



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BAZI BİYOLOJİK TOKSİNLERİN ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE ANALİZİ

Doğa Ekin ORHAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL

ANKARA

2026

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BİYOLOJİK TOKSİNLERİN ELEKTROKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ANALİZİ**

Doğa Ekin ORHAN

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL**

**ANKARA
2026**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bazı Biyolojik Toksinlerin Elektrokimyasal Yöntemlerle Analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar kendime aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Doğa Ekin ORHAN

Tarih: 01/06/2026

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Doğa Ekin ORHAN tarafından hazırlanan

“Bazı Biyolojik Toksinlerin Elektrokimyasal Yöntemlerle Analizi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/06/2026

İmza

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nurgül KARADAŞ BAKIRHAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Raportör

İmza

Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL

Ankara Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Bazı Biyolojik Toksinlerin Elektrokimyasal Yöntemlerle Analizi

Bu tez kapsamında, epipolitiyodiyoksopiperazin sınıfı bir mikotoksin olan gliotoksinin elektrokimyasal davranışının voltametrik yöntemlerle incelenmesi ve çift sarmallı DNA ile etkileşiminin aydınlatılması için iki farklı yöntem olan biyosensör yüzeyinde ve inkübasyon çözeltilerinde çalışma planlanmıştır. Farklı çalışma elektrotlarının karşılaştırılması sonucunda, en yüksek ve tekrarlanabilir pik akımları camı karbon elektrot ile elde edilmiştir ve gliotoksinin tayininde uygun çalışma elektrodu olarak seçilmiştir. Gliotoksinin elektrokimyasal davranışı, döngüsel voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametri yöntemleriyle incelenmiştir. Destek elektroliti ve pH optimizasyonu çalışmaları sonucunda, gliotoksinin boş camı karbon elektrot ile en yüksek ve tekrarlanabilir sinyal verdiği ortamın pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi olduğu belirlenmiştir. Tarama hızı deneyleri, gliotoksinin yükseltgenme mekanizmasının geri dönüşümsüz ve difüzyon kontrollü bir süreç olduğunu göstermiştir. Gliotoksin ile çift sarmallı DNA arasındaki etkileşimi araştırmak amacıyla geliştirilen DNA biyosensörüyle derişim ve süre taraması deneyleri yapılmıştır. Diferansiyel puls voltametri yöntemiyle yapılan ölçümler sonucunda, optimum etkileşim koşullarının pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin derişimi ve 60 dakikalık etkileşim süresi olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda özellikle deoksiguanozin sinyalinde belirgin değişimler gözlenmiştir. Elde edilen bulgular, gliotoksinin çift sarmallı DNA ile etkileşiminde guanin bazının yapısını etkilediğini ve oksidatif hasara yol açabileceğini göstermiştir. +0,465 V'ta gözlenen yeni pik, guanin oksidasyon ürünü olan 8-oksoguanin oluşumuyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca deoksiguanozin pik potansiyelinin pozitif potansiyele kayması ve pik şeklinin bozulması, gliotoksinin çift sarmallı DNA ile güçlü etkileştiğini ve hatta bağlanma mekanizmasının interkalasyon olabileceğini göstermiştir. Çözelti ortamında gerçekleştirilen gliotoksin-çift sarmallı DNA etkileşimi çalışmalarında, etkileşimin kısa inkübasyon sürelerinde gerçekleştiği, daha sonraki sürelerde ise pik akımlarının değişiminin sınırlı kaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular, çözelti ortamında gliotoksinin çift sarmallı DNA ile kısa sürede etkileşime girerek sistemin belirli bir süre sonra dengeye ulaştığını göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışma ile literatürde ilk kez boş camı karbon elektrot üzerinde gliotoksinin elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve çift sarmallı DNA ile etkileşim mekanizması ortaya koyulmuştur.

Anahtar sözcükler: Biyosensör, dsDNA Etkileşimi, Gliotoksin, Oksidatif Hasar, Voltametri

SUMMARY

Analysis of Some Biological Toxins by Electrochemical Methods

Within the scope of this thesis, the electrochemical behavior of gliotoxin, an epipolythiodioxopiperazine-class mycotoxin, was investigated using voltammetric methods, and a double-stranded DNA biosensor was developed to elucidate its interaction with double-stranded DNA. Based on comparisons of different working electrodes, the highest and most reproducible peak currents were obtained with the glassy carbon electrode, which was selected as the most suitable working electrode for the determination of gliotoxin. The electrochemical behavior of gliotoxin was investigated using cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, and square-wave voltammetry. According to supporting electrolyte and pH optimization studies, the medium in which gliotoxin produced the highest and most stable signal at the bare glassy carbon electrode was determined to be a pH 2.91 phosphate buffer solution. Scan rate experiments demonstrated that the oxidation mechanism of gliotoxin is irreversible and diffusion-controlled. Concentration and interaction time studies were carried out using the developed biosensor to investigate the interaction between gliotoxin and double-stranded DNA. Measurements performed by differential pulse voltammetry showed that the optimum interaction conditions were 1.85×10^{-4} M gliotoxin prepared in a pH 4.66 acetate buffer solution and an interaction time of 60 minutes. Under these conditions, significant changes were observed, particularly in the deoxyguanosine signal, whereas changes in the deoxyadenosine signal were more limited and irregular. These findings demonstrated that gliotoxin affects the structure of guanine bases during its interaction with double-stranded DNA and may lead to oxidative damage. The new peak observed at +0.465 V was associated with the formation of 8-oxoguanine, an oxidation product of guanine. In addition, the positive shift in the deoxyguanosine peak potential and distortions in peak shape supported that gliotoxin may exhibit intercalative binding by inserting between DNA base pairs. In solution-phase gliotoxin-double-stranded DNA interaction studies, it was observed that the interaction occurred faster during the initial minutes, while changes in peak current became limited at later times. These findings indicate that gliotoxin interacts with double-stranded DNA rapidly and that the system reaches equilibrium after a certain period. In conclusion, this study investigated, for the first time in the literature, the electrochemical behavior of gliotoxin at a bare glassy carbon electrode and developed a glassy carbon electrode-based biosensor using only double-stranded DNA.

Keywords: Biosensor, dsDNA Interaction, Gliotoxin, Oxidative Damage, Voltammetry

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
Özet	iv
Summary	v
İçindekiler	vi
Önsöz	viii
simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikotoksinlerin Genel Özellikleri	2
1.2. Mikotoksinlerin Zararları	2
1.3. Gliotoksin Hakkında Bilgi	3
1.3.1. Gliotoksinin Mantarlardaki Biyosentezi ve Etki Mekanizması	3
1.3.2. Gliotoksinin Toksik Etkileri	5
1.3.3. Gliotoksin ile Yapılmış Literatür Çalışmaları	6
1.3.3.1. Elektrokimyasal Çalışmalar	6
1.3.3.2. Kromatografik Çalışmalar	7
1.3.3.3. Diğer Çalışmalar	9
2. GEREÇ ve YÖNTEM	14
2.1. Elektrokimya	14
2.1.1. Elektrokimyasal Hücreler	14
2.1.2. Elektrokimyada Kütle Aktarımı	15
2.1.2.1. Difüzyon	15
2.1.2.2. İyonik Migrasyon	16
2.1.2.3. Konveksiyon	17
2.1.3. Elektroanalitik Yöntemler	18
2.1.3.1. Polarografi	19
2.1.3.2. Voltametri	20
2.1.4. Elektrokimyasal Analizlerde Kullanılan Elektrotlar	20
2.1.4.1. Referans Elektrotlar	20
2.1.4.1.1. Standart Hidrojen Elektrodu	20
2.1.4.1.2. Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrodu	21
2.1.4.1.3. Kalomel Referans Elektrodu	22
2.1.4.2. Yardımcı Elektrotlar	24
2.1.4.3. Çalışma Elektrotları	24
2.1.4.3.1. Cıva Elektrotlar	25
2.1.4.3.2. Katı Elektrotlar	26
2.1.4.3.3. Modifiye Elektrotlar	26
2.1.4.3.4. Döner Disk Elektrotlar	26
2.1.5. Voltametrizde Kullanılan Uyarma Sinyalleri	27
2.1.5.1. Döngüsel Voltametri	27
2.1.5.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi	28
2.1.5.3. Kare Dalga Voltametrisi	29
2.1.6. Sıyırma Voltametrisi	31
2.1.6.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi	31
2.1.6.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi	31
2.1.6.3. Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi	31
2.1.6.4. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi	32
2.2. Biyosensörler	32
2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	33

2.2.1.1. DNA Biyosensörleri	34
2.2.1.2. Elektrokimyasal Biyosensörler	35
2.2.2. Biyosensörlerde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri	36
2.2.3. İdeal Biyosensör Yapısı	38
2.2.4. Biyosensörlerin Kullanım Alanları	38
2.3. Validasyon	39
2.3.1. Analitik Yöntem Validasyonu	39
2.3.2. Validasyon Parametreleri	40
2.3.2.1. Doğruluk	40
2.3.2.2. Kesinlik	40
2.3.2.3. Seçicilik	41
2.3.2.4. Doğrusallık	41
2.3.2.5. Çalışma Aralığı	41
2.3.2.6. Teşhis Sınırı	42
2.3.2.7. Tayin Alt Sınırı,	42
2.3.2.8. Duyarlılık	42
2.3.2.9. Sağlamlık	42
2.3.2.10. Tutarlılık	43
2.3.2.11. Stabilité	43
2.4. Kullanılan Ekipmanlar	43
2.4.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	43
2.4.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	44
2.5. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	45
2.5.1. Destek Elektrolit Çözeltileri	45
2.5.2. Gliotoksin Stok Çözeltisi	46
2.5.3. dsDNA Stok Çözeltisi	46
2.6. Deneylerde Kullanılan Voltametrik Yöntemler	46
2.6.1. dsDNA Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi	47
2.6.2. Farklı Derişimlerdeki Gliotoksinin CKE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA'nın Yükseltgenme Sinyallerine Etkisinin İncelenmesi	47
2.6.3. Gliotoksinin dsDNA Yükseltgenme Sinyallerinde Zamana Bağlı Oluşturduğu Değişimlerin İncelenmesi	48
2.6.4. Çözelti Ortamında Hazırlanan Farklı Derişimlerdeki Gliotoksinin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	49
3. BULGULAR	50
3.1. Çalışma Elektrotlarının Pik akımı Üzerindeki Etkisi	50
3.2. Gliotoksin Maddesinin Boş CKE ile Voltametrik Yöntemlerle İncelenmesi	51
3.2.1. Gliotoksinin DV Yöntemi ile İncelenmesi	51
3.2.2. Gliotoksinin KDV Yöntemi ile İncelenmesi	54
3.2.3. Gliotoksinin DPV Yöntemi ile İncelenmesi	57
3.2.4. Gliotoksinin DV Yöntemi ile Hız Taraması Çalışmaları	62
3.3. Gliotoksin-dsDNA Etkileşiminin DPV Yöntemi ile İncelenmesi	66
3.3.1. Gliotoksin Derişimine Bağlı Olarak dsDNA/CKE Biyosensörünün Yükseltgenme Sinyallerindeki Değişimlerinin İncelenmesi	66
3.3.2. dsDNA/CKE Biyosensöründe Gliotoksin-DNA Süre Etkileşiminin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri Üzerinden Değerlendirilmesi	69
3.3.3. Çözelti Ortamında Gerçekleştirilen Gliotoksin-dsDNA Etkileşiminin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri ile İncelenmesi	77
4. TARTIŞMA	87
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	101

ÖNSÖZ

Analitik Kimya Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı kapsamında yürütülen bu tez çalışmasında, epipolitiyodiyoksopiperazin sınıfı bir mikotoksin olan gliotoksinin elektrokimyasal davranışı boş camı karbon elektrot kullanılarak incelenmiş; ayrıca gliotoksinin çift sarmallı DNA ile etkileşimi, çift sarmallı DNA immobilize edilmiş camı karbon elektrot tabanlı biyosensör sistemiyle ve çözelti ortamında olmak üzere iki farklı yaklaşım üzerinden araştırılmıştır. Gliotoksinin elektrokimyasal davranışının belirlenmesi, çift sarmallı DNA ile etkileşim mekanizmasının araştırılması ve elde edilen deneysel veriler doğrultusunda gliotoksinin elektrokimyasal yöntemlerle analizine yönelik literatüre katkı sunulması amaçlanmıştır.

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi, akademik deneyimi ve yol gösterici yaklaşımıyla bana destek olan, çalışmanın her aşamasında katkılarını ve emeğini hissettiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Burcu DOĞAN TOPAL'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana katkı sağlayan, akademik bakış açımın gelişmesinde emeği geçen tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince sağladıkları destek için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı'na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgileri, anlayışları ve destekleriyle her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

2D-İTK	İki boyutlu ince tabaka kromatografisi
5'-IAF	5'-iyodoasetamidoflorosein
8(OH)dGMP	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
8-oxoG	8-oksoguanin
AgCl	Gümüş klorür
Al	Alüminyum
Au	Altın
BKEE	Bor katkılı elmas elektrot
BLI	Biyokatman interferometri
C	Kapasitans
cm ²	Santimetre kare
Co	Kobalt
ConA	Concanavalin A
Cr	Krom
Cu ²⁺	Bakır (II) iyonu
dCMP	Deoksisitidin-3'-monofosfat
dk	Dakika
DME	Damlayan cıva elektrodu
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPV	Diferansiyel puls voltametri
dsDNA	Çift sarmal deoksiribonükleik asit
d(TG)MP	6-hidroksi-5,6-dihidroksitimidin (timin glikol) monofosfat
dTMP	Deoksitimidin-3'-monofosfat
DTT	Dithiothreitol
DV	Döngüsel voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ETP	Epipolitiyodiyoksopiperazin
Fe ²⁺	Demir (II) iyonu
FLASSA	Floresan etiketli aptamer yapı değiştirme testi
g	Gram
GSH	Glutatyon
Gy	Gray
Hg ₂ Cl ₂	Cıva/cıva (I) klorür veya kalomel
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre

KBB	Kan-beyin bariyeri
kbç	Kilobaz çifti
KCl	Potasyum klorür
KDPGE	Kenar düzlemlı pirolitik grafit elektrot
KDV	Kare dalga voltametrısı
kg	Kilogram
L	Litre
La	Lantan
LD50	Letal doz 50
LPS	Lipopolisakkarit
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometrısı
M	Molar
m	Kalibrasyon deklemine ait eğim değeri
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol
MNP	Manyetik nanopartikül
Mo	Molibden
MTT	Metil tiyazolil tetrazolyum
mV	Milivolt
MXene	Titanyum karbür tabanlı nanotabaka
N	Normal
NaBH ₄	Sodyum borohidrit
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
OPA	Tek kap analiz
pM	Pikomolar
pmol	Pikomol
r	Korelasyon katsayısı
R	Direnç
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTCA	Gerçek zamanlı hücre analizi
sn	Saniye
SAM	Kendiliğinden birleşen tek katman
SCE	Doygun kalomel elektrodu

SHE	Standart hidrojen elektrodu
SPR	Yüzey plazmon rezonansı
ssDNA	Tek iplikli deoksiribonükleik asit
TAS	Tayin alt sınırı
TAMRA	Floresan boya
TDN	Dörtüzlü deoksiriboz nükleik asit nanoyapısı
TEER	Transendotelyal elektrik direnci
ThT	Tiyoflavin T
Ti	Titanyum
TS	Teşhis sınırı
V	Volt
V	Vanadyum
YPSK	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
Z	Empedans
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
σ	Standart sapma
$\bar{X}$	Ortalama değer
%	Yüzde
%BSS	Yüzde bağıl standart sapma
%VK	Yüzde varyasyon katsayısı

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Gliotoksinin molekül yapısı	3
Şekil 1.2. Gliotoksinin indirgenmesiyle ditiyol gliotoksin oluşumu	4
Şekil 2.1. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre	15
Şekil 2.2. Derişim farkından dolayı oluşan difüzyon hareketi	16
Şekil 2.3. Gerilim etkisi altında gerçekleşen yük hareketi	17
Şekil 2.4. Çözelti içerisinde uygulanan karıştırmanın etkisi	17
Şekil 2.5. Yaygın olarak kullanılan elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılma şeması	18
Şekil 2.6. Damlayan cıva elektrodu yapısı	19
Şekil 2.7. Standart hidrojen elektrodu yapısı	21
Şekil 2.8. Gümüş-gümüş klorür elektrodu yapısı	22
Şekil 2.9. Doygun kalomel elektrodu yapısı	23
Şekil 2.10. Voltametrik ölçümlerde kullanılan çalışma elektrotları	25
Şekil 2.11. DV potansiyel – zaman grafiği	27
Şekil 2.12. DV potansiyel – akım grafiği	28
Şekil 2.13. DPV potansiyel – zaman grafiği	29
Şekil 2.14. DPV potansiyel – akım grafiği	29
Şekil 2.15. KDV, potansiyel – zaman grafiği	30
Şekil 2.16. KDV potansiyel – akım grafiği	30
Şekil 2.17. Biyosensörün bileşenleri	33
Şekil 2.18. Biyosensörlerin sınıflandırılma şeması	34
Şekil 2.19. İmmobilizasyon yöntemleri	37
Şekil 2.20. Biyosensörlerin kullanım alanları	39
Şekil 3.1. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile CKE, BKEE ve KDPGE ile elde edilen voltamogramları	50
Şekil 3.2. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile DV ile elde edilen voltamogramları	52
Şekil 3.3. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile DV ile elde edilen voltamogramları	53
Şekil 3.4. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile DV ile elde edilen voltamogramı	54
Şekil 3.5. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile elde edilen KD voltamogramları	55
Şekil 3.6. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen KD voltamogramları	56
Şekil 3.7. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile elde edilen KD voltamogramı	57
Şekil 3.8. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları	58
Şekil 3.9. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları	59
Şekil 3.10. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile elde edilen DP voltamogramı	60
Şekil 3.11. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi; pH 2,36 fosfat; pH 3,62 asetat; pH 5,69 asetat; pH 7,05 fosfat pH 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları	61
Şekil 3.12. Farklı pH değerlerinin DPV yöntemi ile $4,60 \times 10^{-5}$ M derişimdeki gliotoksinin pik akımı üzerindeki etkisi	61
Şekil 3.13. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ile elde edilen hız taraması voltamogramları	62
Şekil 3.14. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $v - i_p$ grafiği	63
Şekil 3.15. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $v^{1/2} - i_p$ grafiği	64
Şekil 3.16. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $\log v - \log i_p$ grafiği	64
Şekil 3.17. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $\log v - E_p$ grafiği	65

Şekil 3.18. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süre etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı	66
Şekil 3.19. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-5} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri	68
Şekil 3.20. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri	68
Şekil 3.21. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 15 dk sürelerle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı	69
Şekil 3.22. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk – 120 dk sürelerle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı	70
Şekil 3.23. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri	71
Şekil 3.24. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri	72
Şekil 3.25. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5} \text{ M} - 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 60 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı	73
Şekil 3.26. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5} \text{ M} - 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri	74
Şekil 3.27. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5} \text{ M} - 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri	75
Şekil 3.28. %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin boş CKE ve dsDNA/CKE biyosensörü ile 60 dk süre etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı, dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 60 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı	76
Şekil 3.29. $1,55 \times 10^{-5} \text{ M} - 1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ derişim aralığındaki gliotoksin ile $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'nın 0. dk çözelti ortamındaki etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. pH 4,66 tampon çözeltisi içinde hazırlanan $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'ya ait voltamogram	78
Şekil 3.30. $6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$, $1,55 \times 10^{-5} \text{ M}$ ve $3,10 \times 10^{-5} \text{ M}$ derişimlerde hazırlanan gliotoksin ile $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'nın 30 – 480 dk sürelerle çözelti ortamındaki etkileşimi sonucu dGuo'ya ait sütun grafikleri. pH 4,66 tampon çözeltisi içinde hazırlanan sadece $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'nın dGuo sinyaline ait sütun grafikleri	79
Şekil 3.31. $6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$ gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'nın çözelti ortamında 210 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5} \text{ M}$ dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram, sadece $6,20 \times 10^{-6} \text{ M}$ gliotoksinin %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	80

Şekil 3.32. $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram, sadece $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	81
Şekil 3.33. $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram, sadece $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	83
Şekil 3.34. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 210 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	84
Şekil 3.35. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 360 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 360 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	85
Şekil 3.36. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 480 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 480 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram	86

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Farklı kalomel elektrotlar ve özellikleri	22
Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	37
Çizelge 2.3. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler	43
Çizelge 2.4. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	44
Çizelge 2.5. Deneylerde kullanılan standart maddeye ait bilgiler	44
Çizelge 2.6. Deneylerde kullanılan destek elektrolitleri ve içerikleri	45
Çizelge 3.1. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile CKE, BKEE ve KDPGE ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	51
Çizelge 3.2. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	52
Çizelge 3.3. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	53
Çizelge 3.4. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile 0,1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	54
Çizelge 3.5. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	55
Çizelge 3.6. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	56
Çizelge 3.7. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile 0,1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	57
Çizelge 3.8. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	58
Çizelge 3.9. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	59
Çizelge 3.10. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile 0,1 M H ₂ SO ₄ çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri	60
Çizelge 3.11. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin çözeltisinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ile elde edilen hız taraması değerleri	63
Çizelge 3.12. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6}$ M – $4,60 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 15 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	67
Çizelge 3.13. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6}$ M – $4,60 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 15 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	67
Çizelge 3.14. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	70
Çizelge 3.15. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	71
Çizelge 3.16. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 60 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	73
Çizelge 3.17. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 60 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	74
Çizelge 3.18. . %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA/CKE biyosensörü ile 60 dk süre etkileşimine ait dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	76
Çizelge 3.19. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin boş CKE ile 60 dk süre etkileşimine ait dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	76

Çizelge 3.20. $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	80
Çizelge 3.21. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	80
Çizelge 3.22. $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	82
Çizelge 3.23. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	82
Çizelge 3.24. $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	83
Çizelge 3.25. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşim sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	83
Çizelge 3.26. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 210 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	84
Çizelge 3.27. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 360 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 360 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	85
Çizelge 3.28. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 480 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 480 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri	86

1. GİRİŞ

Canlılarda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların tümü metabolizma olarak adlandırılır. Metabolizma ürünleri metabolitlerdir. Metabolitler, birincil ve ikincil (özelleşmiş) metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılır. Hücre bölünmesi, solunum, enerji üretimi, büyüme, üreme ve depolama gibi yaşamsal fonksiyonları sürdürmek için gerekli olan bileşikler birincil metabolitler olarak adlandırılırken, birincil metabolitler dışında kalan ve canlıların yaşam fonksiyonlarının devamı için zorunlu olmayan diğer bileşikler ikincil metabolitler olarak ifade edilmektedir (Bhatla vd., 2023; Daley vd., 2017; Thirumurugan vd., 2018). İkincil metabolitler tür içinde veya farklı türler arasında iletişim sağlanması, savunma, besin ihtiyacının karşılanması, adaptasyon, simbiyotik etkileşimler veya hayatta kalma gibi özellikleriyle üretildikleri canlıya sağladıkları avantajlarla bilinmektedir (Macheleidt vd., 2016). Bu bileşikler, bitkiler, mantarlar, bakteriler, algler ve hayvanlar tarafından üretilen ve geniş bir çeşitlilik gösteren doğal bir ürün grubudur. Günümüzde 500.000 ikincil metabolit tanımlanmıştır. Bu bileşiklerin 100.000'i hayvansal, 350.000'i bitkisel ve 70.000'i mikrobiyal kökenlidir. Mikroorganizmalardan elde edilen metabolitler arasında yaklaşık 33.500 biyoaktif mikrobiyal metabolit tanımlanmıştır. Bu biyoaktif metabolitlerin kökenleri detaylandırıldığında, yaklaşık %12,5'i (4.200) tek hücreli bakterilerin ve siyanobakterilerin metabolitlerini oluştururken %41'i (13.700) aktinomiset fermentasyonlarının ürünlerinden oluşmaktadır. En büyük kısım olan yaklaşık %47'sinin (15.600) de fungal kökenli olduğu teşhis edilmiştir (Bills ve Gloer, 2016). Birçok ikincil metabolitin antibakteriyel veya antifungal ajan olup, kanser ilaçları, kolesterol düşürücü ilaçlar, bağışıklık baskılayıcılar, antiparazit ajanlar ve herbisitler gibi formülasyonlarda kullanılarak faydalandığı kanıtlanmıştır (Vaishnav ve Demain, 2011). İkincil metabolitlerin faydalarının yanında birçok zararı da bilinmektedir. Hızlı etki göstermeleri ve düşük derişimlerinde bile ($LD_{50} < 25$ mg/kg) ölümcül olmaları nedeniyle, ikincil metabolit grubunun içerisinde yer alan biyotoksinler, ikincil metabolitlerin canlılara ve çevreye verdikleri zararların önemli kaynaklarından sayılmaktadır (Orhan vd., 2025; Prasad vd., 2025). Besinler aracılığıyla alındıklarında akut ve kronik toksisiteye neden olabilen bu maddelerin, teratojenik ve karsinojenik etkilere sahip oldukları; cilt irritasyonu, karaciğer hasarı, hamilelikte düşük, üreme sisteminde bozulmalar, immün sistem baskılanması, solunum sistemi hasarı, kardiyovasküler komplikasyonlar, görme kaybı, felç ve motor fonksiyonlarda bozukluklara yol açabildikleri literatürde bildirilmektedir (Tang vd., 2023).

1.1. Mikotoksinlerin Genel Özellikleri

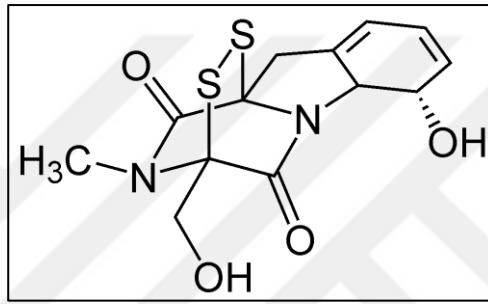
Mikotoksin terimi ilk kez 1962 yılında İngiltere’de yaşanan bir veterinerlik krizi sırasında ortaya atılmıştır. Bu olayda, deoksinivalenol ile kontamine olmuş yem tüketen yaklaşık 100.000 hindi yavrusunun ölmesi, mikotoksin kavramının ortaya konulmasına neden olmuştur (Juraschek vd., 2022). Mikotoksinler mantarlar tarafından üretilen ve kimyasal yapı bakımından oldukça geniş bir çeşitlilik gösteren ikincil metabolitlerdir. Mantarlar tarafından üretilen bu bileşiklerin böcekler, mikroorganizmalar, nematodlar, otobur hayvanlar ve insanlar gibi çeşitli çevresel tehditlere karşı bir savunma mekanizması olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Mikotoksin oluşumunu sıcaklık, nem seviyesi, kullanılan fungusit ve gübre miktarı, mantarın bulunduğu ortamın besin içeriği, coğrafi koşullar, böcekler tarafından verilen zarar düzeyi, toksijenik mantar türleri arasındaki etkileşimler gibi pek çok çevresel ve biyolojik faktör etkiler. Günümüzde yaklaşık 400 mantar kaynaklı ikincil metabolitin toksik olduğu bilinmektedir ve tarımsal ürünlerin yaklaşık dörtte birinde bu bileşiklere rastlandığı rapor edilmektedir. Mikotoksinler üretim, işleme, taşıma ve depolama gibi aşamaların herhangi birinde ortaya çıkabilecek çok sayıda kontaminasyon yoluyla gıda ve tarım ürünlerinde bulunabilmektedir (Cinar, 2020).

1.2. Mikotoksinlerin Zararları

Mikotoksinlerin canlılar üzerindeki etkisi oldukça geniştir. Toksinin türüne ve dozuna bağlı olarak, toksine maruz kalma süresinin yanı sıra bireylerin yaşlarına, cinsiyetlerine ve sağlık durumlarına da bağlı olarak akut veya kronik toksisiteye neden olabilmektedir. Akut etkiler genellikle maruziyetten sonraki 72 saat içinde ortaya çıkarken, kronik etkiler aylar, yıllar veya daha uzun süre boyunca sürebilir. Mikotoksinler sindirim, solunum, deri ile temas ya da lenfatik sistem ve dolaşım sistemine giriş yoluyla toksisite oluşturabilir. Bu toksinler protein sentezinin engellenmesi, makrofaj sisteminin zedelenmesi, akciğerlerin solunum mekanizmasındaki işlevinin bozulması ve bakteriyel endotoksinlere karşı duyarlılığın artması gibi temel biyolojik süreçleri olumsuz etkileyerek ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Literatürde ayrıca bağışıklık sisteminin zayıflaması, sitotoksisite, karaciğer ve böbrek hasarı veya kanseri, bağırsak bariyerinin bozulması, fetal gelişim bozuklukları ve ölümcül toksik sendromlar gibi önemli patolojik sonuçlar bildirilmiştir (Awuchi vd., 2022).

1.3. Gliotoksin Hakkında Bilgi

Gliotoksin, yapısında disülfid bağı bulunan epipolitiyodiyoksopiperazin (ETP) sınıfında bir mikotoksindir. *Aspergillus fumigatus* başta olmak üzere *Aspergillus fischeri*, *Eurotium chevalieri*, *Gliocladium fimbriatum*, *Trichoderma virens* ve *Dichotomomyces cejpai* gibi mantar türleri tarafından sentezlenmektedir (Singh ve Kumari, 2022; Ye, Liu, Zhang ve Zhang, 2021). İlk kez 1936 yılında *Gliocladium fimbriatum* türünden Weindling ve Emerson tarafından izole edilmiş ve bu nedenle “gliotoksin” olarak adlandırılmıştır (Fukuyama vd., 1981). *A. fumigatus*’un önemli virülans faktörlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Gliotoksin maddesinin molekül yapısı Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Gliotoksinin molekül yapısı

IUPAC İsmi: (1*R*,7*S*,8*S*,11*R*)-7-hidroksi-11-(hidroksimetil)-15-metil-12,13-ditiya-9,15-diazatetrasilko[9.2.2.0^{1,9}.0^{3,8}]pentadeka-3,5-dien-10,14-dion

(3*R*,6*S*,10*aR*)-6-Hidroksi-3-(hidroksimetil)-2-metil-2,3,6,10-tetrahidro-5*aH*-3,10*a*-epiditiyopirazino[1,2-*a*]indol-1,4-dion

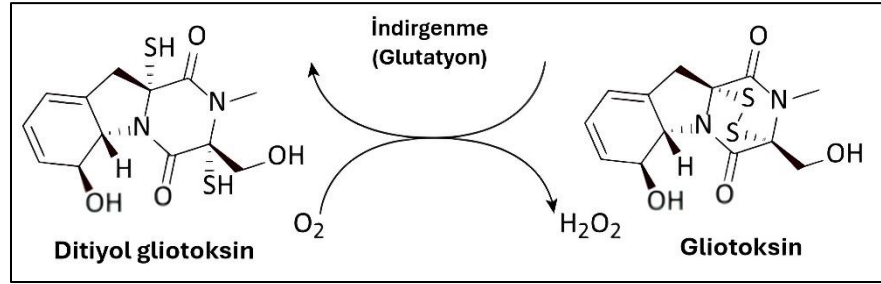
Kapalı Formülü: C₁₃H₁₄N₂O₄S₂

Molekül Kütlesi: 326,4 g/mol

1.3.1. Gliotoksinin Mantarlardaki Biyosentezi ve Etki Mekanizması

Gliotoksin, ETP sınıfına ait bir bileşik olup yapısında tekrarlı olarak indirgenip yeniden oluşabilen bir disülfid köprüsü içerir. Bu yapısal özellik, gliotoksine hücre içinde güçlü bir redoks aktivitesi kazandırmakta ve biyolojik etkilerinin temelini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, gliotoksinin özellikle indirgenmiş ditiyol formunun Şekil 1.2’de

belirtildiği gibi gözlenen biyolojik etkilerden büyük ölçüde sorumlu olduğunu göstermektedir (Dolan vd., 2015).



Şekil 1.2. Gliotoksinin indirgenmesiyle ditiyol gliotoksin oluşumu

Gliotoksin biyosentezi, *Aspergillus fumigatus* başta olmak üzere ilgili mantar türlerinde bulunan gli gen kümesi olarak adlandırılan genlerin koordineli aktivitesine dayanmaktadır. GliP geni tarafından kodlanan non-ribozomal peptid sentetaz (GliP), diketopiperazin iskeletinin oluşumunu katalizler. Sitokrom P450 mono-oksijenaz (GliC) aracılığıyla amino aside bir hidroksil grubu eklenir ve ardından glutasyon S-transferaz (GliG) tarafından katalizlenen sülfürasyon basamağı gerçekleşir. Daha sonra, GliK ve GliJ'nin katalitik aktiviteleri ile glutamil grupları uzaklaştırılır ve GliI tarafından kodlanan aminotransferazın aracılık ettiği süreç sonucunda karakteristik epiditiyol yapısı oluşur. GliN geni tarafından kodlanan N-metiltransferaz (GliN) ve/veya GliM geni tarafından kodlanan O-metiltransferaz (GliM), serbest amid olarak görev yaparak amid metilasyonunu hızlandırır ve ETP yapısına stabilite kazandırır. Buna ek olarak, gliotoksin oksidoredüktaz (GliT) tarafından katalizlenen bir disülfid bağının oluşumu ile meydana gelir. Ayrıca GliZ'nin gliotoksin biyosentezi için düzenleyici olduğu gösterilmiş olup, geninin inaktivasyonu gliotoksin üretimini tamamen ortadan kaldırmaktadır. GtmA, gliotoksinin biyosentez gen kümesinin bir parçası olmamakla birlikte, gliotoksindeki disülfid bağının parçalanmasına aracılık ederek bis-ditiyobis(metiltiyo)-gliotoksinin oluşumunu sağlayabilmektedir. Ayrıca GliA gliotoksinin hücre dışına taşınmasından sorumludur. Bu nedenle hem GtmA hem de GliA gliotoksinin konak üzerindeki sitotoksitesini azaltarak katkıda bulunmaktadır (Ye vd., 2021).

Mantarlarda gliotoksin üretimi ve hücre içi etkileri, oksidatif stres, kükürt asimilasyonu, glutasyon (GSH) sentezi, S-adenozil metiyonin aracılı metil grup transferi ile demir ve çinko metabolizması gibi birçok metabolik yolakla yakından ilişkilidir. Toksin kendi biyosentezini otoindüksiyon yoluyla artırabilen bir molekül olmasına karşın, çinko iyonlarının gliotoksin gen kümesi aktivitesini baskıladığı bildirilmiştir. Hücre içi çinko

düzeyinin azalması durumunda gliA, gliT, gliZ ve gtmA genlerinin ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Kükürdün, sistein, metiyonin ve GSH biyosentezi gibi yollarda görev aldığı için toksinin üretimi açısından kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, *Aspergillus fumigatus* tarafından gliotoksinin hücre içine alınmasının ardından, toksinin GSH aracılı kimyasal indirgenme ile ditiyol formuna (dtGT) dönüştüğü gösterilmiştir. Gliotoksinin hücre içi toksisitesinin GSH düzeyine bağlı olduğu ve hem biyosentezinde hem de hücresel etkilerinde redoks dengesinin belirleyici rol oynadığı bildirilmiştir (Delbaje vd., 2025). Bunun yanı sıra, gliotoksinin tarımsal alanda kullanım potansiyeline sahip olduğu, başta çeltik yanıklık hastalığı olmak üzere çeşitli bitki hastalıklarının kontrolünde fungusit ve insektisit olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Gliotoksin üreten *Trichoderma virens* suşu temel alınarak geliştirilen GL-21, Glio Gard™ ve Soil Gard™ gibi ticari preparatların sera ve tarla bitkilerinde fide ve kök hastalıklarının kontrolünde etkili sonuçlar sağladığı görülmüştür (Ye, Liu, Zhang ve Zhang, 2021).

1.3.2. Gliotoksinin Toksik Etkileri

Gliotoksin bağışıklık sistemi hücreleri ve diğer hedef hücreler üzerinde çok yönlü toksik etkilere sahiptir. Özellikle nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolunu inhibe ederek immün yanıtı baskılamaktadır. Bu süreç, antijen sunan hücrelerin ve makrofajların fonksiyonlarını bozmakta veya apoptotik hücre ölümünü tetikleyerek bu hücrelerin eliminasyonuna yol açmaktadır (Dolan vd., 2015; Waring ve Beaver, 1996; Ye vd., 2021). Gliotoksinin yapısındaki reaktif disülfid köprüsü, hücre içi indirgen ortamda açılarak serbest tiyol grupları ile kararlı disülfid bağları oluşturmaktadır. Böylece NADPH oksidaz, glutaredoksin gibi enzimleri inhibe ederek hücresel antioksidan sistemleri bozmakta ve oksidatif strese yol açmaktadır (Dolan vd., 2015; Ye vd., 2021). Oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi deoksiribonükleik asitte (DNA) tek ve çift sarmal kırıklar gibi hasarlar oluşturarak genotoksik etkilere neden olmaktadır (Waring ve Beaver, 1996; Ye vd., 2021). Mitokondriyal yolda Bcl-2 ailesi proteinlerini (Bak/Bim) ve ardından kaspazları aktifleştirerek programlanmış hücre ölümünü tetiklemesiyle birçok hücre tipi için güçlü bir apoptoz indükleyicisi sayılmaktadır (Dolan vd., 2015). Oluşan immünosupresif, oksidatif ve apoptotik etkiler gliotoksine maruz kalan dokularda ciddi organ hasarı geliştirebilmektedir. *Aspergillus* kaynaklı enfeksiyonlarda alveolar makrofajları ve akciğer epitel hücrelerini öldürerek pulmoner doku bütünlüğünü bozmakta ve hastalığın patogenezi artırılmaktadır. Benzer şekilde, yüksek doz gliotoksin karaciğer hücrelerinde nekrotik hasara yol açabilmektedir (Ye vd., 2021).

1.3.3. Gliotoksin ile Yapılmış Literatür Çalışmaları

Çoğunluğu hücresel çalışmalar olmak üzere, gliotoksin maddesi ile ilgili literatürde rapor edilen elektrokimyasal, kromatografik ve diğer yöntemlerle yapılmış çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

1.3.3.1. Elektrokimyasal Çalışmalar

Wang vd. (2025) tarafından yapılan bir çalışmada, *Aspergillus fumigatus* tarafından üretilen gliotoksinin miktar tayini için aptamer tabanlı, etiket gerektirmeyen bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen sensör, gliotoksine özgü aptamerler ile eksonükleaz III'ün bir araya getirilmesine dayanmaktadır. Gliotoksinin aptamer-DNA çift sarmalına bağlanması sonucunda serbest kalan tek iplikli DNA, ardışık olarak saç tokası (hairpin) yapısındaki problemlerle etkileşmiş ve bu süreç Eksonükleaz III tarafından katalizlenerek çok sayıda G-kuadrupleks dizisinin oluşmasına yol açmıştır. Oluşan G-kuadrupleks yapıları, potasyum iyonlarının varlığında hemin ile kompleks oluşturarak elektrot yüzeyinde bir elektrokimyasal sinyal meydana getirmiş; bu sayede amperometrik ve diferansiyel puls voltametrik ölçümler ile yüksek duyarlılık elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensörle 5 pM – 1 nM aralığında doğrusal çalışma aralığı ve 3,14 pM değerinde teşhis sınırı (TS) değeri elde edilmiştir. Ayrıca, seçicilik çalışmalarında aflatoksin B1, zearalenon ve okratoksin A gibi girişimcilerin sensör sinyalini etkilemediği gösterilmiş; insan serumu ile yapılan analizlerde ise %94 – 102 arasında değişen geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

İki boyutlu nanomalzemeler ve DNA nanoyapıları kullanılarak yeni bir elektrokimyasal DNA (E-DNA) biyosensörü Wang ve ekibi tarafından başka bir çalışmada geliştirilmiştir. Sensör tasarımında, yüksek iletkenlik ve geniş yüzey alanı sunan MXene (Ti_3C_2) nanotabaka üzerine dört yüzölçümlü DNA nanoyapılarının (TDN) entegre edilmesiyle, aptamer tabanlı bir TDN/MXene kompleks platformu oluşturulmuştur. Sensör, gliotoksin varlığında aptamer-hedef etkileşimine dayalı bir mekanizmayla çalışmış ve sabit potansiyelde gerçekleştirilen amperometrik ölçümler, streptavidin-peroksidaz aracılı sinyal amplifikasyonu sayesinde yüksek elektrokimyasal sinyal üretmiştir. Sensörle 5 pM – 10 nM seviyesinde doğrusal bir çalışma aralığı ve 5 pM gibi bir TS değeri elde edilmiştir. Ayrıca, insan serumu ile yapılan analizlerde %96,3 – 115 arasında geri kazanım ve %2,2 – 9,4 arasında bağıl standart sapma değerleri elde edilmiştir (Wang vd., 2019).

Başka bir çalışmada, *Dichotomomyces cejpii*'den elde edilen gliotoksinin altın yüzey üzerinde kendiliğinden birleşen tek katman (SAM) oluşturma kapasitesi ile biyosensör hazırlanmıştır. SAM, proteinlerin denatürasyonunu önlemek ve biyolojik aktivitesini korumak amacıyla immobilizasyon platformu olarak kullanılmıştır. Çalışmada, gliotoksin altın elektrot yüzeyine adsorbe edilerek (Au/GT) bir sistem oluşturulmuştur. Sonuçlar, gliotoksinin disülfid köprüsünün yüzey adsorpsiyonu sırasında kırıldığını, moleküllerin altın yüzey üzerinde güçlü şekilde kemisorbe edildiğini ve $2,3 \times 10^{-10}$ mol/cm² yüzey alanına sahip kararlı bir SAM oluşturduğunu göstermiştir. *Canavalia brasiliensis* kaynaklı ConBr lektini Au/GT yüzeyine immobilize edilmiştir. Lektinin biyolojik aktivitesini koruyarak D-mannoz şekerini özgül olarak tanıyabildiği hem yüzey plazmon rezonansı (SPR) hem de elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleriyle doğrulanmıştır. İmpedimetrik analizler, şeker-lektin etkileşiminde hidrojen bağlarının ve Ca²⁺ /Mn²⁺ iyonlarının önemli rol oynadığını gösterirken, gliotoksin ile oluşturulan SAM'in 11-merkaptoundekanoik asit ve sistein gibi klasik tiyol SAM'lere göre daha dayanıklı ve kararlı bir yüzey sağladığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma gliotoksinin yalnızca toksikolojik açıdan değil, aynı zamanda biyosensör yüzeyinin tasarımında doğal bir yapı taşı olarak da kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle etiket gerektirmeyen impedimetrik biyosensör sistemleri için güçlü ve biyolojik olarak uyumlu bir platform sunduğu ortaya koyulmuştur (Abreu vd., 2017).

1.3.3.2. Kromatografik Çalışmalar

Pena vd. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, hayvansal ortamlardan izole edilen *Aspergillus fumigatus* suşlarının gliotoksin üretme potansiyeli araştırılmış ve gliotoksin miktarının belirlenmesi amacıyla sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) kullanılarak çevreye zarar vermeyen ve hızlı sonuç verebilen bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu kapsamda, maya özütü-sükroz agar besiyerinde kültüre edilen toplam 143 suş değerlendirilmiş ve toksin ekstraksiyonu kloroform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem, 2500 ng/g'de %100,3 ve 7000 ng/g'de %92,4 oranında geri kazanım sağlamıştır. Sonuçlar, suşların %61,5'inin gliotoksin üretebildiğini ve seviyelerin 3430,5 ng/g tayin alt sınırına (TAS) kadar ulaşabildiğini göstermiştir. Çalışmada, gliotoksinin *A. fumigatus*'un patobiyolojisindeki önemli rolü ile hayvan sağlığı ve özellikle kırsal bölgelerde çalışan bireyler üzerindeki potansiyel etkileri vurgulanmıştır.

Zhang vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, gliotoksinin miktar tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) ile bir yöntem geliştirilmiştir. Bu

yöntemde metanol ve suyun 50:50 (h/h) oranındaki karışımı mobil faz olarak kullanılmış, akış hızı 1,0 mL/dk olarak belirlenmiş ve ölçümler 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Analizler Inertsil ODS-SP kolonu kullanılarak yürütülmüştür. Geliştirilen yöntemin 0,5 – 2,5 mg/mL derişim aralığında doğrusallık gösterdiği ve determinasyon katsayısının (R^2) 0,999 olduğu belirlenmiştir. Yöntemin geri kazanımı %99,22 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, gliotoksin örneklerinin 5 saat boyunca stabilitesini koruduğu ve yöntemin tekrarlanabilirliğinin yeterli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen YPSK yönteminin farklı numunelerde gliotoksinin tayini için uygun olduğu ve ileride yapılacak çalışmalar ile olası klinik uygulamalar açısından önemli bir temel oluşturduğu değerlendirilmiştir.

Başka bir çalışmada, gliotoksinin miktar tayinini geliştirmek amacıyla yenilikçi bir tek kaplı türevleştirme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde gliotoksin önce sodyum borohidrit (NaBH_4) kullanılarak indirgenmiş, daha sonra oluşan tiyol grupları 5'-iyodoasetamidoflorosein (5'-IAF) ile alkilenmiştir. Elde edilen türev, ters faz YPSK ile analiz edilmiştir. GT-(AF)₂ türevinin molar absorptivitesi, gliotoksine göre 6,8 kat artış göstermiş olup bu durum, 40 ng/125 pmol gibi düşük derişimlerin bile teşhis edilmesine olanak sağlamıştır (Davis vd., 2011).

Golden vd. (1998) tarafından rapor edilen bir çalışmada *Aspergillus fumigatus* tarafından üretilen gliotoksinin DNA üzerindeki hasar oluşturuıcı etkileri ve genotoksik özellikleri incelenmiştir. Araştırmada, HeLa hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri gliotoksine maruz bırakılmış, oluşan DNA adüktleri ³²P radyoetiketleme tekniği ve iki boyutlu ince tabaka kromatografisi (2D-İTK) kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, gliotoksinin ETP halkası aracılığıyla redoks döngülerine katıldığını, ROS oluşumuna yol açtığını ve bu türlerin DNA ile etkileşerek 6-hidroksi-5,6-dihidroksitimidin (timin glikol) monofosfat [d(TG)MP] düzeyinin %0,0'dan %30,4'e ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin [8(OH)dGMP] düzeyinin ise %0,09'dan %4,2'ye çıkardığını göstermiştir. HeLa DNA'sı gerekli redoks ajanlarının varlığında 0,1 mmol/L ve 0,3 mmol/L gliotoksin derişimlerinde 1 ve 20 saat inkübe edilmiştir. Maruziyet süresinin derişimden daha etkili olabileceği, 20 saatlik inkübasyon ile 0,3 mmol/L gliotoksinin deoksitimidin-3'-monofosfat (dTMP) ve deoksisitidin-3'-monofosfatı (dCMP) tamamen ortadan kaldırmasıyla belirlenmiştir. Sonuçlar, gliotoksinin indirgenmiş disülfid köprüsü üzerinden süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşumunu tetikleyerek DNA bütünlüğünü bozduğunu ve hücresel düzeyde ciddi yapısal hasara yol açtığını göstermiştir.

1.3.3.3. Diğer Çalışmalar

Zheng vd. (2024) bir çalışmada gliotoksinin teşhisi amacıyla hedef tarafından yönlendirilen bölünmüş aptamere dayalı tek kap analiz (OPA) yöntemi geliştirilmiştir. İlk aşamada gliotoksine özgü APT16 isimli aptamer optimize edilmiştir ve elde edilen çekirdek dizininin (APT16MT) bağlanma afinitesinin yaklaşık 20 kat arttığı gözlemlenmiştir. Biyokatman interferometri (BLI) analizleri, aptamerin gliotoksine yüksek özgüllükle bağlandığını ve HSA ile BSA gibi girişimcilerle çapraz reaktivite göstermediğini ortaya koymuştur. Moleküler dinamik simülasyonları, GTX-APT16MT kompleksinin kararlı olduğunu ve bağlanmanın esas olarak hidrofobik etkileşimler ile ortalama iki hidrojen bağı üzerinden gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Optimize edilen aptamer iki fragmana (SA1 ve SA2) ayrılmış; bu fragmanların gliotoksin yokluğunda kararlı yapı oluşturamadığı, ancak toksinin varlığında yeniden bir araya gelerek G-kuadrupleks yapı oluşturduğu ve tiyoflavin T (ThT) floresansını belirgin biçimde artırdığı gözlemlenmiştir. Geliştirilen OPA yöntemi ile 0,128 nM – 2 µM aralığında doğrusallık ve 0,07 nM değerinde TS elde edilmiştir. İçme suyu, serum ve gözyaşı gibi numunelerde %95,1 – 107,2 aralığında geri kazanım elde edilmiştir.

Başka bir çalışmada, deniz kökenli bir mantardan elde edilen gliotoksinin meme kanseri hücreleri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerindeki etkileri Şenol ve ark. tarafından in vitro ortamda incelenmiştir. MTT (metil tiyazolil tetrazolyum) hücre canlılığı testi ve xCelligence gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) testi sonuçlarında her iki hücre hattı için 1,5625 µM toksin miktarı IC₅₀ olarak belirlenmiştir ve bu derişimde hücre çoğalmasının belirgin şekilde baskılandığı gözlenmiştir. Kinetik analizler, 1,5625 µM derişimde gliotoksinin mitotik indeksi ve DNA sentezini zamana bağlı olarak azalttığını; buna karşılık apoptotik hücre oranını 72. saatte MCF-7 hücrelerinde %3,13'ten %21,34'e, MDA-MB-231 hücrelerinde %3,16'dan %19,43 düzeyine çıkardığını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, gliotoksinin hormon bağımlı ve bağımsız meme kanseri hücrelerinde antiproliferatif ve proapoptotik etki gösterdiğini ve potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini ortaya koymuştur (Şenol vd., 2023).

Gao vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, gliotoksine özgü aptamerler immobilizasyon gerektirmeyen GO-SELEX teknolojisi kullanılarak bağlanmıştır. Çalışmada geliştirilen aptamerlerin bağlanma afinitesi, özgüllüğü ve yapısal stabilitesi, kısaltma ve mutasyon stratejileri uygulanarak optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda elde edilen APT8T1M adlı aptamer, gliotoksinin teşhisi için floresan etiketli aptamer yapı

değiştirme testinin (FLASSA) geliştirilmesinde kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem, 0,1 nM – 100 nM aralığında doğrusallık göstermiş olup TS değeri 0,05 nM olarak belirlenmiştir. Yöntem serum ve idrar örneklerine uygulanmıştır. %98,76 – 110,85 arasında değişen geri kazanım ve %5,45 – 14,59 aralığında düşük varyasyon değerleri elde edilmiştir.

Comas vd. (2019) tarafından rapor edilen bir çalışmada, gliotoksinin tümör hücrelerine hedefli ve etkin bir şekilde taşınmasını sağlamak amacıyla floresan boya (TAMRA) ve glikoz ile fonksiyonelleştirilmiş biyoyumlu manyetik nanopartiküllerin (MNP'lerin) kullanıldığı bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Gliotoksinin biyoyumlu MNP'lere kovalent olarak bağlanmasıyla biyolojik aktivitesini koruduğu, hücre içi alımının arttığı ve bu özelliklerin glikoz varlığında daha da güçlendiği gözlemlenmiştir. Glikoz ve TAMRA ile fonksiyonelleştirilmiş MNP'ler sayesinde gliotoksinin hücre içine alımı ve lizozomal konumlanması takip edilebilmiş, L929 fare sarkoma hücrelerinde artan sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgularla, gliotoksinin nanopartiküller aracılığıyla tümör hücrelerine taşınabileceği ilk kez gösterilmiş; kanser başta olmak üzere farklı hastalıkların tedavisinde hücreye özgül ligandlar kullanılarak geliştirilecek yöntemler için temel sağlanmıştır.

Başka bir çalışmada ise gliotoksinin insan kan-beyin bariyeri (KBB) üzerindeki etkileri, indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (iPSC) türetilmiş beyin mikrovasküler endotelial hücreleri kullanılarak in vitro ortamda incelenmiştir. Sonuçlar, gliotoksinin hem akut (2 saat) hem de kronik (24 saat) maruziyette, 1 µM ve üzerindeki derişimlerde KBB bütünlüğünü bozduğunu göstermiştir. Akut gliotoksin uygulaması sonrası transendotelial elektrik direnci (TEER) değerlerinde düşüş gözlenirken, sodyum floresin geçirgenliğinde yaklaşık 8 kat artış gözlenmiş ve bariyer fonksiyonundaki bozulmanın geri dönüşümsüz olduğu belirlenmiştir. Kronik maruziyet deneylerinde ise 1 – 10 µM derişimlerde gliotoksinin tek tabakalı endotelial hücre bütünlüğünün kaybına ve hücrel metabolik aktivitenin belirgin şekilde azalmasına yol açtığı görülmüştür. Sitotoksisite analizleri, gliotoksinin hücre tipine bağlı olarak etki gösterdiğini ve özellikle astrositlerde çok düşük derişimlerde dahi yüksek duyarlılık oluşturduğunu ortaya koymuştur. IC₅₀ değerleri astrositler için $3,38 \times 10^{-10}$ M, endotelial hücreler için $8,24 \times 10^{-6}$ M ve nöronlar için $1,99 \times 10^{-6}$ M olarak bulunmuştur. Gliotoksinin 60 dakika (dk) sonunda uygulanan dozunun yaklaşık %2'sinin KBB'yi aştığı ve geçişin pasif difüzyonla gerçekleştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, gliotoksinin klinik olarak saptanan derişim aralıklarında dahi kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü bozabildiğini ve *A. fumigatus*'un santral sinir sisteminde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Patel vd., 2018).

Gliotoksinin insan periferik lenfositlerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri in vitro ortamda rapor edilmiştir. Araştırmada, *Aspergillus fumigatus*'tan laboratuvar ortamında elde edilerek saflaştırılan gliotoksin ile ticari olarak satın alınan standart gliotoksin örnekleri kullanılmış ve her iki örnek de 25, 50, 100 ve 200 ng/mL derişimlerde çalışılmıştır. Sitotoksisite, MTT testi ile ölçülmüş ve saflaştırılmış gliotoksinin lenfosit proliferasyonunu sırasıyla %21, %39,10, %61,99 ve %87,45 oranlarında inhibe ettiği; standart gliotoksinin ise aynı derişimlerde %17,89, %34,92, %58,34 ve %85,22 oranlarında büyüme inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Bulgular, gliotoksinin sitotoksik etkisinin derişime bağılı olduğunu ve saflaştırılmış örneğin standart gliotoksine göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. %1 agaroz jel elektroforezi analizlerinde, gliotoksin uygulanan hücrelerde DNA yapısının bozulduğu gözlenmiştir. DNA hasarının düşük derişimlerde bile ortaya çıktığı ve gliotoksin derişimi arttıkça DNA parçalanmasının daha belirgin hale geldiği belirlenmiştir. Sonuçlar, gliotoksinin insan lenfositlerinde hem hücre canlılığını azaltan güçlü bir sitotoksik ajan hem de DNA hasarına yol açan önemli bir genotoksik madde olduğunu göstermektedir (Nouri vd., 2015).

Gliotoksinin miktar tayini için yapılan başka bir çalışmada, toksinin etkileri insan KB hücre hattında ortaya çıkan morfolojik değişikliklerin indüklenmesine dayanmıştır. Bu yöntemde, hücrelerde meydana gelen değişikliklerin değerlendirilmesi, 1 saatlik inkübasyon süresinin ardından doğrudan optik mikroskop altında gözlemlenir ve 630 nm dalga boyunda çalışan otomatik bir mikropilaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gliotoksin için TS'nin belirlenmesinde, 18 – 20 ng derişim aralığı kullanılmıştır. Hücrelerin en az %30'unda morfolojik değişikliğe sebep olan en düşük derişim, kültür ortamında 0,18 µg/mL olarak bulunmuş olup bu değer, kuyucuk başına 18 ng gliotoksin miktarına karşılık gelmiştir. Inkübasyon süresinin uzatılmasının bu eşik değerin daha da düşürülmesinde etkili olmadığı belirlenmiştir. Geliştirilen biyotest, farklı mantar türleri tarafından gliotoksin üretiminin incelenmesinde kullanılmış ve çeşitli ekstraktlar arasında gliotoksin üreten üç *Aspergillus fumigatus* suşu vurgulanmıştır. Ayrıca, geliştirilen biyotestin çok düşük TS'ye sahip olması ve ölçüm öncesinde son derece kısa bir inkübasyon süresi gerektirmesi, yöntemi literatürde daha önce bildirilen biyolojik testlere göre daha hızlı ve hassas hale getirmiştir (Grovel vd., 2006).

Sutton vd. (1994) bir çalışmada, gliotoksinin in vivo immünosupresif etkileri, subletal olarak ışınlanmış fare modeli kullanılarak araştırılmıştır. Deneylerde, 6-8 haftalık CBA/H dişi farelere 4 veya 6 Gy dozunda radyasyon uygulanmış ve ardından 5 gün boyunca 100 µg derişimine kadar olan gliotoksin dozları intraperitoneal olarak enjekte

edilmiştir. Bulgular, gliotoksinin özellikle bağışıklığı baskılanmış farelerde toksisitesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca tek doz gliotoksin uygulamasının bağışıklık sisteminin toparlanmasını yaklaşık 2 hafta geciktirdiği belirlenmiştir. Toksisite analizlerinde, ışınlanmamış farelerde $>100 \mu\text{g}$ gliotoksin letal etki oluştururken, 6 Gy ışınlanmış farelerde $100 \mu\text{g}$ gliotoksin ile %25 mortalite gözlenmiş ve LD_{50} değerleri 0 Gy için $9,9 \text{ mg/kg}$, 6 Gy için $7,9 \text{ mg/kg}$ olarak hesaplanmıştır. Splenosit analizlerinde gliotoksin uygulanan ışınlanmış farelerde dalaktaki toplam lökosit sayısının azaldığı gözlemlenmiştir. Özellikle lipopolisakkarite (LPS) yanıt veren olgun B lenfositlerinin iyileşmesinin geciktiği, buna karşılık Concanavalin A'ya (ConA) yanıt veren T hücre yanıtının etkilendiği ortaya konulmuştur. Akış sitometrisi sonuçları 16. günde gliotoksin verilen farelerde dalaktaki B hücre oranının %70'ten %37'ye düştüğünü göstermiştir. Histolojik incelemeler, elektron mikroskopisi ve agaroz jel elektroforezi analizleri, gliotoksinin timus, dalak ve mezenterik lenf nodlarında apoptozu indüklediğini ve özellikle timusta belirgin DNA fragmentasyonu oluşturduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu çalışma gliotoksinin in vivo koşullarda bağışıklık hücrelerinde apoptoza yol açarak bağışıklık sisteminin yanıtının yeniden yapılmasını geciktirdiğini ve aspergilloz patogeneğinde önemli bir virülans faktörü olabileceğini ortaya koymaktadır.

Eichners vd. (1988) bir çalışmada, gliotoksinin plazmid ve ökaryotik DNA üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar hücresiz sistemlerde araştırılmıştır. Yapılan agaroz jel elektroforezi analizleri, gliotoksinin indirgenmiş ditiol formunun $[\text{GT}(\text{SH})_2]$, Fe^{2+} veya Cu^{2+} iyonlarının varlığında DNA'da hem tek hem de çift iplikli kırıklara neden olduğunu göstermiştir. Plazmid DNA'da süper sarmal Form I yapısının kısa sürede Form II ve Form III'e dönüştüğü ve %50 DNA kaybı için gerekli $\text{GT}(\text{SH})_2$ derişiminin $0,060 \pm 0,010 \text{ mM}$ olduğu gözlemlenmiştir. Disülfid formdaki gliotoksin tek başına etkisiz olduğu, ancak GSH, DTT (dithiothreitol) veya NADH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid) gibi indirgen ajanların varlığında yeniden aktif hâle gelerek DNA hasarı oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca metal şelatörlerinin ve katalazların hasarı büyük ölçüde azaltması, bu etkinin ROS aracılığıyla gerçekleştiğini göstermiştir. Benzer DNA parçalanmasının makrofajlardan izole edilen genomik DNA'da da gözlenmesi, gliotoksinin redoks döngüsü yoluyla ROS üretimini artırarak DNA hasarına ve buna bağlı antiproliferatif ve sitotoksik etkilere neden olabileceğini ortaya koymuştur.

Başka bir çalışmada gliotoksinin immün hücreler üzerindeki etkileri incelenmiş ve etki mekanizmasının genomik DNA hasarıyla ilişkisi ortaya konulmuştur. Deneylerde, fare dalak hücreleri başta olmak üzere farklı hücre tipleri 1 saat boyunca $1 \mu\text{g/mL}$ gliotoksin ile

muamele edilmiş ve ardından hücreler 4-12 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar, gliotoksinin dalak hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak çift sarmal deoksiribonükleik asit (dsDNA) kırıkları oluşturduğunu göstermiştir. DNA parçalanması 30 ng/mL gibi düşük derişimlerde gözlenmiş, 4 saat sonra teşhis edilebilir hâle gelerek 8-12 saat içinde belirginleşmiştir. Agaroz jel elektroforezi ve akış sitometrisi analizleri, gliotoksin uygulanan dalak hücrelerinde DNA'nın >48,3 kbç'den <6,5 kbç'ye uzanan geniş bir kesit dağılımı sergilediğini ortaya koymuştur. DNA sentezi analizlerinde, T ve B lenfositlerinde proliferasyonun 30 ng/mL gliotoksin derişiminde tamamen inhibe edildiği, buna karşın P815 hücrelerinde DNA sentezinin 1 µg/mL dozda yalnızca yaklaşık %25 oranında azaldığı belirlenmiştir. Radyoaktif [³⁵S]-GT bağlanma deneyleri, duyarlı ve dirençli hücre tiplerinin gliotoksini benzer düzeylerde bağladığını, dolayısıyla hücresel seçiciliğin toksinin hücreye alımından bağımsız olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışma gliotoksinin immünosupresif etkisinin temelinde belirli hücre tiplerinde genomik DNA'da geri dönüşü olmayan hasar oluşturarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (Braithwaite vd., 1987).

Gliotoksin miktar tayinine yönelik yapılan elektrokimyasal çalışmalar incelendiğinde, literatürde çoğunlukla aptamer tabanlı biyosensörler ve nanomalzemeli sistemlerin kullanıldığı görülmektedir. Gliotoksinin DNA hasarı, sitotoksik etkileri ve biyolojik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar ise hücresel ve moleküler düzeydedir.

Bu tez çalışmasında, literatürde ilk kez gliotoksinin elektrokimyasal davranışı boş camısı karbon elektrot üzerinde voltametrik ölçümlerle incelenmiş ve dsDNA immobilize edilmiş camısı karbon elektrot tabanlı bir biyosensör sistemi geliştirilerek gliotoksin-dsDNA etkileşimi açıklanmaya çalışılmıştır. Yöntemin kolay hazırlanabilir olması, kısa analiz süresine sahip olması ve düşük maliyetli olması gibi avantajları sayesinde literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca geliştirilen sensörün, gliotoksinin toksikolojik analizi ve gıda numunelerinde düşük maliyetli ve hızlı tayinine yönelik uygulanabilir bir yöntem sunabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Elektrokimya

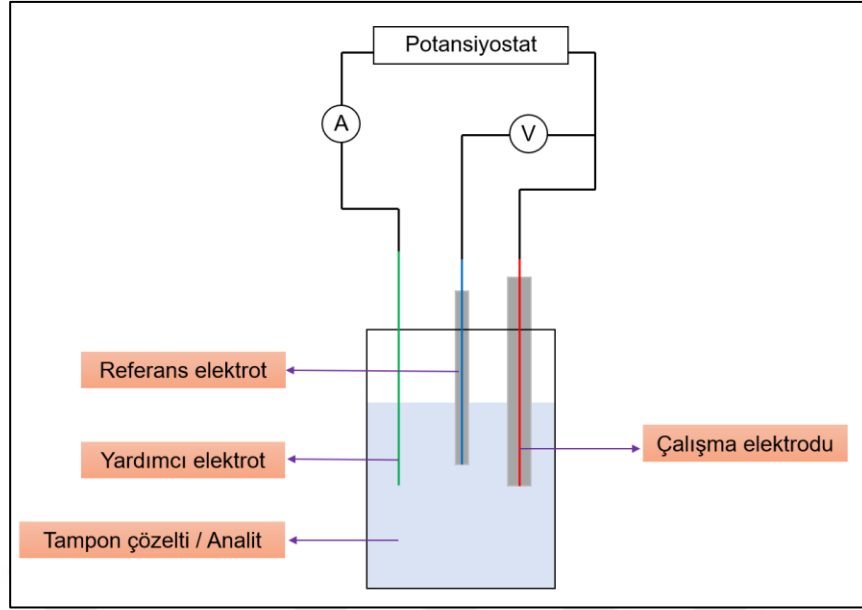
Elektrokimya, maddelerin etkileşimleri sırasında kimyasal ve elektrik enerjisinin birbirlerine dönüştüğü olayları inceleyen bilim dalıdır. Akım ve potansiyel gibi parametreler kullanılarak cihazdan elektriksel bir sinyal elde edilir. Konduktometri, kulometri, potansiyometri ve voltametri başlıca elektrokimyasal yöntemlerdir. Elektrokimyasal analiz yöntemleri, yüksek duyarlılıkları, seçicilikleri, ölçüm hızları ve sahip oldukları diğer avantajlarıyla öne çıkmaktadır. Çoğu zaman elektrokimyasal analiz için 1 mL'den daha az hacimlerde analit yeterli olmaktadır (Fomichov vd., 2025; Rieger, 2012).

Basit bir elektrokimyasal düzenek güç kaynağı, ölçüm çözeltisi ve güç kaynağına bağlı elektrotlardan oluşur. Elektronların ayrıldığı elektrotta anot (yükseltgenmenin gerçekleştiği elektrot) adı verilir. Yükseltgenme anot üzerinde gerçekleşir ve elektronlar reaksiyonun ürünleri olarak ortaya çıkar. Elektronların dış devreden girerek indirgenme reaksiyonuna katıldığı elektrotta katot (indirgenmenin gerçekleştiği elektrot) adı verilir. Elektron akışı, anottan katoda doğru olmak üzere, bir elektrokimyasal hücre içinde gerçekleşir. Elektrokimya, oluşan yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarında gerçekleşen elektron alışverişini elektriksel ölçümler kullanarak inceler (Petrovic, 2020; Schotten vd., 2020; Yammine vd., 2024).

2.1.1. Elektrokimyasal Hücreler

Elektrokimyasal hücreler iki ana gruba ayrılır: galvanik ve elektrolitik hücreler. Galvanik hücrelerde elektrotlar bir iletkenle bağlandığında oluşan reaksiyonlar kendiliğinden gerçekleşirken ($\Delta G < 0$), elektrolitik bir hücrede elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleşebilmesi için açık devre potansiyelinin üzerinde dışarıdan bir potansiyelin uygulanması gerekir ($\Delta G \geq 0$).

Elektrolitik hücrelerde elektrotlar, işlevlerine göre çalışma elektrodu, referans elektrodu ve yardımcı (karşıt) elektrot olmak üzere farklı şekilde adlandırılır. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücrede kullanılan elektrotlar Şekil 2.1'de verilmiştir.



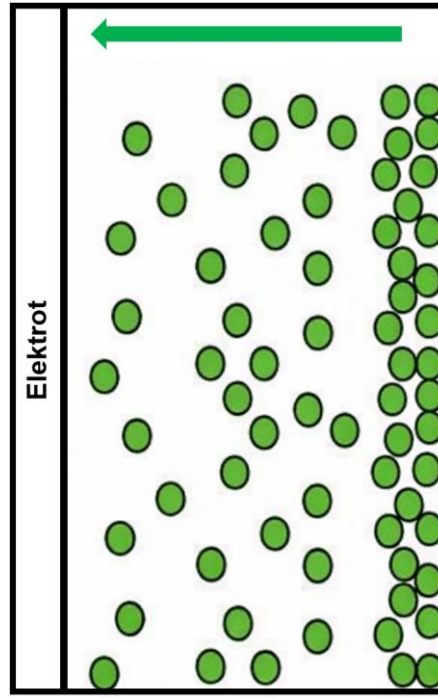
Şekil 2.1. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre

2.1.2. Elektrokimyada Kütle Aktarımı

Elektrokimyasal sistemlerde elektrot-çözelti arayüzünde gerçekleşen reaksiyonların hızı ve verimi, elektroaktif maddelerin elektrot yüzeyine nasıl taşındığına bağlıdır. Bu taşınım yolları genel olarak difüzyon, iyonik migrasyon ve konveksiyon olmak üzere üç temel mekanizma ile açıklanmaktadır.

2.1.2.1. Difüzyon

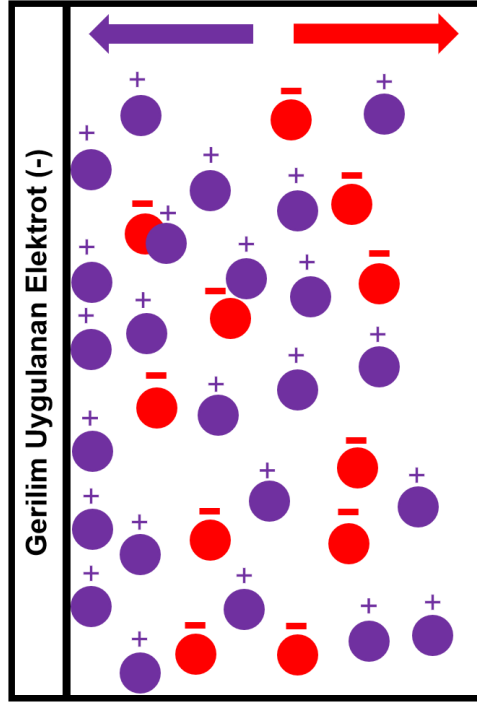
Difüzyon, elektroaktif maddelerin herhangi bir dış kuvvet olmadan yüksek derişimli bölgeden düşük derişimli bölgeye doğru hareket etmesi olarak tanımlanır. Elektrokimyada difüzyon genellikle elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonları sonucunda meydana gelir. Reaksiyon ilerledikçe elektrot yüzeyine yakın bölgede elektroaktif türlerin derişimi azalır ve bu durum, çözeltinin daha derin bölgelerinden yüzeye doğru difüzyon akışını etkiler (Lu vd., 2023). Elektroaktif türlerin difüzyon hareketi Şekil 2.2’de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Derişim farkından dolayı oluşan difüzyon hareketi

2.1.2.2. İyonik Migrasyon

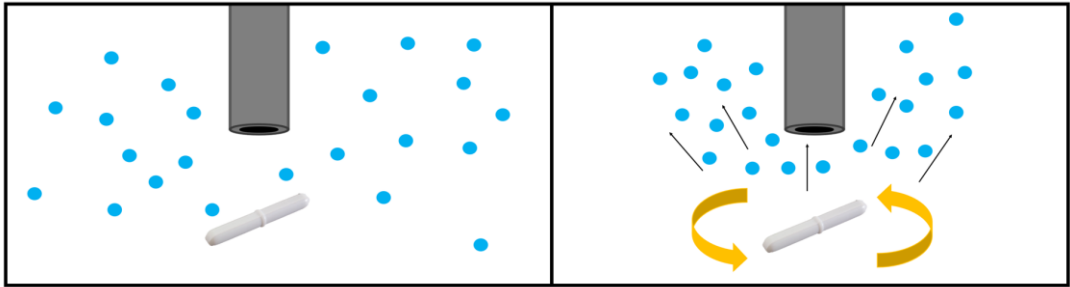
İyonik migrasyon, yüklü maddelerin çözelti içerisindeki elektrik alan etkisiyle yönlü olarak hareket etmesini ifade eder. Elektriksel alanda katyonlar katoda, anyonlar ise anoda doğru göç eder (Şekil 2.3). Elektrokimyasal hücrelerde uygulanan potansiyel veya elektrot üzerinde oluşan Faraday akımları, çözeltide elektrik alanlarının oluşmasına neden olur ve bu alanlar migrasyonu tetikler. Klasik elektrokimyasal analizlerde migrasyonun etkisi genellikle ihmal edilir; bunun temel nedeni, yüksek derişimde destek elektrolitleri olarak adlandırılan tuz, asit, baz ve çeşitli tampon çözeltileri gibi maddeler kullanılarak iyonik migrasyonun etkisinin ortadan kaldırılmasıdır.



Şekil 2.3. Gerilim etkisi altında gerçekleşen yük hareketi

2.1.2.3. Konveksiyon

Konveksiyon, kütle aktarımının çözeltinin toplu hareketi yoluyla gerçekleştiği mekanizmadır. Bu hareket, çözeltinin dışarıdan karıştırılması (Şekil 2.4'te gösterildiği gibi) akış sistemi yardımıyla veya elektrokimyasal reaksiyonların kendisiyle gerçekleştirilebilir (Lemay vd., 2023).

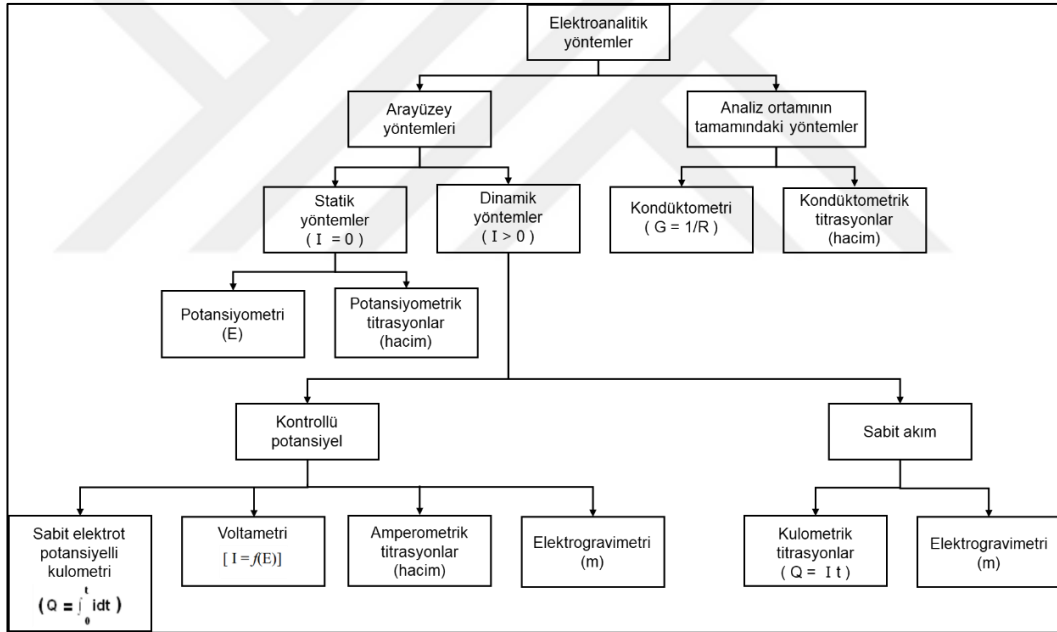


Şekil 2.4. Çözelti içerisinde uygulanan karıştırmanın etkisi

2.1.3. Elektroanalitik Yöntemler

Elektrokimyasal analiz yöntemleri, kullanılan çalışma prensibine bağlı olarak farklı gruplar altında sınıflandırılabilir. Yaygın olarak kullanılan sınıflandırma şeması Şekil 2.5'te gösterilmektedir.

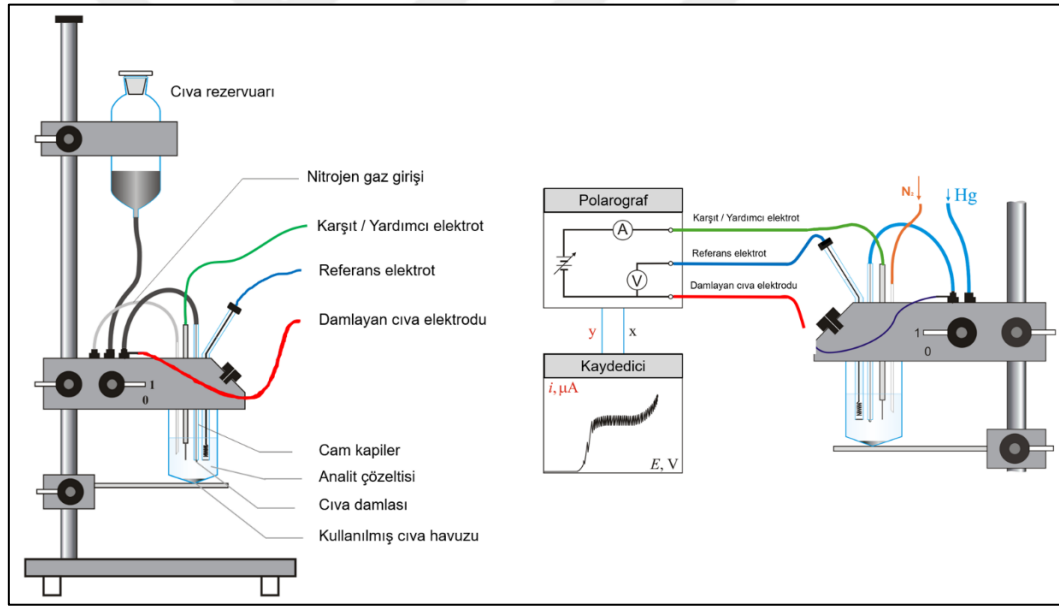
Elektrokimyasal yöntemlerin en önemli avantajları arasında düşük tayin limitleri sayılabilir. Düşük miktarlarda numune analizi, karmaşık ön hazırlama basamakları gerektirmemesi ve hızlı analiz yapılabilmesi gibi sağladığı avantajlar sayesinde analitik kimyada, farmasötik analizlerde ve birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı elektroanalitik yöntemlerde düşük çözücü tüketimi ve düşük maliyetli taşınabilir cihaz gereksinimi elektrokimyasal yöntemleri diğer yöntemlerden ayırmaktadır (Cruz-Pacheco vd., 2026; Uslu ve Ozkan, 2011).



Şekil 2.5. Yaygın olarak kullanılan elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılma şeması. (I= akım, E= potansiyel, R= direnç, G= iletkenlik, Q= yük miktarı, t= zaman, hacim=standart çözelti hacmi,, ağırlık=elektrokimyasal olarak biriktirilen türün kütlesi) (Skoog vd., 2013)

2.1.3.1. Polarografi

Polarografi, ilk olarak Çekoslovak kimyager Jaroslav Heyrovský tarafından 1922 yılında geliştirilmiştir. Yöntem, çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodu (DME) kullanılarak Şekil 2.6'da şematik olarak gösterildiği üzere potansiyostat ile kontrol altında gerçekleştirilen bir elektroanalitik tekniktir. Akım-potansiyel eğrilerinin otomatik olarak kaydedilmesini sağlayan polarografi cihazının 1922 yılında geliştirilmesiyle yöntem, analitik kimyada yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. IUPAC tanımına göre polarografi, yüzeyi sürekli veya periyodik olarak yenilenen sıvı çalışma elektrotların kullanımını kapsamaktadır (Cerdà, 2005). Polarografik yöntemler, yaklaşık 10^{-5} M düzeyindeki elektroaktif türlerin tayinine olanak sağlayan yüksek duyarlılıkları nedeniyle ilk dönemlerde elektroanalitik teknikler arasında önemli bir yer tutmuştur (Ozkan ve Uslu, 2016).



Şekil 2.6. Damlayan cıva elektrodu yapısı

Damlayan cıva elektrodunun -2.5 V veya -3.0 V potansiyel değerlerine kadar ulaşabilen potansiyel aralığı, indirgenme reaksiyonları için avantajlı olsa bile, cıvanın yaklaşık $+0.4$ V civarında çözünmeye başlaması pozitif potansiyel aralığını sınırlamaktadır. Cıvanın toksik ve potansiyel olarak kanserojenik etkilerinin bulunmasından dolayı, bazı çevresel ve sağlık problemlerine yol açabileceği de damlayan cıva elektrodunun dezavantajları arasında yer almaktadır. Bu durum, elektrodun rutin analizlerde kullanımını sınırlamaktadır. Tüm bu faktörler, polarografinin ve damlayan cıva elektrodu kullanımının

modern analitik teknikler karşısında daha sınırlı alanlarda tercih edilmesine neden olmaktadır (Zuman, 2002).

2.1.3.2. Voltametri

Voltametrimin gelişimi, polarografi yöntemine dayanmaktadır. Yöntem elektrotun potansiyelinin kontrollü ve genellikle basamaklı olarak değiştirilmesi sırasında oluşan akımın ölçülmesine dayanır ve ölçülen akım elektrot-çözelti arayüzündeki yük transfer hızının doğrudan bir göstergesidir. Uygulanan potansiyel çalışma elektroduna uygulanır. Voltametrik analizler, döngüsel voltametri (DV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (KDV) gibi çeşitli ölçüm yöntemleri kullanılarak yapılabilmektedir (Osteryoung, 1993; Westbroek vd., 2005).

2.1.4. Elektrokimyasal Analizlerde Kullanılan Elektrotlar

Elektrokimyasal analizlerde üç farklı elektrot türü kullanılır: referans elektrot, yardımcı (karşıt) elektrot ve çalışma elektrodu.

2.1.4.1. Referans Elektrotlar

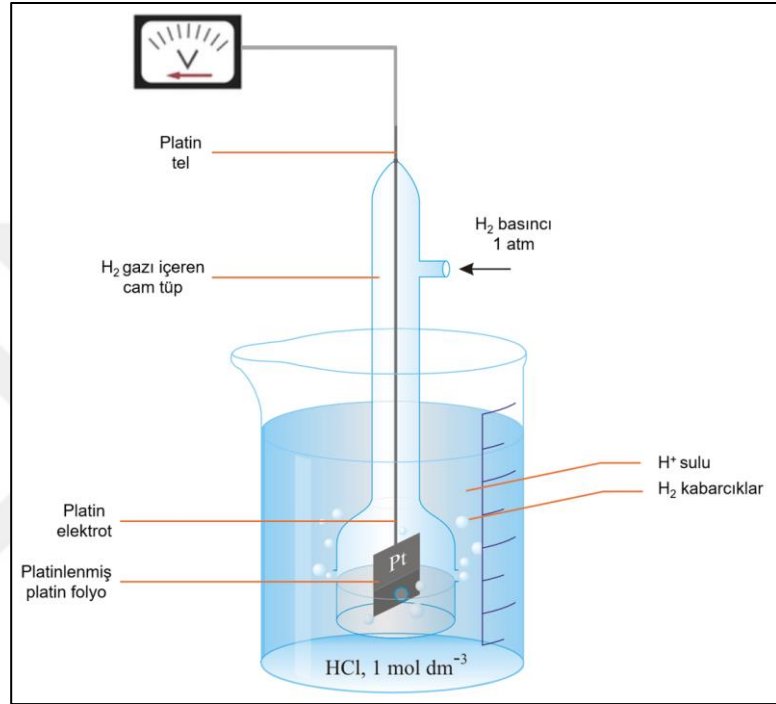
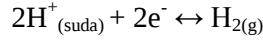
Referans elektrotlar ara yüzey boyunca katyon ve anyonların eşit olmayan difüzyon hızlarından dolayı oluşabilecek potansiyellerini azaltmak amacıyla elektrokimyasal ölçümlerde kullanılır. Elektrokimyasal ölçümler sırasında çalışma elektrodu ile aynı sıcaklıkta olmalı ve polarize olmamalıdır. Standart bir referans elektrotun belirlenmiş koşullar altında potansiyeli sıfır olarak kabul edilir ve çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin kontrolünü sağlar.

2.1.4.1.1. Standart Hidrojen Elektrodu

Standart hidrojen elektrodu (SHE) evrensel olarak kabul edilen standart referans elektrottur. Elektrot yapısı Şekil 2.7’de şematize edilmiştir. Diğer tüm referans elektrotların standart potansiyelleri, aynı sıcaklık koşullarında SHE potansiyeline göre tanımlanır. IUPAC’ın 2008’deki tanımına göre SHE, birim aktivitede hidrojen iyonları içeren bir çözelti ile temas hâlinde olan ve 1 atm kısmi basıncına göre tanımlanan hidrojen gazı ile doyurulmuş bir platin elektrottan oluşur. Bu tanımda, aktivitesi 1 mol dm⁻³ olan hidrojen

iyonlarının diğer iyonlarla etkileşime girmediği varsayılır. SHE için yalnızca potansiyelin değil, potansiyelin sıcaklık katsayısının da sıfır olduğu geleneksel olarak kabul edilmektedir (Brett, 2009; Inzelt vd., 2013).

Elektrotta oluşan reaksiyon aşağıdaki gibidir;

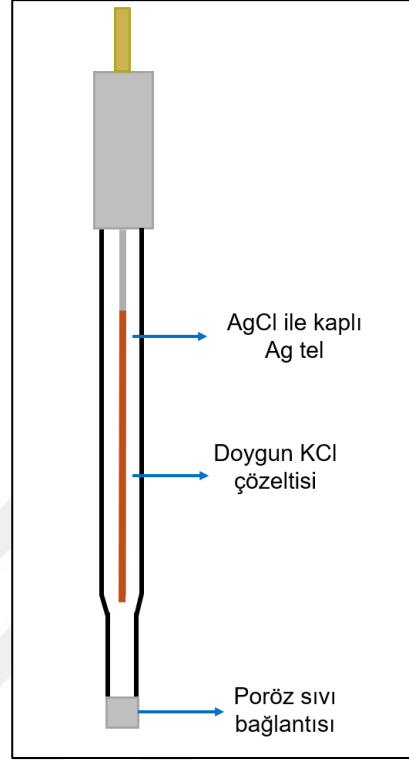
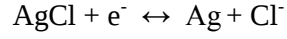


Şekil 2.7. Standart hidrojen elektrodu yapısı

2.1.4.1.2. Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrodu

Gümüş, farklı anyonlarla çok sayıda az çözünür bileşik oluşturan bir elementtir. Bu bileşikler arasında gümüş (I) halojenürleri (özellikle gümüş klorür, AgCl) potansiyometrik ölçümlerde kullanılan elektrotların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmıştır. Gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl) referans elektrotlarının hazırlanışlarının basit olması, küçük boyutlarda tek parça hâlinde üretilebilmeleri ve bazı durumlarda doğrudan çözelti içine daldırılabilmesi gibi özellikleri avantajları arasında sayılmaktadır. Elektrodun yapısı Şekil 2.8'de gösterilmektedir. Elektrot katı AgCl ile kaplı gümüş telin doymuş KCl çözeltisinde olmasına dayanır. Elektroanalitik ölçümlerde sıkça kullanılan referans elektrotlardan biridir (Inzelt vd., 2013).

Elektrotta oluşan reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Şekil 2.8. Gümüş-gümüş klorür elektrodu yapısı

2.1.4.1.3. Kalomel Referans Elektrodu

Yapısında cıva/cıva (I) klorür (Hg_2Cl_2) diğeri adıyla kalomel, bulundurduğu için kalomel referans elektrodu olarak adlandırılmıştır.

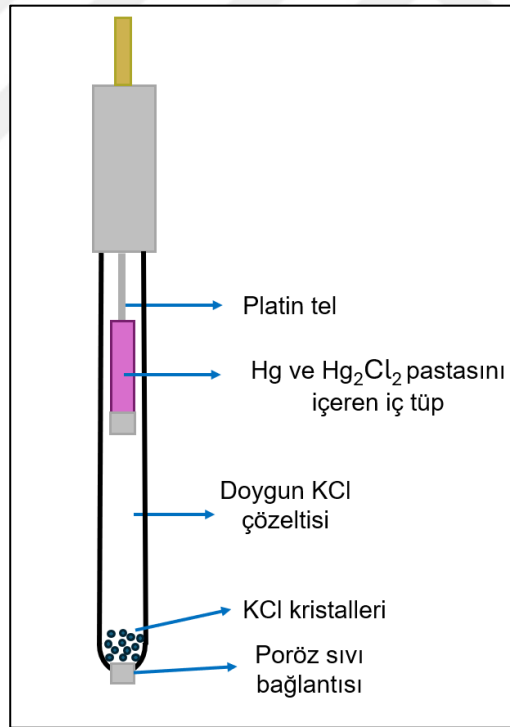
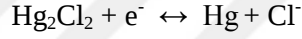
Çizelge 2.1’de 25 °C’de farklı kalomel elektrotların özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı kalomel elektrotlar ve özellikleri (Onur, 2011)

Elektrot	Hg_2Cl_2	KCl	Elektrot Potansiyeli (V)
0,1 N kalomel elektrot	Doygun	0,1 N	$e = 0,334$
1 N kalomel elektrot	Doygun	1 N	$e = 0,280$
Doygun kalomel elektrot	Doygun	Doygun	$e = 0,242$

Doygun kalomel elektrot (SCE), kalomel elektrot çeşitleri arasında hazırlanması en kolay olduğu için elektrokimyasal çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektrodun hazırlanmasında kullanılan cıvanın saflığı ve kalomelin cıvaya eklenme yöntemi, elektrodun performansı ve potansiyel kararlılığını etkilemektedir. Kararlı bir yapıda referans elektrot elde edebilmek için kullanılan kalomelin ince taneli olması gerekir. Elektrot kalomelin kuru cıva yüzeyinde ince bir tabaka oluşturacak şekilde eklenmesiyle veya cıva ve kalomelin KCl çözeltisi içerisinde macun hale getirilip platin tel ile temas edecek biçimde yerleştirilmesiyle hazırlanabilmektedir (Şekil 2.9). Doğru şekilde hazırlanan kalomel elektrot yüksek tekrarlanabilirliğe sahip güvenilir bir referans elektrot olarak kullanılabilir (Onur, 2011; Zoski, 2007).

Elektrota oluşan reaksiyon aşağıdaki gibidir;



Şekil 2.9. Doygun kalomel elektrodu yapısı

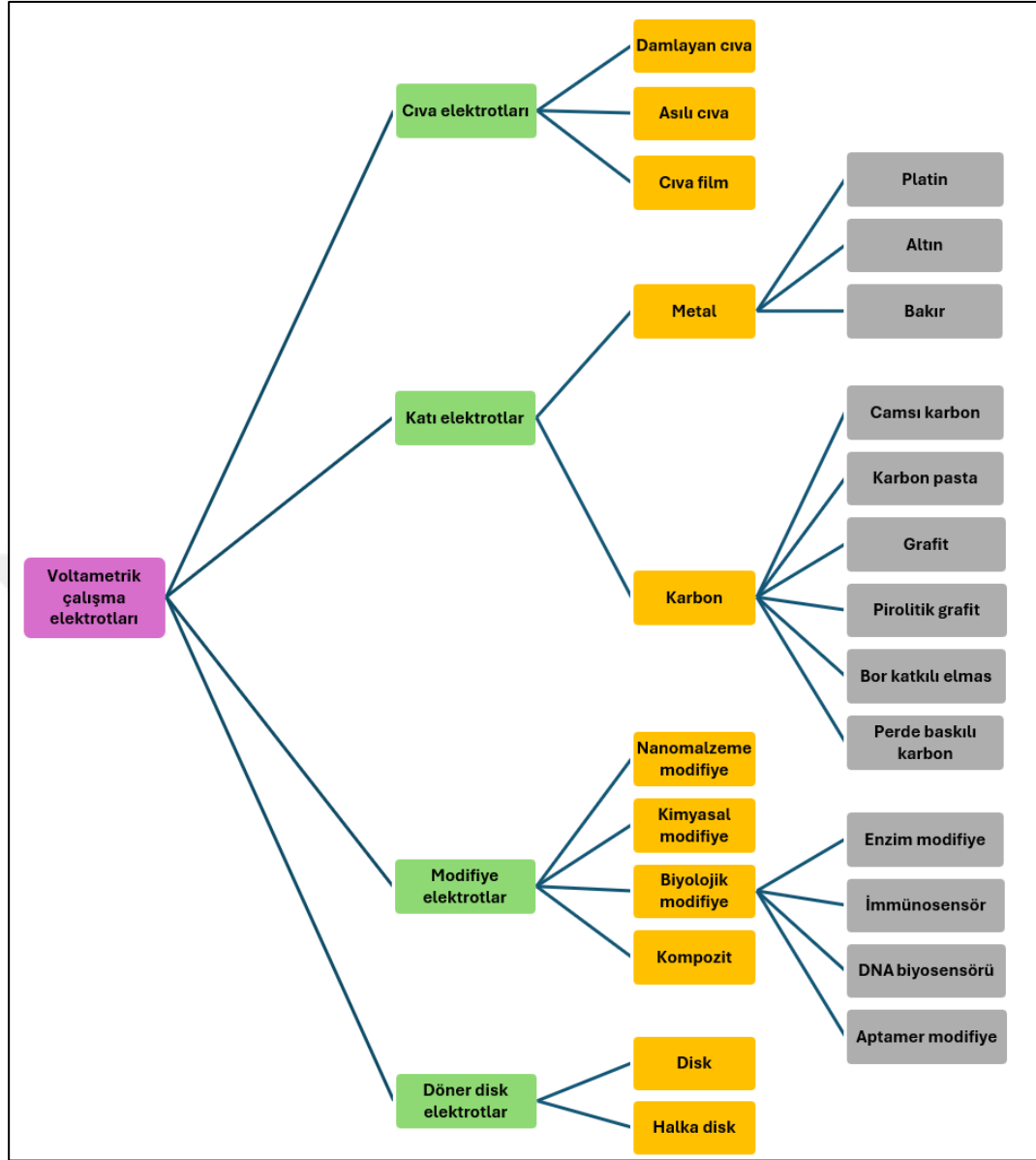
2.1.4.2. Yardımcı Elektrotlar

Yardımcı (karşıt) elektrot elektrokimyasal hücre içerisinde kullanılan üç elektrottan biridir. Sistemde oluşan fazla akımın referans elektrot üzerinden geçmesini engelleyerek, akımı çalışma elektrodu ile kendisi arasında kontrol altına alır. Yardımcı elektrodun temel görevi, çalışma elektrodunda gerçekleşen indirgenme ya da yükseltgenme reaksiyonlarını dengelemek amacıyla karşıt reaksiyonların kendi yüzeyinde gerçekleşmesini sağlamaktır. Bu elektrodun kimyasal olarak inert olması ve çalışma elektrodunda oluşan ürünleri etkilememesi gerekir; bunun için genellikle platin gibi geniş yüzey alanına sahip soylu metaller kullanılır. Yardımcı elektrotta yaygın olarak kullanılan platindir. Bunun yanı sıra, maliyet ve sistem gereksinimlerine bağlı olarak nikel, bakır veya paslanmaz çelik gibi daha ekonomik alternatiflerin de yardımcı elektrot olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. Çok yüksek akımların söz konusu olduğu ve reaksiyon ürünlerinin çalışma elektrodunu etkilemesini önlemek amacıyla, bu elektrotlar cam frit aracılığıyla ana hücreye bağlanan ayrı bir hücreye de yerleştirilebilmektedir. Yardımcı elektrodun yüzey alanının çalışma elektrodunun yüzey alanına eşit veya daha büyük olması, uygulanan akım yoğunluğunun kararlı bir şekilde sağlanabilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Gholami ve Pirsaeheb, 2021; Zoski, 2007).

2.1.4.3. Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrodu hücrede elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur. Çalışma elektrodu olarak yaygın biçimde asal metaller (özellikle altın ve platin), karbon türleri (pirolitik karbon, camsı karbon, karbon macunu, karbon nanotüpler ve buhar fazında çöktürülmüş elmas), sıvı metaller (cıva ve cıva amalgamları) ile yarı iletken malzemeler (indiyum-kalay oksit ve silisyum) kullanılmaktadır. Çalışma elektrotları, belirli kimyasal türlere karşı duyarlılıklarının artırılması veya bir elektrokimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli potansiyelin düşürülmesi amacıyla kimyasal olarak modifiye edilebilmektedir. Bu tür modifikasyonlar, elektrotların sensör ya da katalitik özellik kazanmasını sağlar (Zoski, 2007).

Voltametrik analizlerde tercih edilen çalışma elektrotlarının türleri ve sınıflandırılması Şekil 2.10'da gösterilmektedir.



Şekil 2.10. Voltametrik ölçümlerde kullanılan çalışma elektrotları

2.1.4.3.1. Cıva Elektrotlar

Cıva, voltametrik analizlerde sıklıkla tercih edilen bir çalışma elektrodu malzemesidir. Oda sıcaklığında sıvı hâlde bulunması ve her ölçüm öncesinde yüzeyinin yenilenebilmesi, cıva elektrotların önemli avantajları arasındadır. Ayrıca birçok ağır metal ile amalgam oluşturabilmesi ve hidrojenin indirgenmesini zorlaştırması, negatif potansiyel bölgesinde güvenilir ölçümler yapılmasını sağlar (Komorsky-Lovrić, 2010).

2.1.4.3.2. Katı Elektrotlar

Katı elektrotlar metal yapıda ve karbon yapıda olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilir. Altın, camı karbon, grafit ve perde baskılı karbon elektrotlar yaygın olarak kullanılan katı çalışma elektrotlarına örnek verilebilir.

Altın elektrotlar inert yapıdadır ve yüzey modifikasyonlarına olanak tanır; ancak klorür iyonlarına karşı hassasiyeti ve dar pozitif potansiyel aralığı nedeniyle kullanım alanı sınırlı olabilmektedir (Komorsky-Lovrić, 2010).

Camsı karbon elektrotlar, çeşitli şekillerde üretilibilmeleri ve yüzeylerinin kolayca parlatılabilmeleri gibi özellikleri sayesinde elektroanalitik çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Fenol-formaldehit esaslı reçinelerin inert atmosfer koşullarında ısıtılma işlemine tabi tutulmasıyla elde edilen camı karbon gaz geçirmez bir yapıya sahiptir. Yaklaşık 2 V'lık geniş bir potansiyel aralığında hem anodik hem de katodik bölgelerde kullanılabilir. Elektrot yüzeyinin oksit oluşumuna karşı dirençli olması uzun süreli kullanımını da mümkün kılmaktadır (Haddad, 1990).

2.1.4.3.3. Modifiye Elektrotlar

Modifiye elektrotlar, elektrot yüzeyine belirli kimyasal veya biyolojik türlerin kontrollü biçimde immobilize edilmesiyle elde edilen elektrotlardır. Bu tür elektrotlarda yüzey modifikasyonu, kimyasal bağlanma, adsorpsiyon, elektrokimyasal kaplama, plazma deşarjı gibi yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Immobilize edilen moleküller çoğu durumda kendi kimyasal ve elektrokimyasal özelliklerini korumaktadır. Yüzeydeki bağlanma türü, modifiye tabakanın kalınlığı ve moleküllerin yüzey üzerindeki biçimi, elektron transfer hızını ve voltametrik sinyali etkileyebilir. Bu nedenle modifiye elektrotlar hem analitik performansın geliştirilmesinde hem de elektrot yüzeyindeki moleküler etkileşimlerin anlaşılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Albery ve Hillman, 1981; Snell ve Keenan, 1979).

2.1.4.3.4. Döner Disk Elektrotlar

Döner disk elektrotlar elektrokimyasal reaksiyonlarda kütle transferi etkilerini kontrol etmek ve reaksiyon kinetiğini incelemek amacıyla kullanılır. Bu yöntemde elektrot belirli bir hızda döndürülerek elektrot yüzeyine doğru kontrollü bir konveksiyon akışı

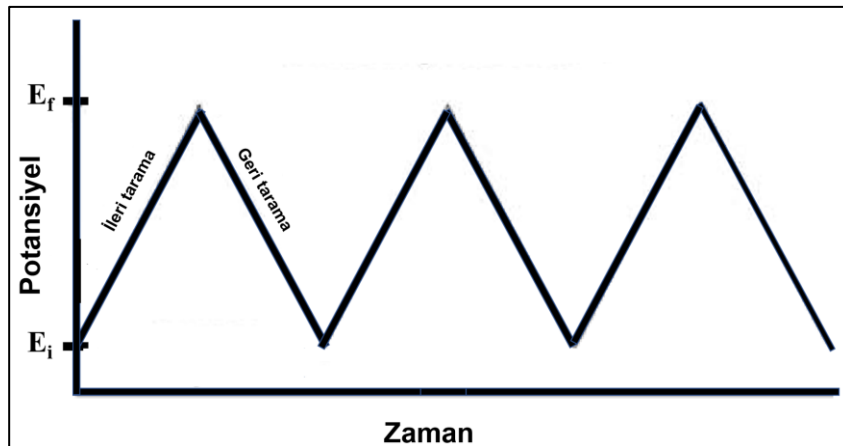
oluşturulur. Elektrotun dönmesiyle birlikte elektroaktif türlerin yüzeye taşınması hızlanır ve elektrot boyunca homojen bir difüzyon tabakası oluşur. Bu sayede, ölçülen akımın yalnızca elektrot kinetiğinden mi yoksa kütle transferinden mi kaynaklandığı ayırt edilebilir. Bu elektrotlar özellikle difüzyon kontrollü reaksiyonların incelenmesinde, korozyon çalışmalarında ve elektrokimyasal kinetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Popov, 2015).

2.1.5. Voltametrizde Kullanılan Uyarma Sinyalleri

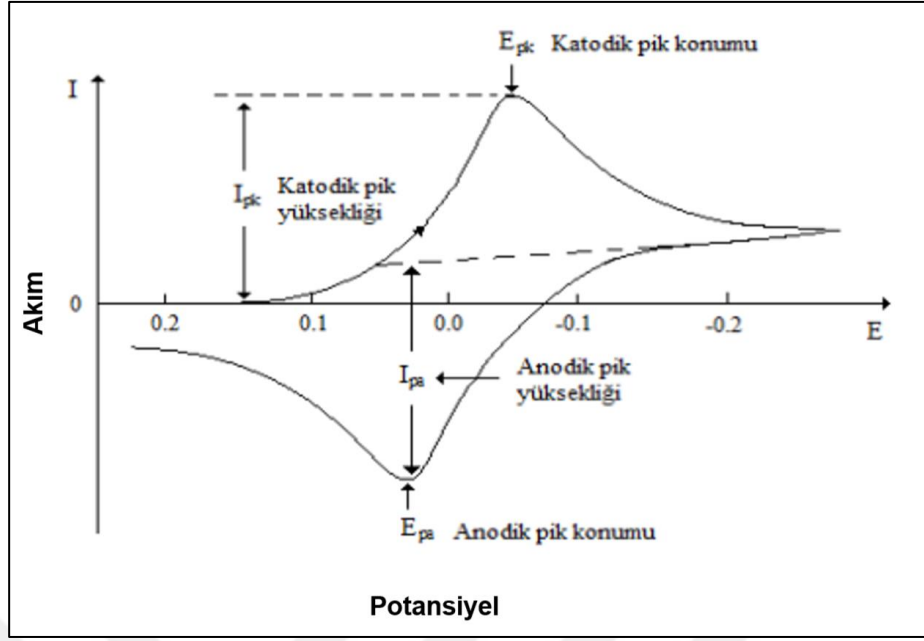
Tez çalışmasında DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılmıştır. Kullanılan ölçüm yöntemleri aşağıda açıklanmıştır.

2.1.5.1. Döngüsel Voltametri (DV)

DV madde, biyolojik numune veya elektrot yüzeyi gibi çeşitli elektroaktif türlerin araştırılmasını sağlayan, birçok kinetik ve mekanik çalışmada yaygın olarak kullanılan önemli ve basit bir elektroanalitik yöntemdir. Genellikle niceliksel teşhislerden ziyade yükseltgenme-indirgeme reaksiyon süreçleri için kullanılır. Çalışmaya bağlı olarak tam, kısmi veya tekrarlı bir dönüşüm ile geniş bir potansiyel aralığında hızlı bir şekilde ölçüm alınabilmektedir. İzlenen sinyal (Şekil 2.11) doğrusal potansiyel taramasının üçgen dalga konfigürasyonudur. Çalışma elektrotundaki potansiyel her iki yönde de (ileri ve geri) değişir (Aristov ve Habekost, 2015; Bora vd., 2013; Mendoza vd., 2015) ve Şekil 2.12’de şematize edilmiştir.



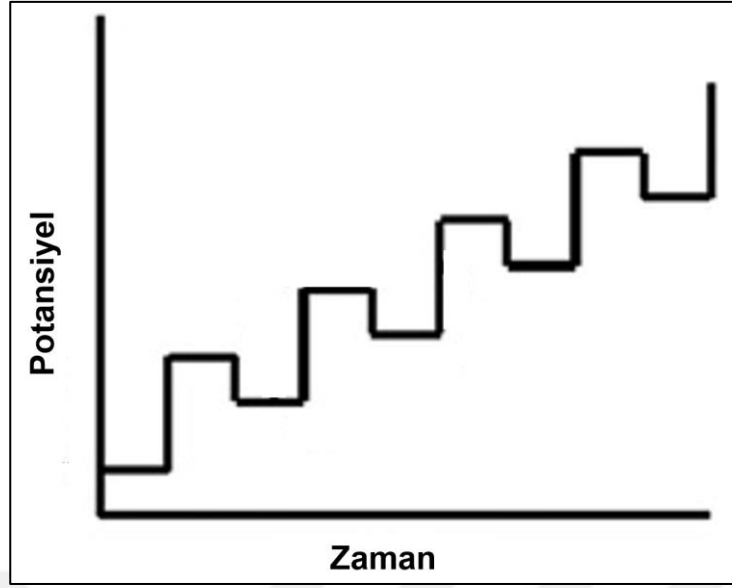
Şekil 2.11. DV potansiyel – zaman grafiği



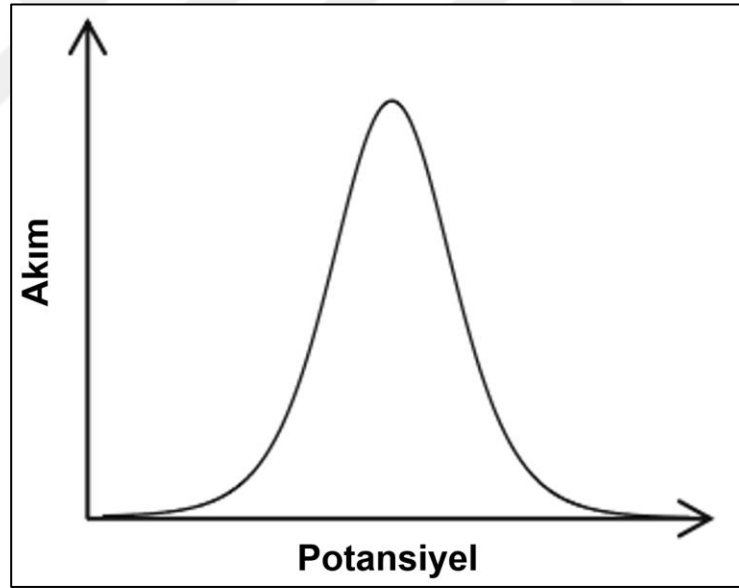
Şekil 2.12. DV potansiyel – akım grafiği

2.1.5.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

DPV, potansiyel taraması yavaşça değişen bir potansiyel üzerine uygulanan küçük genlikli ardışık pulslar aracılığıyla gerçekleşir. Akım ölçümü, her puls öncesinde ve sonunda gerçekleştirilerek diferansiyel akım elde edilir. Hassas bir ölçüm yöntemidir. Akım her puls için iki yerden ölçülür; ilki puls uygulanmadan hemen önce, ikincisi pulsun uygulanmasından hemen sonradır. Böylece akıma karşı iyi bir ayırım sağlanmış olur. Her bir puls için, bu noktadaki akım değerlendirmesindeki farklılık belirlenir ve potansiyele karşı grafiği çizilir. Diferansiyel ölçüm, normal dalga benzeri tepkiler yerine küçük genlikli potansiyel pulslarla katmanlı bir rampa üretir (Şekil 2.13). Tarama hızı son derece yavaştır (genellikle 5 mV/s; tam tarama için 80 saniye gerekir). Bu da akımı düşük tutar ve taramaların her 2-3 dk'de bir yeniden yapılmasına olanak tanır. Sonuç olarak, akım farklı bir şekilde akar ve elde edilen pik, Şekil 2.14'te gösterildiği gibi, DV'ye göre daha keskindir. Bu sayede birbirine yakın potansiyellerde olan maddelerin daha kolay analiz edilmesine olanak sağlar (Kawagoe vd., 1993; Mendoza vd., 2015).



Şekil 2.13. DPV potansiyel – zaman grafiği

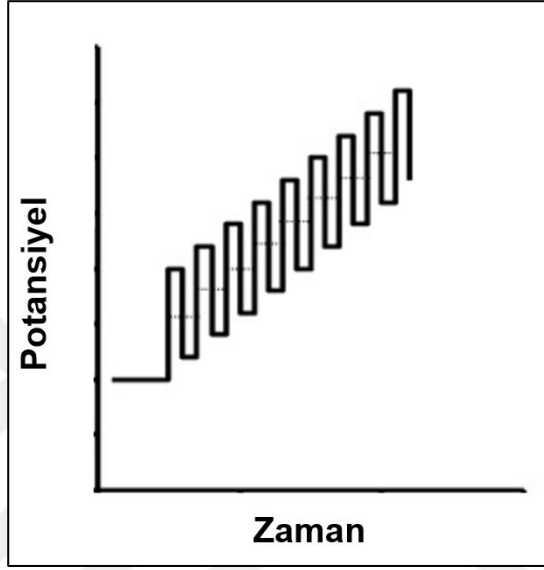


Şekil 2.14. DPV potansiyel – akım grafiği

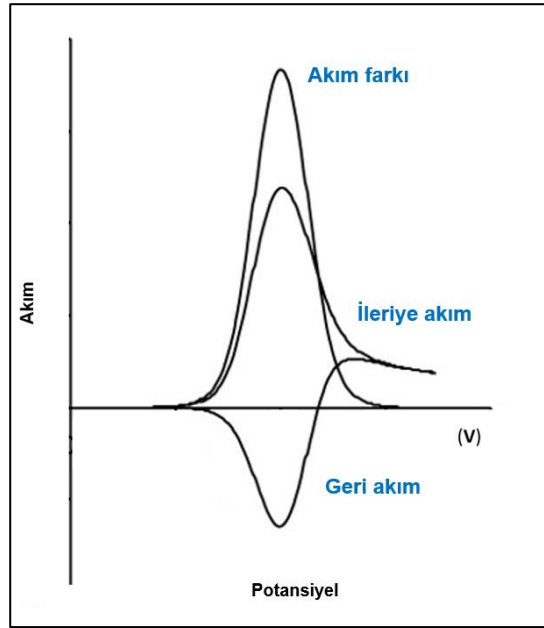
2.1.5.3. Kare Dalga Voltametrisi (KDV)

Kare dalga voltametrisinde (KDV) voltammogramlar, merdiven gibi potansiyel bir rampanın Şekil 2.15’te gösterildiği gibi potansiyel darbelerle değiştirilmesiyle elde edilir.

Her merdiven rampası eşit büyüklükte ve zıt yönde iki potansiyel puls alır ve her tekrarda bir döngü oluşturur. İleri ve geri akımlar arasındaki fark net akımı belirler ve voltamogramda çan şeklinde bir eğri olarak görüntülenir (Şekil 2.16). Potansiyelin çift yönlü uygulanması sonucunda, aynı döngü içerisinde elektrot reaksiyonu anodik ve katodik yönlerde gerçekleşir. Yüksek hassasiyeti ve arka plan akımlarını azaltması nedeniyle avantajlı bir yöntemdir (Mendoza vd., 2015; Mirceski vd., 2013).



Şekil 2.15. KDV potansiyel – zaman grafiği



Şekil 2.16. KDV potansiyel – akım grafiği

2.1.6. Sıyırma Voltametrisi

Elektrot üzerine biriktirilen maddenin daha sonra çözelti fazına verilerek ölçülebilmesini sağlayan bir yöntemdir. Sıyırma voltametrisi çoğunlukla metal iyonlarının tayininde kullanılır ve genel olarak dört ana grupta sınıflandırılır.

2.1.6.1. Anodik Sıyırma Voltametrisi

Bu yöntemde, voltametrik ölçüm öncesinde uygulanan bir ön deriştirme basamağı bulunmaktadır. Bu aşamada, çözeltide bulunan metal iyonları yarı dalga potansiyelinden daha negatif bir potansiyelde katı bir elektrot yüzeyinde (örneğin cıva elektrodu) indirgenerek amalgam formunda biriktirilir. Ardından yapılan sıyırma basamağında, elektrot potansiyeli anodik yönde doğrusal ya da alternatif tarama teknikleriyle hızla artırılır ve biriktirilen metalin yükseltgenerek tekrar çözelti fazına geçmesi sağlanır. Oluşan voltamogramda gözlenen sıyırma piki akımı, elektrot yüzeyinde biriktirilen metal iyonu ile orantılıdır (J. Wang, 1988).

2.1.6.2. Katodik Sıyırma Voltametrisi

Bu yöntemde, elektrot yüzeyinde ön deriştirme yoluyla biriktirilen analit katodik tür olarak değerlendirilir. Potansiyel taraması sırasında analitin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesiyle çözünmeyen bir film oluşur ve bu durum analitin elektrottan uzaklaştırılmasına neden olur. Ön deriştirme işleminden sonra analit negatif potansiyel aralığında indirgenerek elektroanalitik tayini yapılır (Bond, 1980).

2.1.6.3. Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi

Bu yöntem, anodik sıyırma voltametrisiyle, biriktirme adımı bakımından aynıdır, fakat sıyırma aşamasında elektrot yüzeyinde toplanmış metalik maddenin ortamda bulunan Hg^{2+} iyonları gibi bir yükseltgen ajanla kimyasal olarak yükseltgenmesi sonucunda elektrot potansiyelinde gerçekleşen farklılıklar zamana karşı kayıt altına alınır (Jagner ve Graneli, 1976).

2.1.6.4. Adsorptif Sıyırma Voltametrisi

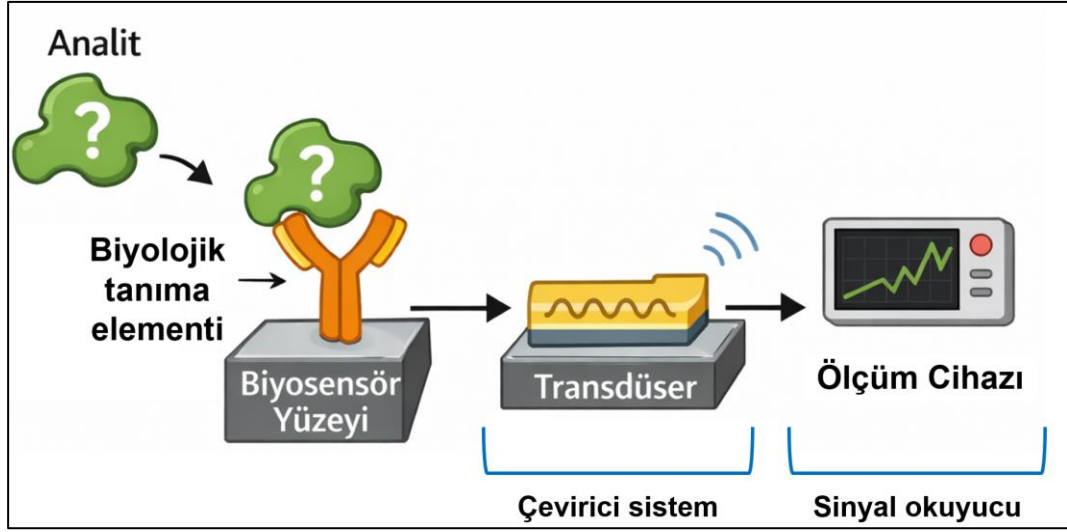
Adsorptif sıyırma yönteminde metal iyonları, yüzey aktif şelat kompleksleri oluşturarak elektrot yüzeyinde birikip uzaklaştırılır. Bu aşama elektrot yüzeyindeki madde tarafından adsorpsiyonla gerçekleştirilir. Anodik sıyırmada kolaylıkla indirgenip amalgam oluşturan metallerin tayini mümkündür. Mo, Al, Ti, Fe, La, Cr, V, Co gibi metallerin analizleri adsorptif sıyırma voltametrisiyle yapılır. Yöntem yalnızca metal iyonlarıyla sınırlı olmayıp, uygun koşullar altında çeşitli organik bileşiklerin, ilaç moleküllerinin ve biyolojik maddelerin tayininde de kullanılmaktadır. Bu amaçla cıva elektrotların yanı sıra farklı özelliklere sahip katı ve modifiye elektrotlar da kullanılmaktadır (Lovrić, 2009; Özkan ve Biryol, 1993).

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik tanıma mekanizmasını fiziksel bir sinyal çıktısına dönüştürebilen analitik sistemlerdir.

Biyosensörün temel kavramı 1962 yılında Leyland C. Clark tarafından ortaya koyulmuştur. Clark ve Lyons (1962), daha önce Clark tarafından geliştirilen oksijen elektrodundan yola çıkarak, oksijen veya hidrojen peroksitin elektrokimyasal olarak algılanmasının uygun şekilde immobilize edilmiş enzimler sayesinde biyolojik analizlerde kullanılabileceğini görmüşlerdir. Bunun sonucunda oksijen ya da hidrojen peroksit varlığını tayin edebilen glikoz oksidaz temelli bir elektrot geliştirilerek biyolojik numunelerde glikozun seçici ve güvenilir biçimde analiz edilmesi sağlanmıştır.

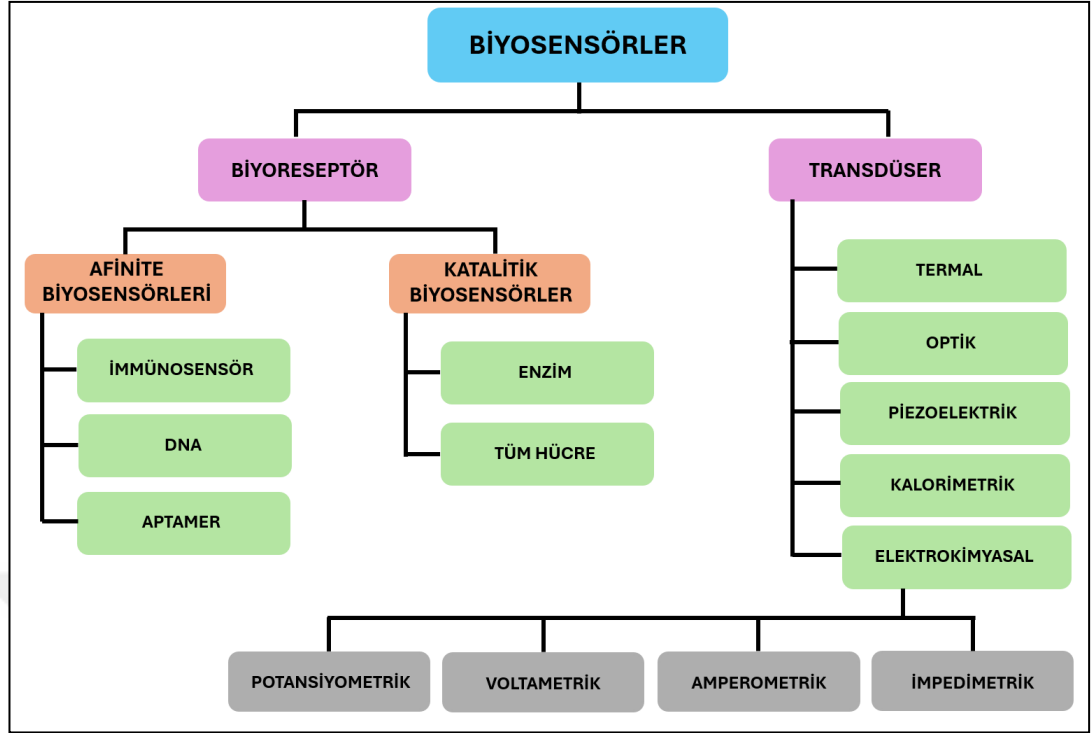
Bu sistemler temelde üç bölümden oluşur: analiti seçici olarak tanıyan bir biyolojik tanıma elementi (biyoreseptör), bu etkileşimi ölçülebilir sinyale çeviren bir transdüser (sinyal çevirici) ve sinyal işleme sistemi (sinyal okuyucu). Biyosensörün yapısı Şekil 2.17’de şematize edilmiştir. Çalışma mekanizması olarak, biyolojik bileşen sensör yüzeyine immobilize edilir ve analitin bağlanması veya dönüştürülmesi sonucu oluşan biyokimyasal değişimler transdüser aracılığıyla elektriksel sinyallere dönüştürülür. Oluşan sinyal, analit derişimiyle orantılıdır ve uygun elektronik sistemler kullanılarak ölçülür (Karunakaran vd., 2015).



Şekil 2.17. Biyosensörün bileşenleri

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, kullanılan biyolojik tanıma elemanına veya transdüser türüne göre sınıflandırılabilir. Biyolojik tanıma elemanına göre afinite ve katalitik biyosensörler; transdüser türüne göre ise termal, optik, piezoelektrik, kalorimetrik ve elektrokimyasal biyosensörler olmak üzere alt sınıflara ayrılabilir. Şekil 2.18’de biyosensörlerin biyoreseptör ve transdüser türlerine göre sınıflandırılması gösterilmektedir.



Şekil 2.18. Biyosensörlerin sınıflandırılma şeması

Afinite biyosensörlerinde, analit ile reseptör arasındaki bağlanma geri dönüşümsüzdür ve etkileşim sürecinde herhangi bir yeni biyokimyasal ürün meydana gelmez. Bu tür sensörlerde biyolojik tanıma elemanları olarak antikorlar, hücre reseptörleri ve nükleik asitler (DNA ve RNA) kullanılmaktadır.

Katalitik biyosensörlerde, analit ile biyoreseptör arasındaki etkileşim sonucunda yeni bir biyokimyasal reaksiyon ürünü oluşur. Bu biyosensör türünde biyolojik tanıma elemanları olarak enzimler, mikroorganizmalar, dokular ve tüm hücreler kullanılmaktadır.

2.2.1.1. DNA Biyosensörleri

DNA biyosensörleri nükleik asit temelli biyosensörlerdir. Literatürde bu sensörler biyodedektörler olarak da adlandırılmaktadır. DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin tamamlayıcı dizilere seçici bağlanma özelliği sayesinde hedef DNA dizilerinin tayinin yapılmasını sağlar. DNA biyosensörlerinin çalışma mekanizması, tek iplikli deoksiribonükleik asit (ssDNA) problarının biyosensör yüzeyine immobilize edilmesi ve hedef DNA'nın bağlanmasıyla meydana gelen biyokimyasal değişimlerin uygun bir transdüser aracılığıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesine dayanır.

Bu biyosensörlerin önemli avantajlarından biri nükleik asitlerin denatüre edilebilir ve yeniden kullanılabilir olmasıdır. Örneğin, DNA çift sarmalı, sıcaklık veya tampon çözeltilerinin değiştirilmesiyle ayrıştırılabilir ve sensör yüzeyi yeniden aktif hale getirilebilir. Bu durum, DNA biyosensörlerinin tekrar kullanılabilir olmasını sağlamaktadır. Ayrıca DNA biyosensörleri, karmaşık örnek matrislerindeki analitlerin yüksek seçicilikle teşhis edilmesini sağlar.

DNA biyosensörleri: ilaç keşfi ve çalışmaları, oksidatif DNA hasarı, klinik tanı, enfeksiyona yol açabilecek hastalıkların erken teşhis ve tedavisi, genetik hastalık çalışmaları, çevresel analizler ve gıda güvenliği gibi birçok alanda kullanılan hızlı, basit ve ekonomik analitik sistemlerdir. Özellikle elektrokimyasal DNA biyosensörleri, taşınabilirlikleri ve yüksek performansları sayesinde gelecekteki klinik uygulamalar için alternatif bir seçenek olmaktadır (Kaur vd., 2018).

2.2.1.2. Elektrokimyasal Biyosensörler

Bu tip biyosensörlerde kullanılan transdüser mekanizması elektrokimyasaldır. Biyolojik tanıma elementi, analiz edilecek biyomolekül ile etkileşime girer ve bu özgün kimyasal etkileşim transdüser tarafından genellikle akım, potansiyel veya empedans şeklinde bir elektriksel sinyale dönüştürülür. Ölçülen elektriksel parametreye göre, potansiyometrik, voltametrik, amperometrik ve impedimetrik gibi elektrokimyasal biyosensörler bulunmaktadır. Transdüser çeşidine göre sınıflandırılan elektrokimyasal biyosensörler aşağıdaki gibidir;

Potansiyometrik transdüserler: Bu tür transdüserler, hücreden akım geçmediği koşullarda (sıfır akımda) hücrenin elektromotor kuvvetinin ölçülmesine dayanır. Ölçülen potansiyel, analit derişiminin logaritmasıyla doğru orantılıdır. Potansiyometrik yöntemler, yüksek seçicilik ve basit ölçüm prensipleri nedeniyle biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Voltametrik transdüserler: Bu transdüserlerde, analizi yapılacak maddenin yükseltgenme veya indirgenme reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanana kadar hücreye artan veya azalan bir potansiyel uygulanır. Bu sırada hücre akımında ani bir artış veya azalış meydana gelir ve bir pik akımı oluşur. Oluşan bu pik akımının yüksekliği, elektroaktif maddenin derişimi ile doğru orantılıdır. Uygun yükseltgenme veya indirgenme

potansiyeli biliniyorsa, potansiyel doğrudan bu değere ayarlanarak akım ölçümü yapılabilir (Eggins, 1996).

Amperometrik transdüserler: Amperometrik transdüserler reaksiyon sonucunda oluşan elektroaktif türlerin sabit bir potansiyelde elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi veya indirgenmesiyle meydana gelen akımın ölçülmesini sağlar. Ölçülen akım genellikle nanoamper ile mikroamper aralığındadır ve analit derişimi ile doğru orantılıdır. Bu tip biyosensörler duyarlılıkları nedeniyle yaygın olarak tercih edilir.

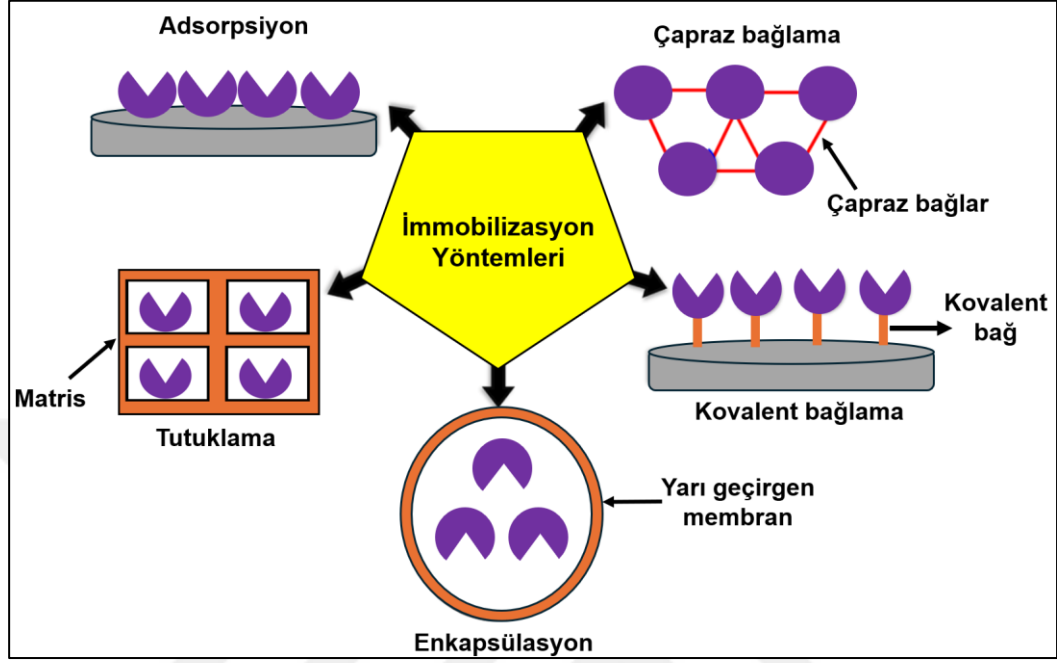
İmpedimetrik transdüserler: Bu transdüserlerde ortamda meydana gelen reaksiyonlar özellikle empedans (Z) veya onun bileşenleri olan direnç (R) ve kapasitans (C) üzerinden elektrokimyasal olarak ölçülür. Ölçüm mekanizması genellikle iki elektrot arasında düşük genlikli alternatif bir gerilim uygulanmasına ve ölçülen empedans değişiminin analit derişimiyle ilişkilendirilmesine dayanır. Numunede bulunan elektrolitlerin empedans değerlerini doğrudan etkilemesi, bu tip biyosensörlerin dezavantajları arasındadır. Potansiyometrik ve amperometrik biyosensörlere kıyasla daha az yaygın kullanılır (Pohanka ve Skládal, 2008).

2.2.2. Biyosensörlerde Kullanılan İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyolojik tanıma elementinin transdüser ile doğrudan ve güçlü bir şekilde bağlantılı olması gerekmektedir ve bu amaca yönelik olarak zaman içinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Eggins, 1996). Geliştirilen immobilizasyon yöntemler aşağıdaki gibidir;

- 1) **Adsorpsiyon:** En basit yöntem olup biyolojik bileşenin bir yüzeye adsorbe edilmesine dayanır.
- 2) **Mikroenkapsülasyon:** Biyolojik bileşenin zarlar arasında hapsedilmesi işlemidir. Glikoz ve üre biyosensörlerinde kullanılan yöntemlerden biridir.
- 3) **Tutuklama:** Biyolojik bileşen, bir jel, macun veya polimer matrisi içerisinde hapsedilir. Oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.
- 4) **Kovalent bağlama:** Biyolojik bileşen ile transdüser arasında kovalent kimyasal bağların oluşturulmasına dayanır.
- 5) **Çapraz bağlama:** Transdüser ile biyolojik materyali kimyasal olarak bağlamak amacıyla bifonksiyonel bir ajan kullanılır. Bu yöntem çoğunlukla adsorpsiyon veya tutuklama gibi diğer yöntemlerle birlikte uygulanır.

İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi ve karşılaştırılması Şekil 2.19 ve Çizelge 2.2’de sırasıyla verilmiştir.



Şekil 2.19. İmmobilizasyon yöntemleri

Çizelge 2.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Viswananthan ve Govindasamy, 2019)

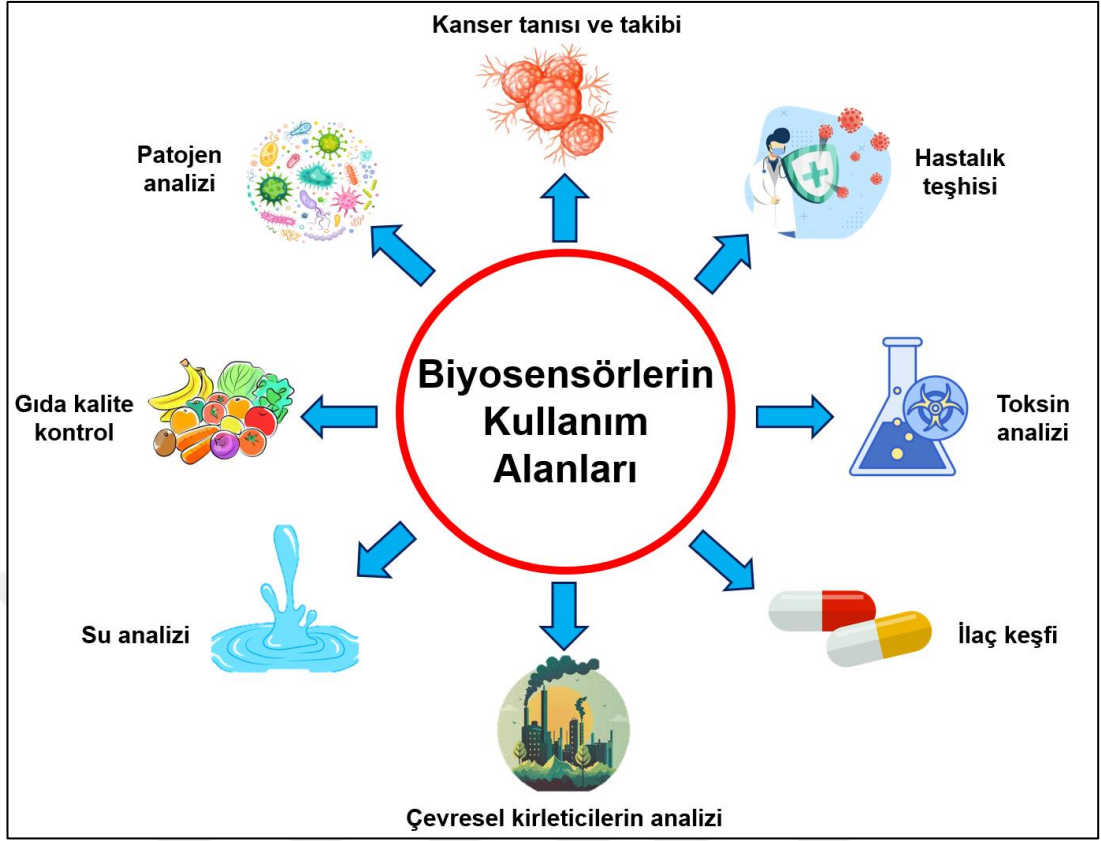
Yöntemler	Adsorpsiyon	Kovalent Bağlama	Tutuklama	Çapraz Bağlama	Enkapsülasyon
Avantajlar	Basit ve kolaydır	Substrata güçlü bağlanır	En hızlı immobilizasyon yöntemidir	Ucuz ve basit bir yöntemdir	Ucuzdur ve büyük miktarlarda immobilizasyon yapılabilir
	Reaktif gerekmez	Sızıntı yoktur	Gözenek boyutu ayarlanabilir		
	Moleküllere daha az zarar verir	Farklı fonksiyonel gruplarla destek yapılabilir	Konformasyon değişimi riski düşüktür		
Dezavantajlar	Verim düşüktür	Kimyasal modifikasyon enzimin fonksiyonel yapısını bozabilir	Molekül sızıntısı vardır	Kullanılan çok fonksiyonlu bileşikler uzun sürede denatürasyona neden olabilir	Gözenek boyutu sınırlıdır
	Sızıntı fazladır		Difüzyon kısıtlaması vardır		
	Moleküller yüzeyden desorbe olabilir				

2.2.3. İdeal Biyosensör Yapısı

İdeal bir biyosensörde biyoreseptörün sensör yüzeyine kararlı ve tekrarlanabilir bir biçimde immobilize edilmesi önemlidir. Biyoreseptör hedef analiti kompleks biyolojik numunelerde dahi yüksek seçicilikle tanıyabilmelidir. Çok düşük derişimlerde bile hızlı ve güvenilir bir şekilde tayin yapılabilirdir. Biyotanıma olayı sonucunda meydana gelen değişimin algılanabilmesi için transdüserin biyotanıma elemanı ile uyumlu çalışması gerekmektedir. Ayrıca, ideal biyosensör sistemi minyatürize edilebilir bir yapıda olmalı, kullanıcı dostu bir tasarım sunmalı ve karmaşık cihazlara dahi ihtiyaç duymadan analizi yapabilmelidir. Ölçüm sonuçlarının ekran, akıllı telefon veya bulut tabanlı dijital platformlar aracılığıyla hızlı ve anlaşılır bir biçimde kullanıcıya iletilebilmesi gereklidir.

2.2.4. Biyosensörlerin Kullanım Alanları

Biyosensörler, yüksek seçicilik ve duyarlılıkları sayesinde birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde biyosensörler gıda kalitesi ve güvenliğinin izlenmesi, doğal ve yapay bileşenlerin ayırt edilmesi, patojenlerin teşhisi ve pestisit kalıntılarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Fermentasyon endüstrisinde glikoz, laktat, etanol ve benzeri biyokimyasal parametrelerin izlenmesi, ürün kalitesinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Tıp alanında ise diyabet tanısında glikoz ölçümünde, enfeksiyon hastalıklarının hızlı teşhisinde, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili biyobelirteçlerin erken evrede teşhisinde, kanser tanısında ve takibinde kullanılmaktadır. Floresan biyosensörler, özellikle ilaç keşfinde, kanser araştırmalarında ve hücresel düzeyde biyolojik süreçlerin izlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca biyosensörler metabolik mühendislik alanında hücre içi metabolizmanın in vivo ortamda izlenmesine olanak tanımaktadır. Bitki biyolojisinde metabolik yolların aydınlatılması, gen ekspresyonunun ve metabolit taşınımının incelenmesinde kullanılmaktadır. Savunma ve klinik uygulamalarda ise toksik maddelerin, mikroorganizmaların ve çevresel kirleticilerin teşhisi amacıyla yararlanılmaktadır (Mehrotra, 2016). Biyosensörlerin yaygın olarak kullanıldığı alanlar Şekil 2.20’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.20. Biyosensörlerin kullanım alanları

2.3. Validasyon

Validasyon, bir sistemin belirlenmiş şartlar altında sürekli ve tekrarlanabilir biçimde istenen kalite özelliklerini sağladığının bilimsel olarak kanıtlanmasıdır.

2.3.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizlerde kullanılan bir yöntemin doğru, kesin ve güvenilir sonuçlar verdiğinin bilimsel olarak kanıtlanması sürecidir. Bu süreçte analitik yöntem, planlanan kullanım amacına uygunluğuna, kullanılan analitik teknolojiye ve belirlenen performans özelliklerine bakılarak değerlendirilir (Chavan ve Desai, 2022).

2.3.2. Validasyon Parametreleri

Yöntem validasyonu için değerlendirilen temel parametreler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Doğruluk
- Kesinlik
- Seçicilik
- Doğrusallık
- Çalışma aralığı
- Teşhis sınırı
- Tayin alt sınırı
- Duyarlık
- Sağlamlık
- Tutarlılık
- Stabilitate

2.3.2.1. Doğruluk

Doğruluk, analitik yöntemin ölçüm sonucunun gerçek sonuca ne kadar yakın olduğunu gösterir. Yöntemin analiti doğru şekilde ölçebilme yeteneğini ifade eder. Doğruluk parametresi referans standart ile karşılaştırma, kör matriks ortamında analizi yapılan maddeyi ilave etme ve analizi yapılan maddeye bulunduğu ortamda standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi olmak üzere üç farklı yaklaşımla belirlenebilmektedir. Elde edilen bulgular, geri kazanım yüzdesi (%) olarak hesaplanır. Yüksek doğruluk yöntemin sistematik hatalardan arındırıldığını ve güvenilir ölçümler sunduğunu gösterir (International Council for Harmonisation, 2023). % geri kazanım aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\% \text{ Geri kazanım} = (\text{Pratik değer} / \text{Teorik değer}) \times 100$$

2.3.2.2. Kesinlik

Kesinlik, aynı numunenin tekrarlı ölçüm sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin ve birbirlerine yakınlığının ölçüsüdür. Bu parametre, tekrarlanabilirlik, orta kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç farklı şekilde değerlendirilmektedir. Yöntemin rastgele

hatalara karşı tutarlılığını ortaya koyar ve genellikle yüzde bağıl standart sapma (%BSS) veya yüzde varyasyon katsayısı (%VK) ile ifade edilir ve standart sapma değerinin (σ) ortalama değere ($\bar{X}$) bölünüp 100 ile çarpılmasıyla elde edilir (Sushila Dagadu vd., 2022). % BSS aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$\% \text{ BSS} = (\sigma / \bar{X}) \times 100$$

2.3.2.3. Seçicilik

Seçicilik, analitik yöntemin numune içerisinde bulunabilecek diğer bileşenlerin varlığında analiti kesin ve doğru şekilde tayin edebilme yeteneğini ifade eder. Yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya bozunma ürünlerinin analit sinyalinin etkilememesi beklenir. Validasyon parametreleri içinde ilk bakılacak olan parametredir. Stabilitate tayini kapsamında mutlaka incelenmesi gereken parametredir (International Council for Harmonisation, 2023).

2.3.2.4. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik sinyal ile analit derişimi arasındaki ilişkinin belirli bir aralıkta doğru orantılı olup olmadığını gösterir. Bu parametre, farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerin ölçülmesiyle değerlendirilir. Elde edilen veriler genellikle kalibrasyon eğrisi ve korelasyon katsayısı (r) üzerinden yorumlanır. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, analitik yöntemin duyarlılığını yansıtan önemli bir parametredir. Bu nedenle, yöntemin doğrusallığı değerlendirilirken duyarlılık da aynı anda belirlenmiş olur (Araujo, 2009).

2.3.2.5. Çalışma Aralığı

Çalışma aralığı, kabul edilebilir doğruluk, kesinlik ve doğrusallığın sağlandığı analitik yöntemin alt ve üst derişim sınırlarını ifade eder. Genellikle doğrusal çalışma aralığına dayanarak belirlenir ve yöntemin hangi derişim aralığında güvenle kullanılabileceğini gösterir. Yöntemin uygulama amacı bu aralıkta değişiklik gösterebilir (Rao, 2018).

2.3.2.6. Teşhis Sınırı

Teşhis sınırı (TS), bir analitin numune içerisinde varlığının teşhis edilebildiği ancak doğru ve kesin olarak tayin edilemediği en düşük derişim miktarını ifade eder. Tayin sınırları içerisinde girmeyen derişimdir. Analitin derişimi cinsinden ifade edilir. TS değeri, kullanılan analitik yöntem ve cihazın hassasiyetine bağlı olarak değişebilir. Genellikle, miktarı bilinen numuneler azalan derişimlerde analiz edilir ve sinyalin kaybolduğu noktaya kadar ölçüm yapılır. Sinyal/gürültü oranı 3 olarak alınır. TS'ye yakın ya da kör çözeltiden elde edilen sinyalin, kesişim noktasının veya kalibrasyon eğrisindeki en düşük derişim düzeyinde bulunan analite ait yanıtın en az üç tekrarlı ölçümünden elde edilen σ değeri ile kalibrasyon denkleminde ait eğim değeri (m) ile kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$TS = 3.3 \times \sigma / m$$

2.3.2.7. Tayin Alt Sınırı

Tayin alt sınırı (TAS), bir analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik düzeyinde nicel olarak ölçülebildiği en düşük derişimdir. TAS yöntemin alt sınırda ne kadar güvenilir ölçüm yapabildiğinin göstergesidir. Özellikle safsızlık ve bozunma ürünlerinin analizlerinde kritik öneme sahiptir. Analitin derişimi cinsinden ifade edilir. Sinyal/gürültü oranı 10 olarak alınır (Sushila Dagadu vd., 2022). TS hesaplamasında da kullanılan σ ve m değerleri baz alınarak aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$TAS = 10 \times \sigma / m$$

2.3.2.8. Duyarlılık

Duyarlılık, doğrusallığın belirlendiği derişim aralığında elde edilen kalibrasyon doğrusunun eğimi ile ifade edilir. Eğimin yüksek olması, analit derişimindeki küçük değişimlerin ölçüm yanıtında belirgin farklılıklar oluşturduğunu ve yöntemin daha duyarlı olduğunu gösterir (Antignac vd., 2003).

2.3.2.9. Sağlamlık

Sağlamlık (kararlılık), analitik yöntemin küçük değişimlerden etkilenmeden kalabilme yeteneğini ifade eder. Mobil faz bileşimi, pH, akış hızı, iyonik güç veya sıcaklık

gibi parametreler kromatografik yöntemlerde karşılaşılan değişimlere örnek olarak verilebilir. Bu parametre yöntemin normal kullanımındaki güvenilirliğinin ölçüsünü gösterir (Sharma vd., 2018).

2.3.2.10. Tutarlılık

Tutarlılık, aynı numunenin farklı analistler tarafından, farklı cihazlar, farklı günler, farklı laboratuvarlar veya farklı reaktifler kullanılarak analiz edilmesi durumunda elde edilen sonuçların tekrarlanabilirlik derecesini ifade eder. Bu parametre, yöntemin çevresel ve sistemsal değişkenlerden etkilenmediğini belirtir (Vander Heyden vd., 2001).

2.3.2.11. Stabilité

Stabilité, analiz sırasında kullanılan numune ve standart çözeltilerin sıcaklık, pH değişimi, oksidatif ve fotolitik koşullar altında belirli bir süre boyunca kimyasal ve fiziksel özelliklerini koruyup korumadığını ifade eder. Saklama süresinin sonunda stabilité, taze ve uygun şekilde hazırlanmış stok çözeltisi ile karşılaştırma yapılarak belirlenir. Bu parametre, yöntemin rutin analizlerde kullanılabilmesi için önemli ve tamamlayıcı bir validasyon kriteri olarak kabul edilir (Bakshi ve Singh, 2002).

2.4. Kullanılan Ekipmanlar

2.4.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Elektrokimyasal ölçümlerin yapılabilmesi için deneylerde kullanılan araç ve gereçler, modelleri ve markaları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Araç ve Gereçler	Model ve Marka
Deney hücresi	Tek bölmeli cam elektrokimyasal hücre
Çalışma elektrotları	Camsı karbon elektrot (CKE) (3.0 mm) (BASİ MF 2012) Kenar düzlemli pirolitik grafit elektrot (KDPGE) (3.0 mm) (BASİ EF 1368) Bor katkılı elmas elektrot (BKEE) (3.0 mm) (BioLogic M-BDD-3)
Yardımcı elektrot	Platin tel elektrot (BASİ MW 1032)
Referans elektrot	Ag/AgCl elektrot (3 M NaCl) (BASİ MF 2052)
Potansiyostat cihazı	AUTOLAB-PGSTAT302N (GPES, sürüm 2.1.6; Eco Chemie, Hollanda)

Çizelge 2.3. Devam. Deneylerde kullanılan araç ve gereçler

Araç ve Gereçler	Model ve Marka
Analitik terazi	Shimadzu ATX-224R (Shimadzu, Japonya)
pH Metre	HANNA HI2002-02 Edge® (Hanna instruments, ABD)
Karıştırıcı	ISOLAB Vorteks Standart 3000 rpm (İnterlab, Türkiye)
Parlatma pedi	BASI MW 1040
Manyetik karıştırıcı	Velp MST Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya)
Ultrasonik Su Banyosu	JP Selecta (İsvicre)
Vakumlu fırın	EV 018 (Nüve, Türkiye)
Manyetik karıştırıcı	Poligonal şekilli, PTFE kaplı manyetik balık
Farklı hacimlerde otomatik mikropipetler	eppendorf, Almanya
Farklı hacimlerde kapaklı cam balon jojeler	İsolab, Türkiye
Farklı hacimlerde beherler	İsolab, Türkiye
Farklı hacimlerde (1,5 ml ve 15 ml) kapaklı santrifüj tüpleri	Nest Scientific, ABD
Otomatik mikropipetlere uygun pipet uçları	İnterlab, Türkiye ve Nest Scientific, ABD

2.4.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel süreçte çözelti hazırlamasında kullanılan kimyasallar Çizelge 2.4’te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	Kimyasal Formülü	Marka
Glasiyel asetik asit	CH ₃ COOH	İsolab
Sodyum asetat trihidrat	CH ₃ COONa.3H ₂ O	İsolab
Sülfürik asit	H ₂ SO ₄	Sigma
Fosforik asit	H ₃ PO ₄	Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	İsolab
Disodyum hidrojen fosfat	Na ₂ HPO ₄	Sigma
Etanol absolü	CH ₃ CH ₂ OH	Emsure
Dana timus kaynaklı deoksiribonükleik asit sodyum tuzu (dsDNA)	-	Sigma

Deneylerde kullanılan standart madde üretici firma tarafından sentezlenmiştir. Madde ile ilgili bilgiler Çizelge 2.5’te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Deneylerde kullanılan standart maddeye ait bilgiler

Özellikler	Bilgiler
Standart madde	<i>Gliocladium fimbriatum</i> kaynaklı Gliotoksin
Üretici firma	Apollo Scientific
CAS No	67-99-2
Yüzde saflık	%99,42
Erime derecesi	204°C
Fiziksel form	Beyaz toz

2.5. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Deneylerde asetat tamponu, fosfat tamponu, H_2SO_4 , gliotoksin ve dsDNA stok çözeltileri kullanılmıştır.

2.5.1. Destek Elektrolit Çözeltileri

Destek elektrolit çözeltileri, elektrokimyasal analizlerde ortamın iletkenliğini artırmaya yardımcı olan ve migrasyonu azaltarak daha kararlı ölçümler elde edilmesini sağlayan inert elektrolit içeren çözeltilerdir. Deneylerde asetat, fosfat tampon çözeltileri ve 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi destek elektrolitleri olarak kullanılmıştır.

Tampon çözeltiler, ortama az miktarda asit veya baz eklendiğinde ya da çözelti seyreltildiğinde dahi pH değişimine karşı direnç gösteren çözeltilerdir. Elektrokimyasal ölçümlerde ortamın pH değerini sabit tutarak analitin ölçülmesine olanak sağlar.

Deneylerde kullanılan tampon çözeltilerin pH değerleri 2,36; 2,91; 3,62; 4,66; 5,69; 5,91; 7,05; 8,19 olarak ölçülmüştür. Hazırlanan tampon çözeltilerinde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Deneylerde kullanılan destek elektrolitleri ve içerikleri

pH Değeri	Tampon Çözelti Cinsi	Kimyasal Madde (1)	Kimyasal Madde (2)	Madde Miktarı (1)	Madde Miktarı (2)	Ölçülen pH Değeri
2,00	Fosfat tampon çözeltisi	Fosforik asit	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	0,376 mL	1,56 g	2,36
3,00	Fosfat tampon çözeltisi	Fosforik asit	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	0,058 mL	1,56 g	2,91
3,70	Asetat tampon çözeltisi	Asetik asit	Sodyum asetat trihidrat	1,425 mL	0,34 g	3,62
4,70	Asetat tampon çözeltisi	Asetik asit	Sodyum asetat trihidrat	0,570 mL	1,36 g	4,66
5,70	Asetat tampon çözeltisi	Asetik asit	Sodyum asetat trihidrat	0,142 mL	3,40 g	5,69
6,00	Fosfat tampon çözeltisi	Disodyum hidrojen fosfat	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	0,710 g	4,68 g	5,91
7,00	Fosfat tampon çözeltisi	Disodyum hidrojen fosfat	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	1,420 g	0,94 g	7,05
8,00	Fosfat tampon çözeltisi	Disodyum hidrojen fosfat	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat	2,270 g	0,16 g	8,19

Fosfat ve asetat tampon çözeltileri, Çizelge 2.6’da belirtilen miktarlarda maddeler kullanılıp hacmi 100 mL’lik balon jojede ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

0,1 M H₂SO₄ (sülfürik asit) çözeltisi için derişik sülfürik asitten 0,544 mL alınmış ve hacim 100 mL’lik balon jojede ultra saf su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin pH değerleri HANNA HI2002-02 Edge® pH metre cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

2.5.2. Gliotoksin Stok Çözeltisi

Gliotoksin ana stok çözeltisi 5 mg katı maddenin bulunduğu vida kapaklı vial içerisine 3,5 mL absolü etanol ilave edilip ultrasonik su banyosunda çözdürülmesiyle hazırlanmıştır.

Hazırlanan gliotoksin stok çözeltisinin derişimi $4,40 \times 10^{-3}$ M’dir.

2.5.3. dsDNA Stok Çözeltisi

dsDNA stok çözeltisi için 3 mg dsDNA analitik terazide tartılmış ve 6 mL ultra saf su ile çözdürülmüştür. Çözeltinin homojenliği, +4 °C’de 1 gün bekletilmesinin ardından ISOLAB Vorteks Standart 3000 rpm (İnterlab, Türkiye) karıştırma cihazı kullanılarak 1 dk süreyle karıştırılmasıyla sağlanmıştır. dsDNA stok çözeltisinin derişimi, 260 nm’de ultraviyole-görünür spektroskopisi ile ölçülen absorbans değeri ve molar absorpsiyon katsayısının $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak kullanılmasıyla hesaplanmıştır (Shahzad vd., 2019).

Hazırlanan dsDNA stok çözeltisinin derişimi $1,85 \times 10^{-4}$ M’dir.

2.6. Deneylerde Kullanılan Voltametrik Yöntemler

Gliotoksinin elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve optimal çalışma koşullarının belirlenmesi amacıyla boş CKE ile DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılmıştır.

Her elektrokimyasal ölçüm öncesinde boş CKE yüzeyi mekanik olarak temizlenmiştir. Bu amaçla elektrot yüzeyi nemlendirilmiş, üzerine 0,01 µm alüminyum oksit süspansiyonu uygulanmış parlatma pedi kullanılarak parlatma işlemi

gerçekleştirilmiştir. Ardından elektrot ultra saf su ile yıkanmış ve ölçüme hazır duruma getirilmiştir.

Boş CKE ile yapılan DV, DPV ve KDV yöntemlerine ait ölçümler belirlenen parametrelerle gerçekleştirilmiştir. DV yöntemi ile 0,1 V/s tarama hızı kullanılmıştır. DPV ölçümleri 0,01 V/s tarama hızında ve 0,05 V/s puls genliğinde; KDV ölçümleri ise 0,01 V/s tarama hızında, 0,25 V/s puls genliğinde ve 5 Hz frekansta yapılmıştır. Tüm ölçümler 0 ile +1,60 V potansiyel aralığında gerçekleştirilmiştir.

DNA biyosensörünün geliştirilmesine yönelik deneylerde ise yüksek hassasiyete sahip olması ve yöntemin literatürde daha önce optimize edilen çalışmalara dayanması nedeniyle DPV yöntemi tercih edilmiştir (Cheraghi vd., 2023; Orhan vd., 2025; Yıldız vd., 2025).

2.6.1. dsDNA Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi

dsDNA'nın CKE yüzeyine immobilizasyonu ve çözelti ortamında gliotoksin ile etkileşiminin araştırılmasında kullanılan prosedür, literatürde daha önce rapor edilen (Cheraghi vd., 2023; Orhan vd., 2025; Yıldız vd., 2025) çalışmalar dikkate alınarak, aşağıda verilen adımlar doğrultusunda deneyler yürütülmüştür.

2.6.2. Farklı Derişimlerdeki Gliotoksinin CKE Yüzeyine İmmobilize Edilen dsDNA'nın Yükseltgenme Sinyallerine Etkisinin İncelenmesi

CKE yüzeyinin temizlenmesi: CKE yüzeyi, dsDNA ile modifikasyon işleminden önce mekanik olarak temizlenmiştir. Mekanik ön işlemde CKE, ısıtılmış ve yüzeyine 0,01 µm alüminyum oksit damlatılmış bir parlatma pedi yardımıyla temizlenmiştir. Sonrasında elektrot ultra saf su ile durulanıp 35 °C'de kurutulmuştur ve dsDNA immobilizasyonu için elektrot hazır hale getirilmiştir.

CKE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Temizlenmiş ve kurutulmuş CKE yüzeyi, $1,85 \times 10^{-5}$ M derişiminde dsDNA içeren çözeltinin her seferinde 5 µl'nin elektrot yüzeyine damlatılması ve her katman sonrası 35 °C'de kurutulmasıyla üç katman halinde dsDNA ile modifiye edilmiştir.

Gliotoksinin dsDNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş CKE, pH 4,66 asetat tamponu içerisinde %20 etanol varlığında $1,55 \times 10^{-5}$ M – $4,60 \times 10^{-4}$ M arasındaki

değişen derişimlerde hazırlanan gliotoksin ile 15 ve 60 dk süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile gerçekleştirildi.

Ölçüm: Elektrokimyasal ölçümler asetat tampon çözeltisi (pH 4,66) içinde gerçekleştirilmiştir. 0 V ile +1,60 V potansiyel aralığında, 0,005 V/s tarama hızında ve 0,05 V/s puls genliğinde optimize edilen DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gliotoksinin dsDNA etkileşimi sırasıyla yaklaşık +0,95 V ve +1,23 V civarında gözlenen deoksiguanozin (dGuo) ve deoksiadenozine (dAdo) ait yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen derişimler üzerinden değerlendirilmiştir.

Her elektrokimyasal ölçümden önce elektrot yüzeyi yukarıda belirtilen modifikasyon prosedürü uygulanarak yeniden hazırlanmıştır.

2.6.3. Gliotoksinin dsDNA Yükseltgenme Sinyallerinde Zamana Bağlı Oluşturduğu Derişimlerin İncelenmesi

CKE yüzeyinin temizlenmesi: CKE yüzeyi, dsDNA ile modifikasyon işleminden önce mekanik olarak temizlenmiştir. Mekanik ön işlemde CKE, ısıtılmış ve yüzeyine 0,01 µm alüminyum oksit damlatılmış bir parlatma pedi yardımıyla temizlenmiştir. Sonrasında elektrot ultra saf su ile durulanıp 35 °C’de kurutulmuştur ve dsDNA immobilizasyonu için elektrot hazır hale getirilmiştir.

CKE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Temizlenmiş ve kurutulmuş CKE yüzeyi, $1,85 \times 10^{-5}$ M derişiminde dsDNA içeren çözeltinin her seferinde 5 µl’nin elektrot yüzeyine damlatılması ve her katman sonrası 35 °C’de kurutulmasıyla üç katman halinde dsDNA ile modifiye edilmiştir.

Gliotoksinin dsDNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş CKE, pH 4,66 asetat tamponu içerisinde %20 etanol varlığında hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 5 sn – 120 dk sürelerle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile gerçekleştirildi.

Ölçüm: Elektrokimyasal ölçümler asetat tampon çözeltisi (pH 4,66) içinde gerçekleştirilmiştir. 0 V ile +1,60 V potansiyel aralığında, 0,005 V/s tarama hızında ve 0,05 V/s puls genliğinde optimize edilen DPV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gliotoksinin dsDNA etkileşimi sırasıyla yaklaşık +0,95 V ve +1,23 V civarında gözlenen

deoksiguanozin (dGuo) ve deoksiadenozine (dAdo) ait yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimler üzerinden değerlendirilmiştir.

Her elektrokimyasal ölçümden önce elektrot yüzeyi yukarıda belirtilen modifikasyon prosedürü uygulanarak yeniden hazırlanmıştır.

2.6.4. Çözelti Ortamında Hazırlanan Farklı Derişimlerdeki Gliotoksinin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

CKE yüzeyinin temizlenmesi: dsDNA immobilizasyonu öncesinde CKE yüzeyi mekanik olarak temizlenmiştir. Bu işlem için elektrot yüzeyi, 0,01 µm alüminyum oksit içeren ve önceden ıslatılmış bir parlatma pedi kullanılarak parlatılmıştır. Parlatma işleminin ardından elektrot ultra saf su ile durulanmış ve 35 °C’de kurutularak hazır hale getirilmiştir.

Ölçüm: Ölçüm çözeltileri pH 4,66 asetat tampon çözeltisi içerisinde %20 etanol varlığında $6,20 \times 10^{-6}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M derişim aralığında değişen gliotoksin çözeltileri ile $3,70 \times 10^{-5}$ M derişimindeki dsDNA çözeltisinin 480 dk’ye kadar elektrokimyasal hücre içerisinde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Gliotoksin-dsDNA etileşimi kontrol çözeltileri baz alınarak yorumlanmıştır. Kontrol çözeltileri tek başına aynı derişim aralığındaki pH 4,66 asetat tampon çözeltisi içerisinde %20 etanol ile hazırlanan gliotoksin çözeltilerini ve pH 4,66 asetat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan tek başına $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA çözeltisini kapsamaktadır.

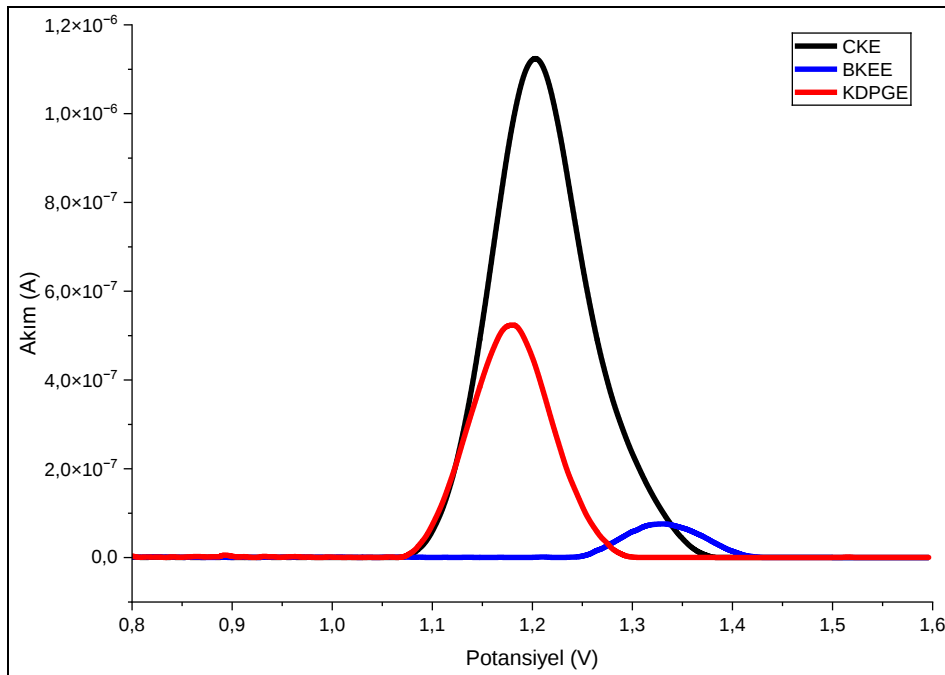
Hazırlanan karışımlar ve kontrol çözeltileri oda sıcaklığında aynı sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. Elektrokimyasal ölçümler dsDNA biyosensöründe kullanılan DPV parametreleri kullanılarak ve boş CKE’nin çözeltiliye daldırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık +0,93 V ve +1,18 V civarında gözlenen yükseltgenme sinyallerindeki değişimler incelenmiş ve farklı derişimlerde hazırlanan gliotoksinin dsDNA etkileşimi bu sinyalde meydana gelen değişimler üzerinden değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Elektrotlarının Pik akımı Üzerindeki Etkisi

Elektrokimyasal deneyler cam hücre içerisinde üçlü elektrot sistemi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrotları olarak boş CKE, BKEE ve KDPGE, referans elektrot olarak Ag/AgCl (3M NaCl) ve yardımcı elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır. Deneyler AUTOLAB-PGSTAT302N model potansiyostat/galvanostat cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışma elektrotlarının pik akımı üzerindeki etkisi, DPV yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Ölçümler $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksin derişiminde ve pH 2,36 fosfat tampon çözeltisi ortamında gerçekleştirilmiştir. Voltametrik sinyaller karşılaştırıldığında, gliotoksine ait en yüksek ve tekrarlanabilir pik akımlarının CKE ile elde edildiği belirlenmiştir. Farklı elektrotlarla yapılan ölçümlere ait voltamogramlar Şekil 3.1’de gösterilirken, pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.1’de detaylı olarak verilmiştir. Çalışmanın devam eden deneylerinde daha yüksek duyarlılık ve daha iyi analitik performans sağlaması nedeniyle CKE, çalışma elektrodu olarak tercih edilmiştir.



Şekil 3.1. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile CKE, BKEE ve KDPGE ile elde edilen voltamogramları

Çizelge 3.1. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile CKE, BKEE ve KDPGE ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

Çalışma Elektrodu	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
CKE	1,127	1,204
KDPGE	0,525	1,183
BKEE	0,078	1,334

3.2. Gliotoksin Maddesinin Boş CKE ile Voltametrik Yöntemlerle İncelenmesi

Gliotoksinin elektrokimyasal davranışı farklı pH değerlerinde destek elektrolitleri kullanılarak DV, DPV ve KDV yöntemleriyle incelenmiştir.

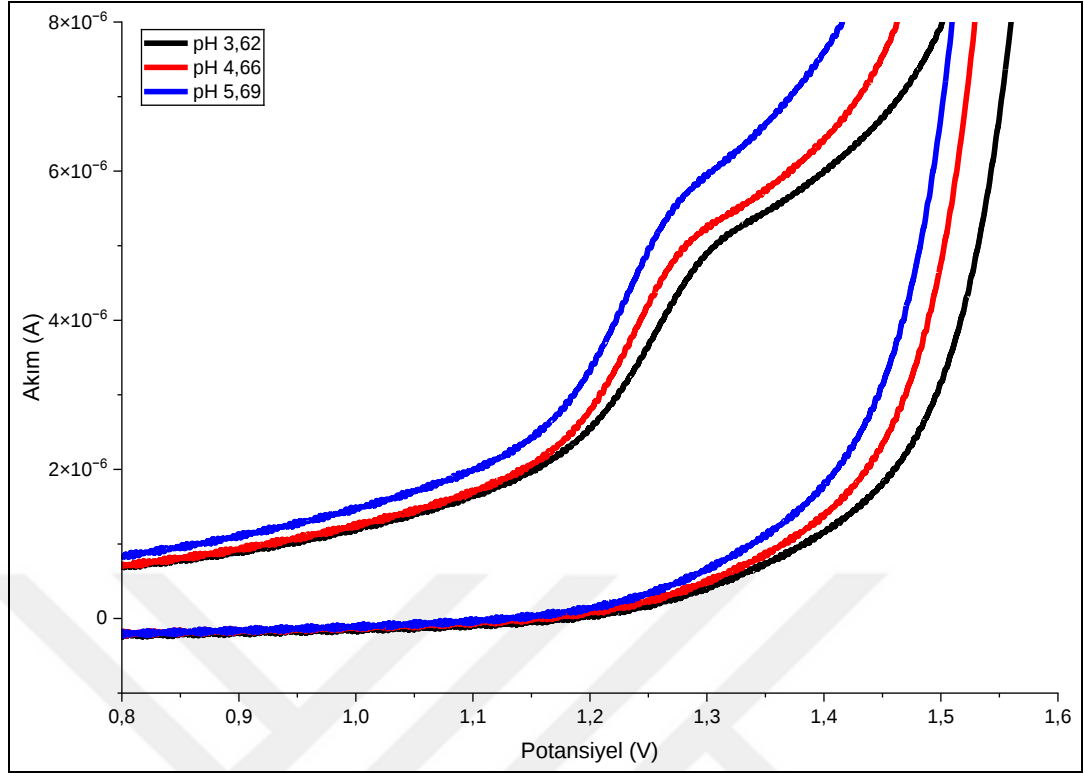
Gliotoksinin yükseltgenme davranışı, pH değerleri sırasıyla 3,62; 4,66; 5,69 olan asetat ve 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 olan fosfat tampon çözeltileri ile 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi kullanılarak $4,40 \times 10^{-3}$ M gliotoksin stok çözeltisinden hazırlanan $4,60 \times 10^{-5}$ M ölçüm çözeltileri ile incelenmiştir.

Boş CKE ile yapılan elektrokimyasal deneyler sonucunda en yüksek ve tekrar edilebilir pik akımının elde edildiği çalışma ortamı pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi olarak belirlenmiştir.

Gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki yükseltgenme davranışı, pH taramasında kullanılan derişimde hazırlanmış ölçüm çözeltilerinde, 0,005 – 0,5 V/s aralığındaki tarama hızlarında DV yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.1. Gliotoksinin DV Yöntemi ile İncelenmesi

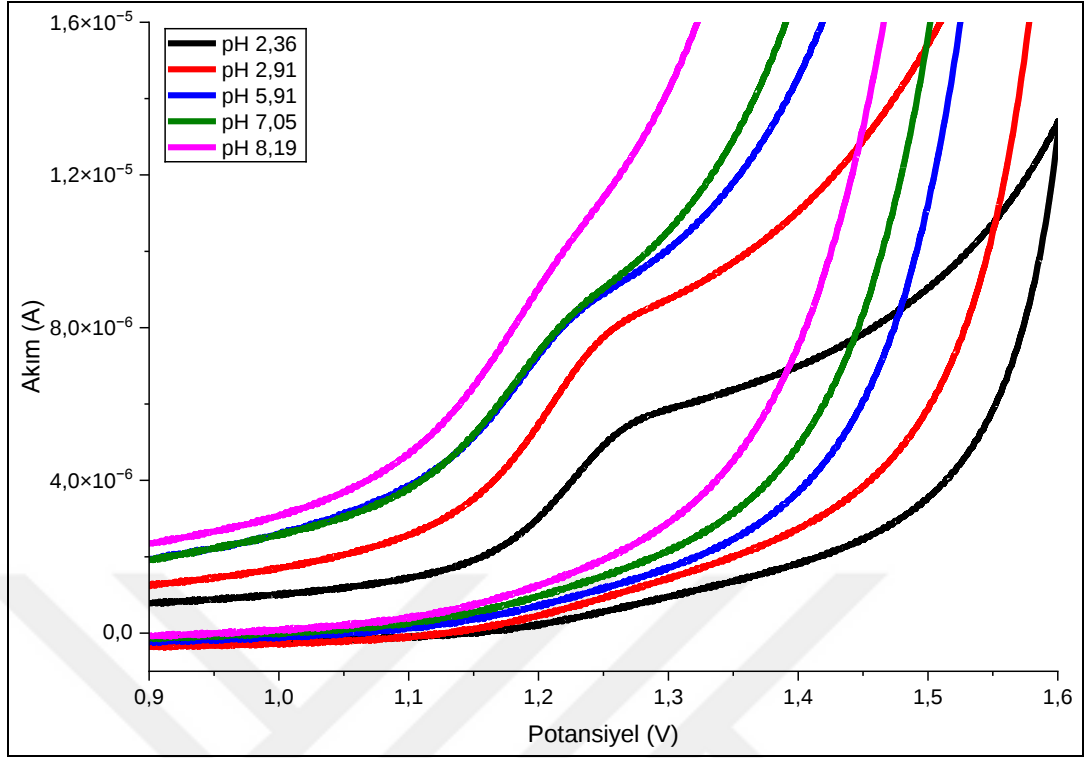
DV yöntemi ile farklı destek elektrolitleri ile elde edilen voltamogramlar Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.2. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile DV ile elde edilen voltamogramları

Çizelge 3.2. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

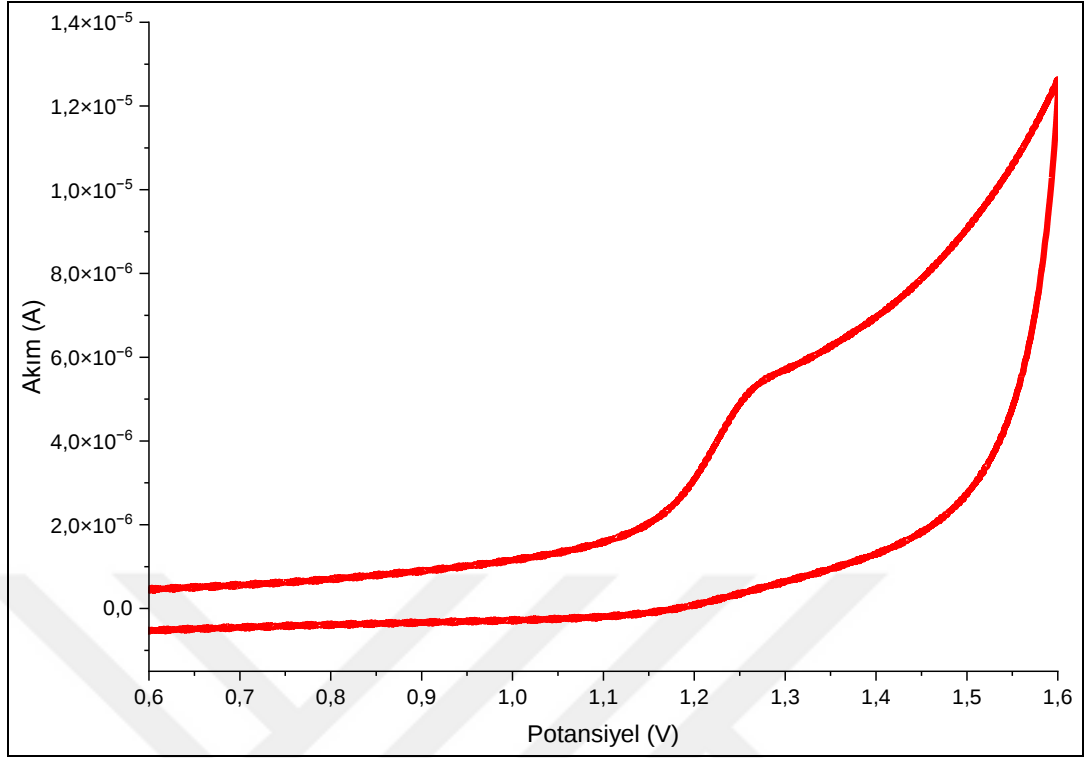
pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
3,62	0,621	1,295
4,66	0,746	1,279
5,69	0,707	1,272



Şekil 3.3. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile DV ile elde edilen voltamogramları

Çizelge 3.3. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
2,36	0,937	1,276
2,91	1,147	1,248
5,91	0,756	1,217
7,05	0,565	1,215
8,19	0,239	1,215



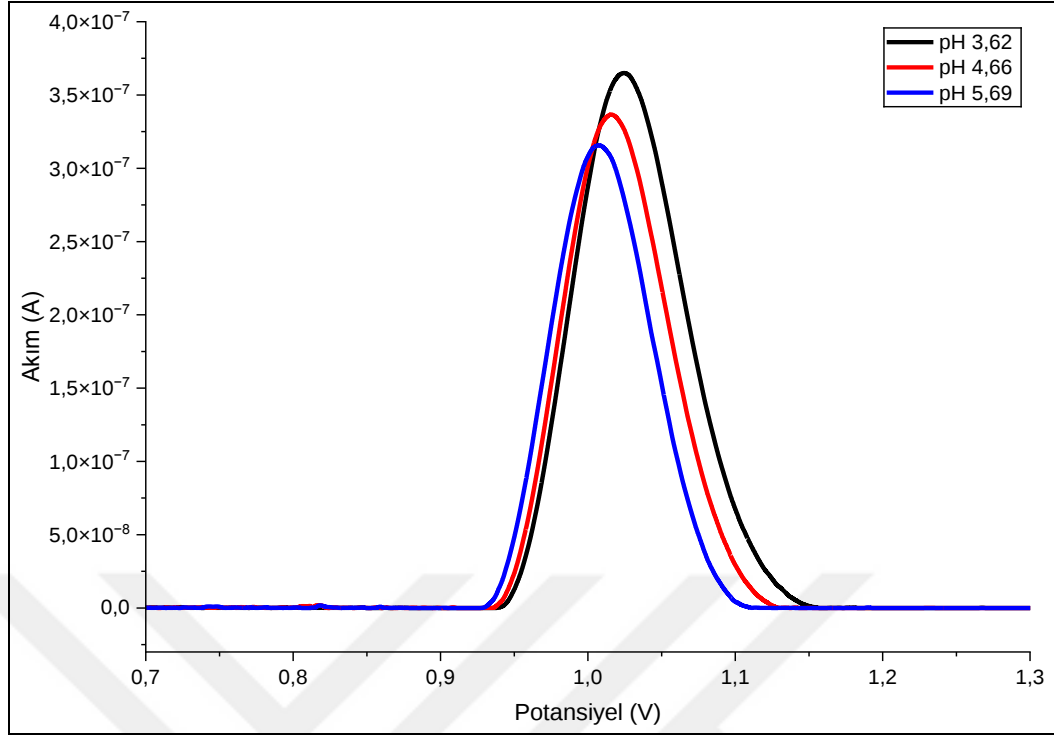
Şekil 3.4. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile DV ile elde edilen voltamogramı

Çizelge 3.4. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DV yöntemi ile 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

pH	Akım (μA)	Potansiyel (V)
1,00	0,812	1,263

3.2.2. Gliotoksinin KDV Yöntemi ile İncelenmesi

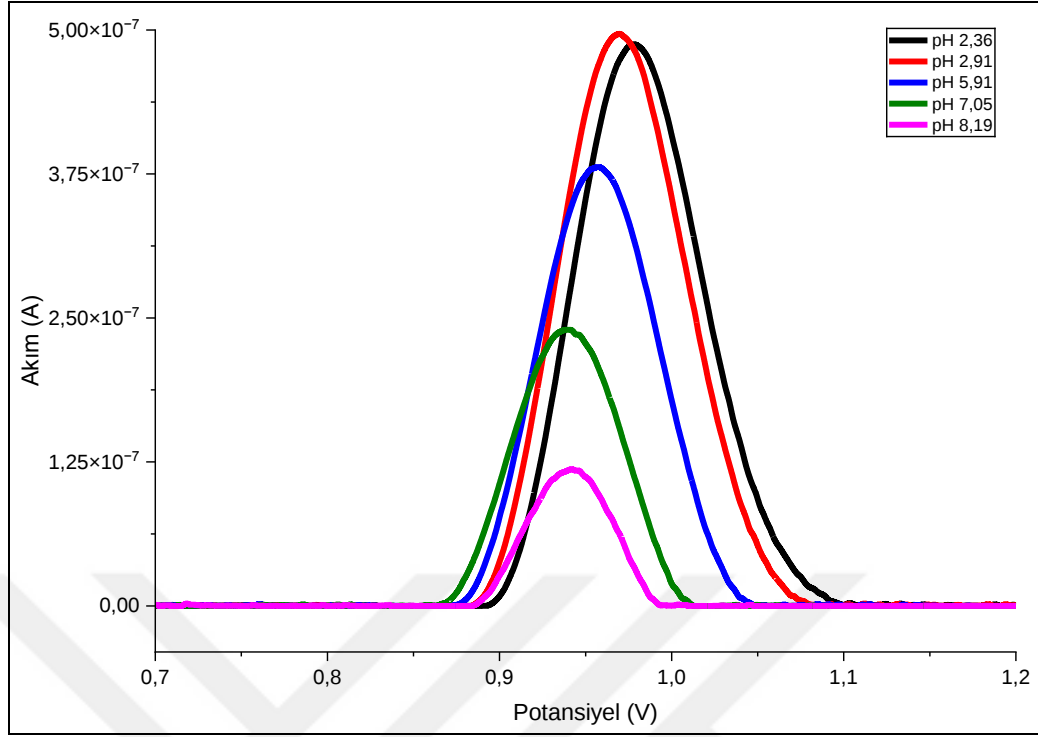
Farklı destek elektrolitleri kullanılarak KDV ile elde edilen voltammogramlar Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Ölçümler sonucunda elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.5. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile elde edilen KD voltamogramları

Çizelge 3.5. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

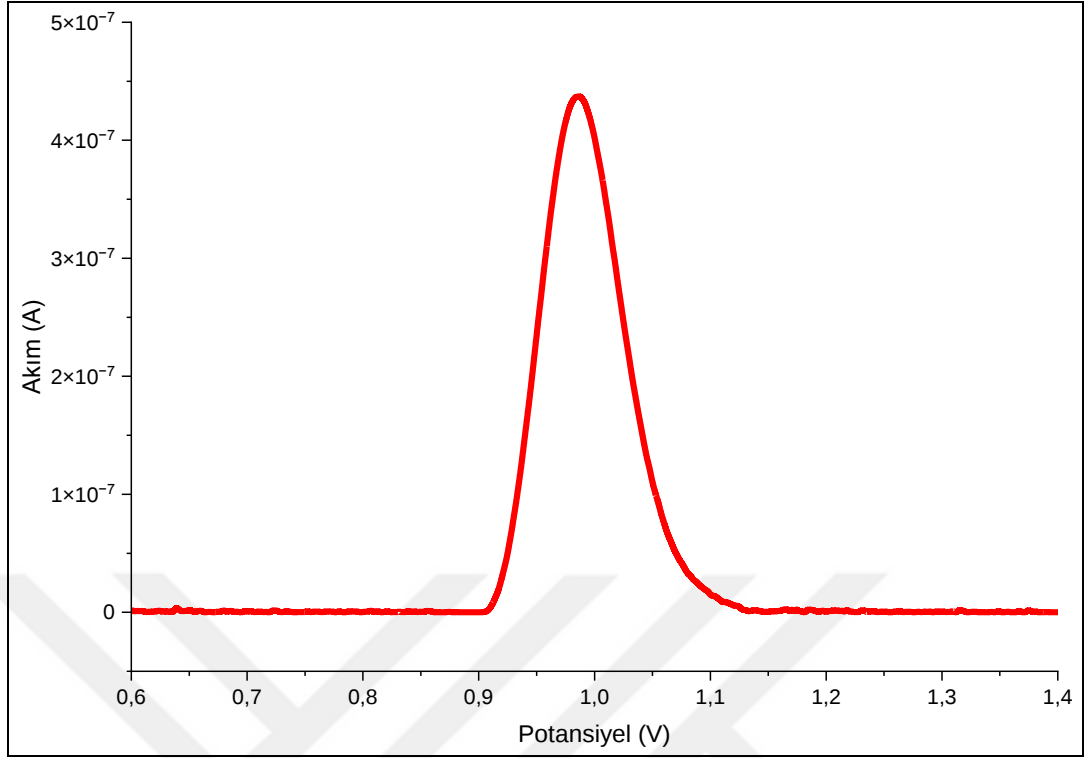
pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
3,62	0,365	1,024
4,66	0,337	1,016
5,69	0,316	1,008



Şekil 3.6. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen KD voltamogramları

Çizelge 3.6. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
2,36	0,489	0,978
2,91	0,497	0,970
5,91	0,381	0,958
7,05	0,240	0,942
8,19	0,119	0,942



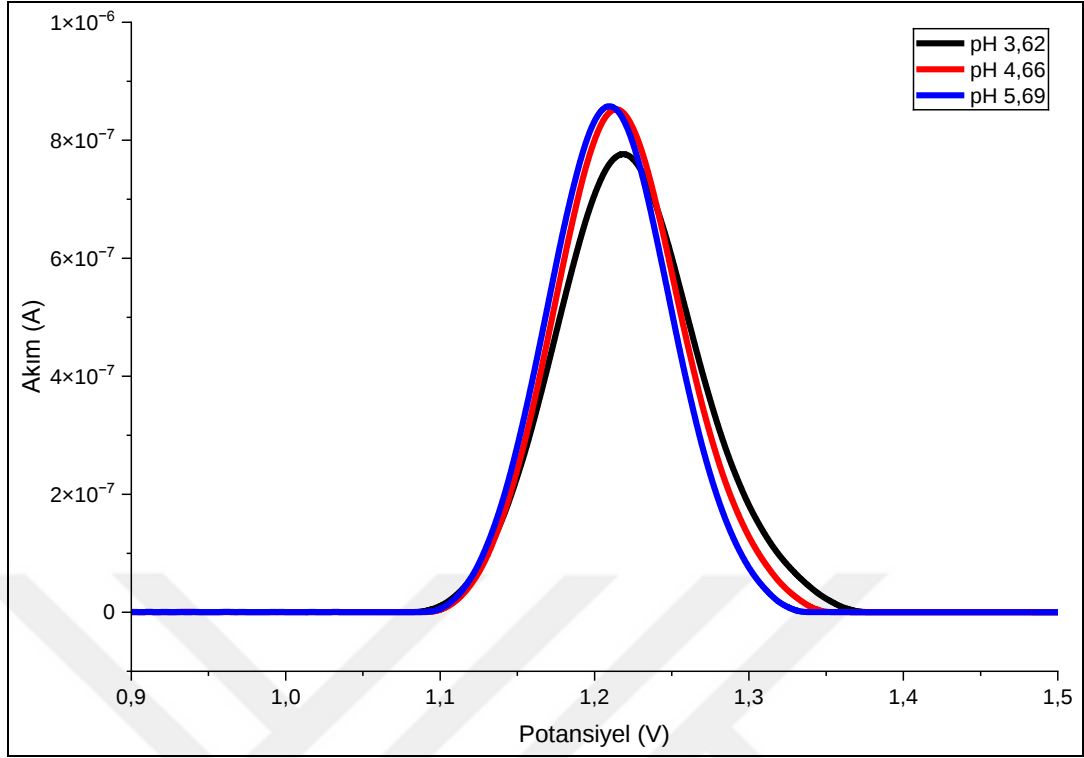
Şekil 3.7. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile elde edilen KD voltamogramı

Çizelge 3.7. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin KDV yöntemi ile 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

pH	Akım (μA)	Potansiyel (V)
1,00	0,437	0,987

3.2.3. Gliotoksinin DPV Yöntemi ile İncelenmesi

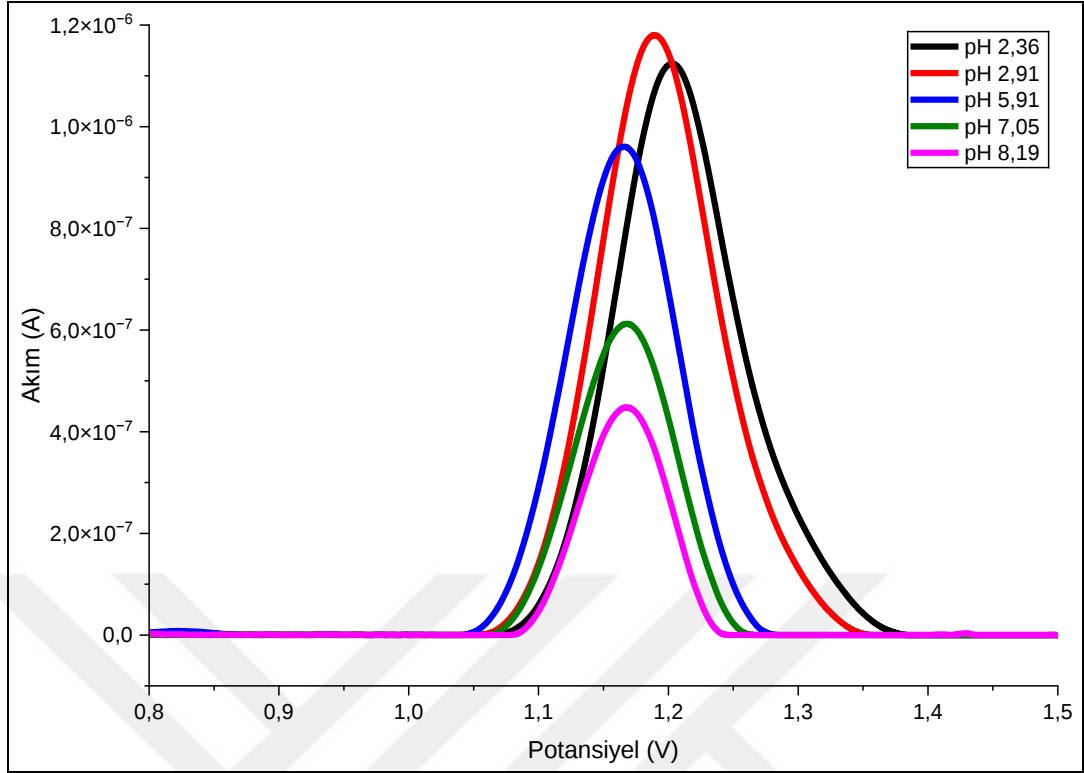
Farklı destek elektrolitleri kullanılarak DPV yöntemi ile elde edilen voltammogramlar Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11’de verilmiştir. Elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.8, Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10’da gösterilmiştir. pH’ın pik akımı üzerindeki etkisini gösteren nokta grafiği Şekil 3.12’de verilmiştir.



Şekil 3.8. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 3,62; 4,66; 5,69 asetat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları

Çizelge 3.8. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile asetat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

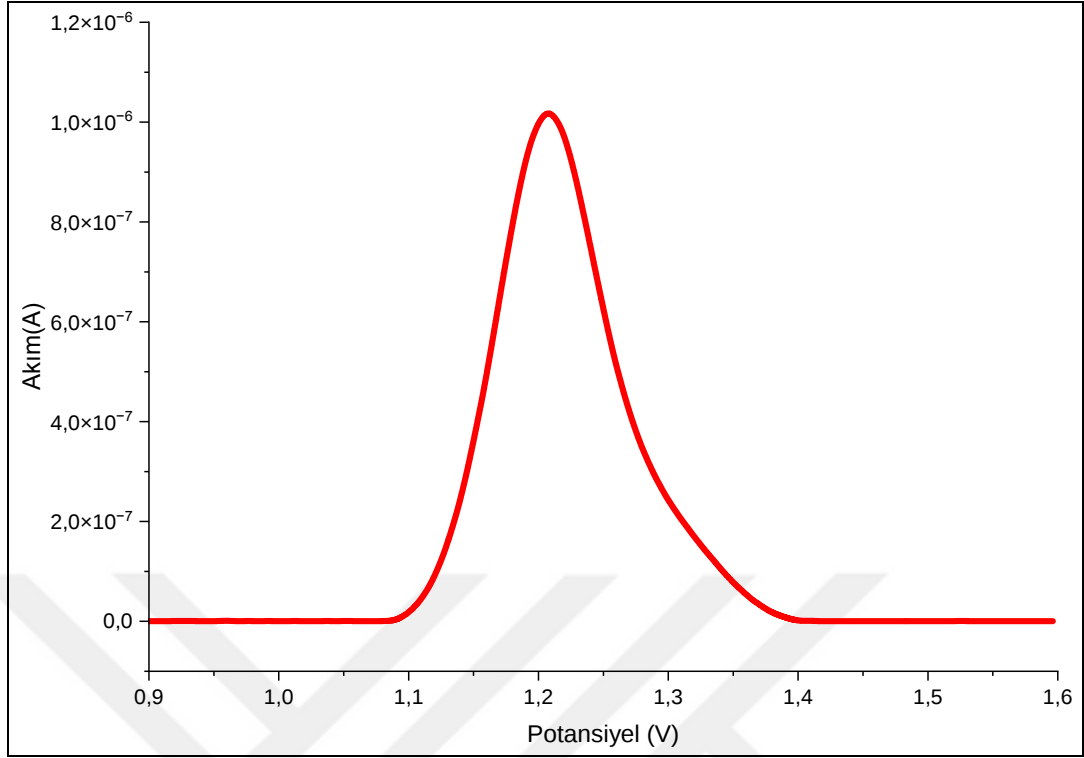
pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
3,62	0,764	1,224
4,66	0,855	1,214
5,69	0,859	1,209



Şekil 3.9. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,36; 2,91; 5,91; 7,05; 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları

Çizelge 3.9. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin DPV yöntemi ile fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

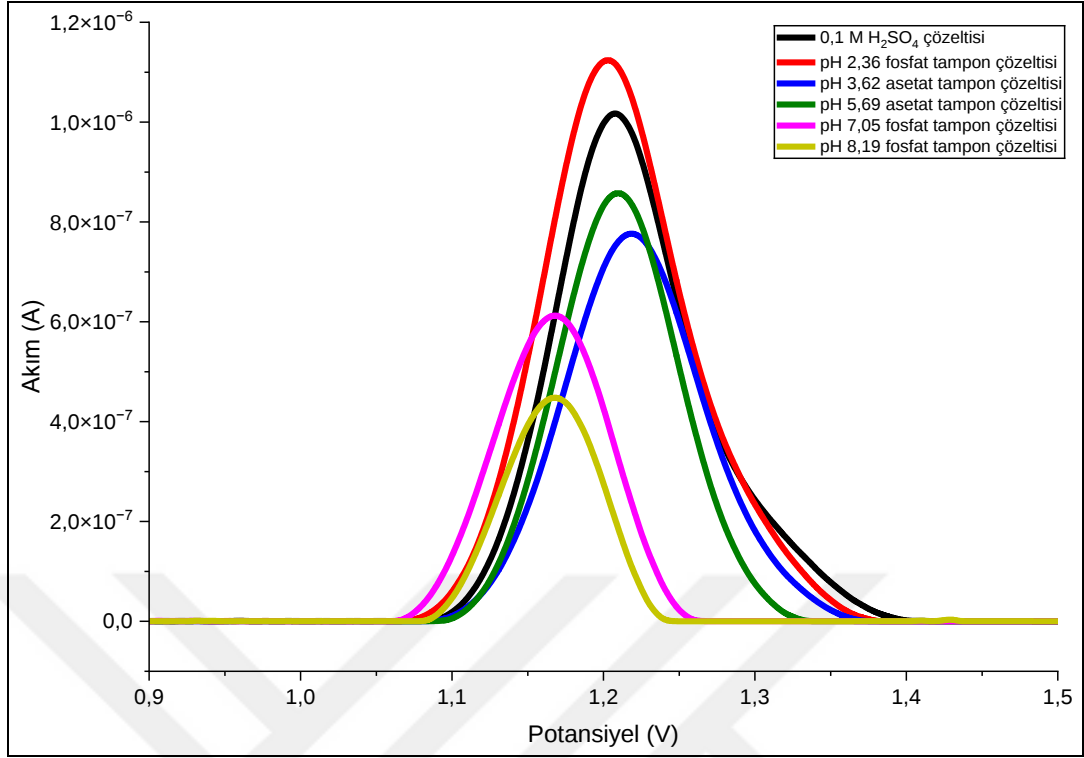
pH	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
2,36	1,127	1,204
2,91	1,183	1,188
5,91	0,961	1,168
7,05	0,614	1,168
8,19	0,450	1,168



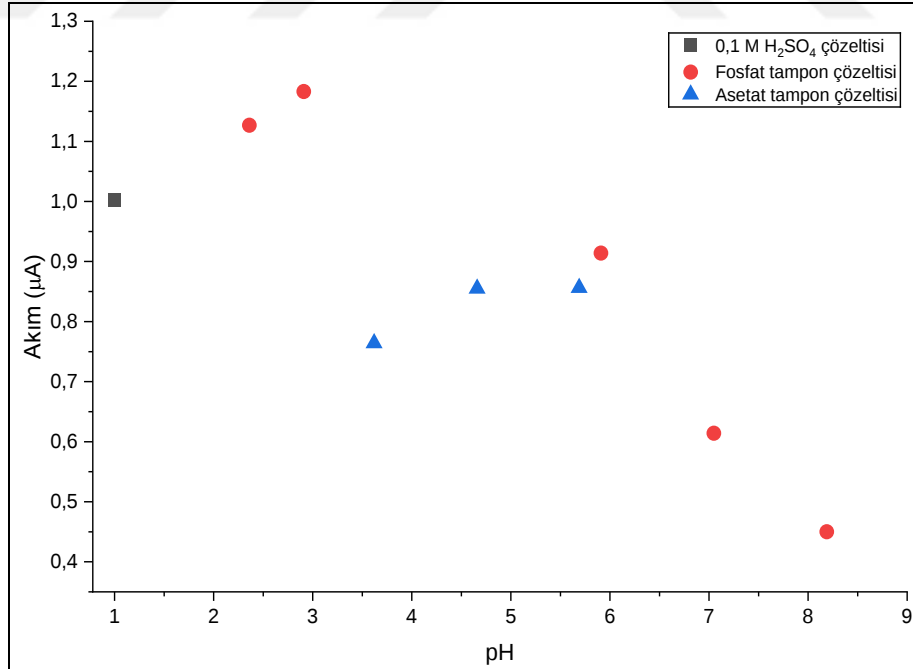
Şekil 3.10. 4,60 × 10⁻⁵ M gliotoksinin 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi ile elde edilen DP voltamogramı

Çizelge 3.10. 4,60 × 10⁻⁵ M gliotoksinin DPV yöntemi ile 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi ile elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri

pH	Akım (µA)	Potansiyel (V)
1,00	1,003	1,209



Şekil 3.11. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,1 M H_2SO_4 çözeltisi; pH 2,36 fosfat; pH 3,62 asetat; pH 5,69 asetat; pH 7,05 fosfat pH 8,19 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen DP voltamogramları

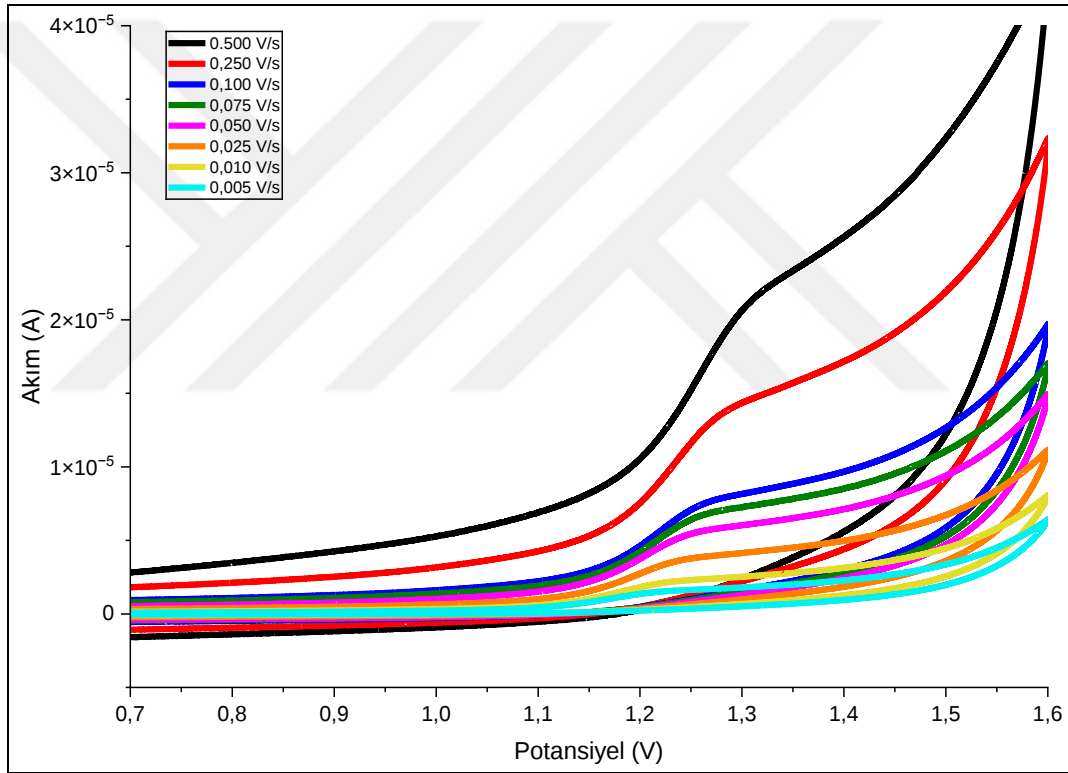


Şekil 3.12. Farklı pH değerlerinin DPV yöntemi ile $4,60 \times 10^{-5}$ M derişimdeki gliotoksinin pik akımı üzerindeki etkisi

pH taraması sonucu elde edilen veriler, gliotoksinin pik akımının asidik ortamlarda daha yüksek olduğunu göstermiştir. Boş CKE ile yüksek ve tekrar edilebilir gliotoksin pik akımı pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ortamında DPV yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.4. Gliotoksinin DV Yöntemi ile Hız Taraması Çalışmaları

Hız taraması çalışmalarında ölçümler DV yöntemi ile $4,60 \times 10^{-5}$ M derişimde pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan gliotoksin ölçüm çözeltileri ile yapılmıştır. Elde edilen voltamogramlar ve veriler Şekil 3.13 ve Çizelge 3.11’de sırasıyla verilmiştir.

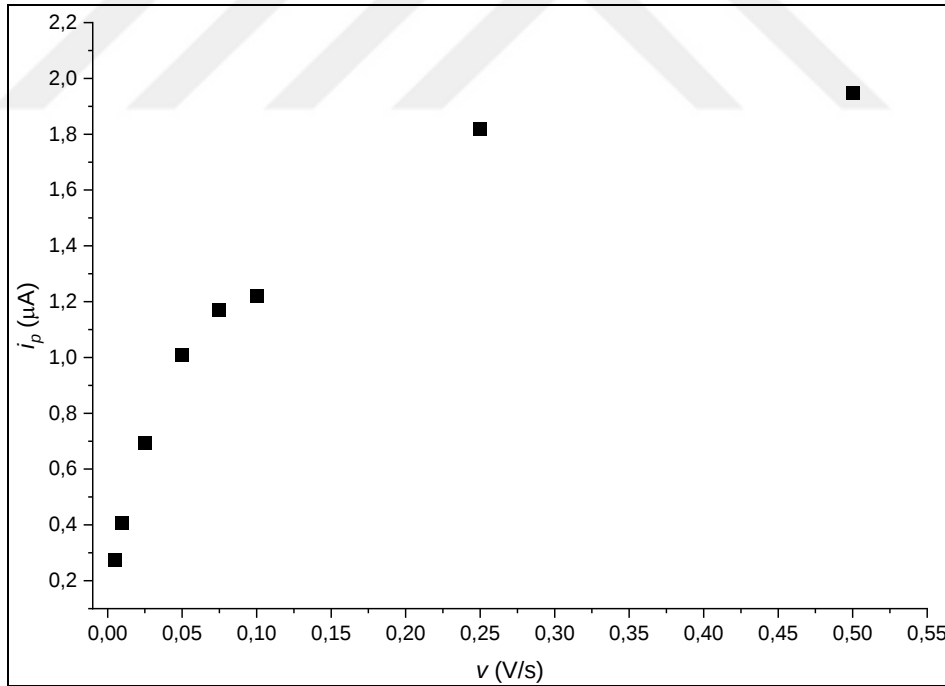


Şekil 3.13. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ile elde edilen hız taraması voltamogramları

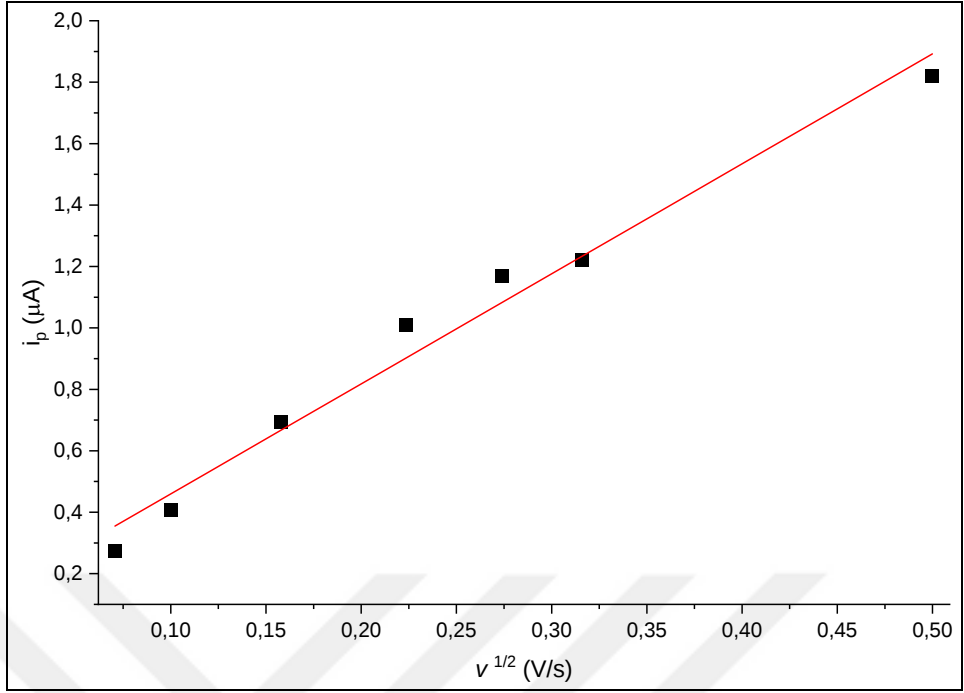
Çizelge 3.11. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksin çözeltisinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ile elde edilen hız taraması değerleri

v (V/s)	$v^{1/2}$	$\log v$	i_p (μ A)	$\log i_p$	E_p (V)
0,500	0,707	-0,301	1,947	0,289	1,302
0,250	0,500	-0,602	1,819	0,260	1,278
0,100	0,316	-1,000	1,220	0,086	1,262
0,075	0,274	-1,125	1,170	0,068	1,255
0,050	0,224	-1,301	1,008	0,003	1,251
0,025	0,158	-1,602	0,693	-0,159	1,239
0,010	0,100	-2,000	0,406	-0,391	1,225
0,005	0,071	-2,301	0,275	-0,561	1,215

Çizelge 3.11’de verilen değerlere göre $v - i_p$, $v^{1/2} - i_p$, $\log v - \log i_p$ ve $\log v - E_p$ grafikleri Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16 ve Şekil 3.17’de sırasıyla verilmiştir.



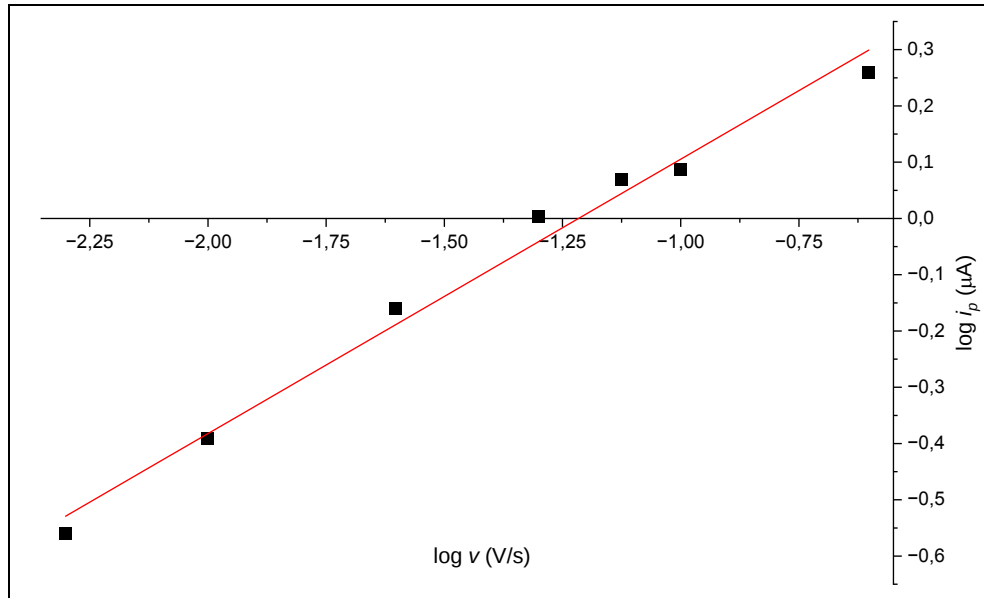
Şekil 3.14. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $v - i_p$ grafiği



Şekil 3.15. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $v^{1/2} - i_p$ grafiği

Hızın karekökünün ve pik akımının doğrusal değişim gösterdiği 0,005 – 0,250 V/s arasındaki hız taramasından elde edilen doğrunun denklemi;

$$i_p (\mu A) = 3,582 v^{1/2} (V/s) + 0,101 \quad r: 0,990 \quad (n: 7)$$

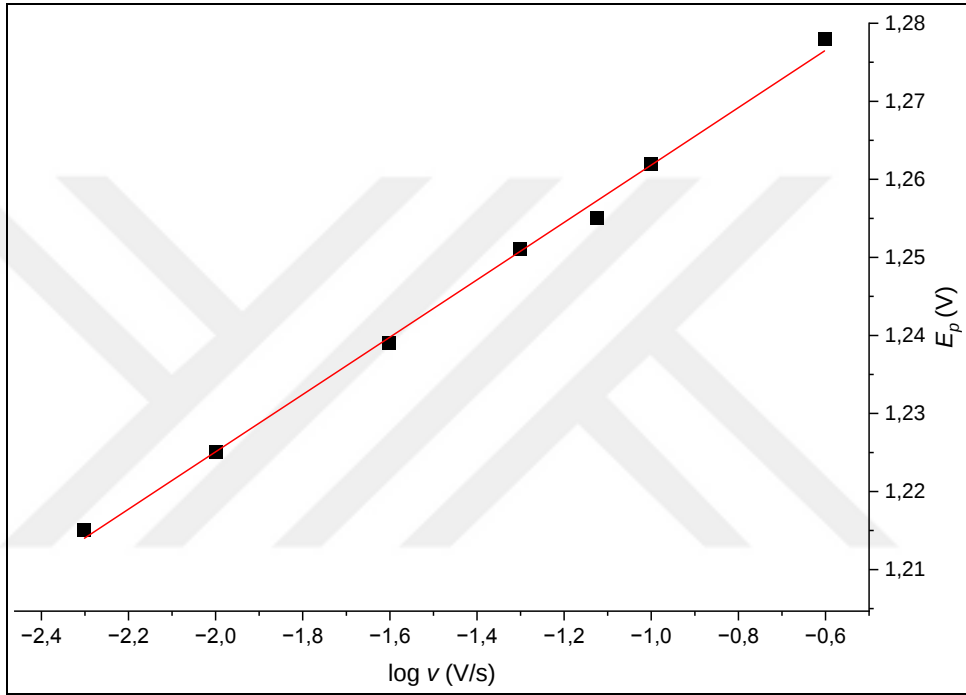


Şekil 3.16. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $\log v - \log i_p$ grafiği

pH 2,91 fosfat tampon çözeltisinde hazırlanan $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin 0,005 – 0,250 V/s arasındaki hız taramasından elde edilen $\log v - \log i_p$ doğrusunun denklemi;

$$\log i_p (\mu A) = 0,488 \log v (V/s) + 0,593 \quad r: 0,994 \quad (n: 7)$$

$\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen doğrunun eğim değerinin 0,5'e yakın olması, gliotoksinin pH'ı 2,91 fosfat tampon çözeltisinde CKE yüzeyine difüzyon hareketiyle taşındığını göstermektedir (Gosser, 1993).



Şekil 3.17. $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 2,91 fosfat tampon çözeltisindeki $\log v - E_p$ grafiği

0,005 – 0,250 V/s arasındaki hız taramasından elde edilen $\log v - E_p$ doğrusunun denklemi;

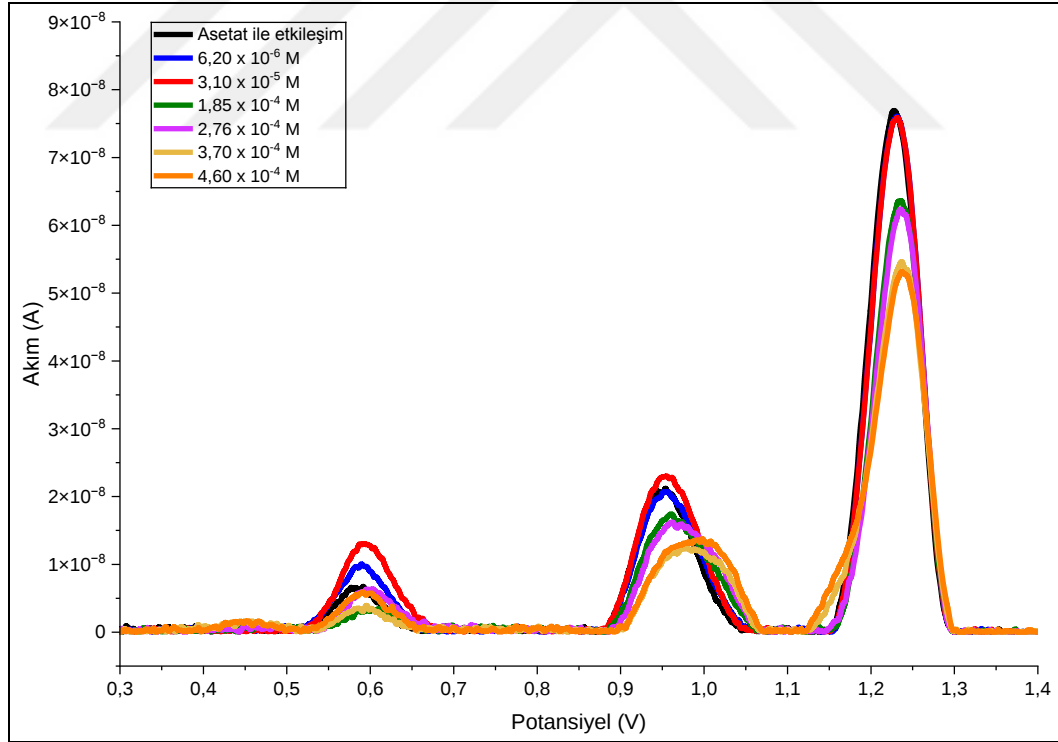
$$E_p (V) = 0,037 \log v (V/s) + 1,299 \quad r: 0,998 \quad (n: 7)$$

$\log v - E_p$ grafiğinin doğrusallık göstermesi, pik potansiyelinin tarama hızına bağlı olarak değiştiğini ve gliotoksinin elektrokimyasal sürecinin geri dönüşümsüz olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Jain vd., 2007).

3.3. Gliotoksin-dsDNA Etkileşiminin DPV Yöntemi ile İncelenmesi

3.3.1. Gliotoksin Derişimine Bağlı Olarak dsDNA/CKE Biyosensörünün Yükseltgenme Sinyallerindeki Değişimlerinin İncelenmesi

$6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ aralığında hazırlanan gliotoksin ölçüm çözeltileri dsDNA ile immobilize edilmiş CKE ile 250 rpm'de 15 dk etkileştirilmiştir. Etkileşim sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Şekil 3.18'de görüldüğü gibi, $1,85 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksin derişimi itibarıyla dGuo ve dAdo pik akımlarında belirgin bir düşüş meydana gelirken, dGuo pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kaydığı ve pik şeklinde belirgin değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Farklı derişimlerdeki gliotoksin çözeltilerinin dsDNA biyosensörü ile etkileşimi sonucu elde edilen dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerlerindeki değişiklikler Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'te, dGuo ve dAdo pik akımı ile gliotoksin derişimi arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler ise Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de sırasıyla verilmiştir.



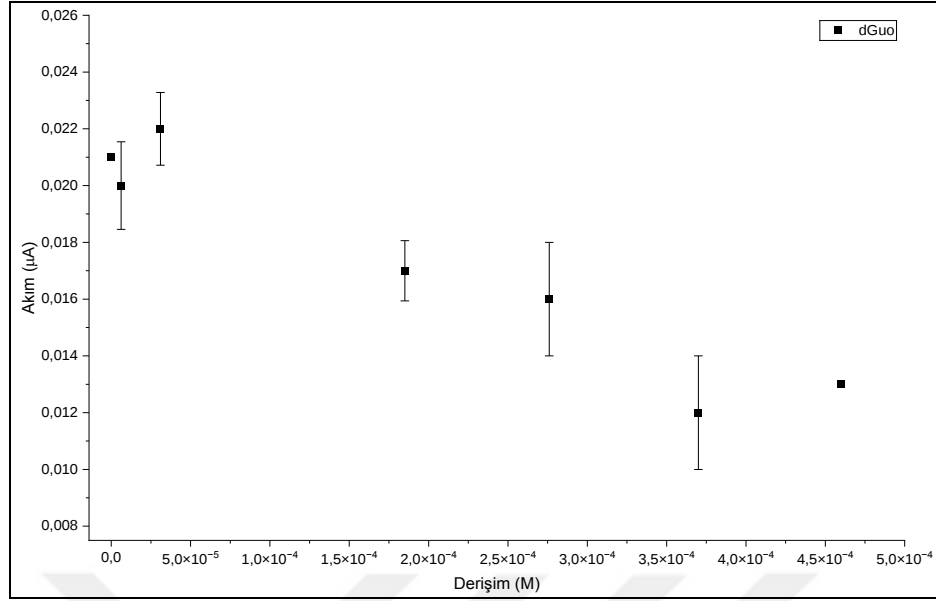
Şekil 3.18. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4} \text{ M}$ gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süre etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (siyah)

Çizelge 3.12. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4}$ gliotoksin ile 15 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

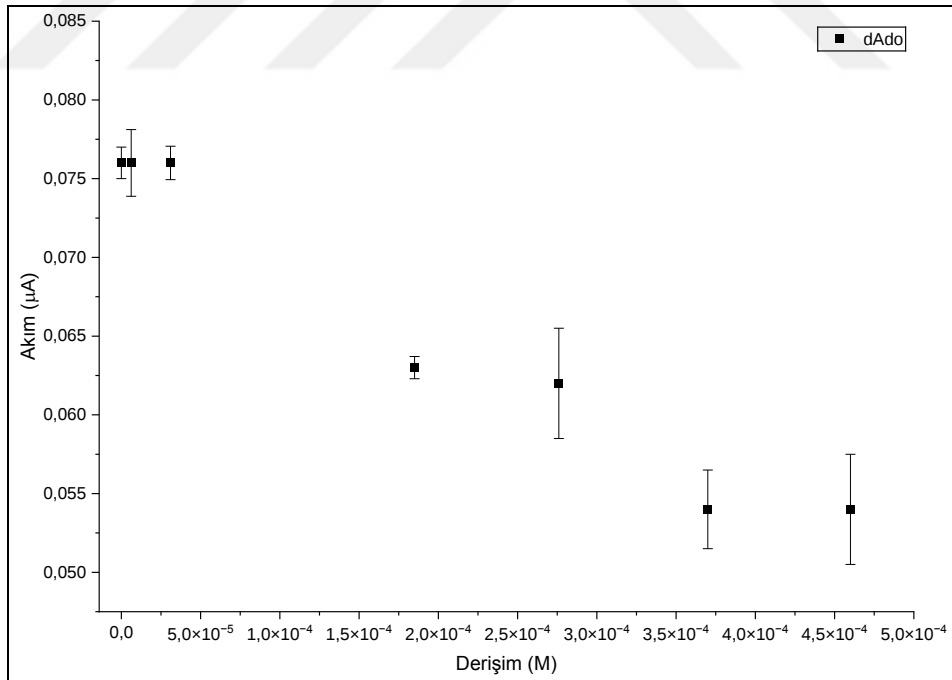
	Derişim (M)	Akım (μA)	Potansiyel (V)
dGuo sinyali	0	0,021	0,947
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim (15 dk)	0	0,021	0,953
	$6,20 \times 10^{-6}$	0,020	0,957
	$3,10 \times 10^{-5}$	0,022	0,955
Gliotoksin ile etkileşim (15 dk)	$1,85 \times 10^{-4}$	0,017	0,959
	$2,76 \times 10^{-4}$	0,016	0,961
	$3,70 \times 10^{-4}$	0,012	0,973
	$4,60 \times 10^{-4}$	0,013	0,997

Çizelge 3.13. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6} \text{ M} - 4,60 \times 10^{-4}$ gliotoksin ile 15 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Derişim (M)	Akım (μA)	Potansiyel (V)
dAdo sinyali	0	0,078	1,231
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim (15 dk)	0	0,076	1,229
	$6,20 \times 10^{-6}$	0,076	1,231
	$3,10 \times 10^{-5}$	0,076	1,231
Gliotoksin ile etkileşim (15 dk)	$1,85 \times 10^{-4}$	0,063	1,237
	$2,76 \times 10^{-4}$	0,062	1,235
	$3,70 \times 10^{-4}$	0,054	1,237
	$4,60 \times 10^{-4}$	0,053	1,237



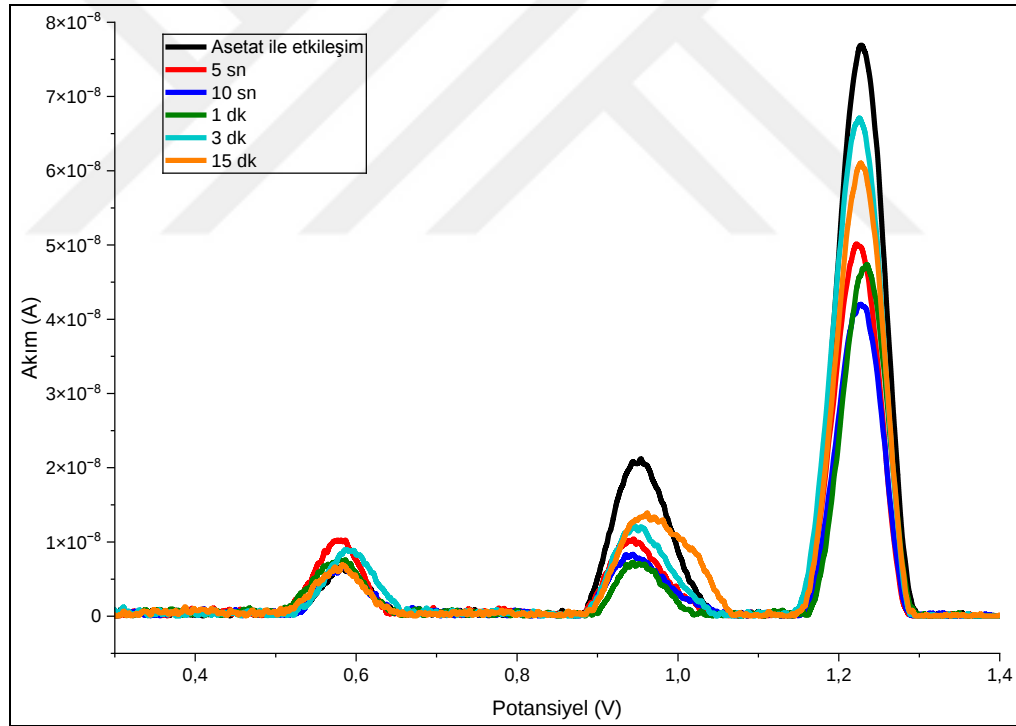
Şekil 3.19. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6}$ M – $4,60 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri



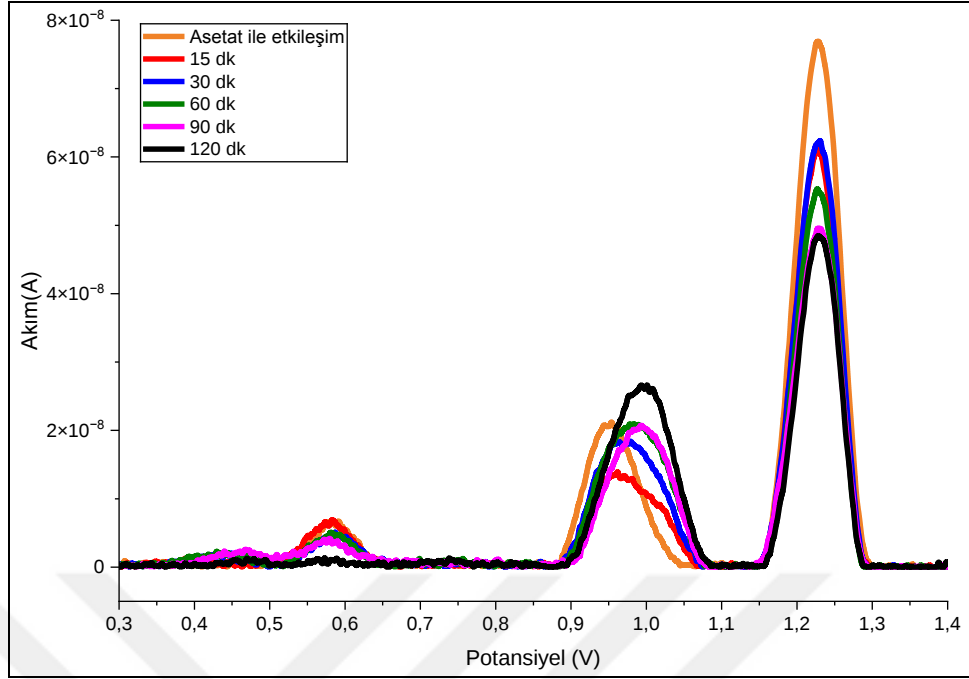
Şekil 3.20. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $6,20 \times 10^{-6}$ M – $4,60 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri

3.3.2. dsDNA/CKE Biyosensöründe Gliotoksin–DNA Süre Etkileşiminin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri Üzerinden Değerlendirilmesi

$1,85 \times 10^{-4}$ M derişimde hazırlanan gliotoksin ölçüm çözeltileri, dsDNA ile immobilize edilmiş CKE ile 250 rpm’de 5 saniye (sn) ile 120 dk arasında değişen sürelerle etkileştirilmiştir. Özellikle 15 dk’lık etkileşim süresinden sonra dGuo pik akımında belirgin değişimler gözlenmiştir. 15. dk’dan sonraki etkileşimlerde dGuo pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kaydığı ve pik akımında önce düşüş, sonra artış meydana geldiği belirlenmiştir. Farklı sürelerdeki etkileşimlere ait voltamogramlar Şekil 3.21 ve Şekil 3.22’de gösterilmiştir. Farklı sürelerdeki gliotoksin-dsDNA etkileşimi sonucu elde edilen dGuo ve dAdo’ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15’te, dGuo ve dAdo pik akımı ile etkileşim süresi arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler ise Şekil 3.23 ve Şekil 3.24’te sırasıyla verilmiştir.



Şekil 3.21. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 15 dk sürelerle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (siyah)



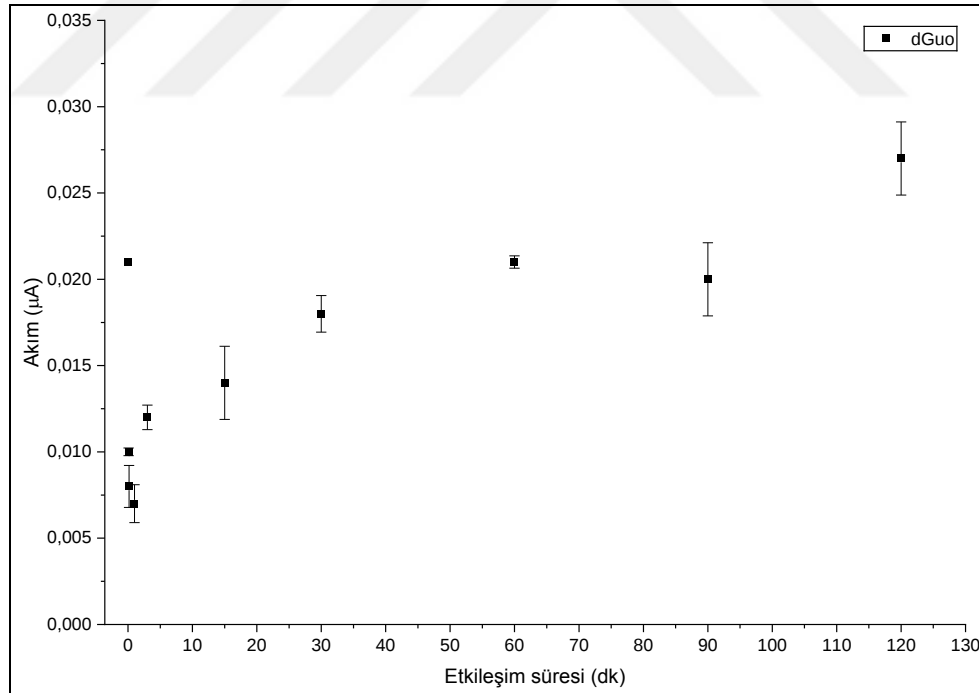
Şekil 3.22. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 15 dk – 120 dk sürelerle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 15 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (turuncu)

Çizelge 3.14. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

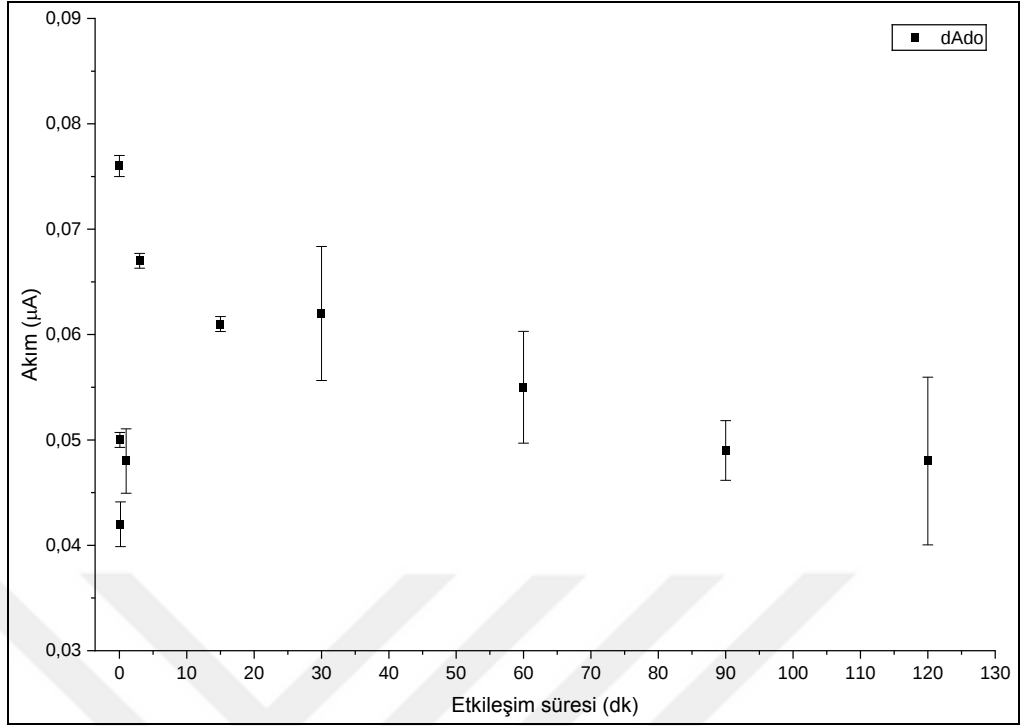
	Etkileşim süresi (sn/dk)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
dGuo sinyali	0	0,021	0,947
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim	15 dk	0,021	0,953
	5 sn	0,010	0,945
	10 sn	0,008	0,943
	1 dk	0,007	0,943
	3 dk	0,012	0,945
	15 dk	0,014	0,961
$1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile etkileşim	30 dk	0,018	0,979
	60 dk	0,021	0,983
	90 dk	0,020	0,993
	120 dk	0,027	1,000

Çizelge 3.15. %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Derişim (M)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
dAdo sinyali	0	0,078	1,231
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim	15 dk	0,076	1,229
	5 sn	0,050	1,221
	10 sn	0,042	1,227
	1 dk	0,048	1,235
	3 dk	0,067	1,225
$1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile etkileşim	15 dk	0,061	1,227
	30 dk	0,062	1,231
	60 dk	0,055	1,227
	90 dk	0,049	1,227
	120 dk	0,048	1,227

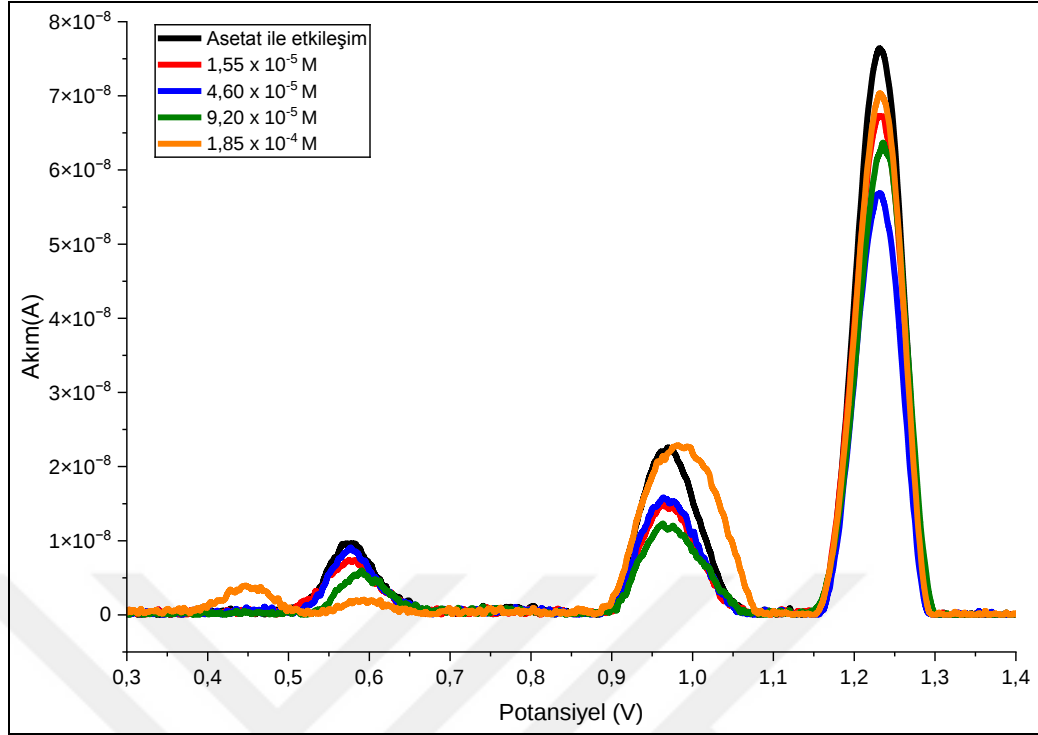


Şekil 3.23. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri



Şekil 3.24. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 5 sn – 120 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri

Gliotoksin-dsDNA etkileşiminin derişime bağlı etkisi, $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M derişim aralığında hazırlanan gliotoksin ölçüm çözeltilerinin 250 rpm'de 60 dk boyunca dsDNA ile etkileştirilmesiyle de araştırılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, $1,55 \times 10^{-5}$ M – $9,20 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında yapılan ölçümlerde dGuo pik akımında azalma gözlenmiştir. $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile etkileşimde dGuo pik akımında belirgin bir artış ve pik potansiyelinde daha pozitif potansiyel değerlerine kayma gözlemlenmiştir. Ayrıca, aynı derişimde +0,465 V potansiyelde yeni bir pik oluşumu görülmüştür (Banciu vd., 2024). $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M derişim aralığındaki gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.25'te, dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerlerindeki değişimler Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.17'de sırasıyla verilmiştir. dGuo ve dAdo pik akımı ile gliotoksin derişimi arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler ise Şekil 3.26 ve Şekil 3.27'de gösterilmiştir.



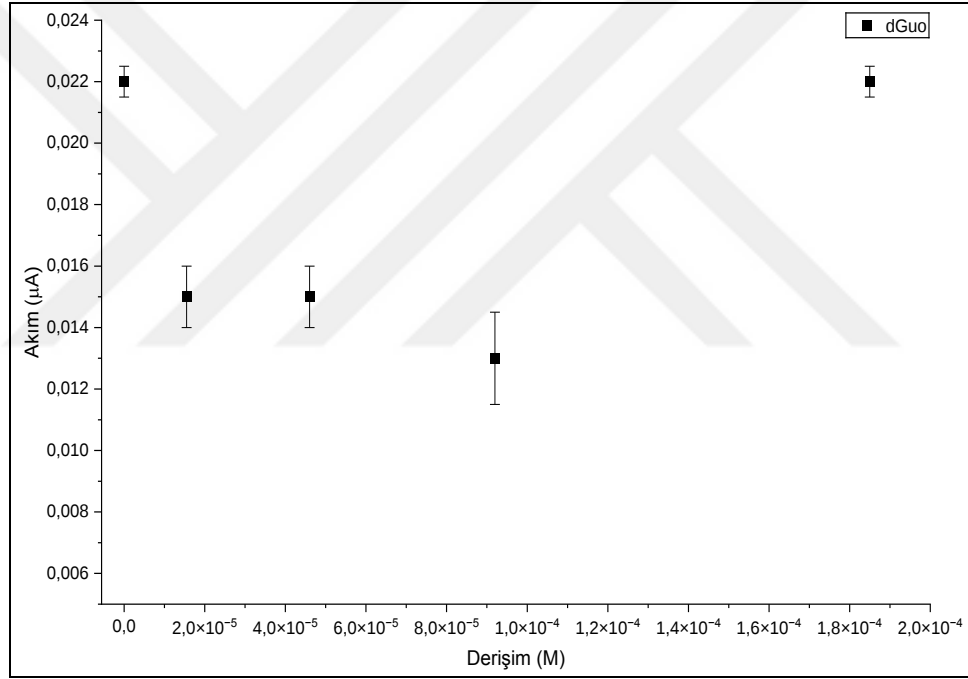
Şekil 3.25. pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 60 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (siyah)

Çizelge 3.16. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 60 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dGuo sinyaline ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

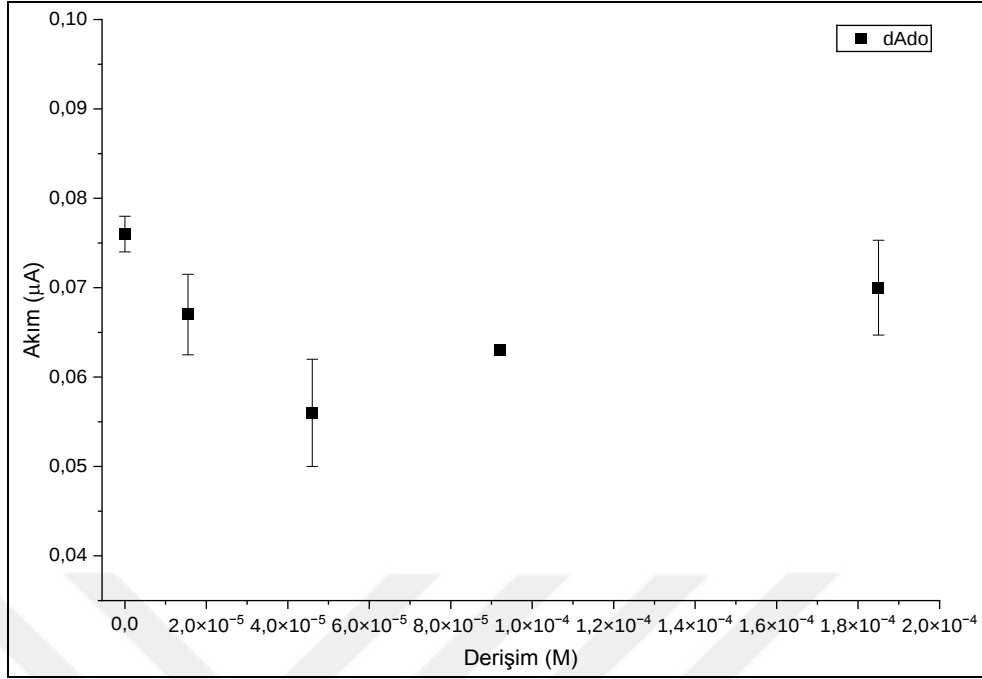
	Derişim (M)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
dGuo sinyali	0	0,021	0,957
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim (60 dk)	0	0,022	0,969
	$1,55 \times 10^{-5}$	0,015	0,961
Gliotoksin ile etkileşim (60 dk)	$4,60 \times 10^{-5}$	0,015	0,963
	$9,20 \times 10^{-5}$	0,013	0,964
	$1,85 \times 10^{-4}$	0,022	0,981

Çizelge 3.17. %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin ile 60 dk süreyle etkileşen dsDNA biyosensörünün dAdo sinyali ve pik potansiyeli verileri

	Derişim (M)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
dAdo sinyali	0	0,072	1,233
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim (60 dk)	0	0,076	1,231
	$1,55 \times 10^{-5}$	0,067	1,231
Gliotoksin ile etkileşim (60 dk)	$4,60 \times 10^{-5}$	0,056	1,233
	$9,20 \times 10^{-5}$	0,063	1,229
	$1,85 \times 10^{-4}$	0,070	1,231



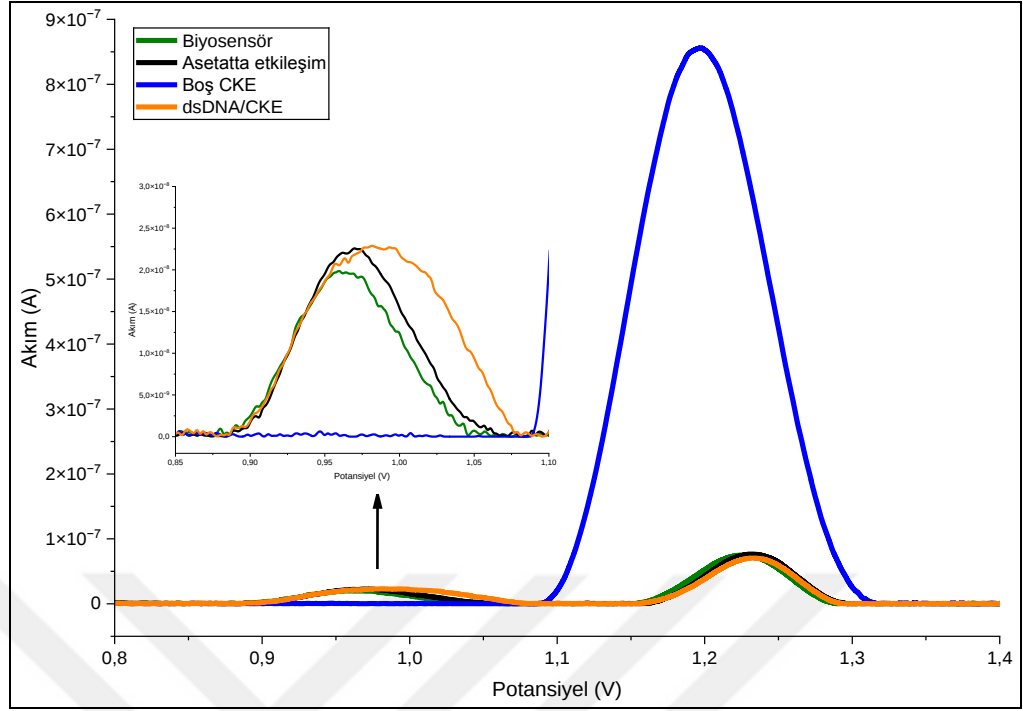
Şekil 3.26. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dGuo'ya ait pik akımı değerleri



Şekil 3.27. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değeri ile pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen dAdo'ya ait pik akımı değerleri

%20 etanol içeren pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA/CKE biyosensörü ve boş CKE ile 60 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.28'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Elde edilen pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.18 ve Çizelge 3.19'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Gliotoksinin boş CKE ile elde edilen 1,207 V'daki pik potansiyeli ile dsDNA/CKE sensörü kullanılarak 1,231 V'da gözlenen dAdo'ya ait pik potansiyelinin birbirine yakın bölgelerde olması nedeniyle, dAdo'ya ait pik akımı değerleri üzerinden net bir değerlendirme yapılamamıştır.



Şekil 3.28. %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin boş CKE (mavi) ve dsDNA/CKE biyosensörü (turuncu) ile 60 dk süre etkileşimine ait voltamogramlar. dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (yeşil), dsDNA biyosensörünün gliotoksin ile etkileşiminden önce 60 dk süreyle etanol/asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen voltamogramı (siyah)

Çizelge 3.18. %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA/CKE biyosensörü ile 60 dk süre etkileşimine ait dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

		dGuo		dAdo	
	Derişim (M)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
dsDNA Biyosensörü	0	0,020	0,960	0,075	1,225
%20 etanol + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim (60 dk)	0	0,022	0,969	0,076	1,231
Gliotoksin ile dsDNA etkileşimi (60 dk)	$1,85 \times 10^{-4}$	0,022	0,981	0,070	1,231

Çizelge 3.19. %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin boş CKE ile 60 dk süre etkileşimine ait dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Derişim (M)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
Gliotoksinin boş CKE ile etkileşimi (60 dk)	$1,85 \times 10^{-4}$	0,833	1,207

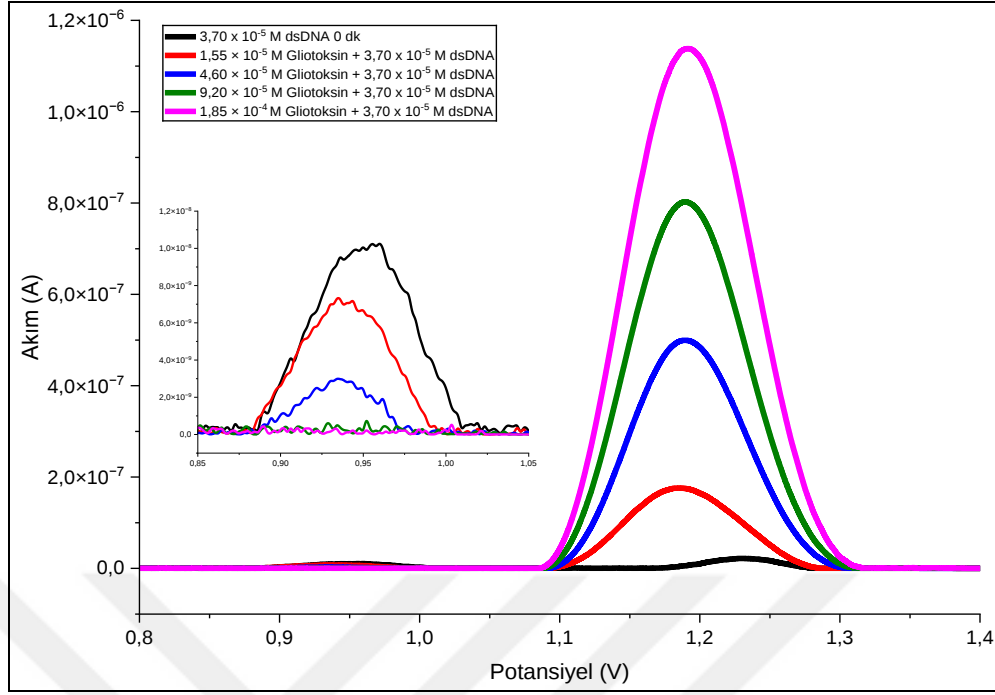
3.3.3. Çözelti Ortamında Gerçekleştirilen Gliotoksin–dsDNA Etkileşiminin dsDNA Yükseltgenme Sinyalleri ile İncelenmesi

Gliotoksin-dsDNA etkileşimi, çözelti ortamında DPV yöntemiyle incelenmiştir. dsDNA ve gliotoksin kontrol çözeltileri ile dsDNA'nın farklı gliotoksin derişimlerindeki karışım çözeltileri hazırlanarak belirli sürelerde bekletildikten sonra DPV yöntemiyle ölçüm yapılmıştır.

Gliotoksin–dsDNA'nın çözelti ortamındaki etkileşimi iki farklı aşamada incelenmiştir. İlk aşamada, $3,70 \times 10^{-5}$ M derişimindeki kontrol dsDNA çözeltisi ile $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M derişim aralığında hazırlanan kontrol gliotoksin çözeltileri ve bu çözeltilerin karışımlarına ait elektrokimyasal sinyaller, etkileşimin başlangıcında (0. dk) ölçülmüştür. Böylece, gliotoksin ve dsDNA'nın tek başına ve birlikte bulundukları ortamlardaki başlangıç elektrokimyasal davranışları değerlendirilmiştir.

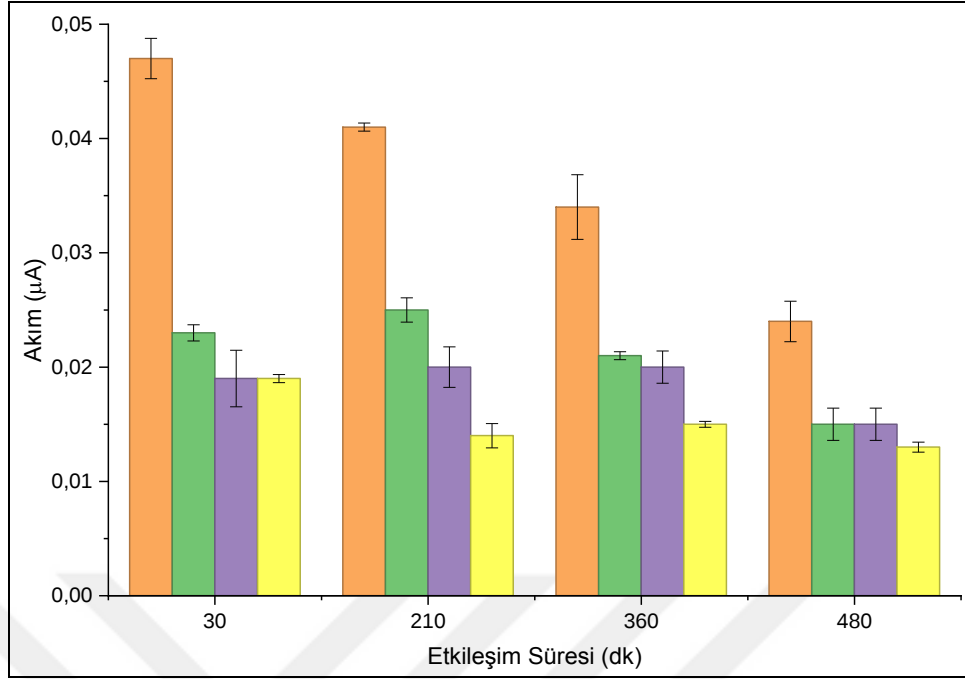
İkinci aşamada ise, $6,20 \times 10^{-6}$ M – $3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığında gliotoksin içeren çözeltiler ile $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA çözeltisi karıştırılarak hazırlanan ölçüm çözeltileri, 30 – 480 dk sürelerle etkileşime bırakılmıştır. Belirlenen sürelerin sonunda elde edilen karışımlar, aynı derişimlerde hazırlanan kontrol çözeltileriyle karşılaştırılmış; zamana bağlı gliotoksin–dsDNA etkileşiminin elektrokimyasal sinyaller üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gliotoksine ait pik potansiyelinin dAdo'nun pik potansiyeline yakın olması nedeniyle, çözelti ortamında yapılan etkileşimlerde dAdo pik akımındaki değişim değerlendirilememiştir. Bu nedenle gliotoksin–dsDNA etkileşiminin değerlendirilmesinde dGuo pik akımı dikkate alınmıştır.

Gliotoksin-dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında 0. dk'de yapılan deneylerinde dGuo sinyali için $1,55 \times 10^{-5}$ M ve $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksin derişimlerinde belirgin düşüş gözlemlenmiş olup $9,20 \times 10^{-5}$ M ve $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin derişimlerinde ise pik akımı elde edilmemiştir (Şekil 3.29).



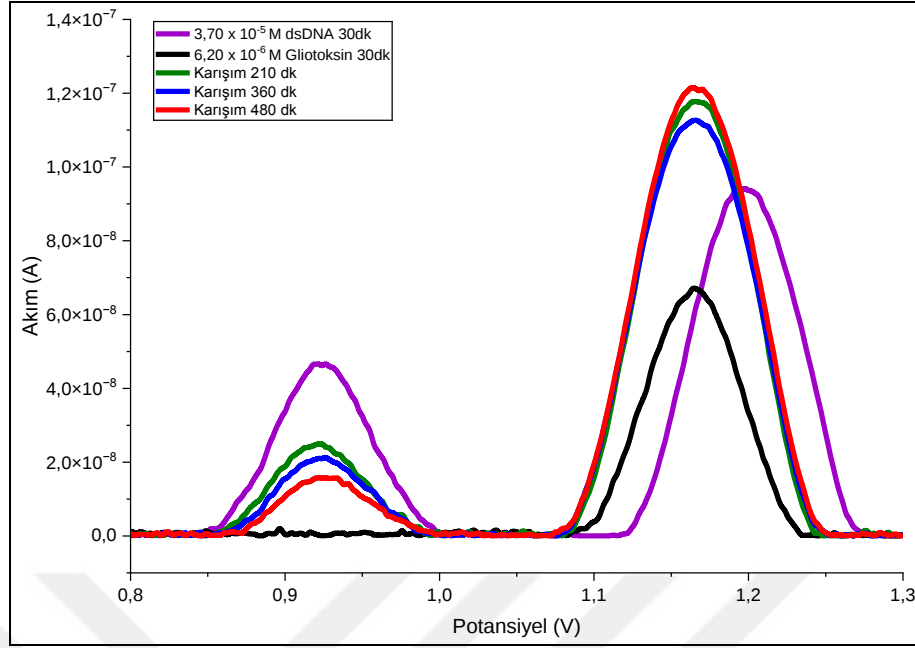
Şekil 3.29. $1,55 \times 10^{-5}$ M – $1,85 \times 10^{-4}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ile $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın 0. dk çözelti ortamındaki etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. pH 4,66 tampon çözeltisi içinde hazırlanan $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait voltamogram (siyah)

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında zamana bağılı olarak incelendiğı deneylerde, $6,20 \times 10^{-6}$ M, $1,55 \times 10^{-5}$ M ve $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin, $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA ile 30, 210, 360 ve 480 dk boyunca etkileşimi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, gliotoksin–dsDNA etkileşiminin dGuo yükseltgenme sinyalini belirgin biçimde etkilediğini ortaya koymaktadır. Özellikle etkileşimin 30. dk'de dsDNA'ya ait dGuo pik akımının yaklaşık yarı yarıya azalması, gliotoksinin dsDNA ile kısa sürede etkileşime girerek guanin bazlarının elektrokimyasal sinyalini azalttığını göstermektedir. Etkileşim süresinin 210, 360 ve 480 dk'ye uzatılmasıyla birlikte dGuo pik akımında, 30. dk'de gözlenen düşüşe göre daha sınırlı değişimler meydana gelmiştir. dGuo'ya ait pik akımının zamana ve derişime bağılı değişimi Şekil 3.30'da sütun grafiğı olarak verilmiştir.



Şekil 3.30. $6,20 \times 10^{-6}$ M (yeşil), $1,55 \times 10^{-5}$ M (mor) ve $3,10 \times 10^{-5}$ M (sarı) derişimlerde hazırlanan gliotoksin ile $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın 30 – 480 dk sürelerle çözelti ortamındaki etkileşimi sonucu dGuo'ya ait sütun grafikleri. pH 4,66 tampon çözeltisi içinde hazırlanan sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın dGuo sinyaline ait sütun grafikleri (turuncu)

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen gliotoksin derişimi ile zamana bağlı olarak incelendiği deneylerde, $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.31'de $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.20'de ve $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın 210 – 480 dk sürelerde etkileşimi sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.31. $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor), sadece $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksinin %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (siyah)

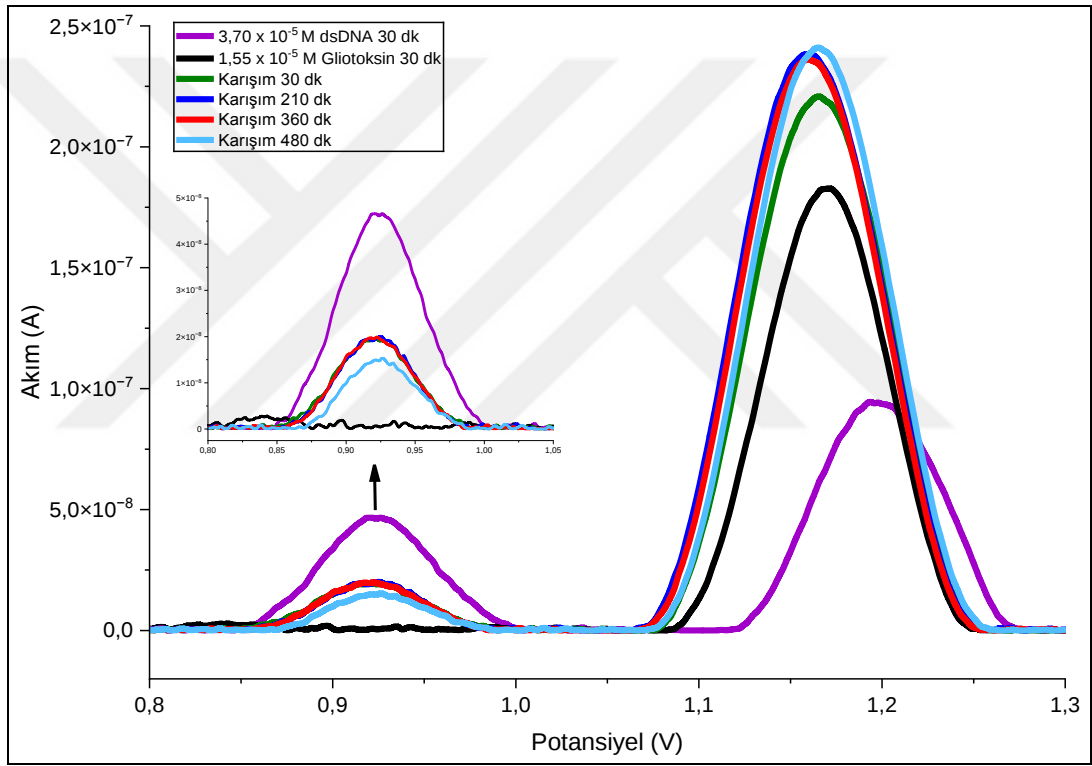
Çizelge 3.20. $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$6,20 \times 10^{-6}$ M Gliotoksin + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,067	1,164

Çizelge 3.21. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,047	0,926	0,094	1,193
Karışım 210 dk	0,025	0,924	0,117	1,166
Karışım 360 dk	0,021	0,926	0,112	1,166
Karışım 480 dk	0,015	0,926	0,121	1,164

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen gliotoksin derişimi ile zamana bağılı olarak incelendiğı deneylerde, $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.32'de $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.22'de ve $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın 30 – 480 dk sürelerde etkileşimi sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.23'te verilmiştir.



Şekil 3.32. $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor), sadece $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin %20 etanollü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (siyah)

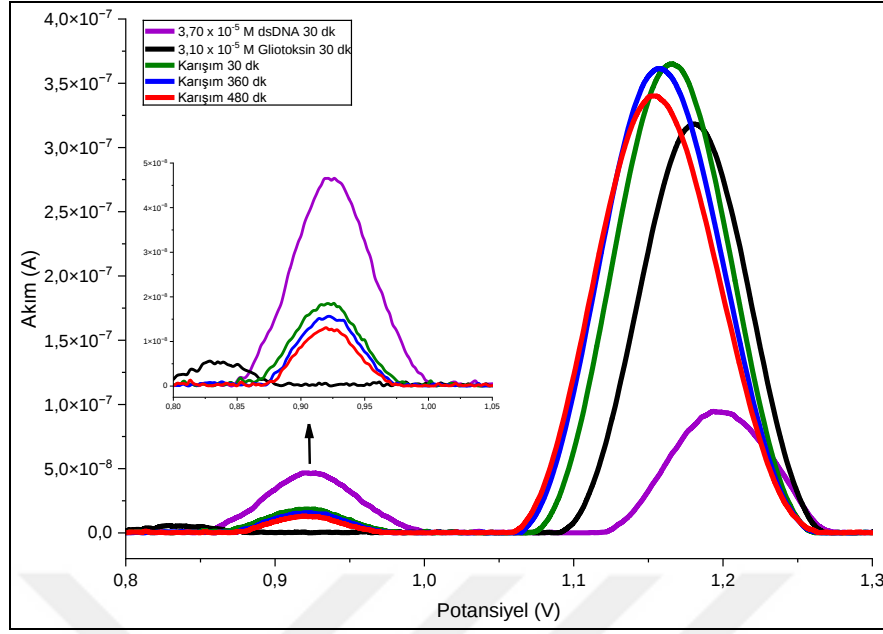
Çizelge 3.22. $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$1,55 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,183	1,172

Çizelge 3.23. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $1,55 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,047	0,926	0,094	1,193
Karışım 30 dk	0,019	0,922	0,221	1,166
Karışım 210 dk	0,020	0,926	0,238	1,158
Karışım 360 dk	0,020	0,922	0,236	1,160
Karışım 480 dk	0,015	0,926	0,241	1,166

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen gliotoksin derişimi ile zamana bağlı olarak incelendiği deneylerde, $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.33'te $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.24'te ve $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın 30 – 480 dk sürelerde etkileşimi sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.25'te verilmiştir.



Şekil 3.33. $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor), sadece $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin %20 etanolü pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde 30 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (siyah)

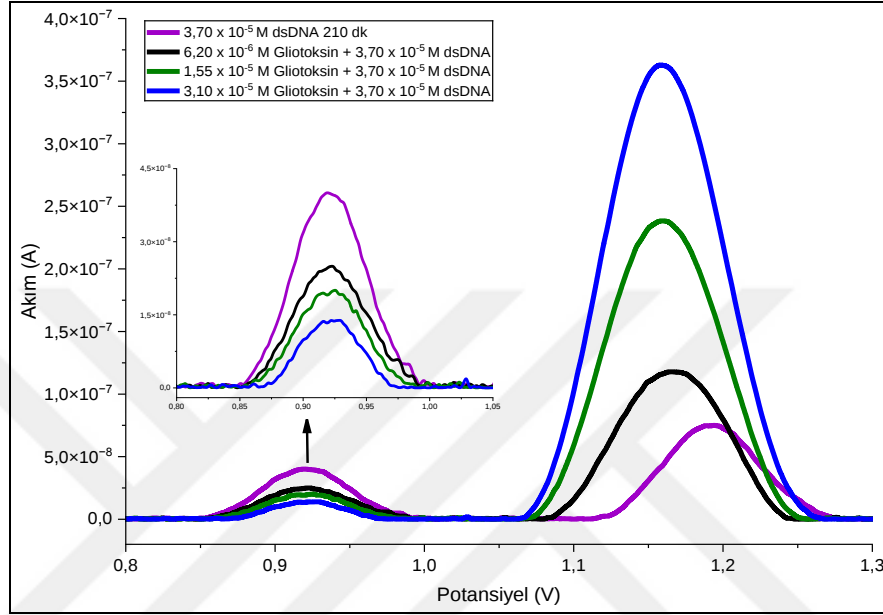
Çizelge 3.24. $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile 30 dk süre etkileşimine ait gliotoksine ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,10 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,318	1,180

Çizelge 3.25. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 30 dk süreyle etkileşim sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $3,10 \times 10^{-5}$ M gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 30 – 480 dk sürelerle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 30dk	0,047	0,926	0,094	1,193
Karışım 30 dk	0,019	0,926	0,337	1,166
Karışım 360 dk	0,015	0,922	0,360	1,158
Karışım 480 dk	0,013	0,920	0,340	1,154

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen sürelerde değişen gliotoksin derişimine bağı olarak incelendiği deneylerde, $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.34'te ve etkileşim sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri Çizelge 3.26'da verilmiştir.

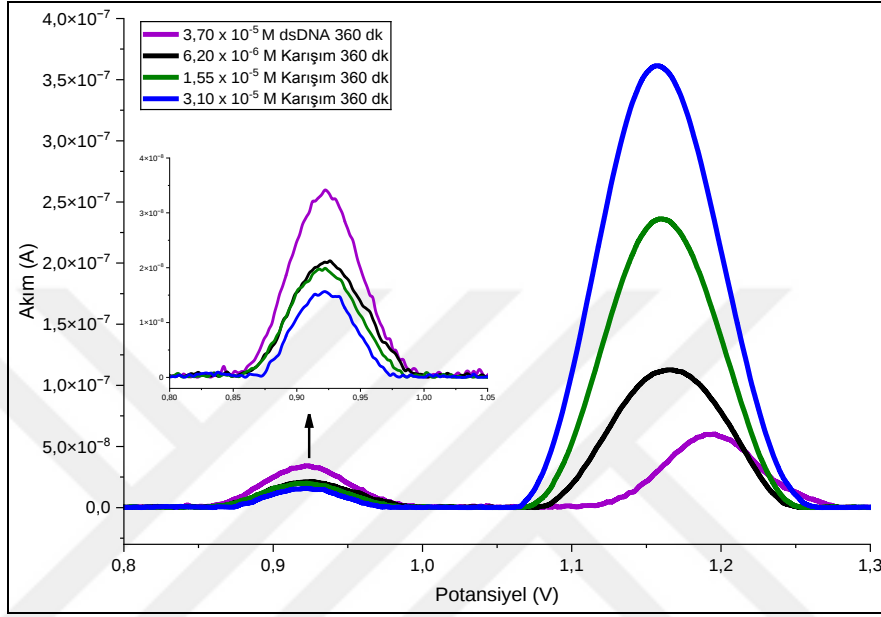


Şekil 3.34. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 210 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor)

Çizelge 3.26. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 210 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
3,70 $\times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 210dk	0,041	0,918	0,075	1,193
6,20 $\times 10^{-6}$ M Gliotoksin ve 3,70 $\times 10^{-5}$ M dsDNA	0,025	0,924	0,117	1,166
1,55 $\times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve 3,70 $\times 10^{-5}$ M dsDNA	0,020	0,926	0,238	1,158
3,10 $\times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve 3,70 $\times 10^{-5}$ M dsDNA	0,014	0,922	0,363	1,158

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen sürelerde değişen gliotoksin derişimine bağı olarak incelendiği deneylerde, $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 360 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.35'te ve etkileşim sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.27'de verilmiştir.

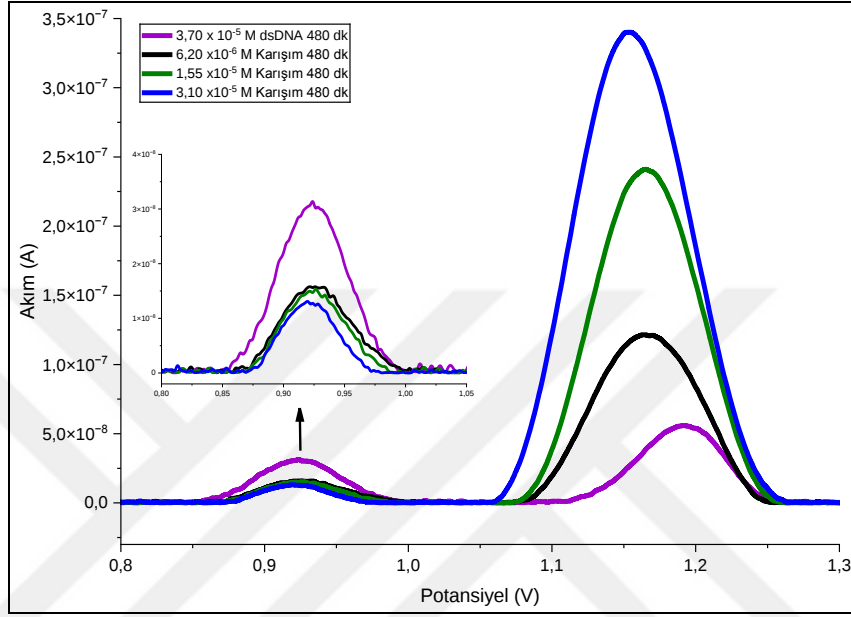


Şekil 3.35. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 360 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 360 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor)

Çizelge 3.27. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 360 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 360 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 360dk	0,034	0,922	0,061	1,195
$6,20 \times 10^{-6}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,021	0,926	0,122	1,166
$1,55 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,020	0,922	0,236	1,160
$3,10 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,015	0,922	0,360	1,158

Gliotoksin–dsDNA etkileşiminin çözelti ortamında sabit seçilen sürelerde değişen gliotoksin derişimine bağı olarak incelendiği deneylerde, $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 210 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar Şekil 3.36'da ve etkileşim sonrası dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli değerleri Çizelge 3.28'de verilmiştir.



Şekil 3.36. $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 480 dk süreyle etkileşimi sonucu elde edilen voltamogramlar. Sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın pH 4,66 tampon çözeltisi içinde 480 dk süreyle etkileşimine ait voltamogram (mor)

Çizelge 3.28. pH 4,66 tampon çözeltisi ile 480 dk süreyle etkileşimi sonucu sadece $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'ya ait dGuo ve dAdo verileri ile $6,20 \times 10^{-6} - 3,10 \times 10^{-5}$ M derişim aralığındaki gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA'nın çözelti ortamında 480 dk süreyle etkileşimi sonucu dGuo ve dAdo'ya ait pik akımı ve pik potansiyeli verileri

	dGuo		dAdo	
	Akım (μ A)	Potansiyel (V)	Akım (μ A)	Potansiyel (V)
$3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA + pH 4,66 asetat tampon çözeltisi ile etkileşim 480dk	0,032	0,924	0,056	1,191
$6,20 \times 10^{-6}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,015	0,926	0,121	1,164
$1,55 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,015	0,926	0,241	1,166
$3,10 \times 10^{-5}$ M Gliotoksin ve $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA	0,013	0,920	0,340	1,154

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, ETP sınıfına ait bir mikotoksin olan gliotoksinin bağışıklık sistemi üzerinde baskılayıcı etki gösteren, oksidatif stres, DNA hasarı ve apoptoza yol açarak hücre ve doku hasarına neden olan etkilerinin açıklanması için uygun, hassas ve güvenilir elektrokimyasal yöntemlerin geliştirilmesi ve gliotoksinin dsDNA ile olan etkileşiminin açıklanması amaçlanmıştır.

Literatürde rapor edilen çalışmalara göre, gliotoksinin elektrokimyasal davranışının boş CKE kullanılarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, literatürde gliotoksin-dsDNA etkileşiminin CKE tabanlı bir dsDNA biyosensörü kullanılarak incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması, bu tez çalışmasının özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Yöntem geliştirme çalışmalarından önce, stok çözeltilerinin hazırlanmasında ve tüm analizlerde kullanılacak gliotoksin maddesinin saflığı, temin edildiği Apollo Scientific firması tarafından sağlanan sertifika ile doğrulanmıştır.

Boş CKE, BKEE ve KDPGE madde 2.6.'da anlatıldığı gibi mekanik bir ön işlem ile temizlenmiştir. Farklı elektrotlarla elde edilen sinyallerin karşılaştırılması sonucunda, CKE ile gözlenen daha yüksek ve tekrarlanabilir pik akımları, bu elektrodun gliotoksinin elektrokimyasal tayini için daha uygun bir çalışma elektrodu olduğunu göstermiştir.

Gliotoksinin elektrokimyasal davranışı, boş CKE üzerinde DV, DPV ve KDV yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Ölçüm koşulları madde 2.6'da verilen parametreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. dsDNA/CKE biyosensörü ve dsDNA ile gliotoksinin çözelti ortamındaki etkileşim çalışmalarında ise DPV yöntemi tercih edilmiş olup, yöntem parametreleri madde 2.6.1'de verilmiştir.

Gliotoksinin yükseltgenme davranışı, pH değerleri 3,62; 4,66 ve 5,69 olan asetat tampon çözeltisi; 2,36; 2,91; 5,91; 7,05 ve 8,19 pH değerlerine sahip fosfat tampon çözeltisi ve 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi ortamında boş CKE kullanılarak araştırılmıştır. pH'ın pik akımı üzerindeki etkisi incelendiğinde, gliotoksinin asidik ortamlarda daha yüksek ve tekrarlanabilir sinyaller verdiği; en yüksek pik akımının ise pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ortamında DPV yöntemi ile elde edildiği belirlenmiştir.

Hız taraması deneyleri, pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi ortamında $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksin çözeltisi kullanılarak DV yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Deneylerde 0,005 – 0,500 V/s aralığındaki tarama hızları uygulanmış ve madde taşınma mekanizması değerlendirilmiştir.

Hız taraması verilerinden elde edilen doğruların denklemleri;

$$i_p (\mu A) = 3,582 v^{1/2} (V/s) + 0,101 \quad r: 0,990 \quad (n: 7)$$

$$\log i_p (\mu A) = 0,488 \log v (V/s) + 0,593 \quad r: 0,994 \quad (n: 7)$$

$$E_p (V) = 0,037 \log v (V/s) + 1,299 \quad r: 0,998 \quad (n: 7) \quad \text{şeklindedir.}$$

Tarama hızının artmasıyla pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kayması ve $\log v - E_p$ grafiğinin doğrusal olması, elektrokimyasal sürecin kinetik olarak kontrol edildiğini ve geri dönüşümsüz bir mekanizma ile gerçekleştiğini göstermektedir. $\log i_p - \log v$ grafiğinden elde edilen eğim değerinin 0,5'e yakın olması ve $i_p - v^{1/2}$ grafiğinin doğrusal olması, gliotoksinin CKE yüzeyine çözeltiden difüzyon yoluyla taşındığını göstermektedir (Aoki ve Chen, 2018).

Gliotoksinin boş CKE üzerindeki elektrokimyasal davranışının belirlenmesinin ardından, gliotoksin-dsDNA etkileşimi hem dsDNA biyosensörü kullanılarak hem de çözelti ortamında gerçekleştirilen etkileşim çalışmalarıyla incelenmiştir. dsDNA/CKE biyosensörü ile 15 dk'lık etkileşim süresinde gerçekleştirilen derişim taraması sonuçlarına göre, düşük gliotoksin derişimlerinde dGuo ve dAdo pik akımlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin derişiminden itibaren daha yüksek derişimlerde dGuo pik akımında belirgin düşüşler gözlenmiştir. Bu durum, belirli bir derişimin üzerinde gliotoksinin dsDNA yapısıyla daha güçlü etkileşime girerek dGuo'da yapısal değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.

$1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin derişiminde 5 sn – 120 dk arasında gerçekleştirilen süre taraması deneylerinde, 60. dk'den itibaren özellikle dGuo pik akımında artış ve pik potansiyelinde pozitif yöne kayma gözlenmiştir. 90 ve 120. dk'de elde edilen sonuçların 60. dk ile benzer olması nedeniyle, optimal etkileşim süresi 60 dk olarak seçilmiştir.

Özellikle dGuo pikinde gözlenen değişimler, gliotoksin-dsDNA etkileşiminin guanin bazlarının yapısında değişikliğe neden olduğunu göstermektedir. dGuo pik akımındaki azalmayla birlikte pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kayması ve simetrik

pik formunun bozulması, gliotoksin ile guanin bazları arasında güçlü bir etkileşim gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Gliotoksin ile dsDNA arasındaki etkileşim, gliotoksinin disülfid köprüsünün redoks aktif yapısı nedeniyle DNA üzerinde oksidatif hasara yol açabilme potansiyeli üzerinden değerlendirilmiştir (Eichners vd., 1988). Elde edilen deneysel sonuçlar neticesinde oksidatif DNA hasarının biyobelirtecinin meydana geldiği gözlenmiştir. $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksinin dsDNA biyosensörü ile 60 dk etkileşimine ait voltamogramlar incelendiğinde (Şekil 3.25) +0,465 V'da elde edilen yeni pikin 8-oksoguanine (8-oxoG) ait olduğu (Abreu vd., 2002; Golden vd., 1998; Oliveira Brett, 2000) ve gliotoksin-dsDNA etkileşimi sonucu oluştuğu düşünülmektedir.

Boş ve dsDNA immobilize CKE kullanılarak elde edilen voltamogramların karşılaştırılması (Şekil 3.28), dGuo pik akımında gözlenen değişimlerin doğrudan gliotoksin-dsDNA etkileşiminden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Gliotoksinin pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde boş CKE ile 60 dk etkileşimi sonucu 1,207 V'da elde edilen yükseltgenme piki, dsDNA varlığında gözlenen dGuo pik sinyali ile potansiyel açısından çakışmamaktadır. Bu durum, dGuo pik akımındaki değişimlerin gliotoksinin kendi yükseltgenme sinyalinden kaynaklanan bir girişimden ziyade, gliotoksinin dsDNA ile etkileşimi sonucu dsDNA yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklandığını göstermektedir.

dsDNA biyosensöründe, $1,85 \times 10^{-4}$ M ve üzerindeki gliotoksin derişimlerinde ve artan etkileşim sürelerinde dGuo pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kayması gliotoksin-dsDNA etkileşiminin interkalatif bağlanma mekanizmasıyla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir (Guzhan Kaya vd., 2025). Özellikle dGuo pik potansiyelinin daha pozitif değerlere kayması, guanin bazlarının yükseltgenmesi için elektron transfer sürecinin zorlaştığını göstermektedir. Pik formundaki bozulma ile değerlendirildiğinde, gliotoksinin özellikle guanin açısından zengin bölgelerde baz çiftleri arasına yerleşerek dsDNA'nın yapısında değişiklikler oluşabileceği, bu nedenle, gliotoksin-dsDNA etkileşiminde guanin bazları üzerinden gözlenen sinyal değişimlerinin interkalasyon mekanizmasıyla uyumlu olabileceği düşünülmektedir.

dsDNA/CKE biyosensörü ile elde edilen verilere göre, dAdo pik akımında gözlenen düşüşlerin düzenli olmadığı sonucuna varılmıştır, bu durumun gliotoksinin dAdo sinyali ile aynı yerde pik vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çözelti ortamında yapılan 0. dk'de gliotoksin-dsDNA etkileşimine ait deney sonuçlarında, dGuo pik akımının $1,55 \times 10^{-5}$ M ve $4,60 \times 10^{-5}$ M gliotoksin derişimlerinde belirgin şekilde azaldığı, daha yüksek gliotoksin derişimlerinde ise pik akımının tamamen kaybolduğı gözlemlenmiştir.

pH 4,66 asetat tampon çözeltisi içerisinde %20 etanol varlığında hazırlanan $6,20 \times 10^{-6}$ M, $1,55 \times 10^{-5}$ M ve $3,10 \times 10^{-5}$ M derişimlerdeki gliotoksin çözeltilerinin, $3,70 \times 10^{-5}$ M derişimindeki dsDNA ile çözelti ortamında 30 dk etkileşimi sonucunda elde edilen dGuo pik akımları; pH 4,66 asetat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanan yalnızca $3,70 \times 10^{-5}$ M dsDNA içeren %100 kabul edilen kontrol çözeltisine göre sırasıyla %48,94, %40,43 ve %40,43 olarak elde edilmiştir. Bu durum, gliotoksinin dsDNA'ya guanin bazılarının üzerinden başlangıçta hızlı bir şekilde bağlandığını, daha uzun inkübasyon sürelerinde ise sistemin doygunluğa ulaştığını göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ETP sınıfına ait önemli bir mikotoksin olan gliotoksinin elektrokimyasal davranışı ayrıntılı olarak incelenmiş ve gliotoksinin dsDNA ile etkileşimini belirlemeye yönelik CKE tabanlı bir dsDNA biyosensörü geliştirilmiştir.

Farklı çalışma elektrotlarının karşılaştırılması sonucunda, en yüksek ve tekrarlanabilir sinyallerin CKE ile elde edilmesi nedeniyle gliotoksinin tayininde uygun çalışma elektrodu olarak CKE seçilmiştir. Gliotoksinin yükseltgenme pik akımının, özellikle asidik ortamda daha yüksek olduğu; en yüksek pik akımının elde edildiği destek elektrolit ortamının ise pH 2,91 fosfat tampon çözeltisi olduğu belirlenmiştir. Tarama hızı çalışmaları, gliotoksinin elektrokimyasal yükseltgenmesinin geri dönüşümsüz ve difüzyon kontrollü bir mekanizma ile gerçekleştiğini göstermiştir.

Geliştirilen dsDNA/CKE biyosensörü ile yapılan etkileşim çalışmalarında, gliotoksin-dsDNA etkileşimi için optimum koşulların pH 4,66 asetat tampon çözeltisinde hazırlanan $1,85 \times 10^{-4}$ M gliotoksin derişimi ve 60 dk etkileşim süresi olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda özellikle dGuo sinyalinde gözlenen değişimler, gliotoksinin dsDNA ile etkileşiminde guanin bazının yapısını değiştirdiğini göstermiştir. dAdo sinyalindeki değişimlerin ise düzenli bir değişim göstermediği belirlenmiştir.

Voltametrik bulgular, gliotoksinin dsDNA üzerinde yalnızca bağlanma değil, aynı zamanda oksidatif hasar oluşturabildiğini de göstermiştir. +0,465 V'ta gözlenen yeni pik, 8-oxoG oluşumu ile ilişkilendirilmiş ve gliotoksinin özellikle guanin bazında oksidasyona neden olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca dGuo pik potansiyelindeki pozitif kayma ve pik formundaki bozulmaların gliotoksin-dsDNA etkileşiminin interkalatif bağlanma mekanizmasıyla gerçekleşebileceğini göstermiştir.

Bu çalışma ile literatürde ilk kez boş CKE üzerinde gliotoksinin elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve yalnızca dsDNA kullanılarak geliştirilen CKE tabanlı bir biyosensörün gliotoksin ile etkileşimi açıklanmaya çalışılmıştır. Bu yönüyle çalışma özgün nitelik taşımaktadır. Ayrıca geliştirilen sensörün gelecekte gliotoksinin toksikolojik ve gıda analizlerinde hızlı ve düşük maliyetli bir tayin yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abreu, D. S., Sousa, T. P., Castro, C. B., Sousa, M. N. V., Silva, T. T., Almeida-Neto, F. W. Q., Queiros, M. V. A., Rodrigues, B. S. F., Oliveira, M. C. F., Paulo, T. F., Cavada, B. S., Nascimento, K. S., Temperini, M. L. A., and Diógenes, I. C. N. (2017). SAM of Gliotoxin on Gold: A Natural Product Platform for Sugar Recognition based on the Immobilization of *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr). *Electrochimica Acta*, 241, 116–123. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2017.04.099>
- Abreu, F. C., Goulart, M. O. F., and Oliveira Brett, A. M. (2002). Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(11–12), 913–919. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(02\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(02)00082-9)
- Albery, W. J., and Hillman, A. R. (1981). Chapter 10. Modified electrodes. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, 78(0), 377–437. <https://doi.org/10.1039/PC9817800377>
- Antignac, J. P., Le Bizec, B., Monteau, F., and Andre, F. (2003). Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. *Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01379-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01379-X)
- Aoki, K. J., and Chen, J. (2018). Tips of Voltammetry. In Voltammetry. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81341>
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Aristov, N., and Habekost, A. (2015). Cyclic Voltammetry - A Versatile Electrochemical Method Investigating Electron Transfer Processes. *World Journal of Chemical Education*, Vol. 3, 2015, Pages 115-119, 3(5), 115–119. <https://doi.org/10.12691/WJCE-3-5-2>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Nwozo, S., Odongo, G. A., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Adeleye, A. O., and Okpala, C. O. R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins* 2022, Vol. 14, Page 167, 14(3), 167. <https://doi.org/10.3390/TOXINS14030167>
- Bakshi, M., and Singh, S. (2002). Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(6), 1011–1040. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00047-X)
- Banciu, D., Porat, ev, and Murray, R. W. (2024). Electrochemical Characterization of Diffusion in Polymeric vs. Monomeric Solvents. *International Journal of Molecular Sciences* 2024, Vol. 25, Page 4472, 25(8), 4472. <https://doi.org/10.3390/IJMS25084472>

- Bhatla, S. C., Lal, M. A., Bhatla, S. C., and Lal, M. A. (2023). Secondary Metabolites. *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 765–808. https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33
- Bills, G. F., and Gloer, J. B. (2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0009-2016>
- Bond, A. M. (1980). *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker Inc.
- Bora, U., Bora, U., Sett, A., and Singh, D. (2013). Nucleic Acid Based Biosensors for Clinical Applications. *Biosensors Journal*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2090-4967.1000104>
- Braithwaite, A. W., Eichner, R. D., Waring, P., and Müllbacher, A. (1987). The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. *Molecular Immunology*, 24(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(87\)90110-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(87)90110-6)
- Brett, C. (2009). Fundamentals of Electrochemistry. *Piezoelectric Transducers and Applications*, 223–239. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77508-9_8
- Cerdà, V. (2005). Polarography. In *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 187–193). Academic Press- Elsevier.
- Chavan, S. D., and Desai, D. M. (2022). Analytical method validation: A brief review. *Journal of Advanced Research and Reviews*, 2022(02), 389–402. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1165>
- Cheraghi, S., Şenel, P., Dogan Topal, B., Agar, S., Majidian, M., Yurtsever, M., Bellur Atici, E., Gölcü, A., and Ozkan, S. A. (2023). Elucidation of DNA-Eltrombopag Binding: Electrochemical, Spectroscopic and Molecular Docking Techniques. *Biosensors 2023, Vol. 13, Page 300, 13(3)*, 300. <https://doi.org/10.3390/BIOS13030300>
- Cinar, A. O. E. (2020). Mycotoxins and Food Safety. In S. Sabuncuoglu (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety* (pp. 43–44). BoD – Books on Demand. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=uGotEAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA43&dq=mycotoxins&ots=L24Uk4BGwF&sig=v19j1blCRP6zVu_CTvmzidZKAfc&redir_esc=y#v=onepage&q=mycotoxins&f=false
- Clark, L. C., and Lyons, C. (1962). ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.1962.TB13623.X>
- Comas, L., Polo, E., Domingo, M. P., Hernández, Y., Arias, M., Esteban, P., Martínez-Lostao, L., Pardo, J., Fuente, J. M. de la, Gálvez, E. M., Comas, L., Polo, E., Domingo, M. P., Hernández, Y., Arias, M., Esteban, P., Martínez-Lostao, L., Pardo, J., Fuente, J. M. de la, and Gálvez, E. M. (2019). Intracellular Delivery of Biologically-Active Fungal Metabolite Gliotoxin Using Magnetic Nanoparticles. *Materials* 2019, Vol. 12, 12(7). <https://doi.org/10.3390/MA12071092>

- Cruz-Pacheco, A. F., Avendaño, S., and Orozco, J. (2026). Portable electrochemical sensing, chemometrics, and data-driven analytics for pharmaceutical monitoring. *Electrochimica Acta*, 545, 147759. <https://doi.org/10.1016/J.ELECTACTA.2025.147759>
- Daley, D. K., Brown, K. J., and Badal, S. (2017). Fungal Metabolites. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy*, 413–421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00020-2>
- Davis, C., Gordon, N., Murphy, S., Singh, I., Kavanagh, K., Carberry, S., and Doyle, S. (2011). Single-pot derivatisation strategy for enhanced gliotoxin detection by HPLC and MALDI-ToF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(8), 2519–2529. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-5344-1>
- Delbaje, E., de Castro, P. A., Pupo, M. T., Rokas, A., and Goldman, G. H. (2025). Gliotoxin Production and Self-Defense in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 79(1), 171–190. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-040324-032342>
- Dolan, S. K., O’Keeffe, G., Jones, G. W., and Doyle, S. (2015). Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. *Trends in Microbiology*, 23(7), 419–428. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.02.005>
- Eggins, B. R. . (1996). *Biosensors: an Introduction*. Vieweg+Teubner Verlag.
- Eichners, R. D., Waring, P., Geue, A. M., Braithwaite, A. W., and Mullbacher, A. (1988). Gliotoxin Causes Oxidative Damage to Plasmid and Cellular DNA*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(5), 3772–3777. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68990-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68990-2)
- Fomichov, S., Linyucheva, O., Vasyliov, G., and Chvertko, Y. (2025). Chapter 1 Basics of Chemistry and Electrochemistry. In *Corrosion of Welded Structures : Part F3739* (p. 47). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-68993-2>
- Fukuyama, T., Nakatsuka, S. I., and Kishi, Y. (1981). Total synthesis of gliotoxin, dehydrogliotoxin and hyalodendrin. *Tetrahedron*, 37(11), 2045–2078. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97960-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97960-8)
- Gao, S., Zheng, X., Tang, Y., Cheng, Y., Hu, X., and Wu, J. (2019). Development of a Fluorescently Labeled Aptamer Structure-Switching Assay for Sensitive and Rapid Detection of Gliotoxin. *Analytical Chemistry*, 91(2), 1610–1618. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05094>
- Gholami, T., and Pirsahab, M. (2021). Review on effective parameters in electrochemical hydrogen storage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(1), 783–795. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2020.10.003>
- Golden, M. C., Hahm, S. J., Elessar, R. E., Saksonov, S., and Steinberg, J. J. (1998). DNA damage by gliotoxin from *Aspergillus fumigatus*. An occupational and environmental propagule: adduct detection as measured by ³²P DNA radiolabelling and two-dimensional thin-layer chromatography. *Mycoses*, 41(3–4), 97–104. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0507.1998.TB00308.X>

- Gosser, D. K. (1993). *Cyclic voltammetry : simulation and analysis of reaction mechanisms*. VCH, New York, N.Y.
- Grovel, O., Kerzaon, I., Petit, K., Robiou Du Pont, T., and Pouchus, Y. F. (2006). A new and rapid bioassay for the detection of gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines produced by fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2005.12.005>
- Guzhan Kaya, H. O. ¸, Bozdemir, C., Istanbulu, H. ¸, and Topkaya, S. N. (2025). Probing Redox Responses and DNA Interactions in Drug Discovery. *Drugs and Drug Candidates 2025, Vol. 4, Page 20, 4(2)*, 20. <https://doi.org/10.3390/DDC4020020>
- Haddad, P. R. (1990). Electrochemical Detection (Amperometry, Voltammetry and Coulometry). In P. R. Haddad (Ed.), *Journal of Chromatography Library* (Vol. 46, Number C, pp. 291–321). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)61142-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)61142-2)
- International Council for Harmonisation. (2023). *ICH Q2(R2) Guideline: Validation of Analytical Procedures*. [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2\(R2\)_Guideline_2023_1130.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2(R2)_Guideline_2023_1130.pdf)
- Inzelt, G., Lewenstam, A., and Scholz, F. (2013). Handbook of reference electrodes. In *Handbook of Reference Electrodes*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36188-3>
- Jagner, D., and Graneli, A. (1976). Potentiometric stripping analysis. *Analytica Chimica Acta*, 83(C), 19–26. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)84627-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84627-4)
- Jain, R., Jadon, N., and Radhapyari, K. (2007). Cathodic adsorptive stripping voltammetric studies on lamivudine: An antiretroviral drug. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313(1), 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2007.04.003>
- Juraschek, L. M., Kappenberg, A., and Amelung, W. (2022). Mycotoxins in soil and environment. *Science of The Total Environment*, 814, 152425. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152425>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., and Bhargava, K. (2015). Introduction to Biosensors. In *Biosensors and Bioelectronics* (pp. 1–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Kaur, H., Bhosale, A., and Shrivastav, S. (2018). Biosensors: Classification, Fundamental Characterization and New Trends: A Review. *International Journal of Health Sciences & Research (Www.Ijhsr.Org)*, 8, 333.
- Kawagoe, K. T., Zimmerman, J. B., and Wightman, R. M. (1993). Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of Neuroscience Methods*, 48(3), 225–240. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(93\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(93)90094-8)

- Komorsky-Lovrić, Š. (2010). Working Electrodes. In *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications* (pp. 273–290). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02915-8_14
- Lemay, S. G., Renault, C., and Dick, J. E. (2023). Particle mass transport in impact electrochemistry. *Current Opinion in Electrochemistry*, 39, 101265. <https://doi.org/10.1016/J.COEELEC.2023.101265>
- Lovrić, M. (2009). Stripping voltammetry. In *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications* (pp. 201–221). Springer Berlin Heidelberg.
- Lu, S. M., Chen, J. F., Wang, H. F., Hu, P., and Long, Y. T. (2023). Mass Transport and Electron Transfer at the Electrochemical-Confined Interface. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 14(5), 1113–1123. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.2c03479>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., Valiante, V., and Brakhage, A. A. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50(Volume 50, 2016), 371–392. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/J.JOBCR.2015.12.002>
- Mendoza, S., Bustos, E., Manríquez, J., and Godínez, L. A. (2015). Voltammetric Techniques. *Agricultural and Food Electroanalysis*, 21–48. <https://doi.org/10.1002/9781118684030.CH2>
- Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., Kappl, R., and Hoth, M. (2013). Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*, 25(11), 2411–2422. <https://doi.org/10.1002/ELAN.201300369>
- Nouri, M. A., Al-Halbosiy, M. M. F., Dheeb, B. I., and Hashim, A. J. (2015). Cytotoxicity and genotoxicity of gliotoxin on human lymphocytes in vitro. *Journal of King Saud University - Science*, 27(3), 193–197. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2014.12.005>
- Oliveira Brett A. M., P. J. A. P. , S. S. H. (2000). Electrochemical Oxidation of 8- Oxoguanine. *Electroanalysis*, 12(12), 969–973.
- Onur, F. (2011). *Analitik Kimya II*. Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Orhan, D. E., Cetinkaya, A., Aybi, E. N., Unal, M. A., Nazir, H., Ozkan, S. A., Ates, I., and Dogan-Topal, B. (2025). Evaluation of the interaction mechanism of dsDNA-propofol binding: Electrochemical, thermodynamic, molecular docking studies and comet assay. *Microchemical Journal*, 213, 113647. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2025.113647>
- Orhan, D. E., Yildiz, M. M., Aybi, E. N., and Dogan Topal, B. (2025). Recent Advances in Electrochemical Affinity Biosensors: Detection of Biological Toxin Agents. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408347.2025.2501709>

- Osteryoung, J. (1993). Voltammetry for the Future. *Accounts of Chemical Research*, 26(3), 77–83.
- Ozkan, S. A., and Uslu, B. (2016). From mercury to nanosensors: Past, present and the future perspective of electrochemistry in pharmaceutical and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 126–140. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2016.05.006>
- Özkan, S., and Biryol, İ. (1993). Sıyırma Voltametrisi. *FABAD Farmasötik Bilimler Dergisi*, 18, 41–49.
- Patel, R., Hossain, M. A., German, N., and Al-Ahmad, A. J. (2018). Gliotoxin penetrates and impairs the integrity of the human blood-brain barrier in vitro. *Mycotoxin Research*, 34(4), 257–268. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0320-7>
- Pena, G. A., Monge, M. P., González Pereyra, M. L., Dalcerro, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., and Cavaglieri, L. R. (2015). Gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* strains from animal environment. Micro-analytical sample treatment combined with a LC-MS/MS method for gliotoxin determination. *Mycotoxin Research*, 31(3), 145–150. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0225-7>
- Petrovic, S. (2020). Electrochemistry crash course for engineers. In *Electrochemistry Crash Course for Engineers*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-61562-8>
- Pohanka, M., and Skládal, P. (2008). Electrochemical biosensors-principles and applications. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE*, 6, 57–64.
- Popov, B. N. (2015). Electrochemical Kinetics of Corrosion. *Corrosion Engineering*, 93–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62722-3.00003-3>
- Prasad, M. N. V., Tetali, S. D., and Bennetau-Pelissero, C. (2025). Biotoxins: Biotechnological and Therapeutic Applications. *Biotoxins: Biotechnological and Therapeutic Applications*, 1–559. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-75309-1>
- Rao, T. N. (2018). Validation of Analytical Methods. In M. T. Stauffer (Ed.), *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches* (BOD-Books on Demand, pp. 131–174). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.72087>
- Rieger, P. H. (2012). *Electrochemistry* (Vol. 2). Springer Science and Business Media. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=UkHqCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=electrochemistry+&ots=n4TwKkzj2k&sig=KAPo78A--69rZeCqXAYGt3BDyig&redir_esc=y#v=onepage&q=electrochemistry&f=false
- Schotten, C., Nicholls, T. P., Bourne, R. A., Kapur, N., Nguyen, B. N., and Willans, C. E. (2020). Making electrochemistry easily accessible to the synthetic chemist. *Green Chemistry*, 22(11), 3358–3375. <https://doi.org/10.1039/D0GC01247E>
- Şenol, G. A., Çalışkan, M., and Topçul, M. R. (2023). Evaluation of kinetic effects of Gliotoxin in different breast cancer cell lines. *Cellular and Molecular Biology*, 69(14), 76–80. <https://doi.org/10.14715/CMB/2023.69.14.12>

- Shahzad, S., Dogan-Topal, B., Karadurmus, L., Caglayan, M. G., Taskin Tok, T., Uslu, B., Shah, A., and Ozkan, S. A. (2019). Electrochemical, spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of calcium channel blockers with dsDNA. *Bioelectrochemistry*, 127, 12–20. <https://doi.org/10.1016/J.BIOELECHEMA.2018.12.007>
- Sharma, S., Goyal, S., and Chauhan, K. (2018). A REVIEW ON ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 10(6), 9–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28279>
- Singh, K., and Kumari, A. (2022). Mycotoxins and Mycotoxins. In *Mycotoxins and Mycotoxins*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-2370-8>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., and Crouch, S. R. (2013). *Enstrümantal Analiz İlkeleri* (E. Kılıç and H. Yılmaz, Eds.; 6th ed.). Bilim Yayıncılık.
- Snell, K. D., and Keenan, A. G. (1979). Surface modified electrodes. *Chemical Society Reviews*, 8(2), 259–282. <https://doi.org/10.1039/CS9790800259>
- Sushila Dagadu, C., Dagadu Chavan, S., and Mahendra Desai, D. (2022). Analytical method validation: A brief review. *Journal of Advanced Research and Reviews*, 2022(02), 389–402. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.2.1165>
- Sutton, P., Newcombe, N. R., Waring, P., and Mullbacher, A. (1994). In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infection and Immunity*, 62(4), 1192–1198. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.4.1192-1198.1994>
- Tang, X., Zuo, J., Yang, C., Jiang, J., Zhang, Q., Ping, J., and Li, P. (2023). Current trends in biosensors for biotoxins (mycotoxins, marine toxins, and bacterial food toxins): principles, application, and perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 165, 117144. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.117144>
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S. S., and Vijayakumar, R. (2018). An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.79766>
- Uslu, B., and Ozkan, S. A. (2011). Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. *Analytical Letters*, 44(16), 2644–2702. <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.553010>
- Vaishnav, P., and Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Number 2, pp. 223–229). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., and Massart, D. L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5–6), 723–753. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00529-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00529-X)

- Viswananthan, J., and Govindasamy, G. (2019). Biosensors and its Transducers. In *Biomedical Engineering and its Applications in Healthcare* (pp. 125–151). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3705-5_6
- Wang, H., Li, H., Huang, Y., Xiong, M., Wang, F., and Li, C. (2019). A label-free electrochemical biosensor for highly sensitive detection of gliotoxin based on DNA nanostructure/MXene nanocomplexes. *Biosensors and Bioelectronics*, 142, 111531. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2019.111531>
- Wang, H., Zhao, Y., Liu, J., Yuan, R., and Xiang, Y. (2025). Aptamer-based and highly sensitive electrochemical label-free gliotoxin biosensor via a dual recycling signal amplification cascade strategy. *Talanta*, 290, 127789. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2025.127789>
- Wang, J. (1988). *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. VCH.
- Waring, P., and Beaver, J. (1996). Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(8), 1311–1316. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(96\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(96)00083-3)
- Westbroek, P. ., Priniotakis, G. ., and Kiekens, Paul. (2005). *Analytical electrochemistry in textiles*. Woodhead.
- Yammine, P., El-Nakat, H., Kassab, R., Mansour, A., Khoury, B. El, Koumeir, D., Matar, Z., Chmaysem, A., Yammine, P., El-Nakat, H., Kassab, R., Mansour, A., Khoury, B. El, Koumeir, D., Matar, Z., and Chmaysem, A. (2024). Recent Advances in Applied Electrochemistry: A Review. *Chemistry 2024*, Vol. 6, Pages 407-434, 6(3), 407–434. <https://doi.org/10.3390/CHEMISTRY6030024>
- Ye, W., Liu, T., Zhang, W., and Zhang, W. (2021). The Toxic Mechanism of Gliotoxins and Biosynthetic Strategies for Toxicity Prevention. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 13510, 22(24), 13510. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413510>
- Ye, W., Liu, T., Zhang, W., Zhang, W., Ye, W., Liu, T., Zhang, W., and Zhang, W. (2021). The Toxic Mechanism of Gliotoxins and Biosynthetic Strategies for Toxicity Prevention. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, 22(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS222413510>
- Yildiz, M. M., Ates, I., Gurbuz, H. N., Unal, M. A., Nazir, H., Uzunoglu, A., Ozkan, S. A., and Topal, B. D. (2025). Exploring efavirenz-DNA interactions: A multidisciplinary approach through electrochemical, toxicological, and in silico investigations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 259, 116763. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2025.116763>
- Zhang, X., Xu, Z., Yang, C., Wang, J., and Wei, Z. (2012). Analytical method of gliotoxin content by HPLC. *Advanced Materials Research*, 581–582(1), 46–49. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.581-582.46>
- Zheng, X., Hu, Z., Gao, S., Li, Z., Chen, J., Zhang, G., Kong, N., Sun, J., and Liu, W. (2024). One-pot assay using a target-driven split aptamer recognition and assembly strategy for

convenient and rapid detection of gliotoxin. *Food Chemistry*, 454, 139738. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2024.139738>

Zoski, C. G. . (2007). *Handbook of electrochemistry*. Elsevier.

Zuman, P. (2002). Polarography in solution of some problems in organic chemistry: recent applications. *Microchemical Journal*, 72(3), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(02\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(02)00089-9)

