk etkileşim sonrası, 0,005 – 0,05 mM CT varlığında (Şekil 4.40), Cu(II) çözeltisi ile 30 dk etkileşim sonrası ve 0,01 − 0,05 mL yeşil çay varlığında Cu(II) çözeltisi ile 30 dk etkileşim sonrası (Şekil 4.41), HPLC-PDA ile elde edilen kromatogramlar incelendiğinde, CT bileşiğinin ve yeşil çay örneğinin özellikle A bazı üzerinde güçlü bir antioksidan etki gösterdiği görüldü. HPLC-PDA yöntemi ile yeşil çay (0,05 mL) ve CT (0,05 mM) için hesaplanan % antioksidan etki değerleri (Eşitlik 4.5), sırasıyla; 61,99 ve 62,22'dir. CT ve yeşil çay için, HPLC-PDA yöntemi ve geliştirilen DPSV yöntemi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında iki yöntemin uyumlu olduğu görüldü (Şekil 4.42). Geliştirilen yöntem ve HPLC-PDA referans yöntemi ile elde edilen bu sonuçlar (n=5) istatistiksel olarak kıyaslandı. Geliştirilen elektrokimyasal yöntem ile referans yöntem arasında *F*-testinin uygulanması sonucunda kesinlik açısından % 95 güvenilirlik düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı gözlendi.

Yöntem validasyonu kapsamında, geliştirilen DPSV ve literatürde mevcut HPLC-PDA yöntemlerinin bazı analitik parametreleri belirlendi. DPSV tekniğine dayalı geliştirilen elektroanalitik yöntem, literatürde mevcut HPLC-PDA yöntemi ile tekrarlanabilirlik (bağıl standart sapma, RSD) ve geri kazanım (REC) bakımından karşılaştırıldı. DNA'da bulunan G, A ve C bazlarının hesaplanan % REC değerleri; DPSV/HPLC-PDA yöntemleri için sırasıyla; 98,9/99,2, 98,3/101,1 ve 97,3/102,5'dir. Sonuçlar, iki yöntemin birbiriyle uyumlu ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Tablo 4.6).

Son olarak geliştirilen yönteme insan serumunda bulunabilecek interferanların etkileri incelendi. DA ve ÜA insan idrarı ve kan serumu gibi fizyolojik sıvılarda bulunmaktadır [254]. Bunların yanı sıra proteinler (temsilen bovin serum albümin kullanıldı) ve glukoz da normal insan serumunda bulunmaktadır [237]. DNA'nın biyolojik sıvılarda tayini yapılmak istendiğinde karşılaşılabilecek bu temel bileşikler baz alınarak denemeler yapıldı. Hazırlanan modifiye elektrot ile dsDNA tayinine DA, ÜA, BSA, glukoz ve fetal bovin serum (sentetik serum) etkileri incelendi. Sentetik serumun etki etmediği miktar (1:1 sey 0,01 mL) belirlendi (Şekil 4.45). ÜA hariç söz konusu maddelerin DNA'da bulunan G, A ve C oksidasyon pik

akımları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görüldü. ÜA ise antioksidan etki gösterdiğinden Cu(II) ile etkileşim sırasında, pozitif bir etki görülmüştür (Tablo 4.7).

Bu tez çalışmasında, insan sağlığı için önemli olan oksidatif DNA hasarının belirlenmesi ve hasarı engelleyici antioksidan aktivite tayini için hızlı analize uygun, seçiciliği ve duyarlılığı yüksek bir elektrokimyasal yöntem geliştirildi. Voltametrik yöntemlerle yapılan literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğu sadece pürin türevi bileşiklerin oksidasyonuna ve hasarına odaklanmaktadır. Tez çalışması ile birlikte, DNA analizine yönelik bu voltametrik çalışmalar üç bazı (A, G ve C) içerecek şekilde genişletilmiştir. Geliştirilen yöntemle çok sayıda antioksidan bileşiğin ve bazı bitkisel örneklerin DNA hasarını engelleyici etkileri belirlenmiştir. Bu bağlamda, geliştirilen modifiye elektrot ve yöntem, DNA bazlarının yüksek akım değerlerinde tespitini, DNA'da Cu(II) katalizli oksidatif hasarın oluşumunu ve hasar oluşumunu engelleyici AO etkinin belirlenmesini olanaklı kılan, hızlı ve güvenilir sonuç veren başarılı bir uygulama olarak nitelenebilir. Çalışmanın literatüre kazandırılması ve aynı yöntemin diğer biyomoleküllerin tayini için uygulanması bundan sonraki hedefler arasındadır.

# KAYNAKLAR

[1]. Wang, S., Ferrag, C., Noroozifar, M., Kerman, K., 2020, Simultaneous determination of four DNA bases at graphene oxide/multi-walled carbon nanotube nanocomposite-modified electrode, *Micromachines*, 11, 294.

[2]. Kehrer, J.P., and Klotz, L.-O., 2015, Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health, *Critical Reviews in Toxicology*, 45, 765–798.

[3]. Rahman, T., Hosen, Islam, M.M.I., 2012, Oxidative stress and human health, Advances in *Bioscience and Biotechnology*, 3, 997–1019.

[4]. Min, K., and Ebeler, S.E., 2008, Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 96–104.

[5]. Halliwell, B., 2006, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, 141, 312–322.

[6]. Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., Kukreti, S., 2019, Oxidative Stress: A key modulator in neurodegenerative diseases, *Molecules*, 24, 1583.

[7]. Akyüz, E., Sözgen Başkan, K., Tütem, E., Apak, R., 2020, Novel iron(III)−induced prooxidant activity measurement using a solid protein sensor in comparison with a copper(II)−induced assay, *Analytical Letters*, 53, 1489–1503.

[8]. Letelier, M. E., Sanchez-Jofre, S., Peredo-Silva, L., Corte-Troncoso, J., Aracena-Parks, P., 2010, Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein binding effects, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 220–227.

[9]. Brewer, G. J., 2010, Risks of copper and iron toxicity during aging in humans, *Chemical Research in Toxicology*, 23, 319–326.

[10]. Videla, L. A., Fernandez, V., Tapia, G., Varela, P., 2003, Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: Role of Kupffer cells, *BioMetals*, 16, 103–111.

[11]. Uzunboy, S., Demirci Çekiç, S., Eksin, E., Erdem, A., Apak, R., 2017, CUPRAC colorimetric and electroanalytical methods determining antioxidant activity based on prevention of oxidative DNA damage, Analytical Biochemistry, 518, 69–77.

[12]. Dizdaroğlu, M., Jagura, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 1102–1115.

[13]. Takane, M., Sugano, N., Iwasaki, H., Iwano, Y., Shimizu, N., 2002, New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals, *Journal of Periodontol*, 73, 551–554.

[14]. Dinçer, Y., and Kankaya, S., 2010, DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 30(4), 1365–1373.

[15]. Oliveira-Brett, A.M., Vivan, M., Fernandes, I.R., Piedade, J.A.P., 2002, Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA, *Talanta*, 56, 959–970.

[16]. Barroso, F.M., de-los-Santos-Álvarez, N., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B.P.P., 2011, Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 30, 1–12.

[17]. Prieto-Simón, B.,Cortina, M., Campàs, M., Calas-Blanchard, C., 2008, Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 129, 459–466.

[18]. Wang, X., Jiao, C., Yu, Z., 2014, Electrochemical biosensor for assessment of the total antioxidant capacity of orange juice beverage based on the immobilizing DNA on a poly L-glutamic acid doped silver hybridized membrane, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 192, 628–633.

[19]. Barroso, M.F., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Casta˜nón, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Delerue-Matos, C., Oliveira, M.B.P.P., Tu˜nón-Blanco, P., 2011, DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2396–2401.

[20]. Chen, D., Wang, G., Li, J., 2007, Interfacial bioelectrochemistry: Fabrication, properties and applications of functional nanostructured biointerfaces, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111, 2351–2367.

[21]. Düzgün, A., Maroto, A., Mairal T., O'Sullivan, C., Rius, F.X., 2010, Solid-contact potentiometric sptasensor based on aptamer functionalized carbon nanotubes for the direct determination of protein, *Analyst*, 135, 1037–1041.

[22]. Sassolas, A., Blum, J., Leca-Bouvier, B., 2009, Electrochemical aptasensors, *Electroanalysis*, 21, 1237–1250.

[23]. Filanovsky, B., Markovsky, T., Bourenko, N., Perkas, R., Persky, A., 2007, Carbon electrodes modified with TiO2/metal nanoparticles and their application for the detection of trinitrotoluene, *Advanced Functional Materials*, 17, 1487–1492.

[24]. Pana H.-Z., Yub H.-W., Wang N., Zhang Z., Wan G.-C., Liu H., Guan X., Chang D., 2015, Electrochemical DNA biosensor based on a glassy carbon electrodemodified with gold nanoparticles and graphene for sensitivedetermination of Klebsiella pneumoniae carbapenemase, *Journal of Biotechnology*, 214, 133–138.

[25]. Muti Erdem, M., 2010, Elektrokimyasal DNA sensörü için nanomalzemelere Dayalı elektrot materyallerinin geliştirilmesi ve uygulamaları, Doktora Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

[26]. Karadeniz, H., Erdem, A., Çalışkan, A., 2008, Electrochemical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbon nanotube based screen printed electrodes, *Electroanalysis*, 17, 1932–1938.

[27]. Wang, J., Kawde, A.N., Musameh, M., 2003, Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 128, 912–916.

[28]. Çalışkan, A., Erdem, A., Karadeniz, H., 2009, Direct DNA hybridization on the single-walled carbon nanotubes modified sensors detected by voltametry and electrochemical impedance spectroscopy, *Electroanalysis*, 19, 2116–2124.

[29]. Erdem, A., Karadeniz, H., Çalışkan, A., 2009, Single-walled carbon nanotubes modified graphite electrodes for electrochemical monitoring of nucleic acids and biomolecular interactions, *Electroanalysis*, 21, 464–471.

[30]. Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., McMullan M., Karadeniz H., Sharma, S., 2010, Streptavidin modified carbon nanotube based graphite electrode for label-free sequence specific DNA detection, *Electroanalysis*, 22, 611–617.

[31]. Yapaşan, E., Çalışkan, A., Karadeniz, H., Erdem, A., 2010, Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors, *Materials Science and Engineering B*, 169, 169–173.

[32]. Annaraj, J., Srinivasan, S., Ponvel, K.M., Athappan, P.R., 2005, Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion® and clay modified electrodes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 669–676.

[33]. Kopáni, M., Celec, P., Danišovič, L., Michalka, P., Biró, C., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364, 61–66.

[34]. Doreswamy, K., Muralidhara, 2005, Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication, *Toxicology*, 206, 169–178.

[35]. Lieber, C.S., 2004, Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis, *Alcohol*, 34, 9–19.

[36]. Behl, C., 2005, Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy, *Subcellular Biochemistry*, 38, 65–78.

[37]. Sanz, A., Caro, P., Barja, G., 2004, Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36, 545–552.

[38]. Tateyama, M., Takeda, A., Onodera, Y., Matsuzaki, M., Hasegawa, T., Nunomura, A., Hirai, K., Perry, G., Smith, M.A., Itoyama, Y., 2003, Oxidative stress and predominant Aβ42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles, *Acta Neuropathologica*, 105, 581–585.

[39]. Kikuchi, A., Takeda, A., Onodera, H., Kimpara, T., Hisanaga, K., Sato, N., Nunomura, A., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A., Itoyama, Y., 2002, Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy, *Neurobiology of Disease*, 9, 244–248.

[40]. Percy, C., Pat, B., Poronnik, P., Gobe, G., 2005, Role of oxidative stress in age-associated chronic kidney pathologies, *Advances in Chronic Kidney Disease*, 12, 78–83.

[41]. Santos-Sánchez, N.F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C. and Beatriz Hernández-Carlos, B., 2019, Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism, antioxidants, In: Shalaby, E. (ed), 5, *IntechOpen* , Londra, 23-50.

[42]. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999, Free Radicals in Biology and Medicine (3rd ed.), *Oxford University Press*, New York.

[43]. Valko M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.

[44]. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1–14.

[45]. Shahidi, F., 1996, Natural Antioxidants: an overview. In Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, Shahidi, F. (ed), *AOCS Press*, Champaign, Illinois.

[46]. Buxton, V.G., Greenstock, L.C., Helman, P.W., Ross, B.A., 1988, Critical review of rate constants for reactions of hydrate electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aquous solution, *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 17, 513.

[47]. Halliwell, B., 1978, Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the prensence of iron chelates, *Febs Letters*, 92, 321–326.

[48]. Steiner, M.G., and Babbs, C.F., 1990, Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 278, 478–481.

[49]. Candelas, L.P., Patel, K.B., Stradford, M.R.L., Wardman, P., 1993, Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid, *Febs Letters*, 333, 151–153.

[50]. Sellers, R.M., and Simic, M.G., 1976, Pulse radiolysis study of the reactions of some reduced metal ions with molecular oxygen in aqueous solution, *Journal of American Chemical Society*, 98, 6145–6150.

[51]. Letelier, M.E., Lepe, A.M., Faundez, M., Salazar, J., Marin, R., Aracena, P., Speisky, H., 2005, Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 151, 71–82.

[52]. Letelier, M.E., Faúndez, M., Jara-Sandoval, J., Molina-Berríos, A., Cortés-Troncoso, J., Aracena-Parks, P., Marín-Catalán, R., 2010, Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions, *Journal of Applied Toxicology*, 135, 208–214.

[53]. Letelier, M.E., Lagos, F., Faundez, M., Miranda, D., Montoya, M., Aracena-Parks, P., Gonzalez-Lira, V., 2007, Copper modifies liver microsomal UDP-glucuronyltransferase activity through different and opposite mechanisms, *Chemico-Biological Interactions*, 167, 1–11.

[54]. Letelier, M.E., Martinez, M., Gonzalez-Lira, V., Faundez, M., Aracena-Parks, P., 2006, Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper, *Chemico-Biological Interactions*, 164, 39–48.

[55]. Letelier, M.E., Molina-Berrios, A., Cortes-Troncoso, J., Jara-Sandoval, J., Müller, A., Aracena-Parks, P., 2010, Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver, *Biological Trace Element Research*, 134, 203–211.

[56]. Letelier, M.E., Pimentel, A., Pino, P., Lepe, A.M., Faundez, M., Aracena, P., Speisky, H., 2005, Microsomal UDP-glucuronyltransferase in rat liver: oxidative activation, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, 480–486.

[57]. Pinnen, F., Cacciatore, I., Cornacchia, C., Sozio, P., Cerasa, L.S., Iannitelli, A., Nasuti, C., Cantalamessa, F., Sekar, D., Gabbianelli, R., Falcioni, M.L., Di Stefano, A., 2009, Codrugs linking L-dopa and sulfur-containing antioxidants: new pharmacological tools against Parkinson's disease, *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 559–563.

[58]. Mancuso, C., Bates, T.E., Butterfield, D.A., Calafato, S., Cornelius, C., De Lorenzo, A., Dinkova Kostova, A.T., Calabrese, V., 2007, Natural antioxidants in Alzheimer's disease, *Expert Opinion on Investigational Drug*, 16, 1921–1931.

[59]. Halliwell, B., and Aruoma, O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*, 281, 9–19.

[60]. Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., Nagy, G., 2007, Antioxidant measurements, *Physiological Measurement*, 28, 41–55.

[61]. Karadağ, A., Özçelik, B., Saner, S., 2009, Review of methods to determine antioxidant capacities, *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.

[62]. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12, 1496–1547.

[63]. Darkwah, W.K., Ao, Y., Adinortey, M.B., Weremfo, A., Abrokwah, F. K., Afriyie, E., 2018, Total phenolic, flavonoid and alkaloid contents, oxidative DNA damage protective and antioxidant properties of methanol and aqueous extracts of Dissotis rotundifolia whole plant, *Free Radicals and Antioxidants*, 8, 82–88.

[64]. Degtyarenko, I. M., and Nieminen, R. M., 2010, Dynamics of biomolecules from first principles, *Science and Technology of Atomic, Molecular, Condensed Matter & Biological Systems*, 1, 557–573.

[65]. Labuda, J., Bubnicova, K.K., Kovalova, L., Vanickova, M., Mattusch, J., Wennrich, R., 2005, Voltametric detection of damage to DNA by arsenic compounds at a DNA biosensor, *Sensors*, 5, 411–423.

[66]. Ivandini, T.A., Honda, K., Rao, T.N., Fujishima, A., Einaga, Y., 2007, Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography, *Talanta*, 71, 648–655.

[67]. Carolina Torres, A., Barsan, M.M., Brett, C.M.A., 2014, Simple electrochemical sensor for caffeine based on carbon and Nafion-modified carbon electrodes, *Food Chemistry*, 149, 215–220.

[68]. Chen, G., Han, X., Zhang, L., Ye, J., 2002, Determination of purine and pyrimidine bases in DNA by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 954, 267–276.

[69]. Lavanya, N., Nizeyimana Claude, J., Sekar, C., 2018, Electrochemical determination of purine and pyrimidine bases using copper doped cerium oxide nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 530, 202–211.

[70]. Ng, K.L., Khor, S.M., 2017, Graphite-based nanocomposite electrochemical sensor for multiplex detection of adenine, guanine, thymine, and cytosine: A biomedical prospect for studying DNA damage, *Analytical Chemistry*, 89, 10004–10012.

[71]. Kool, E.T., Morales, J.C., Guckian, K.M., 2000, Mimicking the structure and function of DNA: Insights into DNA stability and replication, *Angewandte Chemie International Edition*, 39, 990–1009.

[72]. Oliveira-Brett, A.M., Piedade, J.A.P., Silva, L.A., Diculescu, V.C., 2004, Voltametric determination of all DNA nucleotides, *Analytical Biochemistry*, 332, 321–329.

[73]. Jankowska-Śliwińska, J., Dawgul, M., Kruk, J., Pijanowska, D.G., 2017, Comparison of electrochemical determination of purines and pyrimidines by means of carbon, graphite and gold paste electrodes, *International Journal of Electrochemical Science*, 12, 2329–2343.

[74]. Huang, Q., Kaiser, K., Benner, R., 2012, A simple high performance liquid chromatography method for the measurement of nucleobases and the RNA and DNA content of cellular material, *Limnology and Oceanography: Methods*, 10, 608–616.

[75]. Zong, S.Y., Han, H., Wang, B., Li, N., Dong, T.T.X., Zhang, T., Tsim, K.W.K., McPhee, D.J., 2015, Fast simultaneous determination of 13 nucleosides and nucleobases in cordyceps sinensis by UHPLC-ESI-MS/MS, *Molecules*, 20, 21816–21825.

[76]. Brohi, R.O.Z., Khuhawar, M.Y., Channa, A., Laghari, A.J.; Abbasi, K., 2016, Gas chromatographic determination of purines and pyrimidines from dna using ethyl chloroformate as derivatizing reagent, *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, 17, 50–57.

[77]. Li, T., Li, B., Dong, S., 2007, Aptamer-based label-free method for hemin recognition and DNA assay by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 887–893.

[78]. Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M., Fuchs, H., 2002, A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins, *Analytical Biochemistry*, 302, 114–122.

[79]. Zhu, Z., Zhan, L., Hou, C., Wang, Z., 2012, Nanostructured metal-enhanced raman spectroscopy for DNA base detection, *IEEE Photonics Journal*, 4, 1333–1339.

[80]. Fojta, M., Danhel, A., Havran, L., Vyskocil, V., 2016, Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair, *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 160–167.

[81]. Breen, A.P., and Murphy, J.A., 1995, Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 1033–1077.

[82]. Steenken, S., 1989, Purine bases, nucleosides, and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e– and OH adducts, *Chemical Reviews*, 89, 503–520.

[83]. Scharer, O.D., 2003, Chemistry and biology of DNA repair, *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 2946–2974.

[84]. Hasbal, C., 2008, Bronşiyal astımlı çocuklarda oksidatif DNA hasarı, Uzmanlık Tezi, *Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği*.

[85]. Lin, X., Ni, Y., Pei, X., Kokot, S., 2017, Electrochemical detection of DNA damage induced by clenbuterol at a reduced graphene oxide-Nafion modified glassy carbon electrode, *Anaytical Methods*, 9, 1105–1111.

[86]. Oliveira-Brett, A.M., Diculescu, V.C., Chiorcea-Paquim, A.M., Serrano, S.H.P., 2007, DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 49, 413–417.

[87]. Fojta, M., 2002, Electrochemical sensors for DNA interactions and damage, *Electroanalysis*, 14, 1449–1463.

[88]. Sancar, A., 2003, Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors, *Chemical Reviews*, 103, 2203–2238.

[89]. Grollman, A.P., and Moriya, M., 1993, Mutagenesis by 8-oxoguanine: An enemy within, *Trends in Genetics*, 9, 246–249.

[90]. Fundador, E.V., Choudhary, D., Schenkman, J.B., Rusling, J.F., 2008, Accurate DNA fragment sizing by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence array for detection of sequence specificity of DNA damage, *Analytical Chemistry*, 80, 2122–2221.

[91]. Atha, D.H., Ammanamanchi, N., Obadina M., Reipa, V., 2013, Quantitative measurement of electrochemically induced DNA damage using capillary electrophoresis, *Journal of The Electrochemical Society*, 160, G3139–G3143.

[92]. Anderson, D., and Laubenthal, J., 2013, Analysis of DNA damage via single-cell electrophoresis, Methods in Moleculer Biology, 1054, 209–218.

[93]. Kumar, H., Chattopadhyay, A., Prasath, R., Devaraji, V., Joshi, R., Bhavana, P., Saini, P., Ghosh, S.K., 2014, Design, synthesis, physicochemical studies, solvation, and DNA damage of quinoline-appended chalcone derivative: Comprehensive spectroscopic approach toward drug discovery, *The Journal of Physical Chemistry B*, 118, 7257–7266.

[94]. Wang, Q., Wu, Q., Wang, J., Chen, D.D., Fan, P., Wang, B.X., 2014, Spectroscopic investigation on interaction and sonodynamic damage of Riboflavin to DNA under ultrasonic irradiation by using Methylene Blue as fluorescent probe, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, 754–762.

[95]. Liang, J., He, Z., Zhang, S., Huang, S., Ai, X., Yang, H., Han, H., 2007, Study on DNA damage induced by CdSe quantum dots using nucleic acid molecular "light switches" as probe, *Talanta*, 71, 1675–1678.

[96]. Zhou, J., Lu, Q., Tong, Y., Wei, W, Liu, S.Q., 2002, Detection of DNA damage by using hairpin molecular beacon probes and graphene oxide, *Talanta*, 99, 625–630.

[97]. Qiu, Y., Fan, H., Liu, X., Ai, S., Tang, T., Han, R., 2010, Electrochemical detection of DNA damage induced by in situ generated bisphenol A radicals through electro-oxidation, *Microchimica Acta*, 171, 363–369.

[98]. Ni, Y., Wang, P., Song, H., Lin, X., Kokot, S., 2014, Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion–graphene biosensor, *Analytical Chimica Acta*, 821, 34–40.

[99]. Lin, X., Ni, Y., Kokot, S., 2015, An electrochemical DNA-sensor developed with the use of methylene blue as a redox indicator for the detection of DNA damage induced by endocrine-disrupting compounds, *Anaytical Chimica Acta*, 867, 29–37.

[100]. Qiu, Y., Qu, X., Dong, J., Ai, S., Han, R., 2011, Electrochemical detection of DNA damage induced by acrylamide and its metabolite at the graphene-ionic liquid-Nafion modified pyrolytic graphite electrode, *Journal of Hazardous Materials*,190, 480–485.

[101]. Rusling, J.F., 2004, Sensors for toxicity of chemicals and oxidative stress based on electrochemical catalytic DNA oxidation, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1022–1028.

[102]. Turesky, R., 2002, Heterocyclic aromatic amine metabolism, DNA adduct formation, mutagenesis, and carcinogenesis, *Drug Metabolism Reviews*, 34, 625–650.

[103]. Tarun, M., and Rusling, J.F., 2005, Quantitative measurement of DNA adducts using neutral hydrolysis and LC−MS. Validation of genotoxicity sensors, *Analytical Chemistry*, 77, 2056–2062.

[104]. Zhou, L., Yang, J., Estavillo, C., Stuart, J.D., Schenkman, J.B., Rusling, J.F., 2003, Toxicity screening by electrochemical detection of DNA damage by metabolites generated in situ in ultrathin DNA−enzyme films, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 1431–1436.

[105]. Ziyatdinova, G., and Labuda, J., 2011, Complex electrochemical and impedimetric evaluation of DNA damage by using DNA biosensor based on a carbon screen-printed electrode, *Analytical Methods*, 3, 2777–2782.

[106]. Oliveira, S.C.B., and Oliveria-Brett, A.M., 2012, In situ DNA oxidative damage by electrochemically generated hydroxyl free radicals on a boron-doped diamond electrode, *Langmuir*, 28, 4896–4901.

[107]. Lu, L., Xu, L., Kang, T., Cheng, S., 2012, Investigation of DNA damage treated with perfluorooctane sulfonate (PFOS) on $ZrO_2$/DDAB active nano-order film, Biosensors and *Bioelectronics*, 35, 180–185.

[108]. Liu, Y., and Hu, N., 2007, Loading/release behavior of (chitosan/DNA)n layer-by-layer films toward negatively charged anthraquinone and its application in electrochemical detection of natural DNA damage, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 661–667.

[109]. Fojta, M., 2005, Detecting DNA damage with electrodes, *Perspectives in Bioanalysis*, 1, 385–431.

[110]. Scheller, F., Palecek, E., Wang, J., (Editors), Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics, *Elsevier*, Amsterdam, 385–431.

[111]. Palecek, E., and Bartošík, M., 2012, Electrochemistry of nucleic acids, *Chemical Reviews*, 112, 3427–3481.

[112]. Diculescu, V.C., Paquim, A.M.C., Oliveira-Brett, A.M., 2005, Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage, *Sensors*, 5, 377–393.

[113]. Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E., Mascini, M., 2006, Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies, *Analytica Chimica Acta*, 573, 81–89.

[114]. Kimmel, D.W., LeBlanc, G., Meschievitz, M.E., Cliffel, D.E., 2012, Electrochemical sensors and biosensors, *Analytical Chemistry*, 84, 685–707.

[115]. Labuda, J., Oliveira-Brett, A.M., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J., 2010, Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 82, 1161–1187.

[116]. Fojta, M., Kostecka, P., Pivonkova, H., Horakova, P., Havran, L., 2011, Osmium tetroxide complexes as versatile tools for structure probing and electrochemical analysis of biopolymers, *Current Analytical Chemistry*, 7, 35–50.

[117]. Cahova-Kucharikova, K., Fojta, M., Mozga, T., Palecek, E., 2005, Use of DNA repair enzymes in electrochemical detection of damage to DNA bases in vitro and in cells, *Analytical Chemistry*, 77, 2920–2927.

[118]. Havran, L., Vacek, J., Cahova, K., Fojta, M., 2008, Sensitive voltametric detection of DNA damage at carbon electrodes using DNA repair enzymes and an electroactive osmium marker, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1751–1758.

[119]. Ensafi, A.A., Kazemnadi, N., Amini, M., Rezaei, B., 2015, Impedimetric DNA-biosensor for the study of dopamine induces DNA damage and investigation of inhibitory and repair effects of some antioxidants, *Bioelectrochemistry*, 104, 71–78.

[120]. Berghian-Grosan, C., Biris, A.R., Coros, M., Pogacean, F., Pruneanu, S., 2015, Electrochemical and spectroscopic studies of ssDNA damage induced by hydrogen peroxide using graphene based nanomaterials, *Talanta*, 138, 209–217.

[121]. Ames, B.N., 1983, Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases, *Science*, 221,1256.

[122]. Niki, E., Shimaski, H., Mino, M., 1994, Antioxidantism-free radical and biological defence, *Gakkai Syuppn Center*, Tokyo, 3-16.

[123]. Kaur, C., and Kapoor, H.C., 2001, Antioxidants in fruits and vegetablesthe millennium's health, *International Journal of Food Science & Technology*, 36, 703–725

[124]. Bučková, M., Labuda, J., Šandula, J., Križková, L., Štěpánek, I., Ďuračková, Z., 2002, Detection of damage to DNA and antioxidative activity of yeast polysaccharides at the DNA-modified screen-printed electrode, *Talanta*, 56, 939–947.

[125]. Sharma, S., Sehgal, N., Kumar, A., 2003, Biomolecules for development of biosensors and their applications, *Current Applied Physics*, 3, 307–316.

[126]. Wang, J., 2001, Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges, *Electroanalysis*, 13, 975–983.

[127]. Wang, J, 2005, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review, *Electroanalysis*, 17, 7–14.

[128]. Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A., 2009, Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection, *Analytica Chimica Acta*, 643, 83–89.

[129]. Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 2001, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121–131.

[130]. Kuralay, F., and Demirci, S., 2016, Elektrokimyasal biyosensörler: Afinite biyosensörleri, Editör: Denizli, A., *Kukla Yayıncılık*, Ankara, s: 12–20.

[131]. Tiwari, A., Terada, D., Yoshikawa, C., Kobayashi, H., 2010, An enzyme-free highly glucose-specific assay using self-assembled aminobenzene boronic acid upon polyelectrolytes electrospun nanofibers-mat, *Talanta*, 82, 1725–1732.

[132]. Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A., 2012, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, *Chemical Society Reviews*, 41, 2740–2779.

[133]. Dey, D., and Goswami, T., 2011, Optical biosensors: a revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–7.

[134]. Tereshchenko, A., Bechelany, M., Viter, R., Khranovskyy, V., Smyntyna, V., Starodub, N. and Yakimova, R., 2016, Optical biosensors based on ZnO nanostructures: advantages and perspectives. A review, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 229, 664–677.

[135]. Ronkainen, N.J., and Okon, S.L., 2014, Nanomaterial-based electrochemical immunosensors for clinically significant biomarkers, *Materials*, 7, 4669–4709.

[136]. Wang, H., Ishihara, S., Ariga, K., Yamauchi, Y., 2012, All-metal layer-by-layer films: Bimetallic alternate layers ith accessible mesopores for enhanced electrocatalysis, *Journal of the American Chemical Society*, 134, 10819–10821.

[137]. Nick, C., Yadav, S., Joshi, R., Schneider, J.J., Thielemann, C., 2015, A three-dimensional microelectrode array composed of vertically aligned ultra-dense carbon nanotube networks, *Applied Physics Letters*, 107, 013101–013102.

[138]. Ciani, I., Schulze, H., Corrigan, D.K., Henihan, G., Giraud, G., Terry, J.G., Campbell, C.J., 2012, Development of immunosensors for direct detection of three wound infection biomarkers at point of care using electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 413–418.

[139]. Kiran, S., and Misra, R.D.K., 2015, Glucose biosensors: progress, current focus and future outlook, *Materials Technology*, 30, 140–149.

[140]. Patel, S., Nanda, R., Sahoo, S., Mohapatra, E., 2016, Biosensors in health care: the milestones achieved in their development towards lab-on-chip-analysis, *Biochemistry Research International*, 2016, 1–12.

[141]. Zuo, S.H., Zang, L.F., Zhao, Y.H., Yuan, H.H., Lan, M.B., Lawrance, G.A., Wei, G., 2009, Electrochemical detection of short DNA sequences related to the Escherichia coli pathogen using a zirconia-modified screen-printed DNA biosensor, *Australian Journal of Chemistry*, 61, 962–967.

[142]. Sipova, H., Homola, J., 2013, Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: a review, *Analytica Chimica Acta*, 773, 9–23.

[143]. March, G., Nguyen, T.D., Piro, B., 2015, Modified electrodes used for electrochemical detection of metal ions in environmental analysis, *Biosensors*, 5, 241–275.

[144]. Palchetti, I., and Mascini, M., 2008, Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring, *The Analyst*, 133, 846–854.

[145]. Matranga, V., and Corsi, I., 2012, Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches, *Marine Environmental Research*, 76, 32–40.

[146]. Lacroix, C., Coquille, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D., 2014, A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using mytilus spp. as sentinel species, *Marine Pollution bBulletin*, 86, 304–313.

[147]. Downs, M.E.A., Kobayashi, S., Karube, I., 2006, New DNA technology and the DNA biosensor, *Analytical Letters*, 20, 1987–1927.

[148]. Rafique, B., Iqbal, M., Mehmood, T., Shaheen, M.A., 2019, Electrochemical DNA biosensors: a review, *Sensor Review*, 39, 34–50.

[149]. Paleček, E., 1988, Adsorptive transfer stripping voltametry: Determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface, *Analytical Biochemistry*, 170, 421–431.

[150]. Gayathri, S. B., and Kamaraj, P., 2015, Development of electrochemical DNA biosensors-a review, *Chemical Science Transactions*, 4(2).

[151]. Sage, E., and Harrison, L., 2011, Clustered DNA lesion repair in eukaryotes: Relevance to mutagenesis and cell survival, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711, 123–133.

[152]. Qian, P., Ai, S., Yin, H., Li, J., 2010, Evaluation of DNA damage and antioxidant capacity of sericin by a DNA electrochemical biosensor based on dendrimer-encapsulated Au-Pd/chitosan composite, *Microchimica Acta*, 168, 347–354.

[153]. Wang, J., 2000, Survey and summary: From DNA biosensors to gene chips, *Nucleic Acids Research*, 28, 3011–3016.

[154]. Palek, E., and Fojta, M., 2001, Peer reviewed: Detecting DNA hybridization and damage, *Anaytical Chemistry*, 73, 75A–83A.

[155]. Erdem, A., and Ozsoz, M., 2002, Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions, *Electroanalysis*, 14, 965–974.

[156]. Pividori, M.I., Merkoci, A., Alegret, S., 2000, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 291–303.

[157]. Wang, J., 2003, Nanoparticle-based electrochemical DNA detection, *Analytica Chimica Acta*, 500, 247–257.

[158]. Wang, J., Kawde, A.N., Sahlin, E., 2000, Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA, *Analyst*, 125, 5–7.

[159]. Patra, S., Pandey, A.K., Sen, D., Ramagiri, S.V., Bellare, J.R., Mazumder, S., Goswami, A., 2014, Redox decomposition of silver citrate complex in nanoscale confinement: an unusual mechanism of formation and growth of silver nanoparticles, *Langmuir*, 30, 2460–2469.

[160]. Mohammed, A.M., 2016, Fabrication and characterization of gold nano particles for DNA biosensor applications, *Chinese Chemical Letters*, 27, 801–806.

[161]. Oliveira-Brett, A.M., and Matysik, F.M., 1997, Voltametric and sonovoltametric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 429, 95–99.

[162]. Oliveira-Brett, A.M., and Matysik, F.M., 1997, Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 111–116.

[163]. Oliveira-Brett, A.M., and Matysik, F.M., 1997, Sonoelectrochemical determination of nucleosides and nucleotides, *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 125–126.

[164]. Xiao, F., Zhao, F., Li, J., Liu, L., Zeng, B., 2008, Characterization of hydrophobic ionic liquid-carbon nanotubes-gold nanoparticles composite film coated electrode and the simultaneous voltametric determination of guanine and adenine, *Electrochimica Acta*, 53, 7781–7788.

[165]. Hasoň, S., Fojt, L., Šebest, M.F.P., 2009, Improved electrochemical detection of purine nucleobases at mechanically roughened edge-plane pyrolytic graphite electrode, *Electroanalysis*, 21, 666–670.

[166]. Zhang, J., Han, D., Wang, S., Zhang, X., Yang, R., Ji, Y., Yu, X., 2019, Electrochemical detection of adenine and guanine using a three-dimensional WS2 nanosheet/graphite microfiber hybrid electrode, *Electrochemistry Communications*, 99, 75–80.

[167]. Yin, H., Zhou, Y., Ma, Q., Ai, S., Ju, P., Zhu, L., Lu, L., 2010, Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene–nafion composite film modified glassy carbon electrode and the simultaneous determination, *Process Biochemistry*, 45, 1707–1712.

[168]. Park, S.J., Taton, T.A., Mirkin, C.A., 2002, Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes, *Science*, 295, 1503–1506.

[169]. Yang, X., Lu, Y., Ma, Y., Liu, Z., Du, F., Chen, Y., 2007, DNA electrochemical sensor based on an adduct of single-walled carbon nanotubes and ferrocene, *Biotechnology Letters*, 29, 1775–1779.

[170]. Prabhakar, N., Singh, H., Malhotra, B.D., 2008, Nucleic acid immobilized polypyrrole–polyvinylsulphonate film for Mycobacterium tuberculosis detection, *Electrochemistry Communications*, 10, 821–826.

[171]. Yang, T., Zhou, N., Zhong, Y.C., Zhang, W., Jiao, K., Li, G.C., 2009, Synergistically improved sensitivity for the detection of specific DNA sequences using polyaniline

nanofibers and multi-walled carbon nanotubes composites, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2165–2170.

[172]. Zhang, Y., Wang, J., Xu, M., 2010, A sensitive DNA biosensor fabricated with gold nanoparticles/ploy (p-aminobenzoic acid)/carbon nanotubes modified electrode, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 75, 179–185.

[173]. Zawodzinski, T., Minteer, S., Brisard, G., 2006, Physical and analytical electrochemistry: The fundamental core of electrochemistry, *The Electrochemical Society Interface*, 15, 62.

[174]. Chen, A., and Chatterjee, S., 2013, Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 42, 5425–5438.

[175]. Scholz, F., 2002, Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications, In: Scholz, F. (ed), *Springer*, 42229, 331p, Berlin, Germany.

[176]. Castaneda, M.T., Alegret, S., Merkoci, A., 2007, Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles, *Electroanalysis*, 19, 743–753.

[177]. Su H., Li S., Jin Y., Xian Z., Yang D., Zhou W., Mangaran F., Leung F., Sithamparanathan G., Kerman G., 2017, Nanomaterial-based biosensors for biological detections, *Advanced Health Care Technologies*, 3, 19–29.

[178]. Du, J., Yu, X., Di, J., 2012, Comparison of the direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on the surface of Au, CdS and ZnS nanostructures, *Biosensors and Bioelectronics*, 37, 88–93.

[179]. Li, C.M., Li, Y.F., Wang, J., Huang, C.Z., 2010, Optical investigations on ATP-induced aggregation of positive-charged gold nanoparticles, *Talanta*, 81, 1339–1345.

[180]. Miscoria, S.A., Barrera, G.D., Rivas, G.A., 2005, Enzymatic biosensor based on carbon paste electrodes modified with gold nanoparticles and polyphenol oxidase, *Electroanalysis*, 17, 1578–1582.

[181]. Liu, S., and Ju, H., 2003, Electrocatalysis via direct electrochemistry of myoglobin immobilized on colloidal gold nanoparticles, *Electroanalysis*, 15, 1488–1493.

[182]. Ramachandra Rao, C.N., Kulkarni, G.U., Thomasa, P.J., Edwards, P.P., 2000, Metal nanoparticles and their assemblies, *Chemical Society Reviews*, 29, 27–35.

[183]. Faraday, M., 1857, Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 145.

[184]. Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hiller, J., 1951, A study fo the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, 1951, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55–75.

[185]. Frens, G., 1973, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science*, 241, 20–22.

[186]. Li, C., Karadeniz, H., Canavar, E., Erdem, A., 2012, Electrochemical sensing of label free DNA hybridization related to breast cancer 1 gene at disposable sensor platforms modified with single walled carbon nanotubes, *Electrochimica Acta*, 82, 137–142.

[187]. Shi, A., Wang, J., Han, X., Fang, X., Zhang, Y., 2014, A sensitive electrochemical DNA biosensor based on gold nanomaterial and graphene amplified signal, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 200, 206–212.

[188]. Radhakrishnan, S., Sumathi, C., Dharuman, V., Wilson, J., 2012, Gold nanoparticles functionalized poly(3,4-ethylenedioxythiophene) thin film for highly sensitive label free DNA detection, *Analytical Methods*, 5, 684–689.

[189]. Zhang, Y., and Huang, L., 2012, Label-free electrochemical DNA biosensor based on a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles, polythionine and graphene, *Microchimica Acta*, 176, 463–470.

[190]. Erdem, A., 2007, Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74, 318–325.

[191]. Pedano, M.L., Rivas, G.A., Pedano, M.L., 2004, Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes, *Electrochemistry Communications*, 6, 10–16.

[192]. Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., 2006, Direct DNA hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes, *Analytical Chemistry*, 78, 6656–6659.

[193]. Wang, J., Liu, G.D., Jan, M.R., 2004, Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: Carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 3010–3011.

[194]. Li, J., Ng, H.T., Cassell, A., Fan, W., Chen, H., Ye, Q., Koehne, J., Han, J., Meyyappan, M., 2003, Carbon nanotube nanoelectrode array for ultrasensitive DNA detection, *Nano Letters*, 3, 597–602.

[195]. Vaseashta A., Bandopadhyay S., (ed.), Carbon nanotubes based sensor and devices, *Tata McGrawhill Publishing Co. Ltd.*, New Delhi (2004).

[196]. Stozhko, N., Bukharinova, M., Galperin, L., Brainina, K., 2018, A nanostructured sensor based on gold nanoparticles and nafion for determination of uric acid, *Biosensors*, 8, 21.

[197]. Cabrera, C., Gimenez, R., Lopez C., 2003, Determination of tea components with antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4427−4435.

[198]. Pellati, F., Benvenuti, S., Magro, L., Melegari, M., Soragni, F., 2004, Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea Spp*., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 289–301.

[199]. Kıvrak, Ş., Göktürk, T., Kıvrak, İ., 2017, Determination of phenolic composition of *Tilia Tomentosa* flowers using UPLC-ESI-MS/MS, *International Journal of Secondary Metabolite*, 4, 249–256.

[200]. Hasbay Adil, İ., Çetin, H.İ., Yener, M.E., Bayındırlı, A., 2007, Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of theantioxidant activities of the extracts, *The Journal of Supercritical Fluids*, 43, 55–63.

[201]. Hu, C., and Kitts, D.D., 2000, Studies on the antioxidant activity of echinacea root extract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1466−1472.

[202]. Noguerón-Merino, M. C., Jiménez-Ferrer, E., Román-Ramos, R., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Herrera-Ruiz, M., 2015, Interactions of a standardized flavonoid fraction from *Tilia americana* with Serotoninergic drugs in elevated plus maze, *Journal of Ethnopharmacology*, 164, 319–327.

[203]. Sroka, Z., and Bełz, J., 2009, Antioxidant activity of hydrolyzed and non−hydrolyzed extracts of the inflorescence of linden (*Tiliae inflorescentia*), *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 18, 329–335.

[204]. Toker, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Memişoğlu, M., Ito, S., 2001, Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and *Turkish lime* species for quality assessment, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 111–121.

[205]. Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H., 2002, Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449–7454.

[206]. Leantowicz, H., Gorinstein, S., Lojek, A., Leantowicz, M., Čîž, M., Soliva-Fortuny, R., Park, Y.S., Jung, S.T., Trakhtenberg, S., Martin-Belloso, O., 2002, Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 603–610.

[207]. Liang, M., and Guo, L.H., 2007, Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the fenton reaction, *Environmental Science Technology*, 41, 658–664.

[208]. Tang, W., Zhang, M., Li, W., Zeng, X., 2014, An electrochemical sensor based on polyaniline for monitoring hydroquinone and its damage on DNA, *Talanta*, 127, 262–268.

[209]. Tang, W., Li, W., Li, Y., Zhang, M., Zeng, X., 2015, Electrochemical sensors based on multi-walled nanotubes for investigating the damage and action of 6-mercaptopurine on double-stranded DNA, *New Journal of Chemistry*, 39, 8454–8460.

[210]. Lu, L., Xu, L., Kang, T., Cheng, S., 2013, DNA damage due to perfluorooctane sulfonate based on nano-gold embedded in nano-porous poly-pyrrole film, *Applied Surface Science*, 284, 258–262.

[211]. Ensafi, A., Amini, M., Rezaei, B., 2013, Detection of DNA damage induced by chromium/glutathione/$H_2O_2$ system at MWCNTs–poly(diallyldimethylammonium chloride) modified pencil graphite electrode using methylene blue as an electroactive probe, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 177, 862–870.

[212]. 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, 2343–2349.

[213]. Heydari-Bafrooei, E., Amini, M., Saeednia, S., 2017, Electrochemical detection of DNA damage induced by Bleomycin in the presence of metal ions, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 803, 104–110.

[214]. Guo, Z., Liu., X., Liu, Y., Wu, G., Lu, X., 2016, Constructing a novel 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine electrochemical sensor and application in evaluating the oxidative damages of DNA and guanine, *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 671–676.

[215]. Wang, X., and Jiao, K., 2010, Sensitively electrochemical detection of the DNA damage in situ by electro-Fenton reaction based on Fe@$Fe_2O_3$ core-shell nanonecklace and multi-walled carbon nanotube composit, *Analytica Chimica Acta*, 664, 34–39.

[216]. Hájková, A., Barek, J., Vyskočil, V., 2017, Electrochemical DNA biosensor for detection of DNA damage induced by hydroxyl radicals, *Bioelectrochemistry*, 116, 1–9.

[217]. Lu, C., Kang, T.F., Lu, L.F., Xiong, Y., 2012, Electrochemical DNA sensors for rapid detection of DNA damage induced by fenton reaction, C*hinese Journal of Analytical Chemistry*, 40, 1822–1826.

[218]. Mello, L.D., Hernandez, S., Marrazza, G., Mascini, M., Kubota, L.T., 2006, Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1374–1382.

[219]. Ziyatdinova, G., and Labuda, J., 2012, Biosensor with protective membrane for the detection of DNA damage and antioxidant properties of fruit juices, *Electroanalysis*, 24, 2333–2340.

[220]. Ziyatdinova, G., Galandova, J., Labuda, J., 2008, Impedimetric nanostructured disposable DNA-based biosensors for the detection of deep DNA damage and effect of antioxidants, *International Journal of Electrochemical Science*, 3, 223–235.

[221]. Labuda, J., Bučková, M., Heilerová, L., Čaniová-Žiaková, A., Brandšteterová, E., Mattusch, J., Wennrich, R., 2002, Detection of antioxidative activity of plant extracts at the DNA-modified screen-printed electrode, *Sensors*, 2, 1–10.

[222]. Kuzin, Y., Kappo, D., Porfireva, A., Shurpik, D., Stoikov, I., Evtugyn, G., Hianik, T., 2018, Electrochemical DNA sensor based on carbon black-poly (neutral red) composite for detection of oxidative DNA damage, *Sensors*, 18, 3489.

[223]. Chen, M., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H., Wang, S., 2013, Electrochemical biosensors for the monitoring of DNA damage induced by ferric ions mediated oxidation of dopamine, *Electrochemistry Communications*, 28, 91–94.

[224]. de-los-Santos-Alvarez, N., de-los-Santos-Alvarez, P., Lobo-Castanon, M.J., Lopez, R., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., 2007, Electrochemical oxidation of guanosine and adenosine: Two convergent pathways, *Electrochemistry Communications*, 9, 1862–1866.

[225]. Xiong, H., Chen, Y., Zhang, X., Gu, H., Wang, S., 2013, An electrochemical biosensor for the rapid detection of DNA damage induced by xanthine oxidase-catalyzed Fenton reaction, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 85–91.

[226]. Hashkavayia, A.B., Hashemniaa, S., Osfouri, S., 2020, Investigations of antioxidant potential and protective effect of Acanthophora algae on DNA damage: An electrochemical approach, *Microchemical Journal*, 159, 105455.

[227]. Mousavisani, S.Z., Raoof, J.B., Ojani, R., Bagheryan, Z., 2018, An impedimetric biosensor for DNA damage detection and study of the protective effect of deferoxamine against DNA damage, *Bioelectrochemistry*, 122, 142–148.

[228]. Valentini, F., Amine, A., Orlanducci, S., Letizia Terranova, M., Palleschi, G., 2003, Carbon nanotube purification: Preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes, *Analytical Chemistry*, 75, 5413–5421.

[229]. Çelik, S.E., Tufan, A.N., Bekdeşer, B., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2017, Identification and determination of phenolics in lamiaceae species by UPLC-DAD-ESI-MS/MS, *Journal of Chromatographic Science*, 55, 291–300.

[230]. Sağlam, S., Üzer, A., Erçağ, E., Apak, R., 2018, Electrochemical determination of TNT, DNT, RDX, and HMX with gold nanoparticles/poly(carbazole-aniline) film–modified glassy carbon sensor electrodes imprinted for molecular recognition of nitroaromatics and nitramines, *Analytical Chemistry*, 90,7364–7370.

[231]. Niidome A., Nakashima K., Takahashi H., Niidome Y., 2004, Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells, *Chemical Communications*, 1978–1979.

[232]. Wang, Z., Liu, D., Dong, S., 2000, Study on adsorption and oxidation of calf thymus DNA on glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 12, 1419–1421.

[233]. Kuralay, F., and Bayramlı, Y., 2020, Electrochemical determination of mitomycin C and its interaction with double-stranded DNA using a poly(o-phenylenediamine)-multi-walled carbon nanotube modified pencil graphite electrode, *Analytical Letters*, 54, 1295–1308.

[234]. Zhou, Y., Yan, H., Xie, Q., Yao, S., 2015, Determination of guanine and adenine by high-performance liquid chromatography with a self-fabricated wall-jet/thin-layer electrochemical detector at a glassy carbon electrode, *Talanta*, 134, 354–359.

[235]. Tham, G.X., Fisher, A.C., Webster, R.D., 2020, Voltammetric studies on surface-modified electrodes with functionalised carbon nanotubes under different dispersion conditions, *Electrochimica Acta*, 357, 136880.

[236]. Hareesha, N., Manjunatha, J.G., Amrutha, B.M., Pushpanjali, P.A., Charithra, M.M., Prinith Subbaiah, N., 2021, Electrochemical analysis of indigo carmine in food and water samples using a poly(glutamic acid) layered multi-walled carbon nanotube paste electrode, *Journal of Electronic Materials*, 2021, 50, 1230–1238.

[237]. Normal Human Serum, https://www.merckmillipore.com/TR/tr/ product/Human-Serum-Normal-100-ml,MM_NF-S1-100ML#anchor_DS [Ziyaret Tarihi: 21 Aralık 2021].

[238]. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, A., 2009, 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis, *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology*, 27, 120–139.

[239]. Darley-Usmar, V., and Halliwell, B., 1996, Blood radicals: Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system, *Pharmaceutical Research*, 13,649–662.

[240]. Kepley, L.J., and Bard, A.J., 1988, Ellipsometric, electrochemical, and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation, *Analytical Chemistry*, 60, 1459–1467.

[241]. Rasheed, P.A., and Sandhyarani, N., 2017, Electrochemical DNA sensors based on the use of gold nanoparticles: a review on recent developments, *Microchimica Acta*, 184, 981–1000.

[242]. Cao, R., and Li, B., 2011, A simple and sensitive method for visual detection of heparin using positively-charged gold nanoparticles as colorimetric probes, *Chemical Communications*, 47, 2865–2867.

[243]. Sun, Y., Wang, H., Zhang, K., Liu, J., Wang, P., Wang, X., Liu, Q., 2018, Sonodynamic therapy induces oxidative stress, DNA damage and apoptosis in glioma cells, *RSC Advances*, 8, 36245–36256.

[244]. Campuzano, S., Kuralay, F., Castanon, M., Bartosik, M., Vyavahare, K., Palecek, E., Haake, D., Wang, J., 2011, Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and densitive electrochemical detection in untreated clinical samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3577–3583.

[245]. Yang, Y.L., Unnikrishnan, B., Chen, S.M., 2011, Amperometric determination of 4-nitrophenol at multi-walled carbon nanotube-poly(diphenylamine) composite modified glassy carbon electrode, *International Journal of Electrochemical Science*, 6, 3902–3912.

[246]. Zhang, J.J., Wang, B., Li, Y.F., Jia, W.L., Cui, H., Wang, H.S., 2008, Electrochemical study on DNA damage based on the direct oxidation of 8-Hydroxydeoxyguanosine at an electrochemically modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 20, 1684–1689.

[247]. Xiong, H., Wang, Y., Zhang, X., Ye, Y., Wang, S., 2012, Evaluation of antioxidative capacity via measurement of the damage of DNA using an electrochemical biosensor, *Microchimica Acta*, 176, 479–484.

[248]. Min, K., and Ebeler, S.E., 2008, Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels, *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 96–104.

[249]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica Acta*, 160: 413–419.

[250]. Yıldız, L., Sözgen Başkan, K., Esma, T., Apak, R., 2008, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta*, 77, 304–313.

[251]. Baki, S., 2016, Gıda maddelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin tayini için yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi, Doktora Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.

[252]. Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R., 2006, Beneficial effects of green tea-A Review, *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 79–99.

[253]. Neyestani, T.R., Gharavi, A., Kalayi, A., 2009, Selective effects of tea extract and its phenolic compounds on human peripheral blood mononuclear cell cytokine secretions, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 79-88.

[254]. Abdelwahab, A.A., and Shim, Y.B., 2015, Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and folic acid based on activated graphene/MWCNT nanocomposite loaded Au nanoclusters, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 659–665.