

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

158240

**DNA ANALİZLERİNE YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL GENOSENSÖRÜN
TASARIMI VE UYGULAMALARI**

**Analitik Kimya Programı
Yüksek Lisans Tezi**

Eczacı

Hakan KARADENİZ

Danışman

Doç. Dr. K. Arzum ERDEM

İzmir

2004

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. K. Arzum ERDEM

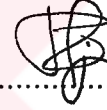


(Danışman)

Üye : Prof. Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ



Üye : Prof. Dr. Belkıs GÖZLER



Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 01 Eylül 2004

İÇİNDEKİLER

I. BÖLÜM	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	6
1. ELEKTROKİMYA	6
1.1. Elektrokimyasal tabakalar:	7
1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektrisel olarak incelenmesi :	8
1.3. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları.....	9
1.4. Voltametri ve esasları.....	9
1.4.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri:.....	10
1.4.2. Voltametrik cihazlar:.....	12
1.4.3. Voltametrizde kullanılan referans(karşılaştırma) elektrotları :.....	12
1.4.4. Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları :	14
1.4.4.1. Karbon elektrotlar :.....	14
1.4.5. Voltamogramlar:.....	18
1.4.6. Voltametrik akımlar.....	19
1.4.7. Elektrokimyasal bir olayda Faradayik işlemler.....	20
1.4.8. Polarografi.....	21
1.4.9. Voltametrik teknikler :.....	22
1.4.9.1. Dönüşümlü Voltametri :	22
1.4.9.2. Diferansiyel Puls Polarografisi :	24
1.4.9.3. Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:	25
1.4.10. Puls polarografisinin uygulamaları :.....	27
2. BİYOSENSÖR	27
2.1. Biyosensör Çeşitleri:	28
2.2. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	28
2.3. Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları.....	30

2.3.1 NÜKLEİK ASİTLER ve DNA:.....	30
2.3.1.1.DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları.....	33
2.3.1.1.1. DNA baz dizilişlerinin yazılımı ile ilgili temel bilgiler.....	33
2.3.1.1.2. İnterkalasyon.....	34
2.3.1.1.3. Nükleik asit hibridizasyonu.....	35
2.4. DNA biyosensörleri:.....	35
2.4.1. İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal biyosensörlerle algılanması.....	36
II. BÖLÜM.....	39
GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	39
2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	39
2.2.1. Mitomycin C (MC) hakkında genel bilgi.....	40
2.2.2. Lycorine (LYC) hakkında genel bilgi.....	41
2.2.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	42
2.2.3.1 Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı.....	42
2.2.3.2.Tampon çözeltilerin hazırlanışı:	43
2.3. KULLANILAN YÖNTEM.....	44
2.3.1 Kullanılan elektrotların hazırlanışı.....	44
2.3.1.1. Karbon pastası elektrodunun hazırlanışı	44
2.3.1.2 Kalem grafit elektrodunun hazırlanışı	44
2.3.2 LYC ile DNA etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elektrokimyasal incelenmesi.....	44
2.3.2.1. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE ve CPE elektrotları kullanılarak guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	45
2.3.2.1-A. CPE kullanarak yapılan çalışmada izlenen basamaklar.....	45
2.3.2.1-B. PGE kullanarak yapılan çalışmada izlenen basamaklar.....	45
2.3.2.2. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE elektrodu kullanılarak adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	46
2.3.2.3. DNA konsantrasyonundaki değişiminin yanıt etkisinin incelenmesi.....	47
2.3.2.4. LYC konsantrasyonundaki değişimin yanıt etkisinin incelenmesi.....	47
2.3.2.5. LYC etkileşim süresindeki değişimin yanıt etkisinin incelenmesi.....	48
2.3.2.6. LYC ile poli[G] etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	48
2.3.3. Mitomisin C (MC) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	48
2.3.3.1. MC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi.....	48

2.3.3.2. MC konsantrasyonundaki değişimin guanin ve adenin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisinin incelenmesi.....	49
2.3.3.3. MC konsantrasyonundaki değişiminin, MC yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisinin incelenmesi.....	49
III.BÖLÜM.....	50
BULGULAR ve TARTIŞMA.....	50
3.1. LYC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular.....	50
3.1.1. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE ve CPE elektrotları kullanılarak, guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular.....	50
3.1.2. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular.....	52
3.1.3. dsDNA konsantrasyonundaki değişimin yanıtta etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular....	53
3.1.4. LYC konsantrasyon değişiminin yanıtta etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular.....	54
3.1.5. LYC etkileşim süresinin yanıtta etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular.....	56
3.1.6. LYC ile poli[G] etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular.....	57
3.2. MC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular.....	59
3.2.1. MC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular.....	59
3.2.2. MC konsantrasyon değişiminin guanin ve adenin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular.....	60
3.2.3. MC konsantrasyonundaki değişimin, MC yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisine ilişkin bulgular.....	62
IV. BÖLÜM	63
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	63
4.1. LYC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi.....	63
4.2. MC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi.....	64
ÖZET.....	66
SUMMARY.....	67
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	68
Arş. Gör. Ecz. Hakan KARADENİZ'in Özgeçmişi.....	83

ÖNSÖZ

Çalışmalarındaki değerli katkılarından dolayı başta, danışmanım Sayın *Doç. Dr. K. Arzum ERDEM'e* , Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın *Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ'e* ve Anabilim Dalımızdaki diğer tüm Öğretim Üyelerine teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteği için bursiyeri olduğum *TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na* ve *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına* teşekkür ederim.

Her zaman desteklerini gördüğüm *tüm değerli çalışma arkadaşlarıma* ve *manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme* teşekkür ederim.

Türk ve dünya bilimine değerli katkıları olan, 30.11.2003 tarihinde kaybettiğimiz hocamız *Prof. Dr. Aycıl KAYALI* anısına...

I. BÖLÜM

GİRİŞ ve AMAÇ

Elektrokimyasal sensörlerin (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya'da oldukça yaygın kullanım alanı bulunmaktadır. Bu cihazlara IUPAC tarafından literatürde getirilen tanım şu şekildedir:

“Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler” denir (16). Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle *BIYOSENSÖR* adını almışlardır (112).

Elektrokimyasal sensörler, yapılarına biyolojik maddeler eklendiği zaman; örneğin, enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. elektrokimyasal sensörlerin en yaygın kullanım alanlarından biri olan *BIYOSENSÖRLER* oluşur .

Biyosensörler, “**biyo**” (biyolojik kökenli) ve “**sensör**” (algılayıcı) kelimelerinden oluşan nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlardır (21). Tanım olarak ise; “Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal iki çevirici sistemden oluşur. Biyokimyasal çevirici, analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün, elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir.

Nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeyleri, Analitik Kimya alanında her geçen gün daha ilgi çekici konular halini almaktadır (3,121). Bu gelişme ile, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin gelecekte hasta başında yapılacak doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir (117). Elektrokimyasal yöntemlerle birlikte DNA'nın nitel ve nicel analizini yapma amacına yönelik tasarlanan

(6-8,13,14,42,48,87,88,115) biyosensörlerde tanıma yüzey katmanı olarak DNA kullanılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır (15,17,18, 22, 72,74,85,101,122).

Nükleik asit (DNA) tanıma yüzeyi içeren biyosensörler (Genosensörler; gene dayalı sensörler), bu yüzey ile etkileşime giren analitin (karsinojen maddeler, ilaçlar vb.) etkileşim mekanizmasının aydınlatılması veya miktarının tayininde veya DNA'daki baz dizisi belli bölgelerdeki hibridizasyon olaylarının izlenmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılabilir (29,30,54,62,69,74,76-78,116,118,123,124,126). Analitin, DNA ile etkileşmesi sonucunda, incelenen maddenin veya DNA'daki bir bazın sinyalinde meydana gelecek değişiklikler sayesinde güvenilir tayinler yapılabilinmektedir (49-52,67,71,80,85,94,103,105,111,119,120,125,128). Bazı ilaç molekülleriyle DNA' nın etkileşmesi (özellikle de antikanser özellik taşıyan ilaç molekülleri ile etkileşim) ve bu etkileşmenin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi; yeni ilaç tasarımları için büyük önem taşımaktadır (47,55,59,66). Bazı maddelerin (çevresel kirlilik ajanları, toksik molekül, vb.) çift sarmal DNA ile interkalasyon (düzlemsel yapıdaki maddenin DNA çift sarmalı arasına girerek yerleşmesi), baza seçimli bağlanma vb. yollarla etkileşimi sonucu bir ürünün meydana gelmesi, bu ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımını getirmiştir (56,90-92). Bir kimyasalın ya da metabolitinin DNA ile etkileşimi sonrasında DNA'da oluşabilecek yan ürünlerin (=adduct) kısa zamanda tespiti kanser araştırmalarında çok önemlidir (2,23,44).

Madde-DNA etkileşiminin sonucunda, çalışmanın türüne göre elde edilen madde sinyali ya da DNA'daki elektroaktif bir bazın sinyalindeki artma veya azalmaya bağlı olarak elektrokimyasal tayin gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar (GCE), karbon pastası elektrotlar (CPE), kalem grafit elektrotlar (PGE), perde baskılı karbon (SCPE) ve altın elektrotlar (Au-

SCPE), altın elektrotlar (AuE) ve asılı civa damla elektrodu (HMDE) incelenen maddelerin mikromolar ve hatta nanomolar gibi düşük konsantrasyonlarının dahi, kısa bir biriktirme basamağı sonrası güvenli ölçümlerini mümkün kılmaktadır (9,19,57,70-72,80,119,120,125).

Günümüzde çok sayıda kalıtsal hastalığa neden olan mutasyonlar artık kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu konudaki bilgilerimiz insan genom projesi (20) devam ettiği sürece artmaktadır . Bu projeye birlikte insan genomunun tüm genleri haritalanabilmesi mümkün olabilmekte, ayrıca tüm varyasyonlar belirlendiği ve farmakogenomik çalışmalar sonuçlandığı zaman, sağlık sisteminde de hızlı sonuç verebilen düşük maliyetli DNA testlerine ihtiyaç duyulacaktır.

Çeşitli biyolojik materyallerde (kan, serum, doku ve vücut sıvıları vb.) belirli bir hastalık, mutasyon gibi kalıtsal bir olayı simgeleyen DNA dizisi saptanması ve bu örneklerden hastalık tayini yapılması tıbbi analizler ve uygulamalarında çok önemlidir. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri rutin analiz yöntemlerine yeni bir alternatif olup, genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı, basit ve ucuz yoldan teşhis edilebilmesi, DNA hasar ve etkileşimlerinin tespit edilebilmesi gibi amaçlarla büyük hızla geliştirilmektedir. Bazı bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklara ait DNA dizilerinin tanımlanması, genomik DNA çiplerinin tasarımı nükleik asit hibridizasyonuna dayanmaktadır. Elektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarlanmasındaki amaçlardan biri de DNA'daki hibridizasyonun tayin edilmesidir. Diziye özgün ve seçimli olarak tayin yapabilen DNA biyosensörleri, bir DNA probu içeren kısım ve tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren çevirim sisteminden oluşmaktadır (65,66,86).

Çalışmamızda, madde ve DNA etkileşmesini incelemek amacıyla bir elektrokimyasal DNA biyosensörü (genosensör) tasarımı gerçekleştirildi. Bu amaçla

yüzeyine çift sarmal DNA (dsDNA) tutturulmuş elektrotlar (karbon pastası elektrodu; CPE ve kalem grafit elektrodu; PGE) kullanılarak, potansiyel antiviral etkili madde Lycorine (LYC) ve antikanser ilaç Mitomycin C (MC)' nin dsDNA ile etkileşmesi elektrokimyasal olarak incelendi. Elektrokimyasal tayin yöntemi olarak diferansiyel puls voltametri tekniği (DPV) kullanıldı. Çalışma sırasında; kullanılan madde ile DNA'nın etkileşme süresi, madde ve DNA konsantrasyonundaki değişim yanıtı etkisi, ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler incelendi. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak kullandığımız kalem grafit elektrot (PGE) ile gerçekleştirdiğimiz çalışmanın getirdiği en önemli yarar; PGE'nin tek kullanımlık olması ve daha tekrarlanabilir sonuçlar vermesidir.

Madde-DNA etkileşiminin genosensörlerle tayinine dayalı ilk bölümünde, potansiyel antiviral etkili madde LYC'in dsDNA ile etkileşmesinin elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma dünya literatürüne girmiştir (53). LYC'in DNA ile etkileşim öncesi ve sonrası, DNA'daki elektroaktif bazlar guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişimi, elektrot olarak PGE ve yöntem olarak DPV'nin kullanılmasıyla incelendi. Bu etkileşim sonunda DNA'nın elektroaktif bazlarına ait sinyallerde azalma saptandı. Ayrıca LYC'in DNA ile etkileşimi, CPE kullanılarak guanin sinyalindeki değişim üzerinden PGE ile elde edilen sinyal karşılaştırıldı. LYC ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, LYC ve DNA konsantrasyonundaki değişimin yanıtı etkisi, çözelti bazında LYC'in polinükleotit olan Poly [G] ile etkileşmesi ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler de incelendi.

Madde-DNA etkileşimine dayalı diğer çalışmamızda daha önce Mitomycin C (MC) ile gerçekleştirilen çalışmalardan (71,82,93,94,105,108,114) farklı olarak tek kullanımlık elektrot olan PGE'nin kullanılmasıyla, MC'nin elektrot yüzeyindeki

dsDNA ile etkileşmesi iki ayrı yolla: hem DNA'nin elektroaktif bazları, guanin ve adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim, hem de MC'nin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden incelendi. Ayrıca MC konsantrasyonundaki değişimin, hem guanin ve adenin bazlarına ait sinyallerde, hem de MC'nin sinyaline dayalı yanıtta etkisi incelendi. Bu etkileşim sonunda ilaç ve DNA'daki aktif bazlara ait sinyallerde azalma saptandı.

Sonuç olarak çalışmamızda tasarımını yaptığımız tek kullanımlık elektrokimyasal genosensör kullanılarak, DNA hedefli maddelerin DNA ile etkileşmesini inceleyerek, gelecekte yeni antikanser ilaç hedefleme çalışmalarına yeni bir boyut getirmeyi ve yakın gelecekte piyasaya sürülecek DNA biyoçiplerinin teknolojisini (43) oluşturacak olan elektrokimyasal genosensörlerinin bir prototipini geliştirmeyi hedefledik.

GENEL BİLGİLER

1. ELEKTROKİMYA

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri, fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalı, elektrokimya olarak tanımlanır. Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir; elektron transferi veya geçişi söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülür.

Analizi yapılacak çözelti, bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analitik yöntemin incelenmesi "elektroanalitik kimya"nın kapsamına girmektedir. Elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, bilgileri de içeren çok fazla sistemi karakterize eden bilgiler verirler.

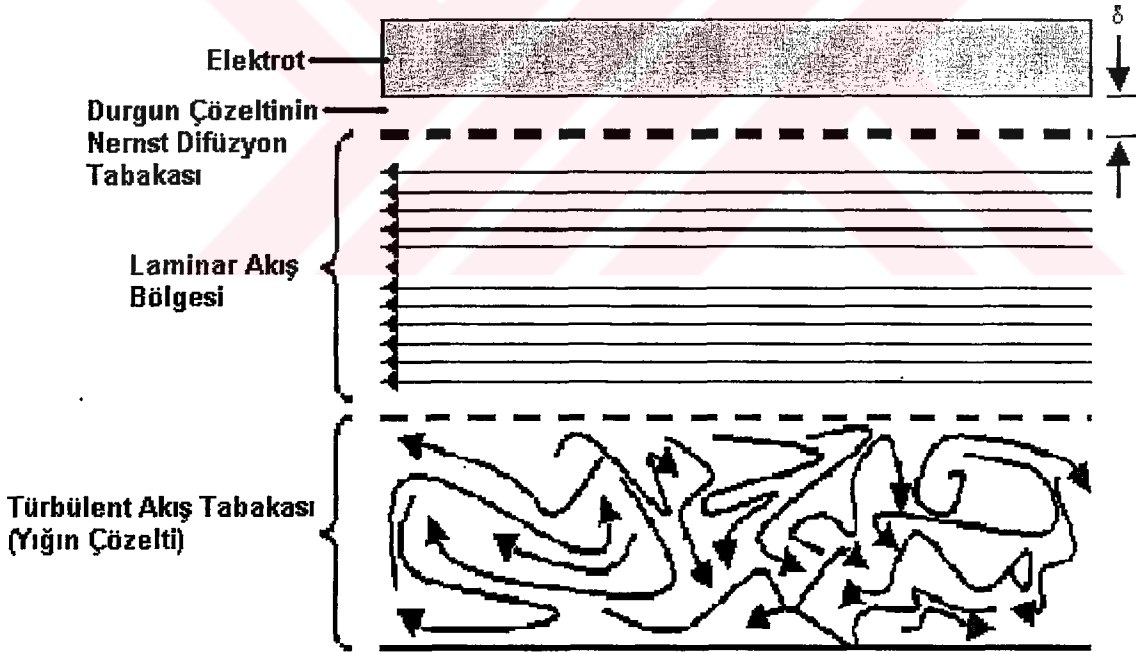
Elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Birincisi, elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elemente, moleküle veya tepkime sonunda oluşan ürüne özel bir yükseltgenme basamağı için spesifiktir. Elektroanalitik yöntemlerin ikinci bir önemli üstünlüğü de, kullanılan cihazların nispeten ucuz olmasıdır (1, 12).

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti

kullanılır. Çeşitli elektrolitik yöntemler ile Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV) vb. de belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon hızı akım ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında oluşur.

1.1 . Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal ölçüm yapılırken elektrot yüzeyi ile analit sıvısı arasında heterojen tabakalar meydana gelmektedir. Bunun nedeni, elektrot, kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron verebilmesi veya o tabakadan elektron alabilmesidir. Genel olarak karıştırılan sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 1'de görülmektedir:



Şekil -1: Elektrot Yüzeyindeki Tabakaların Şematize Olarak Gösterilmesi.

Türbülent akış tabakası: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir.

Laminer akış bölgesi: Yüzeğe yaklaştığında bir laminar akışa geçiş olur. Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerine kayarlar.

Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, laminer akımının hızı sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresindeki ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu çözelti tabakası, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığında olabilir.

1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektriksel olarak incelenmesi:

Elektroda pozitif bir potansiyel uygulandıktan hemen sonra eğer elektrodun yüzeyinde reaksiyona girebilecek aktif bir tür yoksa, hızlı olarak sıfıra düşecek anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu akım her iki elektrodun da yüzeyinde bir negatif yük fazlalığı (veya eksikliği) yaratan bir yükleme akımıdır. Fakat, iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak elektrotlara bitişik olan çözelti tabakalarında derhal bir zıt yüklenme oluşur. Bu etkileşim Şekil-2a 'da gösterilmektedir. Elektrodun yüzeyinde, uygulanan pozitif potansiyelin bir sonucu olarak pozitif yük fazlalığı oluşmuştur. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşmaktadır :

1- bir yoğun iç tabaka (d_0 'dan d_1 ' e), bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaşıldıkça ortaya çıkan potansiyel mesafe ile doğru orantılı olarak azalır,

2- bir difüze tabaka (d_1 'dan d_2 ' e), burada elektrot yüzeyinden uzaklaşıldıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalır (Şekil-2b). Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltilerdeki bu yük topluluğu bir *elektriksel çift tabaka* olarak adlandırılır.

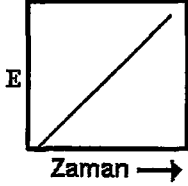
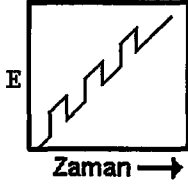
ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine **voltamogram** denir. Voltametrinde, herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodunun ve kullanılan çözücü ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Tarihsel olarak, voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında geliştirilen ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametrinin hala önemli bir kolu olan polarografinin diğer voltametrik tekniklerden en büyük farkı, çalışma elektrodu olarak bir damlayan civa elektrodun (DCE) kullanılmasıdır.

Voltametri, inorganik, fiziko ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlar için de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.4.1. Voltametrinde Kullanılan Uyarma Sinyalleri: (1)

Elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır. Bu uyarma sinyalleri, karakteristik akım cevaplarını oluşturur. Voltametrinde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil-3' de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.

<u>İsim</u>	<u>Dalga Şekli</u>	<u>Voltametrinin tipi</u>
(a) Doğrusal taramalı		POLAROGRAFI HİDRODİNAMİK VOLTAMETRİ
(b) Diferansiyel puls		DİFERANSİYEL PULS POLAROGRAFİSİ
(c) Kare dalga		KARE DALGA VOLTAMETRİSİ
(d) Üçgen		DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMETRİ

Şekil-3: Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

1.4.2. Voltametrik Cihazlar:

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

Tanım olarak;

1) Çalışma elektrodu; tasarımı yapılacak bir biyosensör bu üçlü sistemlerde kullanılabilir. Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltildiği veya indirildiği elektrottur.

2) Referans elektrot; Referans elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir elektrottur. Ag/AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılabilir.

3) Yardımcı elektrot; Pt bir tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturan, fakat ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamayan bir elektrottur.

1.4.3. Voltametri Kullanılan Referans Elektrotlar (Karşılaştırma

Elektrotları) (1,27, 34, 95, 101)

Çalışılan çözeltinin bileşimine duyarlı olan ve elektrokimyasal çalışmalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen elektrotlardır.

Elektrokimyada ilk olarak Standart Hidrojen Elektrot (SHE) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Ayrıca Hidrojen gaz elektrotlar, eskiden beri elektrokimyasal çalışmalarda sadece referans elektrotlar olarak değil, aynı zamanda pH tayinlerinde indikatör elektrotlar olarak da yaygın biçimde kullanılmıştır.

Referans elektrotların çeşitleri :

* *Kalomel Referans Elektrot:* Kalomel (Hg_2Cl_2) ve Hg' dan oluşmuş bir karışım, metalik civa ve KCl çözeltisinden oluşur. Bu elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. Hazırlanışı çok kolaydır .

En yaygın olan ve içersinde doygun KCl çözeltisi bulunan *Doygun Kalomel Elektrot* (DKE)'tur. Potansiyeli, Standart Hidrojen elektroduna(SHE) göre $25^{\circ}C$ de + 0,244 V olarak bulunmuştur. Diğer kalomel elektrotlara oranla sıcaklık katsayısı daha büyüktür.

* *Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot:* En yaygın kullanılan referans elektrotlardan biri olan gümüş-gümüş klörür referans elektrot, Ag bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl^- iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir.

Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli, +0,222 V dur.

* *Civa-Civa(1)Sülfat Referans Elektrot:*

Bu elektrot, doygun kalomel elektroda benzemektedir. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

Bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okunmalıdır.

1.4.4. Voltametrde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrodunun yapımında kullanılan iletken malzeme, platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Bu elektrotlar çeşitli şekil ve büyüklükte olabilmektedirler ve biyosensör tasarımı için en uygun şekilde geliştirilmektedirler.

Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Özellikle de bu potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan büyük akımlarca belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojenden kaynaklanır.

Kullanılan çalışma ortamına göre çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları ; civa elektrodu için 1 M H_2SO_4 çalışma ortamında, (-0.8 V) ile (+0.4 V) aralığı ve 1 M KCl çalışma ortamında, (-1.6 V) ile (+0.2 V) aralığıdır. Karbon elektrodu için ise, 1 M $HClO_4$ ortamında, (+0.2 V) ile (+1.8 V) aralığı ile, 0,1 M KCl ortamında (-1.0 V) ile (+1.2 V) aralığıdır.

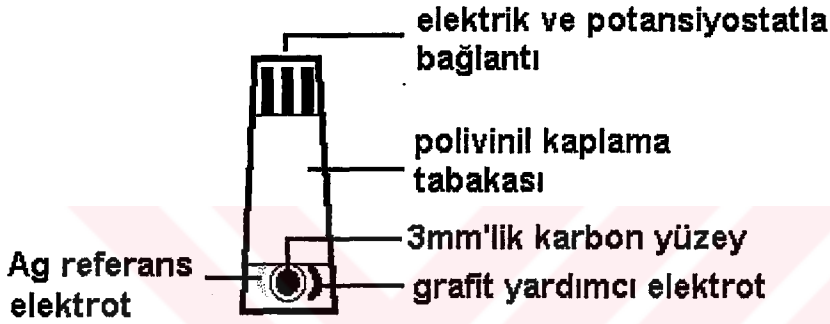
1.4.4.1. Karbon Elektrotlar :

Karbon elektrotlar, özellikle çok ucuz olmaları ve geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına olanak verdiğiinden dolayı elektrokimyasal analizlerde sık kullanılır. Ancak, karbonun yüksek bir yüzey aktivitesi vardır ve bu nedenle organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilir. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon elektrotların çeşitleri:

*** Perde baskılı karbon(grafit) elektrotlar(SCPE):**

Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (68,70).



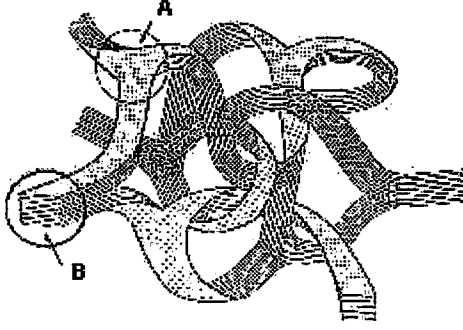
Şekil 4: Perde baskılı karbon (grafit) elektrodun şematik gösterimi.

Elektrokimya alanında çok önemli olan karbon elektrotlarının tüm çeşitlerinde yüzeylerinin düzgün bir şekilde hazırlanması gereklidir.

*** Camsı Karbon Elektrot (GCE) :**

GCE, ticari olarak elektrot üretimine uygun olmamasına rağmen, çok iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahip olması ve geniş bir potansiyel aralığı olması, kimyasal tepkimelere girmemesi ve genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması nedeniyle sıkıca kullanılmaktadır. Kolayca kırılabilen ve sert bir madde olması

dolayısıyla, Camsı karbon, fenol/formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000°C - 3000°C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Şekil 4'te de görüldüğü gibi camsı karbon yüksek yoğunluğa sahip, küçük porlar içeren amorf bir yapıdır. Birbirinin içine geçmiş, ince, grafit benzer şeritlerden oluşmuştur.

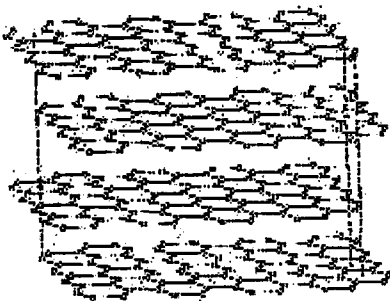


Şekil 5. GCE'nin Amorf Yapısı (A) Kuvvetli Bağlar, (B) Zayıf Bağlar.

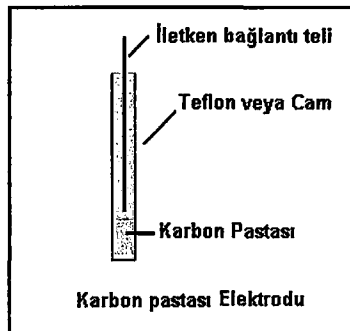
Karbon pastası elektrotlarına göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanısıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı daha yüksektir.

* Karbon Pastası Elektrodu (CPE):

Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilimi Şekil 6' de görülmektedir. Zayıf π bağları ile birbirine bağlanmış olan bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.



Şekil 6. Grafit Tozunda Bulunan Karbon Moleküllerinin Dizilimi.



Şekil 7. Karbon Pastası Elektrodu.

CPE, ucuz olması, yüzey yenilenmesinin kolay olması, düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir. Bağlayıcı madde olarak, Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen kullanılmaktadır. Elektrot aktivitesine pasta bileşiminin büyük etkisi vardır. Bağlayıcı organik sıvı oranı arttıkça, elektron transfer hızı azalmaktadır. CPE'nin en önemli sakıncası, yeterli miktarda organik çözügen içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman, karbon pastasının çözeltide dağılmasıdır.

*Kalem Grafit Elektrot (PGE)

Son yıllarda tekrarlanabilirliğinin daha iyi olması, daha düşük tayin sınırı, ucuz ve tek kullanımlık olması sebebiyle bu elektrodun kullanılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır (53,118).



Şekil 8: Kalem Grafit Elektrot.

1.4.5. Voltamogramlar:

Doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle sigmoidal eğriler (S şeklinde) verir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Keskin artıştan sonraki sabit akıma **sınır akımı**, i_s , denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bu yüzden

$i_s = k C_A$ şeklinde yazılabilir. Burada C_A analit konsantrasyonu ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Yarı-dalga potansiyeli, akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Yarı-dalga potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilgilidir fakat genellikle ona eşit değildir.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye **Hidrodinamik Voltametri** adı verilir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye **Polarografi** denir.

Elektrot sistemine gerilim uygulandığında kapasitif akım ve Faradayik akım olmak üzere 2 çeşit akım oluşur.

1-Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yük ile yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımının oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f): Reaksiyondan kaynaklanan (analiz edilecek maddeden) akımdır.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalır ise duyarlılık artar.

Genellikle 10^{-3} M ve üstünde; $i_c < i_f$ dir ve çalışılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve üstünde ; $i_c \gg i_f$ olduğu için çalışılmaz.

1.4.6. Voltametrik Akımlar:

İncelenen bir elektroliz işleminde akım, analitin difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine taşınma hızı ile kontrol edilir ve bu hız $\partial C_A / \partial X$ ile verilir. Burada X, elektrottan olan uzaklığı cm cinsinden göstermektedir. Düzlemsel bir elektrot için, akımın

$$i = nFD_A (\partial C_A / \partial X)$$

şeklinde bir ifade ile verileceği gösterilebilir. Burada:

I = Amper cinsinden akımı,

N= Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

F =Faraday sabiti (96487 Coulomb / mol elektron),

A =cm² cinsinden elektrot yüzey alanını,

D_A = A' nın cm²s⁻¹ cinsinden difüzyon katsayısını,

C_A = mol/cm³ cinsinden A'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

Oluşan difüzyon akımın zamana karşı fonksiyonu **COTTRELL denklemini** verir.

$$i = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

1.4.7. Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken, diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda ;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [$C_o(0,t)$ ve $C_R(0,t)$], Nernst Denkleminde (eşitlik 1.1) göre saptanmasında kullanılabilir.

$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{C_o}{C_R} \quad (1.1)$$

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

R = Gaz sabiti ($8.314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)

T = Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96487 coulombs)

Elektrot ara yüzeyinde meydana gelen redoks tepkimesi sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilir. Bir elektrottaki kimyasal madde miktarının geçen akımla doğru orantılı olduğunu ifade eden bu tip işlemlere, *faradayik işlemler*, bu şekilde oluşan akımlara da *faradayik akımlar* adı verilir.

Analizlenecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nerst tabakası içinde değişir.

1.4.8. Polarografi : (1, 27)

Polarografi, ilk bulunan ve kullanılan voltametri tipidir ve elektrot olarak damlayan civa elektrodunun kullanılmaktadır. Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi ile, ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede *artık akım* adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir.

Sınır akımları, akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman gözlenir. Difüzyonla kütle aktarımı olduğu için polarografik sınır akımlarına genellikle *difüzyon akımları* denir ve i_d ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır. Difüzyon akımı analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Artık akımların oluşma sebepleri olarak safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları ve destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar sayılabilir.

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğru bir sonuç elde etmek için artık akımın etkisini giderme yoluna gidilir.

Polarografide pH'nın etkisi: (1)

Bazı organik ve inorganik madde reaksiyonları aşağıdaki gibi ifade edilir:



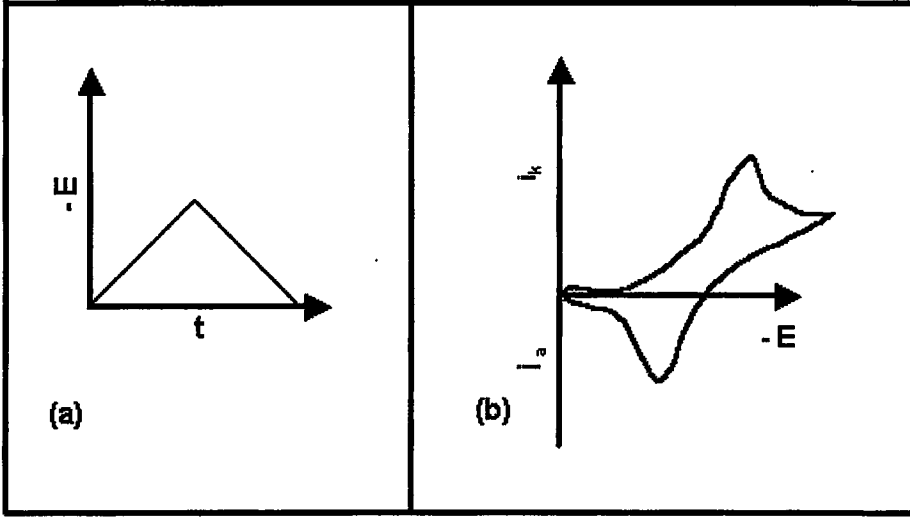
R, analitin yükseltgenmiş şekli ve RH_n de indirgenmiş şeklini göstermektedir. Bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri denklemden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde pH' ya bağlıdır; pH'nın değişimi, reaksiyon sonucunda oluşan ürünün değişmesine bile sebep olabilir. Bu nedenle analit çözelti çok iyi şekilde

tamponlanmalıdır. Eğer bu işlem yapılmazsa, elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH' sı büyük oranda değişebilmektedir. Bu değişimler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve iyi bir görünümü olmayan yayvan eğrilerinin elde edilmesine neden olur. Ayrıca, özellikle organik maddelerle yapılan polarografide tekrarlanabilir yarı-dalga potansiyelleri ve difüzyon akımları elde etmek için iyi bir tamponlama yapmak genellikle çok önemlidir.

1.4.9. VOLTAMETRİK TEKNİKLER:

1.4.9.1. Dönüşümlü Voltametri:

Bu teknikle, gerilimin bir fonksiyonu olarak akım ölçülür. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta akımdaki değişim grafiğe geçirilerek **Dönüşümlü Voltamogram** elde edilir. Dönüşümlü voltametri ile durgun sistemde ve üçlü elektrot sistemiyle çalışılır. Burada hızı difüzyon tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda gözlenebilmektedir. İlk olarak, potansiyel bir maksimuma kadar artar, daha sonra başlangıç değerine yine doğrusal olarak geri döner.



Şekil-9: (a) Dönüşümlü voltametriye elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametriye elde edilen akım-gerilim eğrisi.

Doğru akımdaki gibi kapasitif akımın en küçük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık 10^{-5} M ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri, miktar tayinine dayalı bir yöntem değildir, ama analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda o maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı verebileceğini gösterir.

Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında, seçilen potansiyel aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının ve kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır.

Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir.

$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

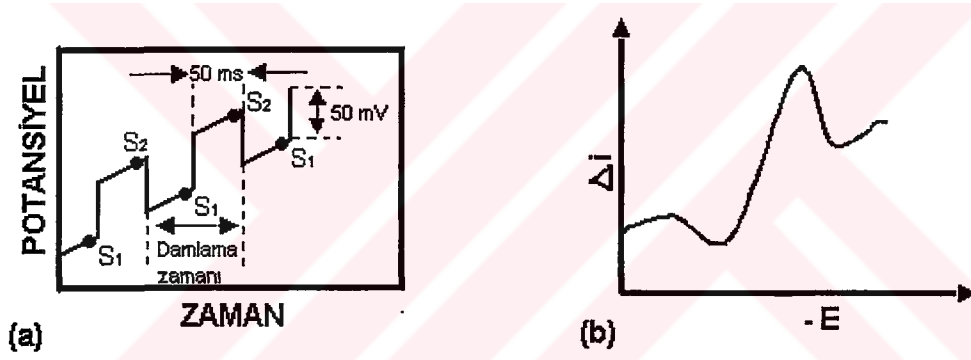
ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, reversible (dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (dönüşümsüz) olarak adlandırılır.

1.4.9.2. Diferansiyel Puls Polarografisi:

Bu teknikle, yarı-dalga potansiyelleri 0,04-0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls polarografisi, çok duyarlı bir yöntemdir ve tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

10 mV' luk veya 50 mV' luk bir puls civa damlasına uygulanır. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir.

Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır.



Şekil-10: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması duyarlılığın artmasıyla açıklanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV artırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında, eğer elektroaktif bir tür varsa, analit konsantrasyonunu yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürecek bir akım artışı gözlenir. Ancak bu potansiyel için gerekli olan denge konsantrasyonuna erişilince, akım difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ki buna

difüzyon kontrollü akım denir. Puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından büyüktür. Damla değiştiğinde, çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir.

Gerilim pulsu ilk uygulandığı zaman damla üzerinde yük artışı nedeniyle faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma olur. Bu akım zamanla azalır ve yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru sıfıra yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek suretiyle faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal / gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlılık da artar.

1.4.9.3. Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Bir kare-dalga voltametesinde uyarma sinyalinin oluşumu Şekil-11'de görülmektedir. Elde edilen akımlar arasındaki fark (Δi), 1 gerilimindeki akımdan, 2 gerilimindeki akım değeri çıkarılarak bulunur. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. İleri puls bir katodik akımını (i_1) geri puls da bir anodik akımını (i_2) oluşturur. Genellikle voltamogramları elde etmek için Δi 'ler ile grafik çizilir. Akımlar arasındaki bu fark, konsantrasyonla doğru orantılıdır.

Kare dalga voltametrisinde, voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az sürede elde edilir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, analizin kesinliğini arttırmak için birkaç voltametrik taramanın sinyali ortalaması alınmalıdır. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasındadır.

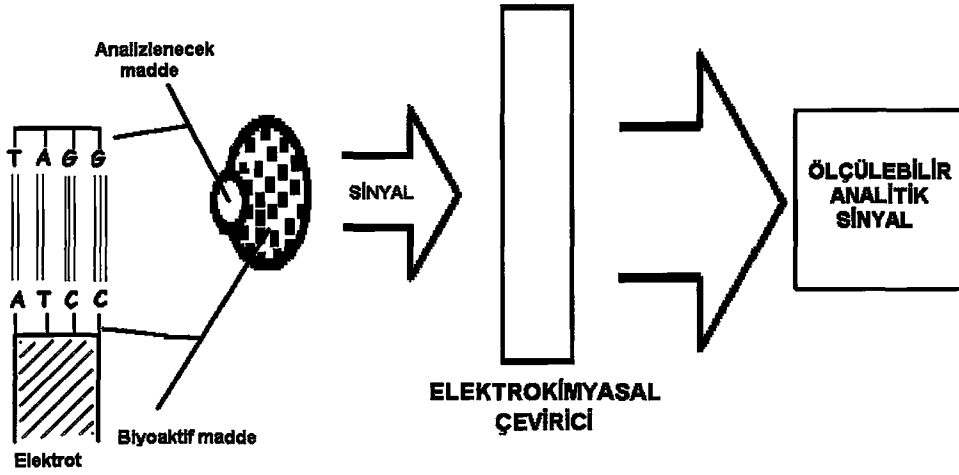
1.4.10. Puls Polarografisinin Uygulamaları: (1)

Günümüzde yüksek duyarlılığı, kolaylığı ve seçiciliğinden dolayı, puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılır.

Elektrokimya'nın pek çok uygulama alanı vardır. Bunlardan biri **Biyosensörlerdir.**

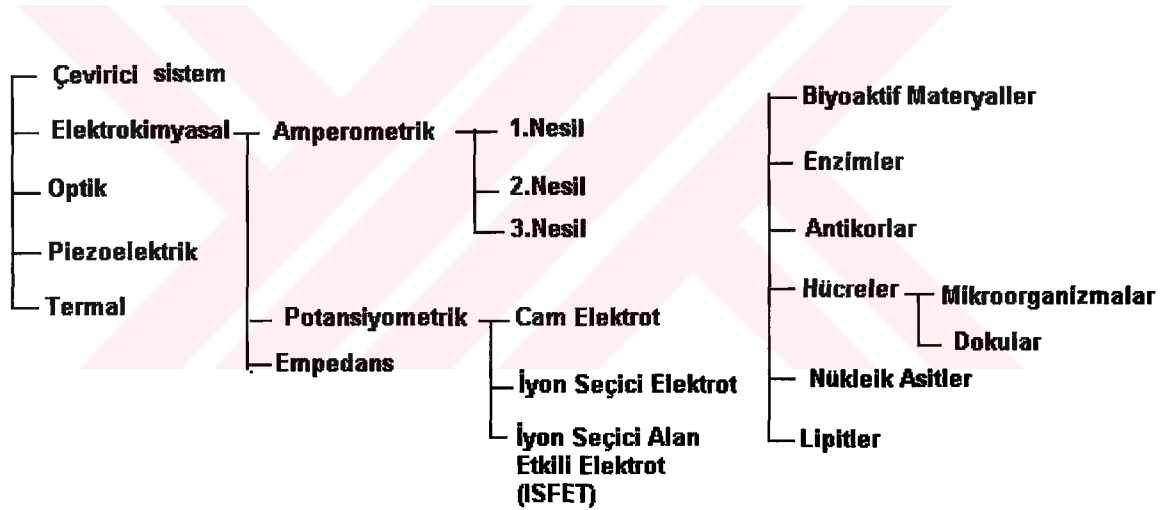
2. BİYOSENSÖR

Biyosensörler, biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (21).



Şema-1: Biyosensörün Yapısı.

2.1 Biyosensör Çeşitleri:



2.2. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler: (41)

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi, seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse, bu eksikliği giderecek uzun işlemler eklenmesi gerekir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün

kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması, ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planlandığı gibi değildir, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Stabilite: Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır; ayrıca, pH, ısı, nem, ortam O₂ konsantrasyonu gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığıdır.

Hızlı Cevap Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa, ikinci örnekte aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır.

Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

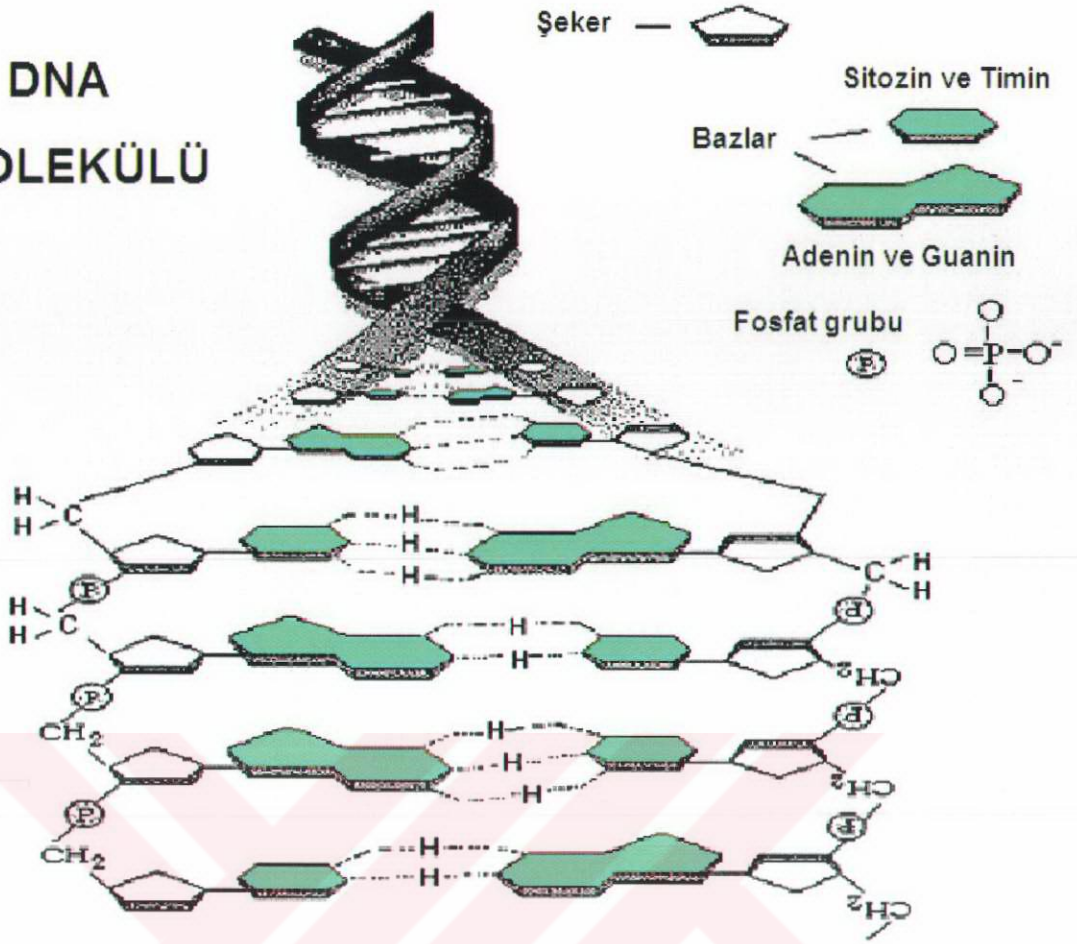
2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları:

2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA : (24-26, 96)

Nükleik asitlerin primer yapısı, belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin belirli bir diziliş sırasına göre 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucu oluşmaktadır. Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimlerine **endonükleaz**, iki uçtan parçalayanlara ise **ekzonükleaz** adı verilmektedir. DNA (Deoksiribonükleik asit) moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri ve Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Buna dayanarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısı için

çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli önerilmiştir. Bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri birarada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısımda, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için, sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir (A-T ve G-C şeklinde). Bu sayede, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğundan, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde, ikinci zincirdeki baz dizisi bulunabilmektedir. DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. **Denatürasyon** adı verilen DNA heliks yapısının bozulması 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G \equiv C$) bulunduğundan yüksek derişimde G ve C içeren DNA, iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ($A = T$) bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işlem **renatürasyon** olarak isimlendirilir.

DNA MOLEKÜLÜ



Şekil-12: DNA Çift Sarmal Yapısı

Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri 5' → 3' yönüne doğru, diğeri ise 3' → 5' yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Molekülündeki zincirler, çift sarmalın dış yüzeyindedir. Bu zincirlerden her biri kovalent bağlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. DNA çift sarmalın her iki zinciri, pürin ve pirimidin bazlarının arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır.

Watson ve Crick tarafından 1953 yılında önerilen ilk DNA yapısı, sağa doğru yönelmiş, her dönüşte 10 nükleotidi bulunan ve küçük oluğa mükemmel yerleşen bağlı su ile stabilize olabilen yapıya sahiptir. DNA dehidrate edildiği zaman, yapısal

değişikliğe uğrayarak A-DNA adını almaktadır. A-DNA da sağa doğru yöneliktir ve her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının yapılanmasıyla genişlemektedir. Bu durumun bir sonucu olarak DNA'nın boyu kısalmaktadır (10).

2.3.1.1. DNA İle İlgili Bazı Terimlerin Tanımlamaları:

2.3.1.1.1. DNA Baz Dizilerinin Yazılımı İle İlgili Temel Bilgiler: (24)

Oligonükleotit: Birden fazla bazın yan yana gelmesiyle oluşur.

Dinükleotitler; İki bazın yan yana gelmesiyle,

Trinükleotitler; üç bazın yan yana gelmesiyle oluşur.

Tekrarlayan oligonükleotitler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotitler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı ve ya üç bazı ifade eder. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek verilebilir.

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: Nokta ile ayrılarak ifade edilen baz çiftlerinden oluşan ve 5' → 3' polaritesine sahip polimerlerdir.

Örneğin mononükleotit gösterilişine, **poly(A).poly(T)** (veya **poly(Da).poly(Dt)** şeklinde gösterilebilir), dinükleotid'e **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotid'e **poly (GAT). Poly (ATC)** örnek verilebilir.

Baz çifti: Birbirinin karşılığı olan iki bazı ifade eder ve gösterilirken nokta ile ayrılır. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

Prob : Baz dizisi belli olan oligonükleotit.

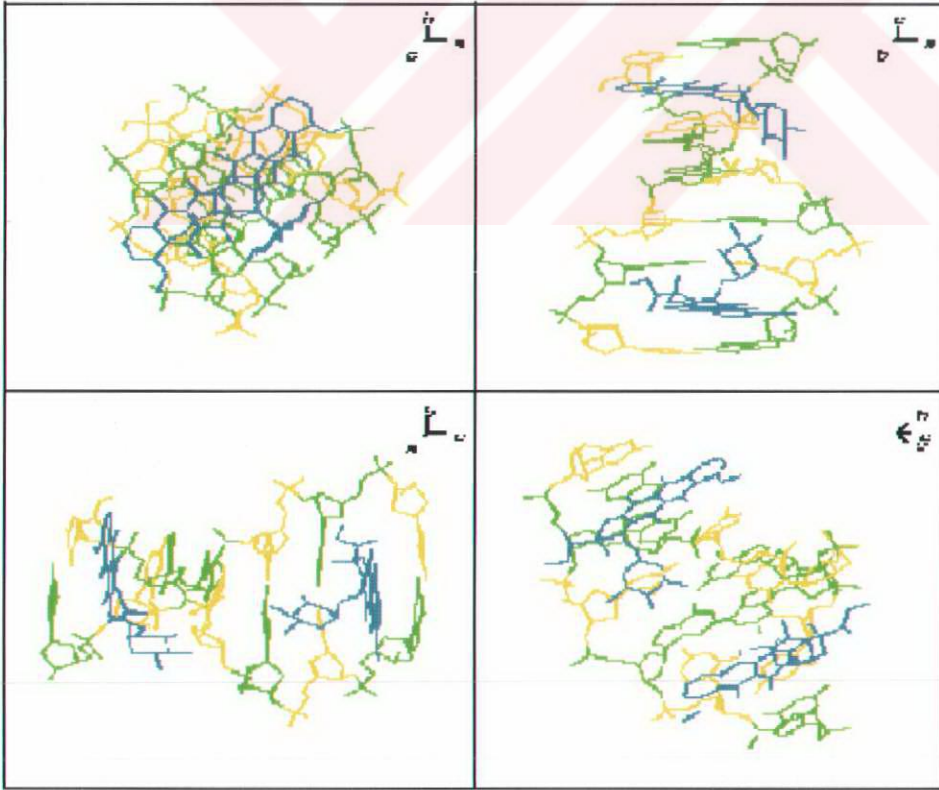
Hedef dizi (Target) : Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotit.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch) : Bir bazı veya birden fazla bazı hedef diziden farklı olan oligonükleotit.

Rastgele dizi (Non complementary) : Hedef diziden tamamen farklı baz dizilimine sahip oligonükleotit.

2.3.1.1.2. İnterkalasyon:

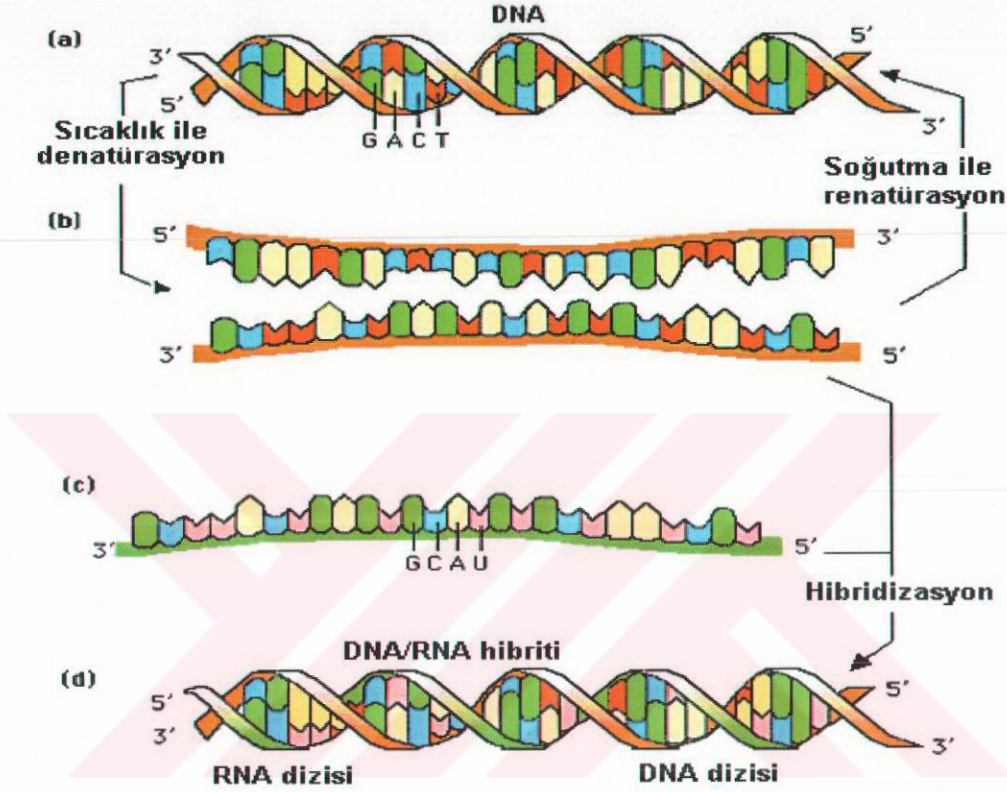
Düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır (5, 35). Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim dönüşümlü ya da dönüşümsüz şekilde gerçekleşmektedir (125). İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Bu maddeler Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler. İnterkalasyon yapabilen bazı ilaçların etki mekanizmaları, bu şekilde açıklanmaktadır.



Şekil-13: İnterkalasyonun Farklı Açılardan Gösterimi

2.3.1.1.3. Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu:

Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır (4).



Şekil-14: Nükleik Asit Hibridizasyonu.

2.4 DNA BİYOSENSÖRLERİ (GENOSENSÖRLER)

Biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri, Analitik Kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir (89,97,99,113). Bu tür tanıma yüzeyleri, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandıracak ve gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır (114).

Tanım yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (75, 79, 88, 93, 114). DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon

olaylarının izlenmesinde (80, 110) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir (10,102,104,110). DNA Biyosensörleri (Genosensörler) dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar vb.) tayininde kullanılabilir.

2.4.1. İlaç -DNA Etkileşmesinin Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Algılanması:

DNA hedefli ilaç tasarımında, ilaç-DNA etkileşmesinin önemli bir yeri vardır. Yeni sentezlenen küçük moleküllerin DNA'ya bağlanması ve onunla etkileşmesi, yeni ilaçların tasarımında olduğu kadar, DNA'yı algılama yöntemlerinin geliştirilmesinde ve çevreye zararlı maddelerin algılanmasında da önemli yer tutar (84). DNA ve hedef molekül veya ilaç arasındaki moleküler etkileşim, bu bileşiklerin hızlı görüntülenmesi ve aygıtların geliştirilmesi için önemlidir. İlaçların DNA'ya bağlanması ile ilgili çeşitli etkileşim türleri vardır. Bu etkileşim çeşitleri, elektrostatik bağlanma, çapraz bağlanma ve interkalasyonla etkileşmedir.

İncelenen maddenin, DNA ile etkileşmesi sonucu oluşan, DNA' daki bir bazın veya incelenen maddenin sinyalindeki değişiklikler sayesinde maddenin DNA ile etkileşme türü hakkında bilgi edinilebilmektedir. Özellikle bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin değişik metodlarla (36,64,73,81) incelenmesinin yanısıra, özellikle son yıllarda elektrokimyasal yöntemlere dayalı tayinler (Tablo-1) kullanılması elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin önemini arttırmaktadır. Kullanılan yöntem basit ve düşük maliyetli olup, hızlı ve seçimli bir şekilde, DNA ile etkileşme türü incelenen ve ilaç olarak hedeflenen maddenin az miktarlarında çalışmayı mümkün kılmaktadır.

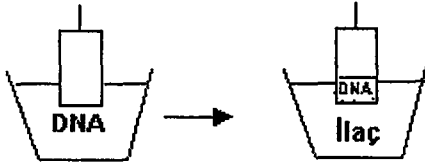
Tablo-1: Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak bazı DNA hedefli maddelerin ve antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin değişik metotlarla tayini.

İlaç	Elektrokimyasal Yöntem	İlaç sinyali	DNA sinyali	Kullanılan elektrot	Kaynaklar
Dokсорubisin	Adsorptif Transfer Sıyırma Alternatif Akım Voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	-	Asılı civa damla elektrodu	96
Daunomisin	Kronopotansiyometrik Sıyırma analizi, Dönüşümlü voltametri	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	Guanin sinyalinde herhangi bir değişiklik yok.	Perde baskılı karbon elektrot, Karbon pastası elektrodu, Dönen disk elektrot	119
Mitomisin C	Dönüşümlü voltametri Kare dalga voltametrisi	Asit ile aktive edilmiş Mitomisin C sinyalinde azalma	Guanin sinyalinde azalma	Asılı civa damla elektrodu, Perde baskılı karbon elektrot	71, 82
Mitoksantron	Diferansiyel Puls voltametrisi, Dönüşümlü voltametri, Kare dalga voltametrisi	Dönüşümsüz ve pH'a bağlı bir ilaç elektrokisidasyonu sözkonusudur.	Guanin ve adenin bazına ait spesifik bir etkileşme gözlenmemiştir.	Camsı karbon elektrot, Karbon pastası elektrodu	9, 32
Prometazin Fentiyazin Klorpromazin Tiyoridazin Proklorperazin	Potansiyometrik Sıyırma analizi, Diferansiyel Puls voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde artış	Guanin sinyalinde azalma	Karbon pastası elektrodu	120
Karboplatin	Diferansiyel puls voltametrisi	-	DNA'ya çapraz bağlanması sebebiyle, Adenin sinyalinde artış	Camsı karbon elektrot	11
Epirubisin	Dönüşümlü voltametri, Diferansiyel puls voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	-	Karbon pastası elektrodu, Camsı karbon elektrot	28, 128

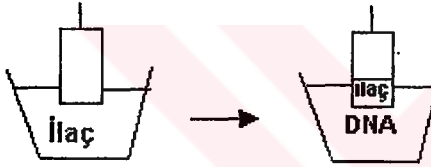
İlaç-DNA etkileşimini elektrokimyasal biyosensörle tayin ederken izlenen yol şu şekildedir; Etkileşim öncesi ve sonrası mevcut ilaç sinyalindeki ve/veya DNA'daki elektroaktif bazlar, guanin ve adenin sinyalindeki değişim ölçülür ve bu değişime göre etkileşim hakkında yorum yapılır (33).

A Elektrot yüzeyinde etkileşim

a. DNA modifiye edilmiş elektrot



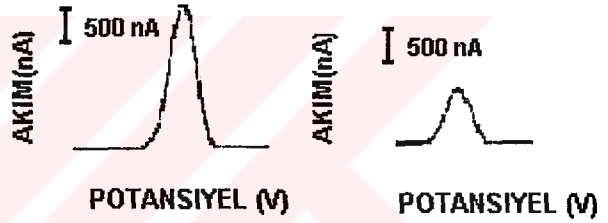
b. İlaç modifiye edilmiş elektrot



ELEKTROKİMYASAL SİNYALLER

Etkileşim öncesi

Etkileşim sonrası



B Çözelti içinde etkileşim



Şema-2: İlaç-DNA etkileşmesine dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensörlerin) tasarımının şematik olarak gösterilmesi: **A)** Çalışma elektrodu yüzeyinde etkileşimin **a)** DNA tutturulmuş elektrot, **b)** ilaç tutturulmuş elektrot kullanılması ile tayin. **B)** Çözelti fazında etkileşim. Etkileşim basamağından sonra izlenen basamaklar: elektrodun yıkanması ve voltametrik teknikler kullanılarak elektrokimyasal ölçümlerin yapılması ve sinyallerin kıyaslanması; etkileşim öncesi ve/veya sonrası ilaç ve/veya DNA'nın voltametrik sinyalindeki artma veya azalmanın bulunması.

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

Ölçümler ve deneyler sırasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar şunlardır;

Terazi (Sartorius-Analytic A-200)

Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)

pH-metre (Schott-Mainz CG 710)

Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag ve ARE 2-Velp)

Potansiyostat; AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda)

Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)

Ag/AgCl referans elektrot

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Mitomycin C (Sigma)

Asetik asit (%99-100) (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Dipotasyummonohidrojenfosfat (Riedel-de Haen)

Potasyumdihidrojenfosfat (Riedel-de Haen)

Grafit tozu (Fisher)

Mineral yağ (Acheson 38)

Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Sigma)

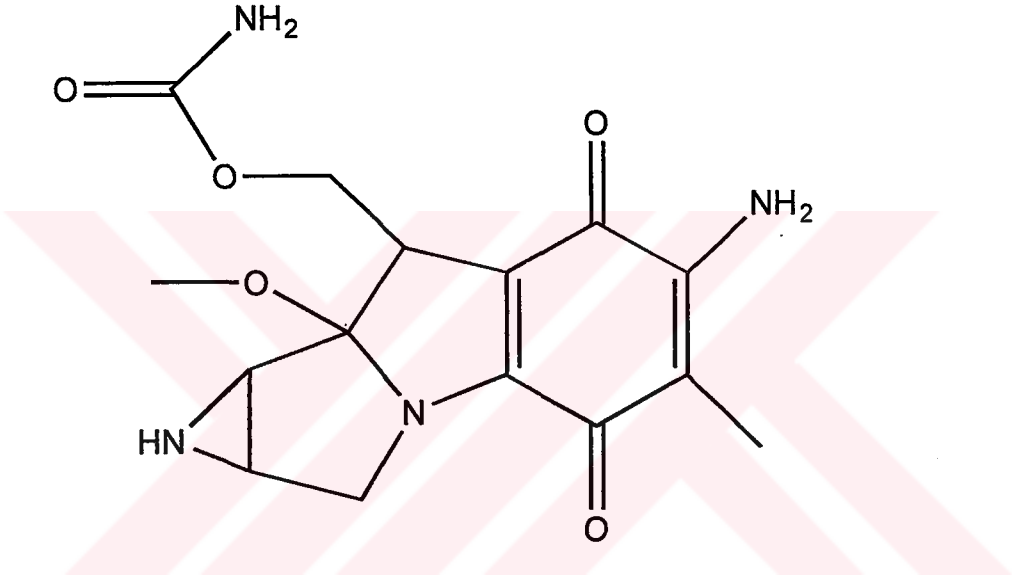
Sodyum klorür (Sigma)

Buzağı timus bezinden elde edilen DNA [=Calf Thymus DNA; çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ss DNA)] (Sigma)

Tüm çalışmalarda Mili Q distile su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25.0 ± 0.5) °C' de gerçekleştirildi.

2.2.1 Mitomycin C (MC) Hakkında Genel Bilgi :

Açık kimyasal formül:



Kapalı kimyasal formül: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

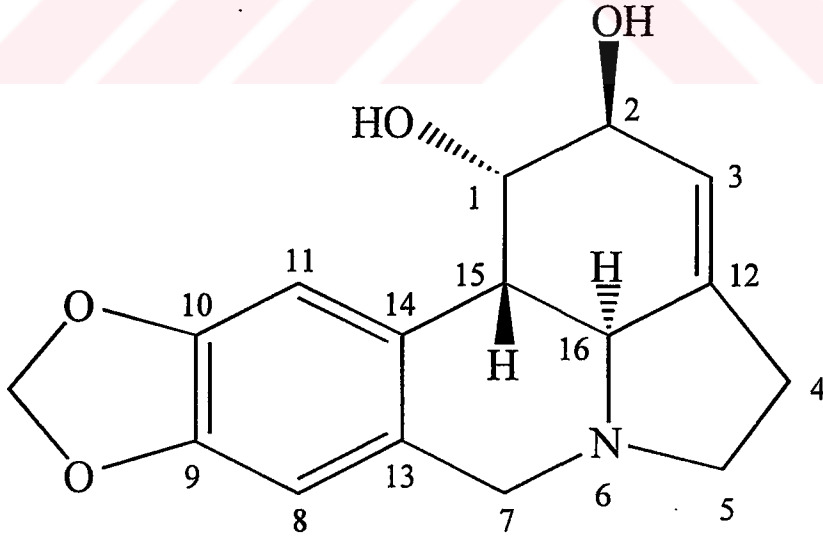
Kimyasal adlandırma: [1aS-(1a α ,8 β ,8a α ,8b α)]-6-amino-8-[[amino karbonil) oksij metil]-1,1a,2,8,8a,8b,-hekzahidro-8a-metoksi-5-metilazirinol[2',3':3,4]pirolo[1,2-a]-indol-4,7-dion, Ametisin

Kimyasal Özellikleri: Su, metanol, aseton, bütül asetat, sikloheksanon içinde güç, benzen, karbontetraklorür ve eterde ise kolay çözünür. Molekül ağırlığı, 334 g/mol'dür.

Farmakolojik özellikleri: Mitomycin C, klinikte solid tümörlere karşı kullanılan antikanser etkili bir antibiyotiktir. Bu ilaç molekülü sitotoksik karakter taşır. Ayrıca çeşitli etkenlerle (deriden penetrasyon (temas etmesi) ya da solunum yolları vb.) bu moleküle maruziyet sonucunda normal insan hücreleri de hasar görmektedir. MC, iki guanin molekülü ile bağlanarak DNA'daki çift zinciri birbirine bağlar. Bu bağlanma DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder (37). MC çok toksik bir maddedir. Letal doz (i.v.) 5 - 9 mg / kg farelerdeki gecikmeli toksisitesi enjeksiyondan 2 gün ile 2 hafta sonra görülmektedir (71,82,93,94,105,108,114).

2.2.2 Lycorine (LYC) Hakkında Genel Bilgi :

Açık kimyasal formül:



Kimyasal adlandırma: 3,12-didehidro-9,10-[metilenbis(oksi)]-galantan-1 α ,2 β -diol

LYC, Amaryllidaceae familyası bitkilerinin taşıdığı ana alkaloidlerin ilgi çekici olanlarından biri olup günümüze kadar farklı genoslara ait türlerde varlığı saptanmıştır (46).

Farmakolojik özellikleri: LYC'in bazı RNA ve DNA virüsleri üzerinde saptanmış antiviral etkisi olduğu bilinmektedir. Çocuk felci, kızamık, Herpes Simplex Tip I gibi bazı virüsleri doza bağımlı olarak inhibe eder. Aynı zamanda sitotoksik ve antimalaryal aktiviteye de sahiptir (65,98). Ayrıca literatürde LYC'in murine ascites tümörün *in vivo* büyümesini inhibe ettiği ve *in vitro* şartlarda tümör hücrelerinin canlılığını azalttığı kayıtlıdır. Murine hücrelerde DNA'nın ve proteinlerin sentezini inhibe ettiği de rapor edilmiştir (39). LYC'in kültüre alınmış K-ras-NRK hücrelerinde protein sentezini spesifik olarak inhibe ettiği ve dolayısıyla da LYC'in memeli hücrelerinde protein sentezinin etkili bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (61). Ayrıca farklı analiz yöntemleri kullanarak (örneğin, HPLC), LYC'in DNA ve/veya RNA ile etkileşmesini gösteren raporlar, literatürde mevcuttur (45,100).

İzolasyonu ve karakterizasyonu: Çalışmada kullanılan LYC Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından, Türkiye'de yetişen *Sternbergia sicula* Tineo ex Guss. ve *Galanthus elwesii* Hook. bitkilerinden izole edilmiş olup, yapısı modern spektroskopik teknikler (NMR, UV, IR, MS) kullanılarak aydınlatılmıştır (58,63).

2.2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

2.2.3.1 Oligonükleotit Çözeltilerinin Hazırlanışı:

Tüm oligonükleotit stok çözeltileri Mili Q distile su ile 1000 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

2.2.3.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı:

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında Mili Q distile su kullandı. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra plastik şişelerde, buzdolabında saklandı. İyonik kuvveti sağlamak için Tris-EDTA tamponu hariç tüm tampon çözeltilerinin litresine derişimi 0.02 M olacak şekilde 1.168 g NaCl eklendi.

0.05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7.4):

Ölçümler sırasında kullanılan 0.05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1.36 g (0.01 mol) KH_2PO_4 ve 6.96 g (0.04 mol) K_2HPO_4 içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7.4 olmaktadır. Gerekliyse pH , 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile 7.4'e ayarlanır.

0.50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4.8):

Kullanılan 0.50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0.2722 g sodyum asetat trihidrat ve 0.1154 mL asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4.8 değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

0.02 M Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7.0):

Kullanılan 0.02 M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3.152 g Trizma HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7.0 değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve / veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8.0):

Kullanılan 0.01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1.576 g Trizma HCl ve 0.372g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8.0 değerine

ayarlanması, 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

2.3 Kullanılan Yöntem

Kullanılan elektrotların aktivasyonu, elektrot yüzeyine dsDNA ve/veya polinükleotitlerin modifiye edilmesi (tutturulması), DNA materyalinin madde ile elektrot yüzeyinde ve/veya çözelti bazında incelenen madde ile etkileşmesine ilişkin basamaklarda, mevcut literatürlerde (28, 32, 83) rapor edilen yol izlenmiştir.

2.3.1. Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı

2.3.1.1. Karbon Pastası Elektrodunun (CPE) hazırlanışı:

Çalışma elektrodu, çapı 3 mm olan cam borudan hazırlandı. İç kısmında karbon pastası içeren elektrotta elektriksel iletkenlik bakır tel ile sağlandı. Karbon pastası, grafit tozu ile mineral yağın 7:3 oranında homojen bir şekilde karıştırılmasıyla hazırlandı. Elektrot (CPE) hazırlandıktan sonra elektrot yüzeyi, yağlı kağıt ile homojen bir yüzey haline çevrildi. Her deneyden önce elektrodun yüzeyi yenilendi (14, 15, 106, 107).

2.3.1.2. Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE) Hazırlanışı:

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot, Tombo kalem uçlarının 3 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (83, 118).

2.3.2. LYC ile DNA etkileşmesinin Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elektrokimyasal incelenmesi:

1000 µg/ml LYC stok çözeltisi Mili Q distile suyla hazırlandı. Çalışma ortamı olarak, 0.5 M asetat tamponu (pH 4.8) ve 0.02 M Tris HCl tamponu (pH 7.0) kullanıldı.

2.3.2.1. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE ve CPE elektrotları kullanılarak guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi:

2.3.2.1-A. CPE kullanılarak yapılan çalışmada izlenen basamaklar:

Karbon pastası elektrodu (CPE) ' nun aktivasyonu: CPE, 0,05M asetat tamponu çözeltisinde (pH:4.8) +1.7 V uygulanarak 60 saniye süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

CPE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive edilmiş CPE, asetat tamponu (pH:4.8) içinde hazırlanmış olan 10 µg/mL konsantrasyonda dsDNA çözeltisine daldırıldı ve +0.5 V gerilim uygulanarak 5 dakika süreyle karışan ortamda DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu ile yapıldı.

Lycorine (LYC)'nin DNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş CPE potansiyel uygulanmaksızın Tris-HCl (pH:7.0) içerisinde hazırlanmış 25-100 µg/ml konsantrasyonlarında değişen LYC çözeltisi içerisinde, 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi Tris tamponu (pH:7.0) ile yapıldı.

Ölçüm: +0.2 V ile +1.4 V arasında 30mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak asetat tamponu (pH 4.8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1.0 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

Ayrıca aynı çalışma, aynı koşullarda yüzeyine DNA modifiye edilmemiş CPE ile tekrarlandı ve sinyallerdeki değişim ölçüldü.

2.3.2.1-B. PGE kullanılarak yapılan çalışmada izlenen basamaklar:

Kalem grafit elektrodu (PGE) ' nun aktivasyonu: PGE, 0.05M asetat tamponu çözeltisinde (pH:4.8) +1.4 V uygulanarak 30 saniye süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

PGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive edilmiş PGE, asetat tamponu (pH:4.8) içinde hazırlanmış olan 16 µg/mL konsantrasyonda dsDNA çözeltisine daldırıldı ve 7.5 dakika süreyle ortamda DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu ile yapıldı.

Lycorine (LYC)'nin DNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş PGE potansiyel uygulanmaksızın Tris-HCl (pH:7.0) içerisinde hazırlanmış 25-100 µg/ml konsantrasyonlarında değişen LYC çözeltisi içerisinde, 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi Tris tamponu (pH:7.0) ile yapıldı.

Ölçüm: +0.2 V ile +1.4 V arasında 30mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genişliğinde tarama yapılarak asetat tamponu (pH 4.8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1.0 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

Ayrıca aynı çalışma, aynı koşullarda yüzeyine DNA modifiye edilmemiş PGE ile tekrarlandı ve sinyallerdeki değişim ölçüldü.

2.3.2.2. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE elektrodu kullanılarak adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi:

Kalem grafit elektrodu (PGE) ' nun aktivasyonu: PGE, 0.05M asetat tamponu çözeltisinde (pH:4.8) +1.4 V uygulanarak 30 saniye süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

PGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive edilmiş PGE, asetat tamponu (pH:4.8) içinde hazırlanmış olan 16 µg/mL konsantrasyonda dsDNA çözeltisine daldırıldı ve 7.5 dakika süreyle ortamda bekletilerek DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu ile yapıldı.

Lycorine (LYC)'nin DNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş PGE potansiyel uygulanmaksızın Tris-HCl (pH:7.0) içerisinde hazırlanmış 25-100 µg/ml konsantrasyonlarında değişen LYC çözeltisi içerisinde, 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi Tris tamponu (pH:7.0) ile yapıldı.

Ölçüm: +0.2 V ile +1.4 V arasında 30mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genişliğinde tarama yapılarak asetat tamponu (pH 4.8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1.2 V civarında gözlenen adenin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

Ayrıca aynı çalışma, aynı koşullarda yüzeyine DNA modifiye edilmemiş PGE ile tekrarlandı ve sinyallerdeki değişim ölçüldü.

2.3.2.3. DNA konsantrasyonundaki değişiminin yanıtta etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada PGE ve dsDNA modifiye edilmiş PGE kullanıldı. Yöntem 2.3.2.1-B'deki koşullarda yapıldı. Ortamdaki dsDNA miktarı, 8 µg/ml'den 32 µg/ml'ye artırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisi incelendi.

2.3.2.4. LYC konsantrasyonundaki değişimin yanıtta etkisinin incelenmesi:

Kalem grafit elektrodu (PGE) ' nun aktivasyonu: PGE, 0.05M asetat tamponu çözeltisinde (pH:4.8) +1.4 V uygulanarak 30 saniye süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

LYC'nin çözelti fazında etkileşmesi: Asetat tamponu içerisinde (pH:4.8) hazırlanan 10 µg/mL dsDNA çözeltisi içersine 0.5-2 µg/ml aralığında artan konsantrasyonlarda LYC ilave edildi. PGE, bu karışım içinde, +0.5V gerilim uygulanarak 5 dakika süreyle karışan ortamda tutuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH:4.8) ile yapıldı.

Ölçüm: +0.2V ile +1.4V arasında 30mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak asetat tamponu (pH: 4.8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. +1.0 V civarında gözlenen guanin bazına ve +1.2 V civarında gözlenen adenin bazına ait yükseltgenme sinyallerindeki değişim incelendi.

2.3.2.5. LYC etkileşim süresindeki değişimin yanıtı etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada PGE ve dsDNA modifiye edilmiş PGE kullanıldı. Yöntem 2.3.2.1-B'deki koşullarda yapıldı. Ortamdaki LYC ile PGE'ye tutturulan dsDNA'in etkileşim süresi, 1-10 dakika arasında değişen sürelerde artırıldı ve etkileşim süresindeki bu değişimin yanıtı olan etkisi incelendi.

2.3.2.6. LYC ile poli[G] etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:

Bu çalışmada PGE ve dsDNA modifiye edilmiş PGE kullanıldı. Yöntem 2.3.2.1-B'deki koşullarda gerçekleştirildi. DNA materyali olarak olarak dsDNA yerine bir polinükleotit olan poli[G] kullanıldı. +1.0 V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi.

2.3.3. Mitomisin C (MC) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:

1000 µg/ml MC stok çözeltisi Mili Q distile suyla hazırlandı. Çalışma ortamı olarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ve 0,02 M Tris HCl tamponu (pH 7,0) kullanıldı.

2.3.3.1. MC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesi:

Kalem grafit elektrodu (PGE) ' nun aktivasyonu: PGE, 0,05M asetat tamponu çözeltisinde (pH:4,8) +1,4 V uygulanarak 30 saniye süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

PGE yüzeyine dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive edilmiş PGE, asetat tamponu (pH:4.8) içinde hazırlanmış olan 10 µg/mL konsantrasyonda dsDNA çözeltisine daldırıldı ve +0.5V gerilim uygulanarak 5 dakika süreyle karışan ortamda DNA elektrot yüzeyine tutturuldu. Yıkama işlemi asetat tamponu ile yapıldı.

Mitomisin C (MC)'nin DNA ile etkileşimi: dsDNA immobilize edilmiş PGE, Tris-HCl (pH:7.0) içerisinde hazırlanmış 2 µg/ml MC çözeltisi içerisinde potansiyel uygulamaksızın, 2 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi Tris tamponu (pH:7.0) ile yapıldı.

Ölçüm: +0,2 V ile +1,4 V arasında 30mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak asetat tamponu (pH 4,8) ortamında ölçüm gerçekleştirildi. + 1,0 V civarında gözlenen guanin ve +1,2 V civarında gözlenen adenin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelendi. Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda, yüzeyine DNA modifiye edilmemiş PGE ile tekrarlandı ve sinyallerdeki değişim ölçüldü.

2.3.3.2. MC konsantrasyonundaki değişimin guanin ve adenin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta olan etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada PGE ve dsDNA modifiye edilmiş PGE kullanıldı. Yöntem 2.3.3.1.'deki koşullarda gerçekleştirildi. Ortamdaki MC miktarı 0.1 µg/ml'den 5 µg/ml'ye artırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisi incelendi.

2.3.3.3. MC konsantrasyonundaki değişimin, MC yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta olan etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada PGE ve dsDNA modifiye edilmiş PGE kullanıldı. Yöntem 2.3.3.1.'deki koşullarda gerçekleştirildi. Ortamdaki MC miktarı 0.1 µg/ml'den 5 µg/ml'ye artırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisi incelendi.

III. BÖLÜM

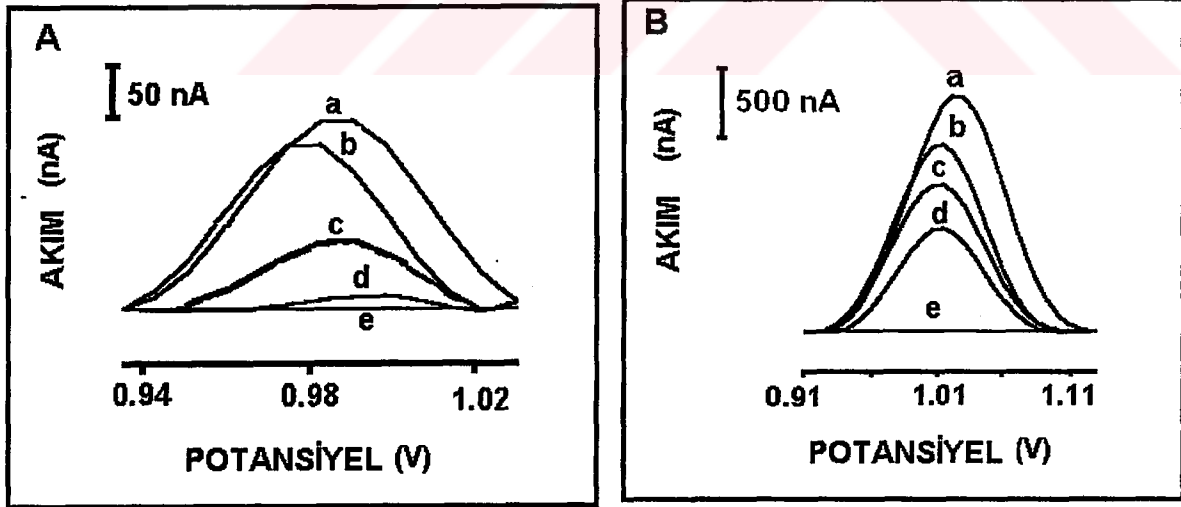
BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. LYC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:

3.1.1. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE ve CPE elektrotları kullanılarak, guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular:

Yöntem, 2.3.2.1-A ve 2.3.2.1-B 'de anlatıldığı gibi yapıldı.

LYC'in CPE ve PGE yüzeyine modifiye edilmiş çift sarmal DNA (dsDNA)'nın etkileşmesini DNA'nın elektroaktif bazı, guanin'e ait +1.0 V 'da gözlenen yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden incelediğimizde, elde edilen voltamogramlar aşağıdaki şekildedir.



Şekil-15: (A) CPE yüzeyinde 10 µg/mL dsDNA olduğu zaman LYC ile etkileşime ait diferansiyel puls voltamogramları : Guanin yükseltgenme sinyalleri (a) etkileşim öncesi dsDNA modifiye edilmiş CPE'de elde edilen guanin yükseltgenme sinyali. CPE yüzeyinde dsDNA ile etkileşen LYC konsantrasyonu (b) 25 µg/mL, (c) sinyali. CPE yüzeyinde dsDNA ile etkileşen LYC konsantrasyonu (b) 25 µg/mL, (c) sinyali.

50 µg/mL, (d) 100 µg/mL, (e) 25 µg/mL konsantrasyonda yalnız LYC , 0.05 M asetat tamponu (pH: 4.80) içinde dsDNA modifiye edilmiş CPE'de. (B) PGE yüzeyinde 16 µg/mL dsDNA olduğu zaman LYC ile etkileşime ait diferansiyel puls voltamogramları (a) dsDNA modifiye edilmiş PGE'de elde edilen guanin yükseltgenme sinyali. PGE yüzeyinde dsDNA ile etkileşen LYC konsantrasyonu (b) 25 µg/mL , (c) 50 µg/mL, (d) 100 µg/mL , (e) DNA içermeyen ortamda 25 µg/mL LYC konsantrasyonunda gözlenen sinyal.

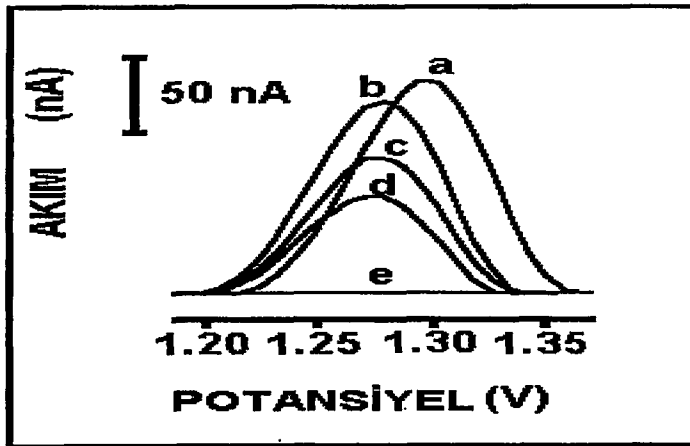
Yapılan araştırmalar sonunda, LYC'in bazı RNA ve DNA virüsleri üzerinde saptanmış antiviral etkisi olduğu bilinmektedir. Çocuk felci, kızamık, Herpes Simplex Tip I gibi bazı virüsleri doza bağımlı olarak inhibe eder. Aynı zamanda sitotoksik ve antimalaryal aktiviteye de sahiptir (65,98). Ayrıca literatürde LYC'in murine ascites tümörün *in vivo* büyümesini inhibe ettiği ve *in vitro* şartlarda tümör hücrelerinin canlılığını azalttığı kayıtlıdır. Murine hücrelerde DNA'nın ve proteinlerin sentezini inhibe ettiği de rapor edilmiştir (39). LYC'in kültüre alınmış K-ras-NRK hücrelerinde protein sentezini spesifik olarak inhibe ettiği ve dolayısıyla da LYC'in memeli hücrelerinde protein sentezinin etkili bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (61). Çalışmamızda ise, LYC'in 25, 50 ve 100 µg/mL gibi değişik konsantrasyonlarının dsDNA modifiye edilmiş PGE ile etkileşmesi sonucunda, guaninin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta bir azalma görüldü.

25 µg/mL konsantrasyondaki LYC'in, CPE yüzeyine immobilize edilmiş 10 µg/mL konsantrasyonundaki dsDNA ile etkileşimine ait tekrarlanabilirlik çalışmasında, guanin yükseltgenme sinyali üzerinden DPV ölçümü yapıldığında (n=3), bağıl standart sapması %11.3 olan 166.1 nA düzeyinde bir sinyal elde edildi ve tayin sınırı S/N=3'den, 225 ng/mL olarak hesaplandı.

25 µg/mL konsantrasyondaki LYC'in, PGE yüzeyine immobilize edilmiş 16 µg/mL konsantrasyonundaki dsDNA ile etkileşimine ait tekrarlanabilirlik çalışmasında, guanin yükseltgenme sinyali üzerinden DPV ölçümü yapıldığında (n=3), bağlı standart sapması % 4.6 olan 1242 nA düzeyinde anlamlı bir sinyal elde edildi ve tayin sınırı S/N=3'den, 30.2 ng/mL olarak hesaplandı. Elde edilen bulgular incelendiğinde CPE ile elde edilen değerlere kıyasla, PGE ile elde edilen tayin sınırının daha düşük olduğu ve sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu görülmektedir. Çalışmada tekrarlanabilirliği, hassasiyeti, tek kullanımlık olması, çalışmaya getirdiği kolaylık ve çalışma süresini kısaltması nedeniyle, PGE daha uygun bulunmuştur.

3.1.2. LYC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, adenin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular:

Yöntem, 2.3.2.2.' de anlatıldığı gibi yapıldı. LYC'in PGE yüzeyine modifiye edilmiş çift sarmal DNA (dsDNA)'nın etkileşmesini DNA'nın elektroaktif bazı, adenine ait, +1.20 V'da gözlenen yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden incelediğimizde, elde edilen voltamogram aşağıdaki şekildedir.



Şekil-16: PGE yüzeyinde 16 µg/mL dsDNA olduğu zaman LYC ile etkileşime ait diferansiyel puls voltamogramları : Adenin yükseltgenme sinyalleri (a) etkileşim öncesi dsDNA modifiye edilmiş PGE'de elde edilen adenin yükseltgenme sinyali. PGE yüzeyinde dsDNA ile etkileşen LYC konsantrasyonu (b) 25 µg/mL , (c) 50 µg/mL, (d) 100 µg/mL, (e) DNA içermeyen ortamda 25 µg/mL LYC konsantrasyonunda gözlenen sinyal.

LYC'in 25, 50 ve 100 µg/mL gibi değişik konsantrasyonlarının dsDNA modifiye edilmiş PGE ile etkileşmesi sonucunda adeninin yükseltgenme sinyalinde, yanıtta bir azalma görüldü.

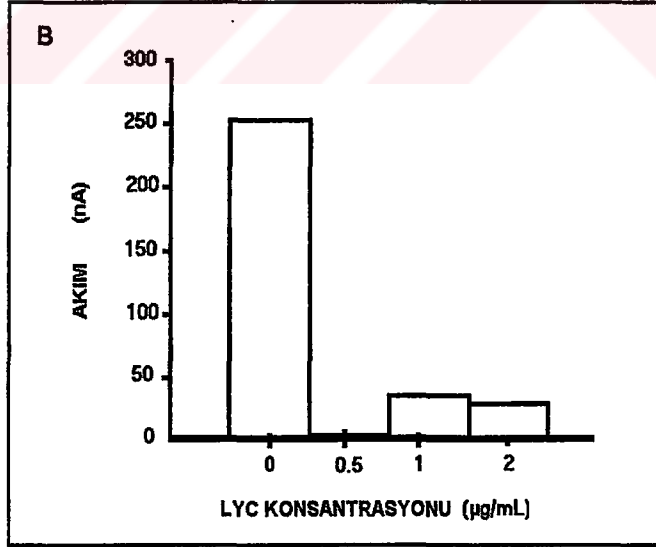
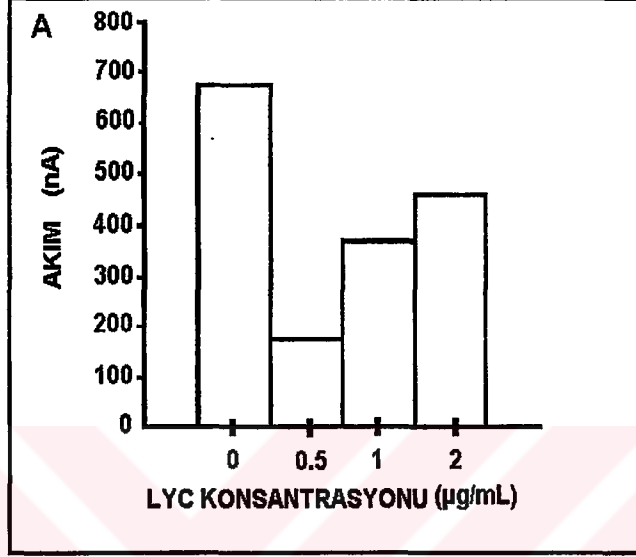
Guanin ve adenin sinyallerindeki bu azalma, LYC'in bu bazlara bağlanmasından meydana gelebilir: gözlenen değişim, adenin ve guanin gibi yükseltgenebilen grupları olan elektroaktif bazların LYC'in elektrot yüzeyindeki DNA ile etkileşirken hasar görmesi şeklinde açıklanabilir.

3.1.3. dsDNA konsantrasyonundaki değişimin yanıtta etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem, 2.3.2.3. 'de anlatıldığı gibi yapıldı. LYC'in optimum konsantrasyonu 25 µg/mL olduğunda DNA konsantrasyonu 8 µg/mL'den 32 µg/mL'ye artırıldığı zaman, ne guanin sinyalinde ne de adenin sinyalinde bir değişiklik gözlenmedi. Bütün deneylerde dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum dsDNA konsantrasyonu olarak 16 µg/mL kullanıldı.

3.1.4. LYC konsantrasyon değişiminin yanıtı etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem, 2.3.2.4. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-17: LYC'in dsDNA ile etkileşiminde, LYC konsantrasyon değişiminin yanıtı etkisinin incelenmesine ait histogram: **(A)** guanin ve **(B)** adenin yükseltgenme sinyali.

dsDNA, çözelti fazındaki LYC'in artan konsantrasyonları ile etkileştiği zaman, LYC'in 0,5 µg/mL'a kadar olan konsantrasyonda guanin sinyaline ait yanıtta hızlı bir azalma gözlemlendi ve bu konsantrasyon değerinden sonra, yanıt 1 µg/mL'ya kadar arttı. 1 µg/mL ile 2 µg/mL konsantrasyon aralığında, arasında yanıtta bir artma gözlemlenmedi.

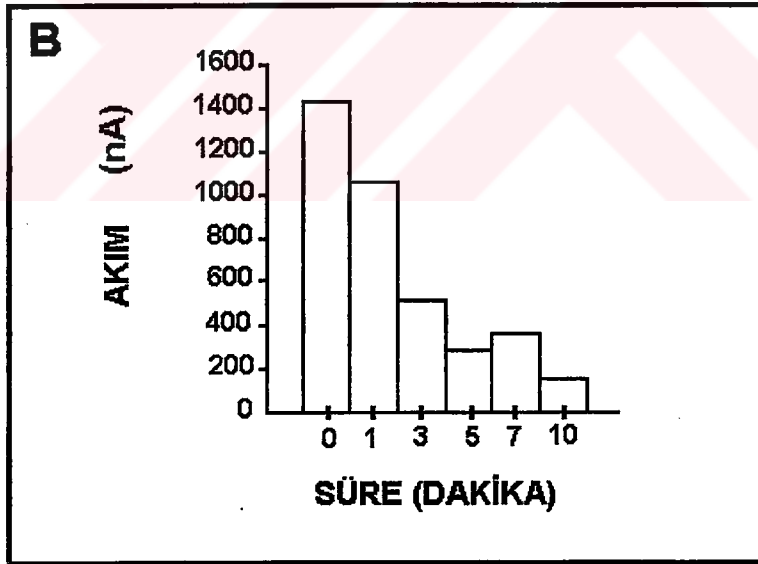
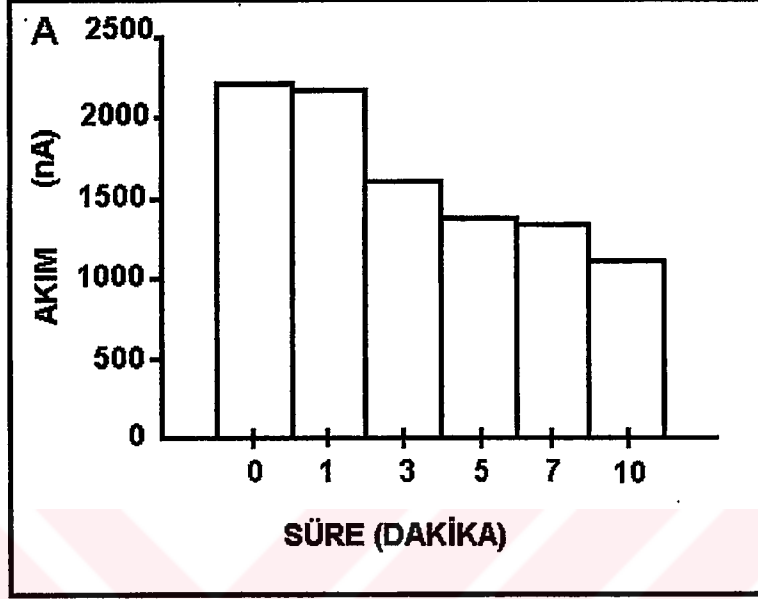
Guanin sinyallerindeki artma dsDNA sarmal yapısının açılmasına ve/veya bozulmasına dayandırılabilir. Guaninin oksidasyon sinyalindeki benzer bir artış, DNA yapısını bozan ajanlar için Fojta ve arkadaşları (38) tarafından damlayan civa elektrodu ile ve Erdem ve arkadaşları (28, 32, 33) tarafından CPE / PGE kullanılarak gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, LYC dsDNA sarmalını açtığı zaman guanin bazları yükseltgenmeye uygun hale gelebilmektedir, buna bağlı olarak daha yüksek bir guanin sinyali gözlemlenmektedir şeklinde yorumlanabilir.

dsDNA, çözelti fazındaki LYC'in artan konsantrasyonları ile etkileştiği zaman, LYC'in 0,5 µg/mL'a kadar olan konsantrasyonda adenin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta dramatik bir azalma gözlemlendi. 1 µg/mL'a kadar keskin bir artış görüldü. Konsantrasyon aralığı, 1 µg/mL ile 2 µg/mL arasında yanıtta bir artma gözlemlenmedi. Adenin sinyaline dayalı sonuçlar guanin sinyaline dayalı sonuçlarla paralellik göstermektedir. Adenin sinyaline dayalı yanıtta benzer bir azalma, dsDNA sarmal yapısının açılmasına ve/veya bozulmasına dayandırılabilir. Ayrıca LYC, dsDNA sarmalını açtığı zaman adenin bazları yükseltgenmeye uygun hale gelebilmektedir şeklinde yorumlanabilir.

3.1.5. LYC etkileşim süresinin yanıt etkisinin incelenmesine ilişkin

bulgular:

Yöntem, 2.3.2.5. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



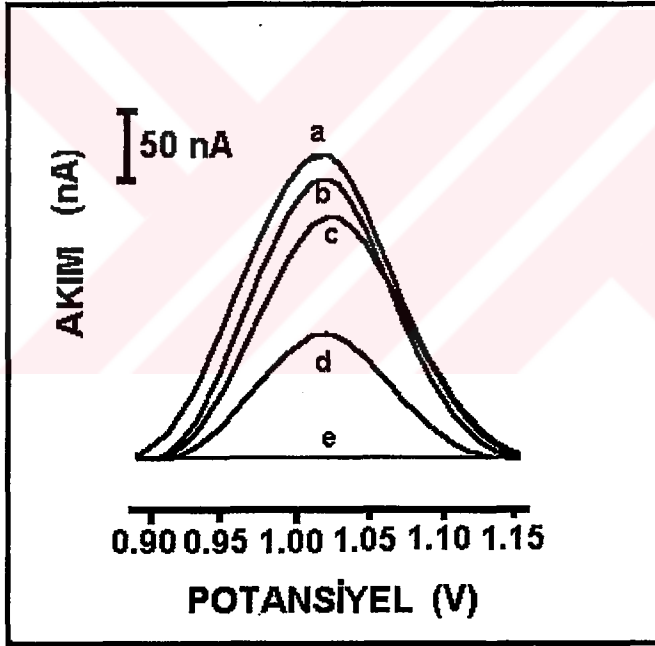
Şekil-18: LYC'in dsDNA ile etkileşiminde, etkileşim süresinin yanıt etkisinin incelenmesine ait histogram: (A) guanin ve (B) adenin yükseltgenme sinyali.

LYC'in etkileşim süresi olarak 1 dakika ile 10 dakika arasında değişen süreler uygulandı. 1 dakikaya kadar guanin oksidasyon sinyaline dayalı yanıtta kademeli bir

azalma ve 1 dakikadan 3 dakikaya kadar olan sürede ise, yanıtta keskin bir azalma elde edildi. 3 dakikadan sonra 10 dakikaya kadar kademeli bir azalma gözlemlendi. LYC'in etkileşim süresi, 10 dakikaya kadar yükseltildiğinde, adenin sinyalinde ilk 3 dakikada hızlı bir azalma elde edildi ve 3 dakikalık etkileşim süresinden sonra bu sinyalde, 10 dakikaya kadar daha fazla azalma gözlenmedi. LYC'in dsDNA ile etkileşmesi için optimum süre 5 dakika olarak belirlendi.

3.1.6. LYC ile poli[G] etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem, 2.3.2.6. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-19: PGE yüzeyinde 10 µg/mL poli[G] olduğu zaman LYC ile etkileşime ait diferansiyel puls voltamogramları. Guanin yükseltgenme sinyalleri; (a) etkileşim öncesi dsDNA modifiye edilmiş PGE'de elde edilen guanin yükseltgenme sinyali. PGE yüzeyinde dsDNA ile etkileşen LYC konsantrasyonu (b) 25 µg/mL , (c) 50

$\mu\text{g/mL}$, (d) 100 $\mu\text{g/mL}$, (e) DNA içermeyen ortamda 25 $\mu\text{g/mL}$ LYC konsantrasyonunda gözlenen sinyal.

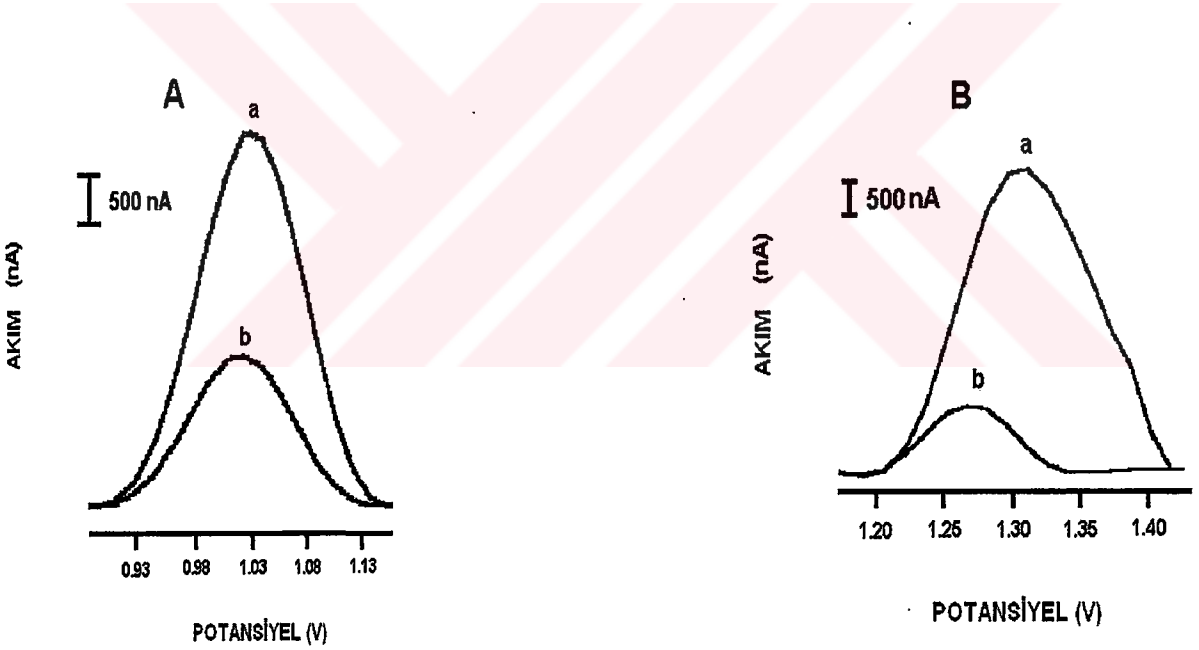
Poli[G] modifiye edilmiş PGE'den elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinde , 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon oranlarında LYC ile etkileşme sonucunda benzer şekilde azalma gözlemlendi. Poli[G] modifiye edilmiş PGE'den elde edilen guanin yükseltgenme sinyalindeki azalmanın nedeni , LYC'in en elektroaktif baz olan guanine bağlanması şeklinde açıklanabilir.



3.2. MC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:

3.2.1. MC ile DNA etkileşmesinin PGE kullanılarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden elektrokimyasal olarak incelenmesinde elde edilen bulgular:

Yöntem, 2.3.3.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı. MC'nin PGE yüzeyine modifiye edilmiş dsDNA ile etkileşmesini, DNA'nın elektroaktif bazları guanin ve adenine ait, sırasıyla +1.0 V ve +1.20 V'da gözlenen yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelediğimizde, elde edilen voltamogramlar aşağıdaki şekildedir.



Şekil-20: PGE yüzeyinde 10 µg/mL dsDNA olduğu zaman MC ile etkileşime ait diferansiyel puls voltamogramları; (A) 10 µg/mL dsDNA'da etkileşim öncesi gözlenen guanin yükseltgenme sinyali (a), 10 µg/mL DNA'nın 2 µg/mL MC ile etkileşim sonrası gözlenen guanin yükseltgenme sinyali (b); (B) 10 µg/mL DNA'da

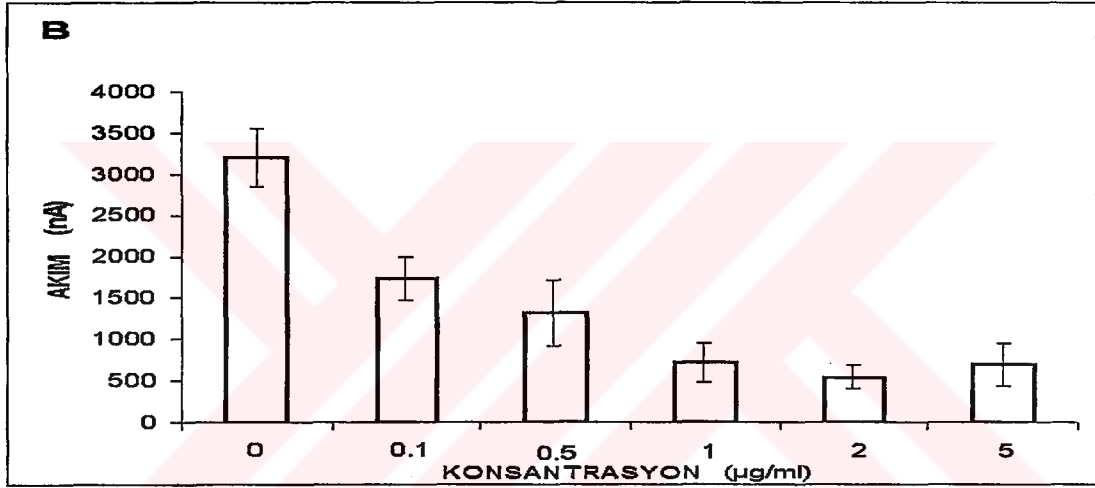
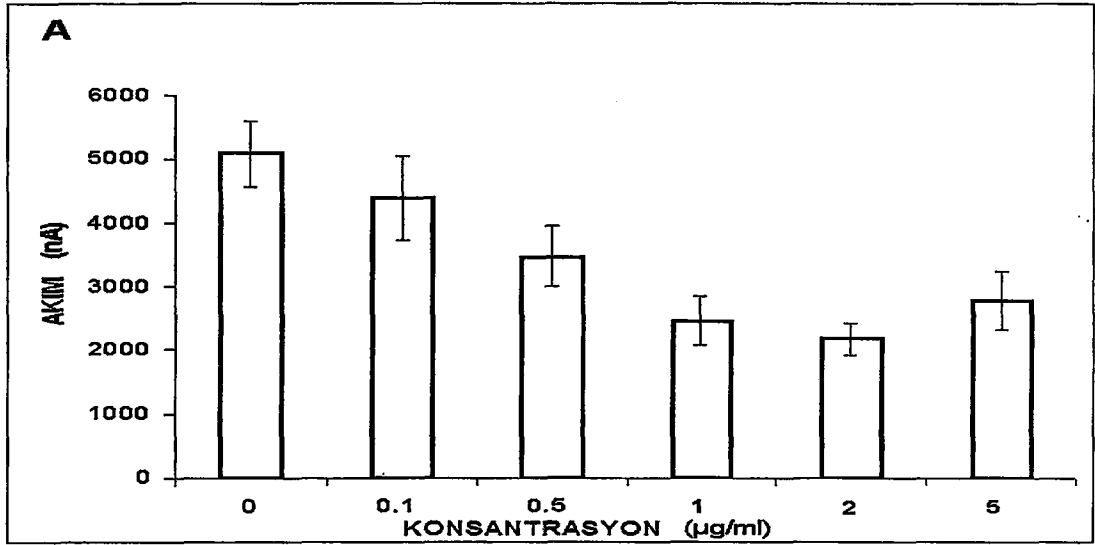
etkileşim öncesi gözlenen adenin yükseltgenme sinyali (a), 10 µg/mL DNA'nın 2 µg/mL MC ile etkileşim sonrası gözlenen adenin yükseltgenme sinyali (b).

Yapılan araştırmalar sonunda, MC'nin DNA ile etkileşme mekanizması şu şekilde açıklanmıştır (35): MC, iki guanin molekülü ile bağlanarak DNA'daki çift zinciri birbirine bağlar. Bu bağlanma DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder. Çalışmamızda ise, MC'nin DNA ile etkileşimi sonrasında, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerinde, gözlenebilir bir azalma mevcuttur. MC'nin elektrot yüzeyindeki DNA ile etkileşmesi sonrasında, DNA'nın çift sarmal yapısını bozabileceği ve/veya MC'nin DNA'nın guanin ve adenin bazlarına spesifik bir bağlanmanın mümkün olabileceği ve bunun sonucunda sinyalde bir azalma gözlemlendiği şeklinde açıklanabilir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, literatürdeki mevcut çalışmalarda rapor edilen sonuçlara paralel olduğu görülmektedir (71,82).

2 µg/mL konsantrasyondaki MC'nin, PGE yüzeyine immobilize edilmiş 10 µg/mL konsantrasyonundaki dsDNA ile etkileşimine ait tekrarlanabilirlik çalışmasında, guanin yükseltgenme sinyali üzerinden DPV ölçümü yapıldığında (n=3), bağıl standart sapması % 4.2 olan 2320 nA düzeyinde anlamlı bir sinyal elde edilmiştir. MC'nin tayin sınırı S/N=3'den, 2 ng/mL'dir. Elde edilen bulgular incelendiğinde, PGE ile elde edilen sonuçlardan hesaplanan bağıl standart sapma değeri ve tayin sınırının, rapor edilen mevcut çalışmalarda (82,105) kullanılan asılı civa damla elektrodu, CPE ve perde baskılı karbon elektrotlar (karbon-SCPE) ile elde edilen sonuçlara kıyasla daha düşük olduğu ve sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu görülmektedir.

3.2.2. MC konsantrasyon değişiminin guanin ve adenin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıt etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem, 2.3.3.2.'de anlatıldığı gibi yapıldı.

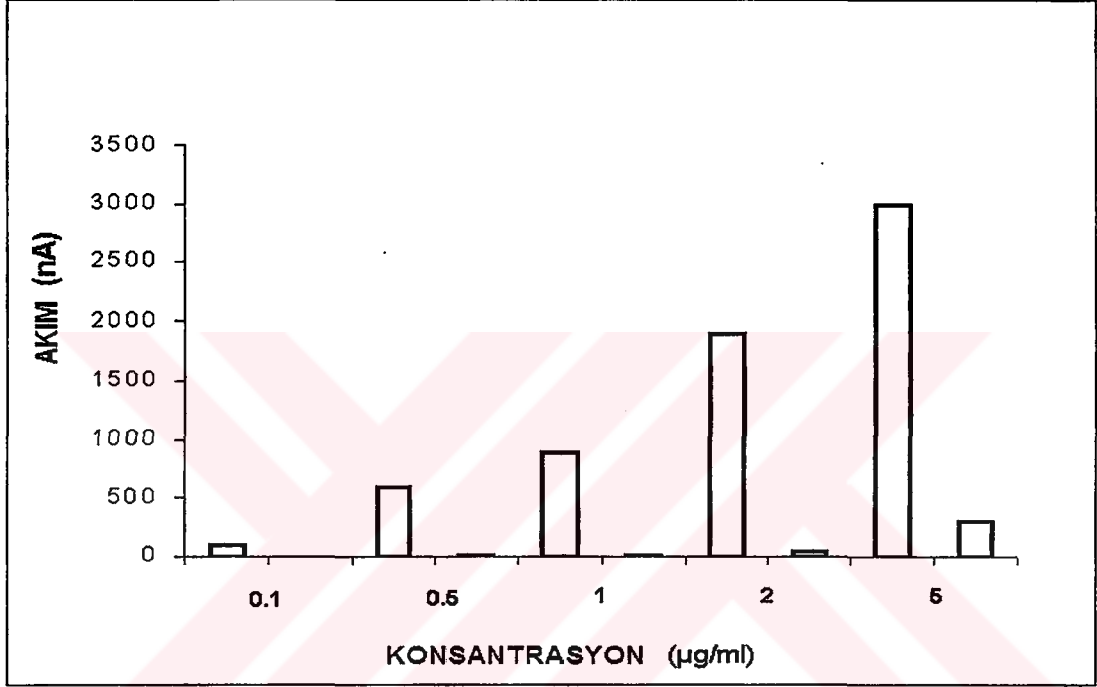


Şekil-21: MC konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin incelenmesine ait histogram: (A) guanin , (B) adenin yükseltgenme sinyali.

MC'nin dsDNA ile etkileşimi sonrası, MC konsantrasyonunun artışına bağlı olarak hem guanin, hem de adenin yükseltgenme sinyalinde bir azalma gözlemlendi ve optimum MC konsantrasyonunun 2 µg/mL olduğu bulundu.

3.2.3. MC konsantrasyonundaki değişimin, MC yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisine ilişkin bulgular:

Yöntem, 2.3.3.3.'de anlatıldığı gibi yapıldı. MC'nin PGE yüzeyine modifiye edilmiş çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşmesi, + 0.873 V 'da gözlenen MC 'nin yükseltgenme sinyalindeki değişim üzerinden incelendi.



Şekil-22: MC konsantrasyon değişiminin MC yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta etkisinin incelenmesine ait histogram.

Çalışmamızda MC'nin dsDNA ile etkileşimi sonrası, MC konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde bir azalmanın yanında aynı şekilde MC nin kendi yükseltgenme sinyalinde de bir azalma gözlemlendi ve optimum MC konsantrasyonunun 2 µg/mL olduğu bulundu.

IV.BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Moleküler tanı ve Farmakogenetik çalışma alanlarında biyosensör tasarımı için kullanılan nükleik asit tanıma katmanları, yeni ve ilgi çekicidir. DNA katmanlarına dayalı biyosensörlerin tasarımı ile ortaya çıkan elektrokimyasal DNA biyosensörleri (genosensörler) ile gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki daha hızlı, daha güvenilir ve daha ucuz DNA analizlere olanak sağlayan biyoçiplere ait önemli adımlar atılmış olacaktır.

4.1. LYC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

LYC'in DNA ile etkileşmesi sonucunda, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim incelenmiş ve geliştirilen yöntem, LYC ile DNA'nın etkileşme mekanizmasının tayini için kullanılmıştır. DNA ile etkileşen çeşitli maddelerin voltametrik davranışlarının tayini, kemoterapide kullanılan DNA'ya özgül olarak bağlanan moleküllerin dizayn edilmesi ve DNA'ya bağlı hasta başı teşhislerde kullanılan biyoteknolojik araçların geliştirilmesinde büyük bir önem taşımaktadır.

Çalışmanın amacı olan DNA ile etkileşen yeni sentezlenen bileşiklerin DNA ile etkileşim türlerinin, geliştirilen bu yöntemle tayini ilaç-DNA etkileşim mekanizmalarının çözülmesinde tek kullanımlık elektrot sistemi ile kombine elektrokimyasal metodların geliştirilmesidir. Bu amaçla karbon pastası elektrodu (CPE) ve kalem grafit elektrodu (PGE) kullanılarak diferansiyel puls voltametri tekniğine dayalı daha hızlı, daha ucuz ve yeni bir yöntem geliştirilmiştir.

4.2. MC ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

MC'nin DNA ile etkileşmesi sonucunda, guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerindeki değişim yanında, MC'nin kendi yükseltgenme sinyalindeki değişimde incelenmiştir. DNA ve antikanser bir ilaç olan MC'ye ait yükseltgenme sinyallerinde gözlenen azalma, MC'nin DNA ile etkileşme mekanizmasının tayini için kullanılmıştır. Etkileşim sonrası gözlenen guanin ve adenin sinyalindeki bu azalma, dsDNA sarmal yapısının açılmasına ve/veya bozulmasına dayandırılabilir. MC'nin DNA ile etkileşme sonrasında, kendi sinyalindeki azalma ise, MC'nin yapısında yer alan yükseltgenebilecek gruplara ait bir hasara dayandırılabilir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ve gelecekte planlanan çalışmaların amacı; DNA'ya hedefli yeni bileşiklerin DNA ile etkileşim türlerinin, elektrokimyasal olarak belirlenmesini sağlamak ve böylece, antikanser ilaç-DNA etkileşim mekanizmalarının hızlı ve güvenli bir şekilde tanımlanmasına alternatif olabilecek, bu sebeplerden dolayı DNA çip teknolojisine uyarlanabilecek yeni bir yöntem tasarlamaktır. Kullanılan yöntem, basit ve düşük maliyetli olup, hızlı ve seçimli şekilde yanıt verebilmektedir. Ayrıca, kalem grafit elektrot (PGE) ile kombine tek kullanımlık elektrot sistemini kullanarak, ilaç olarak hedeflenen maddenin az miktarlarında çalışmayı mümkün kılabilir.

Sonuç olarak, gelecekte DNA'ya hedefli ilaç olarak sentezlenen maddelerin kullanılabilirliğinin araştırılmasına yönelik yeni bir yöntem geliştirilmiştir. İlaç-DNA kompleksinin fonksiyonlarının incelenmesi ve bu fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi, ilaç moleküllerinde hedeflerine göre yapmamız gerekli olan tasarımlar için önemlidir. DNA-ilaç etkileşmelerinin türü ve DNA bazlarındaki yapı değişimleri, geliştirilen elektrokimyasal genosensörler ile aydınlatıldığında, belki ilacın biyolojik

fonksiyonlarını içeren kurallar açıklanabilir. Bu kurallar sayesinde, kullanımda olan ilacın aktivitesini arttırmak veya istenen aktiviteyi gösterecek gerekli yapılara sahip yeni bir sınıf bileşikler dizayn etmek mümkün olacaktır. DNA analizlerine dayalı tasarımılanan elektrokimyasal genosensörlerin, yeni sentezlenecek olan antibiyotik, antiviral, antikanser ilaç ve antisense oligonükleotitlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına katkıda bulunmak ve/veya bir ilaç hammadesinin daha duyarlı bir şekilde tayinini yapmak amacıyla, gelecekte piyasaya sürülecek DNA biyoçiplerinin teknolojisini oluşturacağı ümit edilmektedir.



ÖZET

Çalışmamızda Mitomycin-C (MC) ve Lycorine (LYC) gibi bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmesi, elektrokimyasal yöntemlerle; katı fazda, karbon pastası elektrodu (CPE) ve kalem grafit elektrot (PGE) kullanılarak incelendi. Bu maddelerin çift sarmal DNA (dsDNA) ve/veya polinükleotit ile etkileşmesi, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile incelendi. Deneysel parametrelerdeki farklılık (incelenen madde veya ilaç konsantrasyonu, DNA konsantrasyonu, madde-DNA etkileşme süresi) DPV tekniğiyle ölçüm yapılarak incelendi; ayrıca tayin sınırı ve tekrarlanabilirlik parametreleri de incelendi.

Değişik konsantrasyonlardaki LYC'in hem katı fazda, hem de çözelti fazında dsDNA ve/veya polinükleotit ile etkileşmesi sonucunda, guanin ve adeninin yükseltgenme sinyaline dayalı yanıtta bir azalma görüldü. Bu değişim, DNA'nın elektroaktif bazları olan guanin ve adenine ait yükseltgenebilen grupların kısmen hasar görmesi şeklinde yorumlanabilir.

MC'nin dsDNA ile etkileşiminde, hem DNA'nın elektroaktif bazları olan guanin ve adeninin yükseltgenme sinyallerinde, hem de MC'nin yükseltgenme sinyalinde bir azalma gözlemlendi. MC'nin elektrot yüzeyinde DNA ile etkileşmesi sonrasında yanıtta gözlenen bu azalma, MC'nin DNA'nın çift sarmal yapısını bozabileceği şeklinde yorumlanabilir.

SUMMARY

In this study, the interaction of DNA at the electrode surface in solid state with some DNA targetted compounds; Mitomycine-C (MC) and Lycorine (LYC), was studied electrochemically by using carbon paste electrode (CPE) and pencil graphite electrode (PGE). The interaction of these compounds with double stranded DNA (dsDNA) and/or polynucleotide was studied by using the differential pulse voltammetry (DPV). The differences in the experimental parameters (the concentration of the studied compound or drug, the concentration of DNA, the interaction time of compound with DNA) were studied by measurements using DPV technique. Moreover, the detection limit and the reproducibility were determined.

As a result of the interaction of LYC in different concentrations with dsDNA and/or polynucleotide, a decrease was observed in the response based on the signal of guanine and adenine. This phenomenon could be explained by giving a damage to the oxidizable groups of electroactive bases; guanine and adenine.

In the interaction of MC with dsDNA, a decrease was observed both in the oxidation signals of guanine, adenine and also MC. The decrease observed in the response after interaction of MC with DNA at the electrode surface could be explained as being due to the possible damage of MC to the double helix form of DNA.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
2. Barry, J. P., Norwood, C., Vouros, P. (1996). Detection and identification of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 1432-1438.
3. Barton, J. K., Goldberg, J. M., Kumar, C. V. , Turro, N. J. (1986). Binding modes and base spesificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity , *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2081-2088.
4. Bej, A. K. (1996). Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, *Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications*; Dangler, C. A., Wiley-Liss (Ed), Inc., s. 1-29.
5. Bertino, J. R. (1992). Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C. M. and Reynard, A. M., *Section IX - Cancer Chemotherapy*; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
6. Brabec, V. (1983). Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces - The effects of base composition in DNA and the chemical nature of the adsorbent, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11: 245-255.
7. Brabec, V., Dryhurst, G. (1978). Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode a new probe for studies of polynucleotide structure and reactions, *Electroanal. Chem.*, 89: 161-173.

8. Brabec, V., Koudelka, J. (1980). Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7: 793-805.
9. Brett, A. M. Oliveira, Macedo, T. R. A., Raimundo, D., Marques, M. H., Serrano, S. H. P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 861-867.
10. Brett, A. M. Oliveira, Serrano, S. H. P., Gutz, I., La-Scalea, M. A., Cruz, M. L. (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137.
11. Brett, A. M. Oliveira, Serrano, S. H. P., Macedo, T. A., Raimundo, D., Marques, M. H., La-Scalea, M. A. (1996). Electrochemical determination of Carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 8: 992-995.
12. Brett, C. M. A., Brett, A. M. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, 3.baskı
13. Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E. (1996). Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids, *Electroanalysis*, 8 (8-9): 753-758.
14. Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E. (1996). Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrodes, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.
15. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997). Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.

16. Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De.Engl.*, 30: 516-539.
17. Carter, M. T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7528-7530.
18. Carter, M. T., Rodriguez, M., Bard, A. J. (1989) Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2, 2'-Bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8901-8911.
19. Chiti, G., Marazza, G., Mascini, M. (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 427: 155-164.
20. Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E. , Chakravarti, A. Gesteland, R., Walters, L. and the members of the DOE and NIH planning groups. (1998). New goals for the U.S. Human Project: 1998-2003, *Science*, 282: 682-689.
21. Coulet, P. R. (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, L.J.Blum, P.R. Coulet (Ed), M. Dekker Inc., New York, 1-6.
22. Deforce, D. L. D., Ryniers, F. P. K., Van den Eeckhout, E. G., Lemiere, F. Esmans, E. L. (1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 3575-3584.
23. Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S., Pfeifer, G. P. (1996). Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53, *Science*, 274: 430-432.
24. Dervan, P. B. (1986). Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471.

25. Dervan, P. B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
26. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; R. R. Sinden (Ed), Academic Press, California, 1994, sayfa 1-57.
27. Prof. Dr. A. Yıldız , Prof. Dr. Ö. Genç, (1993). Enstrümental Analiz, *Hacettepe Yayınları*, A-64, sayfa;289-384.
28. Erdem, A., Ozsoz, M. (2001). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437: 107-114.
29. Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U. S., Ozsoz, M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta*, 422: 139-149.
30. Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U. S., Ozsoz, M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis*, 11: 586-588.
31. Erdem, A., Isabel, P. M., Del Valle, M., Alegret, S. (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567: 29-37.
32. Erdem, A., Ozsoz, M. (2001). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem*, 25: 469-475.
33. Erdem, A., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-Drug interactions, *Electroanalysis*, 14: 965-974.
34. Evans, A.(1991). Potentiometry and ISE , *ACOL*, London, s.106-198.

35. Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Prof. Dr. İ. Dökmeci (Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.
36. Firedman, T., Brown, D. M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxidemodification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, 5: 615-623.
37. Fleisher, M. B., Mei, H. Y. and Barton, J. K. (1998). Metal complexes which target DNA sites: coupling recognition to reactivity, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag (Ed), Berlin, s.65-84.
38. Fojta M., Havran L., Palecek E. (1997). Chronopotentiometric detection of DNA strand breaks with mercury electrodes modified with supercoiled DNA, *Electroanalysis*, 9: 1033-1034.
39. Ghosal S., Saini K. S., Razdan S. (1985). *Crinum alkaloids: Their Chemistry and Biology*, *Phytochemistry*, 24: 2141-2156.
40. Gooding J. J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors, *Electroanal.* 14: 1149.
41. Hall, E. A. H.(1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context , *Open University Press*, İngiltere; s.3-30.
42. Hibbert, D. B., Gooding, J. J., Erokhin, P. (2002). Kinetics of irreversible adsorption with diffusion: application to biomolecule immobilization, *Langmuir*, 18: 1770-1776
43. Hodgson, J. (1998). Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future, *Nature Biotech.*, 16: 725-727.
44. Hogue, C. (2000). Identifying carcinogens, *Chem.&Eng. News*, 76: 8-9.
45. Hohmann, J., Forgo, P., Molnar, J., Wolfard, K., Molnar, A., Thalhammer, T., Mathe, I., Sharples, D. (2002). Antiproliferative Amaryllidaceae Alkaloids isolated

from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis festalis*, *Planta Med.*, 68:454-457.

46. Hoshino, O., Cordell, A. G. (Ed.), (1998). The alkaloids chemistry and pharmacology, *Academic Press*, 51: 323-424.
47. Jelen, F., Erdem, A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, 55: 165-167.
48. Jelen, F., Tomschik, M., Palecek, E. (1997). Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA, *J. Electroanal. Chem.*, 423: 141-148.
49. Johnston, D. H., Glasgow, K. C., Thorp, H. H. (1995). Electrochemical Measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 8933-8938.
50. Johnston, D. H., Thorp, H. H. (1996). Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics, *J. Phys. Chem.*, 100: 13837-13843.
51. Johnston, D. H., Welch, T. W., Thorp, H. H. (1996). Electrochemically activated nucleic acid oxidation; Metal Ions in Biological systems, Sigel, A., Sigel, H. (Ed); Vol. 33: *Marcel Dekker*, Inc, NY; 299-324.
52. Ju, H., Zhou, J., Cai, C., Chen, H. (1995). The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode, *Electroanal.*, 7: 1165-1170.
53. Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Irem Kaya, G., Unver, N., Kivcak, B., Ozsoz, M. (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 295-302.

54. Kelley, S. O., Barton, J. K. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, 8: 31-37.
55. Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E. D. A. and Barton, J. K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 9861-9870.
56. Kelley, S. O., Boon, E. M., Barton, J. K., Jackson, N. M., Hill, M. G. (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids Res.*, 27: 4830-4837.
57. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P. E., Ozsoz, M., (2003). Label - free bioelectronic detection of point mutation by using peptide nucleic acid probes and methylene blue, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-4.
58. Kivçak, B., Gözler, T., (1993). *Sternbergia sicula* alkaloitleri, *Ege Üniversitesi Eczacılık Fak. Derg.*, 1: 65-71.
59. Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y. S., Giannoula, K., Mikkelsen, S. R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay, *Anal. Chem.*, 68: 1197-1200.
60. Kulys, J., Hansen, H. E., Buch-Rasmussen, T., Wang, J., Ozsoz, M. (1994). Glucose biosensor based on the incorporation of Meldola Blue and glucose oxidase within carbon paste, *Anal. Chim. Acta*, 288: 193-196.
61. Kushida, N., Atsumi, S., Koyano, T., Umezawa, K. (1997). Induction of flat morphology in K-RAS-TRANSFORMED fibroblasts by Lycorine, an alkaloid isolated from the tropical plant *Eucharis Grandiflora*, *Exp. Clin. Res*, 5: 151-155.
62. Labuda, J., Buckova, M., Heilerova, L., Caniova-Ziakova, A., Brandsteterova, E., Mattusch, J., Wennrich, R. (2002). Voltammetric detection of antioxidative

- properties of flavanoids using electrically heated DNA modified Carbon Paste Electrode, *Sensors*, 2: 1-10.
63. Latvala, A., Önür, M. A., Gözler, T., Linden, A., Kivçak, B., Hesse, M. (1995). Alkaloids of *Galanthus elwesii*, *Phytochemistry*, 39: 1229-1240.
64. Levison, P. R., Dennis, J. W., Jones, K. D., Philpott, R. W., Taylor, S. L., Grimm, V. (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications, *Clin. Chem.*, 44: 2060-2061.
65. Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. (1993). Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*, *J. Nat. Prod.*, 56: 1331-1338.
66. Liu, J., Abid, S., Hail, M. E., Lee, M. S., Hangeland, J., Zein, N. (1998). Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions, *Analyst*, 123: 1455-1459.
67. Liu, S., Ye, J., He, P. ve Fang, Y. (1996). Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, *Anal. Chim. Acta*, 335: 239-243.
68. Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.
69. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982). Electrochemistry of Osmium-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70.
70. Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M. (1999). *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
71. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.

72. Mascini, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, 73-1: 23-30
73. McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P. ve Linn, C. P. (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A-668 A.
74. Mikkelsen, S. R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection-a review , *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
75. Mikkelsen, S. R. (1994). Sequence-selective DNA Sensors for the diagnosis of inherited diseases (Voltametric), *A.B.D Patent no: 5,312,527 (05/ 17/1994)*.
76. Millan, K. M., Mikkelsen, S. R. (1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65: 2317-2323.
77. Millan, K. M., Saraullo, A., Mikkelsen, S. R. (1994). Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, 66: 2943-2948.
78. Millan, K. M., Spurmanis, A. J., Mikkelsen, S. R. (1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes, *Electroanalysis*, 4: 929-932.
79. Modern Drug Discovery (1999). Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics, J.F. Ryan (Ed), Washington DC, 1-2: sayfa 68.
80. Molinier-Jumel, C., Malfroy, B., Reynaud, J. A. and Aubel-Sadron, G. (1978). Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84 (2): 441-449.
81. Müller, W., Crothers, D. M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *Eur. J. Biochem.*, 54: 267-277.

82. Ozkan, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Mascini, M., Ozsoz, M. (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 905-912.
83. Ozsoz M., Erdem A., Kara P., Kerman K., Ozkan D. (2002). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal, *Electroanalysis*, 15: 613-619.
84. Palecek E., Fojta M. (2001). Detecting DNA hybridization and damage, *Anal. Chem.*, 73: 74A.
85. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.
86. Palecek, E. (1994). Probing of DNA structure with osmium tetroxide complexes *in vitro* and in cells, F. Eckstein and D. M. J. Lilley (Ed), *Nucleic acids and Molecular Biology*, Vol. 8: Springer-Verlag Berlin, 1994, 1-13.
87. Palecek, E. (1988). Adsorptive transfer stripping voltammetry: determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface, *Anal. Biochem.*, 170: 421-431.
88. Palecek, E. (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
89. Palecek, E. (1995). Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (Alan Townshend (Ed)), London, Academic press, Vol. 6: 3600-3609.
90. Pandey, P. C., Weetall, H. H. (1994). Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation, *Anal. Chem.*, 66: 1236-1241.
91. Pandey, P. C., Weetall, H. H. (1995). Detection of aromatic compounds based on DNA intercalation using an evanescent wave sensor, *Anal. Chem.*, 67: 787-792.

92. Pang, D. and Abruna, H. D. (1998). Micromethod for the investigation of the interaction between DNA and redox-active molecules, *Anal. Chem.*, 70: 3162-3169.
93. Paz, M. M., Das, A., Tomasz, M. (1999). Mitomycin C linked to DNA minor groove binding and cross-linking properties and *in vitro* antitumor activity, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 7: 2713-2726.
94. Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D.(1999). Interactions of surface-confined DNA with electroreduced Mitomycin C comparison with acid-activated Mitomycin C , *Chemico-Biological Interactions*, 117: 65-81.
95. Pietrzyk, D. J., Frank, C. W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baski, Academic press: s.226- 239.
96. Plambeck, J. A., Lown, J. W. (1984). Electrochemical Studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J. Electrochem. Soc.*, 131 (11): 2556-2563.
97. Pividori, M. I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.
98. Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S. (1989) Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on *Herpes Simplex virus*, *Res. Virol.* 140: 115-128.
99. Richardson, C. L., Springfield, G. E. S., Intercalation inhibition assay for compounds that interact with DNA or RNA, *Amerikan patent no; 4,257,774 / 24 Mart 1981*).

100. Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2000). DNA binding activity of Amaryllidaceae Alkaloids, *Bo. Soc. Chil. Quim.* 45:515-518.
101. Service, R. F. (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396.
102. Steinbach, P. B., Hurtubise, R. J. (2000). Fluorescence of tetrols, tetrols complexed with DNA and benzo[a]pyrene-DNA adducts in methanol/water solutions, *Appl. Spect.*, 54: 287-293.
103. Takenaka, S., Ihara, T., Takagi, M. (1990). Bis-9 acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA, *J. Chem. Soc., Chem. Communications*, 21: 1485-1487.
104. Takeuchi, K. J., Thompson, M. S., Pipes, D. W., Meyer, T. J. (1984). Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media, *Inorg. Chem.*, 23: 1845-1851.
105. Teijeiro, C., Perez, P., Marin, D., Palecek, E. (1995). Cyclic voltammetry of Mitomycin C and DNA, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 77-83.
106. Temel Biyokimya 2, (1997). Bölüm 8: Bilgi Kaynağı olan Makromoleküller; Prof. Dr. T. Onat, Prof. Dr. K. Emerk (Ed); Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı: sayfa 565-567.
107. Thayer, A. M. (1999). Deciphering Diseases, *Chemical & Engineering News*, M. Jacobs (Ed), *American Chemical Society*, North Carolina, 19-28.
108. The Merck Index, (1989). S. Budavari(Ed), Merck and Co. Inc., 11. baskı (Eleventh edition).
109. Thorp, Holden, H. (1998). Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation, *Trends in Biotechnology*, 16: 117-121.

110. Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P. E., Palecek, E. (1999). Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 476: 71-80.
111. Tuite, E., Norden, B. (1994). Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA : A spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 7548-7556.
112. Turner, A. P. F. (1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. (Ed); *Oxford University Press*, Oxford, sayfa v-vii.
113. Wang, J. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review, *Anal. Chim. Acta* , 347: 1.
114. Wang, A. H. J. (1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.1: 52-69. (Ed; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany)
115. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. (1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.
116. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P. A. M., Dontha, N. (1996). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.*, 68: 2629-2634.
117. Wang, J., Fernandes, J. R., Kubota, L. T. (1998). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.
118. Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.

119. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E. (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 45: 33 - 40.
120. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., , Shiraishi, H., Farias, A. M. P., Dontha, N., Luo, D. (1996). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes , *Anal. Chim. Acta*, 332: 139-144.
121. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F. S., Grant, D. H., Ozsoz, M., Flair, M. N. (1997). DNA electrochemical biosensors for enviromental monitoring-A review , *Anal. Chim. Acta*, 347: 1-8.
122. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J. R., Jiang, M., Paz, J. L. L., Waymire, R., Nielsen, T. W., Getts, R. C. (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes , *Electroanalysis*, 10(8): 553-556.
123. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J. R., Paz, J. L. L., Jiang, M., Waymire, R. (1998). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375: 197-203.
124. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F. S., Dontha, N. (1996). DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 68: 4365-4369.
125. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F. S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H. (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, 68: 2251-2254.

126. Wang, J., Rivas, G., Ozsoz, M., Grant, D. H., Cai, X., Parrodo, C. (1997). Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage, *Anal. Chem.*, 69: 1457-1460.
127. Wilson, E. K. (1998). Instant DNA detection, *Chem. & Eng. News*, 76 (21): 47.
128. Xia, C., Guoli, S., Jianhui, J., Ruqin, Y. (1999). Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications, *Anal. Lett.*, 32 (4): 717-727.



Arş. Gör. Ecz. Hakan KARADENİZ'in Özgeçmişi

Doğum Tarihi: 20-07-1979

Doğum Yeri: İzmir

Yabancı Dil: İngilizce (iyi), ÜDS: 63.75

Eğitim:

- *İlk öğrenimi: Mustafa Urcan İlkokulu (1986-1991)*
- *Orta ve lise öğrenimi: İzmir Özel Türk Koleji (1991-1997)*

Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 1998 – Haziran 2002).
(Okul birincisi)

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı (Ekim 2002).

Aldığı Burslar: **TÜBİTAK -Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu** (Ekim 2003- Halen devam etmektedir)

Görevli Olduğu Proje Çalışmaları:

1. Kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle saptanması (TÜBİTAK projesi - TBAG-2161 (102T051) ; Ağustos 2002-Halen devam etmektedir.
2. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (Genosensörlerin) tasarımında kullanılan yeni teknikler ve uygulamaları (TÜBİTAK projesi - Proje No: TBAG-2233; Ocak 2003-Halen devam etmektedir.

Yurt dışında katıldığı projeler:

13/09/2003-30/09/2003 tarihleri arasında Çek Cumhuriyeti Biyobilimler Akademisi Biyofizik Enstitüsü'nde Prof. Dr. Emil PALECEK gözetiminde "Değişik teknikler kullanılarak yeni elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin dizaynı" konusunda (18 gün süreyle).

Yayınlar

1. OZKAN DILSAT, KARA PINAR, **KARADENİZ HAKAN**, OZKAN ZEYNEP, ERDEM ARZUM, JELEN FRANTİSEK, KERMAN KAGAN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical Detection Of Specific DNA Sequences From PCR Amplicons On Carbon And Mercury Electrodes Using Meldola's Blue As An Intercalator", **Turkish. Journal of Chemistry**, basımda, 2004.
2. **HAKAN KARADENİZ**, BESTE GULMEZ, FERİT SAHINCI, ARZUM ERDEM, G. İREM KAYA, NEHIR UNVER, BIJEN KIVCAK, MEHMET OZSOZ, "Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and Lycorine based on Guanine and Adenine signals", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** , 35, 2003,298-302.
3. DILSAT OZKAN, **HAKAN KARADENİZ**, ARZUM ERDEM, MARCO MASCINI, MEHMET OZSOZ, "Electrochemical genosensor for Mitomycin C-DNA interaction based on Guanine signal", **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 35, 2004, 905-912.
4. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERİC, DILSAT OZKAN, PINAR KARA, **HAKAN KARADENİZ**, "Allele-specific genotyping by using electrochemical Guanine and Gold Nanoparticle oxidation signals", **Bioelectrochemistry**, düzeltimde, 2004.

Bildiriler

1. ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, MEHMET OZSOZ, VOLKAN ARMAGAN, SECIL GUR, **HAKAN KARADENIZ**, ZEYNEP AY, HALE TURKAN, DENİZ YURDAKUL, " Polifenol Oksidaz İçeren Mantar Dokusunu Enzim Kaynağı Olarak Kullanan Biyosensör ile Amperometrik Fenol Tayini ve Metal İnhibisyonunun EDTA ile Eliminasyonu ", E. Ü. Eczacılık Fakültesi 2inci Sınıf Öğrencileri, **Biyomed-6 – 6. Uluslar arası Katılımlı Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 06-08 Ekim 1999, Otel Ege Sağlık, İzmir, posterli bildiri, Bildiri Özetleri Kitabı, P-47.**
2. **Hakan KARADENIZ**, Volkan ARMAGAN, Arzum ERDEM, Kagan KERMAN, Burcu MERIC, Dilsat OZKAN, Mehmet OZSOZ, "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri" , E. Ü. Eczacılık Fakültesi 2inci Sınıf Öğrencileri, **2inci Ulusal Veterinerlik Hekimlik Öğrenci Kongresi, İstanbul Üniversitesi, Veteriner Hekimlik Fakültesi, 13-15 Mayıs 2000, İstanbul, sözlü bildiri, Bildiri Özetleri Kitabı.**
3. PINAR KARA, DILSAT OZKAN, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, SACIDE PEHLIVAN, FERDA OZKINAY, DUYGU UNUVAR, GULCIN ITIRLI, **HAKAN KARADENIZ**, MEHMET OZSOZ, "İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, **Proje Sergisi 02-Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi(EBİLTEM), 04-15 Kasım 2002, İzmir, proje sergisi.**
 - **Bu çalışma Proje Sergisi 2002'de Biyolojik Bilimler Dalında birincilik ödülüne layık görülmüştür.**

4. PINAR KARA, DILSAT OZKAN, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, SACIDE PEHLIVAN, FERDA OZKINAY, DUYGU UNUVAR, GULCIN ITIRLI, HAKAN KARADENİZ, MEHMET OZSOZ, "İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, III. Bilimsel Araştırma Forumu, Ege Üniversitesi Tıp fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mart 2003.

** Bu çalışma III. Bilimsel Araştırma Forumu'nda Prof. Dr. Ramazan AKŞİT onuruna verilen Bilimsel Araştırma Ödülüne layık görülmüştür.*

5. HAKAN KARADENİZ, BESTE GÜLMEZ, FERİT ŞAHİNCİ, ARZUM ERDEM, G. İREM KAYA, NEHİR ÜNVER, BİJEN KIVÇAK, MEHMET ÖZSÖZ, " Potansiyel antiviral etkili doğal bileşik Lycorine'in DNA ile etkileşmesinin elektrokimyasal biyosensörlerle tayini", Proje Sergisi 03-Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi(EBİLTEM), 10-21 Kasım 2003, İzmir, proje sergisi.

• Bu çalışma Proje Sergisi 2003'de Biyolojik Bilimler Dalında üçüncülük ödülüne layık görülmüştür.

6. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, DİLŞAT ÖZKAN, PINAR KARA, HAKAN KARADENİZ, BURCU KARAŞAHİN, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ve Yeni Gelişmeler ", II. Uluslar arası katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mayıs 2004.

Katıldığı toplantılar

1. FEBS(Federation of European Biochemistry Societies) tarafından desteklenen "The Design and Building of Quartz Crystal Microbalance(QCM) Biosensors" adlı "İleri Pratik Kurs", **Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe-Ankara,20-27 Haziran 2004.**

Düzenlediği toplantılar

1. II. Uluslar arası katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu, **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mayıs 2004.**

Organizasyon Komitesi: Prof. Dr. Erçin Erciyas, Prof. Dr. Mehmet Şengün Özsöz, Doç. Dr. K. Arzum Erdem, Arş. Gör. Dilşat Özkan, Arş. Gör. Pınar Kara, **Arş. Gör. Hakan Karadeniz, Arş. Gör. Burcu Karaşahin**