

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAC VE DNA (BİYO)SENSÖRLERİNİN TASARIMI VE UYGULAMALARI

Analitik Kimya Programı

DOKTORA TEZİ

T 91570

Uzman Eczacı Kadriye Arzum ERDEM

Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

EGE ÜNİVERSİTESİ DOKÜMAN KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İZMİR / 2000

ÖNSÖZ

Çalışmalarındaki katkılarından dolayı başta, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, danışmanım, Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün Özsöz'e ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Öğretim Üyesi, Sayın Prof. Dr. Aycıl Kayalı'ya ve Anabilim Dalımızdaki diğer tüm Öğretim Üyelerine, çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Ege Üniversitesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Sayın Doç. Dr. Ulus Salih Akarca'ya ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi, Sayın Prof. Dr. Bekir Çetinkaya'ya ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, Sayın Yard. Doç. Dr. Tayfun Dalbastı'ya teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Maddi ve manevi desteği için bursiyeri olduğum TÜBİTAK-Münir Bırsel Vakfına ve çalışmaya maddi desteğinden dolayı Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini gördüğüm tüm çalışma arkadaşlarıma ve her zaman olduğu gibi manevi destekleriyle yanımda olan aileme ve başarıma katkısı olan herkese,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. BÖLÜM.....	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	8
1.ELEKTROKİMYA	8
1.1.ELEKTROKİMYASAL BİR OLAYDA KÜTLE AKTARIM YOLLARI:.....	8
1.2. VOLTAMETRIK YÖNTEMLER :	8
1.2.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri:	9
1.2.2. Voltametrik Cihazlar:	11
1.2.2.1.Referans Elektrodlar (Karşılaştırma elektrodları)	11
1.2.2.2.Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları.....	13
1.2.3.Voltamogramlar:	15
1.2.4. Elektroliz sırasında elektrot yüzeyindeki konsantrasyon değişimleri:	18
1.2.5.Voltametrik Akımlar:	21
1.2.6. Taramalı voltametrizde katı elektrot kullanılarak elde edilen anodik veya katodik pikin maksimum akım değerinin hesaplanması:.....	22
1.2.7. Polarografi :	22
1.2.8. Damlayan elektrotlardaki difüzyon akımı:	23
1.2.9. Polarogramlara pH'nın etkisi:	24
1.2.10. Voltametrik Yöntemler	25
1.2.10.1. Diferansiyel Puls Polarografisi:.....	25
1.2.10.2. Dönüşümlü Voltametri:	27
1.2.10.3. Kare Dalga Polarografisi ve Voltametri:	28
1.2.10.4. Sıyırma Yöntemleri.....	31
1.3. BIYOSENSÖR.....	32
1.3.1. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	33
1.3.2. Biyosensör Çeşitleri:.....	35
1.4. NÜKLEİK ASİTLERİN YAPISI	36
1.4.1. DNA yapısı	36
1.4.2. Peptik Nükleik Asitler (PNA):	38

1.4.4. Nükleik asit hibridizasyonu:.....	41
1.4.5. Nükleik asit hibridizasyonlarının kinetiğini etkileyen faktörler:	42
1.4.6. DNA Biyosensörleri	44
1.4.6.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA Biyosensörleri:.....	45
1.4.6.2. DNA hibridizasyonuna dayalı DNA Biyosensörleri:	48
II. BÖLÜM	55
GEREÇ VE YÖNTEM	55
2.1. KULLANILAN CİHAZLAR	55
2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	56
2.2.1. Kullanılan ilaç hammaddeleri hakkında genel bilgi	59
2.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[Co(phen)_3]^{3+}$ hakkında genel bilgi.....	61
2.3. KULLANILAN YÖNTEM	62
2.3.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalar:	63
2.3.1.1. Epirubisin Hidroklorür (EPR) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:	63
2.3.1.1.1. EPR'nin dsDNA ile etkileşmesinin Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	63
2.3.1.1.2. EPR'nin dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında Dönüşümlü Voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:.....	65
2.3.1.1.3. EPR'nin dönüşümlü voltametrisinde tarama hızının değiştirilerek yanıt etkisinin incelenmesi:	66
2.3.1.1.4. EPR konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	66
2.3.1.1.5. CPE'na tutturulan dsDNA konsantrasyon değişiminin EPR yanıtına etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:.....	67
2.3.1.1.6. EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresindeki değişimin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	67
2.3.1.1.7. EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:.....	67
2.3.1.1.8. EPR-dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tekrarlanabilirlik ve tayin sınırı parametrelerinin incelenmesi:	69

2.3.1.2. Mitoksantron dihidroklorür (MTX) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:	70
2.3.1.2.1. MTX'nun dsDNA ile etkileşmesinin Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	70
2.3.1.2.2. MTX'un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında Dönüşümlü Voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:.....	72
2.3.1.2.3. MTX'un konsantrasyon değişiminin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	73
2.3.1.2.4. MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişiminin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	74
2.3.1.2.5. MTX-dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tayin sınırı parametresinin incelenmesi:.....	74
2.3.2. DNA hibridizasyonuna dayalı biyosensör tasarımı yapılan çalışmalar:.....	75
2.3.2.1. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniğiyle incelenmesi:	75
2.3.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri tekniğiyle incelenmesi:.....	77
2.3.2.3. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in konsantrasyonundaki değişimin yanıtta olan etkisinin incelenmesi:	78
2.3.2.4. Ortamdaki tuz konsantrasyonundaki değişimin yanıtta olan etkisinin incelenmesi:	79
2.3.2.5. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:	79
2.3.2.6. Hepatit-B virüsüne ait dizi tayini için tasarımı yapılacak olan DNA Biyosensörünün tasarımına ilişkin çalışmalar:	79
III. BÖLÜM	81
BULGULAR	81
3.1. İLAÇ-DNA ETKİLEŞMESİNE DAYALI BİYOSENSÖR TASARIMINDA YAPILAN ÇALIŞMALAR İLİŞKİN BULGULAR:.....	81
3.1.1. Epirubisin Hidroklorür (EPR) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular.....	81

3.1.1.1. EPR'nin dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	81
3.1.1.2. EPR'nin DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri ile izlenmesine ilişkin bulgular:.....	83
3.1.1.3. EPR'nin dönüşümlü voltametrisinde tarama hızının değiştirilerek yanıt etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:.....	84
3.1.1.4. EPR konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	86
3.1.1.5. CPE'na tutturulan dsDNA'nın konsantrasyon değişiminin EPR yanıtına etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	87
3.1.1.6. EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresinde değişimin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	87
3.1.1.7. EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	88
3.1.1.8. EPR–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde Tekrarlanabilirlik ve Tayin sınırı parametrelerinin incelenmesine ilişkin bulgular:.....	89
3.1.2. Mitoksantron dihidroklorür (MTX) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	90
3.1.2.1. MTX'nun dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:.....	90
3.1.2.2. MTX'nun dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	92
3.1.2.3. MTX konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	93
3.1.2.4. MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	94
3.1.2.5. MTX–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tayin sınırı parametresinin incelenmesine ilişkin bulgular:.....	96
3.2. DNA HİBRİDİZASYONUNA DAYALI BİYOSENSÖR TASARIMINDA YAPILAN ÇALIŞMALARA İLİŞKİN BULGULAR:.....	97
3.2.1. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[Co(phen)_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniğiyle incelenmesine ilişkin bulgular:.....	97
3.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[Co(phen)_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri tekniğiyle incelenmesine ilişkin bulgular:.....	98

3.2.3. $[Co(phen)_3]^{3+}$ konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:.....	99
3.2.4. Ortamdaki tuz konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:.....	100
3.2.5. $[Co(phen)_3]^{3+}$ ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişikliğin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:.....	100
3.2.6. Hepatit-B virüsüne ait dizi tayini için tasarımı yapılacak olan DNA Biyosensörünün tasarımına ilişkin çalışmalara ilişkin bulgular:.....	101
IV. BÖLÜM	103
TARTIŞMA VE SONUÇ	103
4.1. İLAÇ-DNA ETKİLEŞMESİNE DAYALI BİYOSENSÖR TASARIMINDA YAPILAN ÇALIŞMALARA İLİŞKİN BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ:.....	103
4.1.1. EPR-DNA Etkileşmesine Dayalı Biyosensör Tasarımında Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi:.....	103
4.1.2. MTX-DNA Etkileşmesine Dayalı Biyosensör Tasarımında Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi:.....	108
4.2. DNA HİBRİDİZASYONUNA DAYALI BİYOSENSÖR TASARIMINDA YAPILAN ÇALIŞMALARA İLİŞKİN BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ:	113
ÖZET	121
SUMMARY	122
KAYNAKLAR	123

I. BÖLÜM

GİRİŞ ve AMAÇ

Analitik Kimya'da yaygın kullanım alanı bulunan elektrokimyasal sensörlere (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) IUPAC tarafından literatürde getirilen tanım şu şekildedir:

“Elektrokimyasal sensörler, kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlardır ” (13).

Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısına biyolojik maddeler (enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb.) eklendiği zaman, elektrokimyasal sensörlerin yaygın kullanım alanlarından biri olan *BİYOSENSÖRLER* ortaya çıkmıştır (103).

Biyosensör , “biyo” (=biyolojik kökenli) ve “sensör” (= algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır. Tanım olarak ise; “Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal iki çeviriciden oluşmuştur. Biyokimyasal çevirici analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan madde (biyokimyasal ürün), elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir. Bu ilke doğrultusunda biyosensörler, nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlardır” şeklinde ifade edilebilirler (17).

Biyosensör tasarımında kullanılan nükleik asit tanıma katmanları, Analitik Kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir (117). Bu tür tanıma katmanları, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere ait geçmişe, yeni ve ender boyutlardaki özelliği ekleyecek ve gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli bir rol oynayacaktır (106).

DNA'nın nitel ve nicel analizine dayalı elektrokimyasal yöntemlerle birlikte (7-11, 29, 40, 41, 76, 77, 79, 80, 110) biyosensörlerde tanıma katmanı olarak DNA kullanılmasına ilgi artmaktadır (12, 57, 58, 74, 92, 118, 122).

DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (58, 111) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar vb.) tayininde kullanılabilir. İncelenen maddenin, DNA ile etkileşmesi sonucu oluşan, DNA'daki bir bazın veya incelenen maddenin sinyalindeki değişiklikler sayesinde tayin edilebilmektedir (55, 64, 70, 74, 84, 95, 97, 112, 114, 120, 121, 126).

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle (ilaç, çevresel atıklar, vb.) etkileşmesi ve geliştirilen yeni yöntemlerle bunun incelenmesi; yeni ilaç tasarımı ve tayine yönelik yeni yöntem geliştirme açısından önemlidir (46-48).

Birçok antikanser ilaç, DNA molekülleri ile etkileşir. Bunlardan bazıları DNA ile kovalent bağ yaparken , diğerleri ise kovalent olmayan etkileşimleri kullanarak DNA ile kompleks oluştururlar. Çoğu organik moleküllerin DNA'nın çift sarmal yapısına interkale olabilmeye özelliğine sahip olduğu bilinmektedir. Örneğin, Etidyum Bromür , DNA boyar madde olarak sıkça kullanılan organik bir moleküldür. Basit sentetik interkalatörler; Akridin türevleri (9-amino akridin ve proflavin gibi) de diğer bir örnek olarak verilebilir. Fakat interkalatif özellikteki antitümör ilaçların bir çoğu, bu basit bileşiklerden daha karışık yapıya sahiptir. Örneğin, kinoksalin antibiyotiklerinin temel yapısı olan antrasiklin aromatik grubu buna bir örnektir (105).

Bazı ilaçların dsDNA ile interkalasyon yapma yeteneği (yapısında bulunan düzlemsel grupların DNA'nın baz çiftlerinin arasına girip yerleşmesi), oluşan ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımını gündeme getirmiştir. DNA ile ilaç etkileşmesinin elektrokimyasal tayini sonucu, sinyalde artış veya azalma görülmektedir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camı karbon elektrotlar

(GCE), karbon pastası elektrotlar (CPE) ve asılı civa damla elektrodu (HMDE), incelenen ilaçların mikromolar ve hatta nanomolar konsantrasyonlarının dahi, kısa bir biriktirme sonrası güvenli ölçümlerini mümkün kılmaktadır (55, 64, 70, 84, 87, 97, 112, 114, 120, 121).

Kan, serum, doku ve vücut sıvıları gibi biyolojik örneklerde özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemli bir yer tutar. Bu tip analiz sonuçları bakteri ve virütik kökenli hastalıkların tanınmasında kullanılabilir. Bilinen yöntemler rutin analizler için uygun olmayıp, radyoizotop kullanımı da sonuçların uzun sürede çıkması nedeniyle tercih edilmez. Bilinen bu yöntemlere alternatif olmak üzere çeşitli yeni yöntemler geliştirilmektedir.

DNA biyosensörlerinin klinik araştırmalarda kullanımını biliyoruz. 2003 yılında bitirilmesi planlanan genom projesiyle (16) birlikte, insan genomunun tüm genleri haritalanabildiği, diğer tüm varyasyonların baz dizilimi belirlenebildiği ve farmakogenomik araştırmalar bittiği zaman, sağlık sisteminin hızlı, ucuz DNA testlerine ihtiyacı olacaktır.

Dizi-seçimli DNA biyosensörleri, tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur (49, 53, 75, 116, 119).

J. Wang ve arkadaşları, elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile E. coli (115), HIV (108) ve Mycobacterium tuberculosis'e (116) ait DNA dizilerini biyosensörler ile tayin edebilmiştir.

K. Millan ve arkadaşları, DNA biyosensörleriyle ilgili çalışmalarında, Sistik Fibrozis'e ait DNA dizilerini kullanarak elektrokimyasal tayinini başarmışlardır (61). Ayrıca S. Mikkelsen'e ait 1994 yılında yapmış olduğu, kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleri ile tayini projesi (59), Amerika Birleşik Devletleri tarafından korunmaya alınmıştır (A.B.D Patent No: 5.312.527- 05/17/1994).

Klinikte kullanıma uygun olacak kadar küçük ve tüm sağlık ekibinin kullanabileceği kadar kolay cihazların tasarımları Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı büyük firmalar tarafından başlatılmıştır. S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını ise Clinical Micro Sensors Inc. (CMS) adlı bir Amerikan şirketi satın almış ve böylelikle DNA biyoçiplerinin hayata geçirilmesi için ilk çalışmalar başlamış olup halen devam etmektedir.

Çalışmamızda, ilaç-DNA etkileşmesini incelemek amacıyla bir biyosensör tasarımını gerçekleştirdik; bu amaçla yüzeyine ayrı ayrı çift sarmal DNA (dsDNA) ve denatüre edilmiş DNA (ssDNA) tutturulmuş karbon pastası elektrodu (CPE) kullanarak, antikanser antibiyotik olan Epirubisin (EPR) ve Mitoksantron (MTX)'un dsDNA ve ssDNA ile olan etkileşmesini elektrokimyasal olarak inceledik. Elektrokimyasal tayin yöntemi olarak dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi kullanıldı. Çalışma sırasında; kullanılan ilaç ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, ilaç ve DNA konsantrasyonu, ortam ve pH farklılığı, tarama hızındaki değişikliğin yanıtı etkisi ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler de incelendi. Ayrıca oligonükleotidlerle olan etkileşimleri de incelenerek hibridizasyon indikatörü olarak kullanılıp kullanılmıyacağı da araştırıldı. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak elektrot yüzeyinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın getirdiği en önemli yarar, daha az madde gerektirmesi ve etkileşimin elektrot yüzeyinde olması yüzünden biyosensör tasarımına uygun olmasıdır.

İlaç-DNA etkileşmesine dayalı çalışmamızda daha önce EPR ile gerçekleştirilen çalışmadan (126) farklı olarak karbon pastası elektrodu (CPE) kullanılarak, EPR'nin elektrot yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls ve dönüşümlü voltametri tekniğine dayalı elektrokimyasal tayiniyle birlikte ayrıca, ssDNA ile olan etkileşmesi de incelendi. Ayrıca EPR ile yüzeye tutturulmuş dsDNA'nın etkileşme süresi, ortam ve pH farklılığının biyosensör yanıtı üzerindeki etkisi incelendi. DNA

hibridizasyon biyosensörlerinde yeni bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak amacıyla; oligonükleotidlerle olan etkileşmesi, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelendi.

İncelediğimiz diğer ilaç Mitoksantron (MTX) ile daha önce yapılan çalışmadan (70) farklı olarak çalışmamızda karbon pastası elektrodu (CPE) kullanılarak, MTX'un elektrot yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls ve dönüşümlü voltametri tekniklerine dayalı elektrokimyasal tayiniyle birlikte, ayrıca ssDNA ile etkileşmesi de incelendi. ssDNA ve dsDNA ile alınan yanıtlar arasındaki farklılığa bağlı olarak, hibridizasyon tayinine yönelik kullanımı araştırıldı. Ayrıca MTX ile yüzeye tutturulmuş dsDNA'nın etkileşme süresi, ortam ve pH farklılığının biyosensör yanıtı üzerindeki etkisi incelendi.

Çalışmamızın yayınlanmış olan (25) ikinci bölümünde, DNA hibridizasyonu tayini için kullanılacak bir indikatörün; kobalt fenantrolin $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in, öncelikle, yüzeyine ayrı ayrı çift sarmal DNA (dsDNA) ve denatüre edilmiş DNA (ssDNA) tutturulmuş karbon pastası elektrodu (CPE) kullanarak DNA ile etkileşmesi, dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi kullanılarak incelendi ve daha sonra yöntemin optimizasyonuna yönelik bir çalışma gerçekleştirildi. Hibridizasyon indikatörü, ssDNA ve dsDNA ile etkileştiği zaman ölçülebilen ve birbirinden farklı sinyaller verebilen bileşiktir. Örneğin, Co(III) (12, 14, 15, 60, 62, 113), Fe (II) (15, 42), Ru(II) (4, 42, 43), Os (II), Os(IV) (53, 54, 96)'ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-bipiridin DNA'ya bağlı klatları voltametrik olarak çalışılmaktadır. En iyi sonuç veren hibridizasyon indikatörü olarak belirtilen Co(III)'ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-bipiridin ile olan komplekslerinin DNA'ya bağlanma özellikleri, voltametrik olarak incelenmiştir (58). En iyi sonuç veren hibridizasyon indikatörü olması ve sıklıkla kullanılmalarının nedeni, bu kobalt komplekslerinin düşük potansiyelde elektrokimyasal cevap vermesi ve hibridizasyon sonucunda oluşan prob-hedef dubleksine etkin bir şekilde

bağlanmasıdır (117). K. Millan ve arkadaşları, kobalt kompleksleri ile yaptıkları çalışmada (60) elde edilen pik akımlarının difüzyon katsayılarına bağlı olduğunu ve DNA'ya bağlı komplekslerin, serbest komplekslerden daha yavaş difüzyon yapmakta olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda kullanılan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ genellikle DNA biyosensör tasarımında en fazla kullanılan indikatördür (60, 61, 108, 109, 113, 115, 116, 117, 119); çünkü dsDNA ve ssDNA ile etkileşen $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in yanıtları arasındaki farklılık büyük olup hibridizasyon indikatörü olarak sıkça kullanılmaktadır. Optimizasyonuna ilişkin çalışmada, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in konsantrasyonu, dsDNA ile etkileşme zamanı, tuz konsantrasyonundaki farklılık incelendi, bulaşıcı ve öldürücü olduğu için son derece güncel bir hastalık olan Hepatit-B virüsünün (HBV) tayini için geliştirilen DNA biyosensörü tasarımında hibridizasyon indikatörü olarak ilk defa kullanılmış ve bu çalışma yayınlanmıştır (24). Bilindiği gibi Hepatit B virüsü (HBV) viral hepatite sebep olan bir virüstür. Hepatit B virüsünden kaynaklanan, akut ve kronik vakalar şeklinde ortaya çıkan hastalık, tüm dünya ülkeleri için önemli bir halk sağlığı problemidir. Kronik Hepatit B tedavisinin etkinliği, öncelikle HBV DNA'sının serumda bulunup bulunmadığına göre saptanır ve bu tayin ise moleküler hibridizasyon yöntemlerine göre yapılır (101, 125).

K. Hashimoto ve arkadaşları çalışmalarında (35) fotolitografi tekniğine göre hazırlanan altın elektrotlarıyla birlikte indikatör olarak Hoechst 33258'i kullanarak doğrusal taramalı voltametri tekniğine dayalı HBV tayinini gerçekleştirmişlerdir.

Çalışmamızda K. Hashimoto ve arkadaşlarının çalışmasından (35) farklı olarak bilinen ve sonuçları güvenilir olduğu için sıklıkla hibridizasyon tayinlerinde indikatör olarak kullanılan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ kullanıldı. Ayrıca biyosensörün tasarımında kullandığımız elektrot, CPE olup; K. Hashimoto ve arkadaşlarının çalışmalarında

kullandığı altın elektrodunda DNA'yı elektrot yüzeyine tutturmak için gerekli olan bağlayıcıları zorunlu kılmayan, basit ve ekonomik bir elektrottur.

Çalışmamızda, hedef dizinin farklı konsantrasyonlarındaki davranışı, hedef dizi yerine rastgele bir dizi olan oligonükleotid (non-complementary) veya tek bazı hedeften farklı olan bir oligonükleotid (mismatch) kullanımında davranışı; seçimlilik incelendi. Ayrıca tayin sınırları ve tekrarlanabilirlik parametreleri de incelendi.

Sonuç olarak çalışmamızın ilk bölümünde tasarımı yaptığımız ilaç-DNA etkileşmesine dayalı biyosensörle, bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmesini inceleyerek, gelecekte yeni antikanser ilaç hedefleme çalışmalarına yeni bir boyut getirmeyi ve ayrıca DNA hibridizasyonuna yönelik biyosensörlerin tasarımında yeni bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmayı; çalışmamızın ikinci bölümünde ise, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların daha kısa sürede tayinini mümkün kılacak ve yakın gelecekte piyasaya sürülecek olan DNA biyoçiplerinin teknolojisini oluşturan DNA hibridizasyon biyosensörlerinin bir prototipini Hepatit-B virüsü (HBV) tayini için tasarımı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1.ELEKTROKİMYA

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir; elektron transferi veya geçişi söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülür. 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 (DP), 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 bir olayda kütle aktarım yolları:

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları, üç şekilde gerçekleşmektedir (23). Bu kütle aktarım yolları:

1- Elektriksel göç (MİGRASYON): Elektriksel alanın etkisi ile oluşan bir aktarım yoludur.

2- Karıştırma (KONVEKSİYON): Karıştırma veya titreştirme sonucunda oluşan kütle aktarım yoludur.

3- Difüzyon: Elektrot yüzeyindeki sıvı filmi ile çözelti arasındaki konsantrasyon farklarından kaynaklanan bir kütle aktarım yoludur.

Deneysel koşullara bağlı olarak bunlardan bir tanesi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.2. Voltametrik Yöntemler : (2)

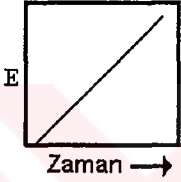
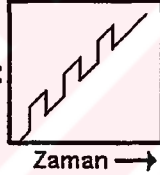
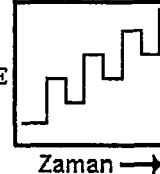
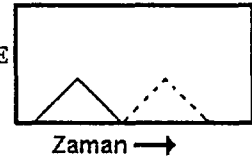
Voltametri, elektroda uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan bir elektrokimyasal yöntemdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir. Voltametri, herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodunun ve kullanılan çözücü ve elektrolitin 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 elektrotun (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.

1.2.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri: (2)

Voltametrizde çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin temelini oluşturan karakteristik akım cevapları oluşturur. Voltametrizde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil-1' de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır. Bunlardan ilk üçü sıklıkla kullanılmaktadır.

İsim	Dalga Şekli	Voltametrinin tipi
(a) Doğrusal taramalı		Polarografi Hidrodinamik voltametri
(b) Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
(c) Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
(d) Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil-1: Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

1.2.2. Voltametrik Cihazlar:

Elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

Bunlar:

- 1- Çalışma elektrodu
- 2- Referans elektrot
- 3- Yardımcı elektrot

Bu üçlü sistemlerde, çalışma elektrodu olarak tasarımı yapılmakta olan bir biyosensör kullanılabilir. Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

İkinci elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir referans elektrottur. Referans elektrot olarak Ag / AgCl veya doymun kalomel elektrot (DKE) kullanılabilir.

Üçüncü elektrot yani yardımcı elektrot ise, helezon şeklinde sarılmış bir Pt 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.

1.2.2.1.Referans Elektrotlar (Karşılaştırma elektrotları) (23, 26, 86)

Elektrokimyasal uygulamalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen,sabit kalan ve tamamıyla çalışılan çözeltinin bileşimine duyarsız olan elektrotlardır.

Bir referans elektrodun sahip olması gereken özellikler:

- 1-Kolay hazırlanabilmeli,
- 2-Potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı,

3-Belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı,

4-Potansiyeli zamanla değişmemeli,

5-Doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okunmalıdır.

Bu niteliklerin çoğuna sahip olmayan Standart Hidrojen elektrotunun referans elektrot olarak kullanılması uygulamada güçlük çıkarır. Bu yüzden civa ve gümüş gibi bir metal ile o metalin az çözünen bir tuzundan yapılmış elektrotların referans elektrot olarak kullanılması daha uygundur.

Referans elektrotların çeşitleri :

* *Kalomel Referans Elektrot:* Kalomel (Hg_2Cl_2) ve Hg' dan oluşmuş bir karışım, metalik civa ve KCl çözeltisinden oluşur. Bu elektrodun yarı tepkimesi,

$1/2 \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (k) + e^- \longrightarrow \text{Hg} (k) + \text{Cl}^-$ şeklinde yazılıp yarı tepkime potansiyeli,

$$E = E_{\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}}^0 - \frac{RT}{F} \log a_{\text{Cl}^-} \quad \text{şeklinde yazılır.}$$

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°C de $+ 0.244 \text{ V}$ olarak bulunmuştur. Diğer kalomel elektrotlara oranla sıcaklık katsayısı daha büyüktür.

* *Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot:* Ag bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl^- iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilen bir elektrottur.

Bu elektrodun yarı tepkimesi,

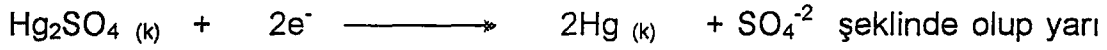
$\text{AgCl} (k) + e^- \longrightarrow \text{Ag} (k) + \text{Cl}^-$ şeklinde olup yarı tepkime potansiyeli,

$$E = E_{\text{AgCl/Ag}}^0 - \frac{RT}{F} \log a_{\text{Cl}^-} \text{ şeklinde yazılır.}$$

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. Elektrodun yarı tepkimesi,

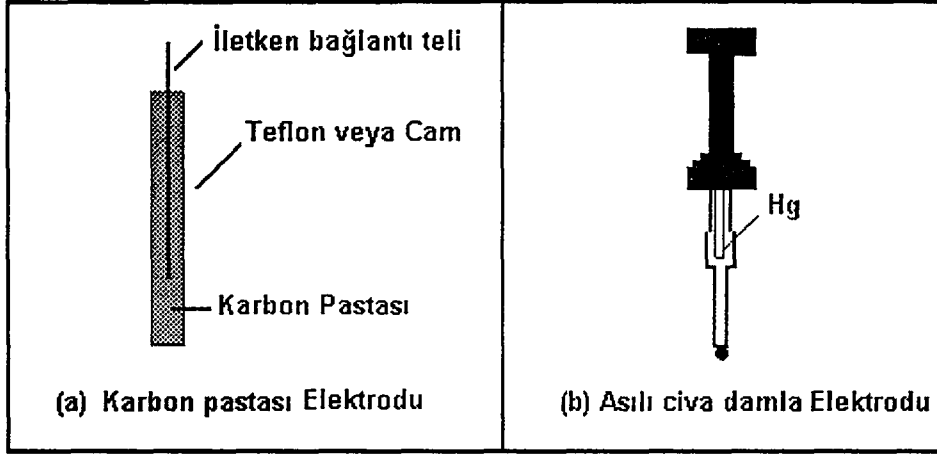


tepkime potansiyeli,

$$E = E_{\text{Hg}_2\text{SO}_4/\text{Hg}}^0 - \frac{RT}{F} \log a_{\text{SO}_4^{-2}} \text{ şeklinde yazılır.}$$

1.2.2.2.Voltametricde kullanılan çalışma elektrotları

Bunlar çeşitli şekil ve büyüklükte olup, 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 tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığı 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. Örneğin, civa elektrotları, civanın hidrojen aşırı geriliminden dolayı, genellikle daha büyük negatif potansiyelerde kullanılabilir.



Şekil-2: (a) Karbon Pastası Elektrodu; (b) Asılı Civa Damla Elektrodu

Çalışma elektrotlarında, kullanılan çalışma ortamına göre seçilen potansiyel çalışma aralıkları; örneğin 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. Karbon pastası elektrodu, civa elektrodu ile kıyaslandığı zaman farklı ve daha geniş potansiyel aralıklarında çalışmaya olanak sağlayan ve kısa sürede ve çok kolaylıkla hazırlanabilen ve ayrıca civa gibi toksik bir metale dayalı olmayan bir elektrot olduğu bilinmektedir. Buna karşın diğer elektrotlara göre daha kötü bir tekrarlanabilirliği vardır (1).

Civa elektrotları:

Civa elektrotlarıyla kullanılabilen negatif potansiyel sınırının çok yüksek olması, kolayca oluşturulabilen yeni bir civa damlası ile taze bir metalik yüzey oluşturulabilmesi ve pekçok metal iyonunun bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturmak suretiyle tersinir olarak indirgenebilmesini mümkün kılması, civa elektrotlarının voltametri çalışmada çalışma elektrodu olarak kullanılma nedenleridir.

Sakıncaları ise, civanın kolayca yükseltgenmesidir; bu özelliğinden dolayı bu metalin anot olarak kullanılması son derece sınırlıdır. Yaklaşık +0,4 V'dan daha yüksek potansiyellerde, Civa (I) oluşumu, diğer yükseltgenbilir türlerin dalgalarını

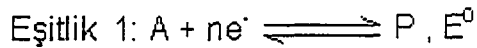
kapatan büyük bir dalga verir. Civa (I) ile kompleks veya çökelek oluşturan iyonlar varsa, bu davranış daha düşük potansiyelerde görülür. Yöntemin duyarlılığını yaklaşık 10^{-5} M'a sınırlayan faradayik olmayan artık akım veya yükleme akımıdır. Daha düşük konsantrasyonlarda artık akım difüzyon akımını aşabilir ki bu da difüzyon akımının doğru ölçümünü engeller. Civa toksik bir metal olup, kullanımını son derece zahmetlidir; örneğin damlayan civa elektrodu, kapillerin tıkanmasından dolayı çalışmayabilir.

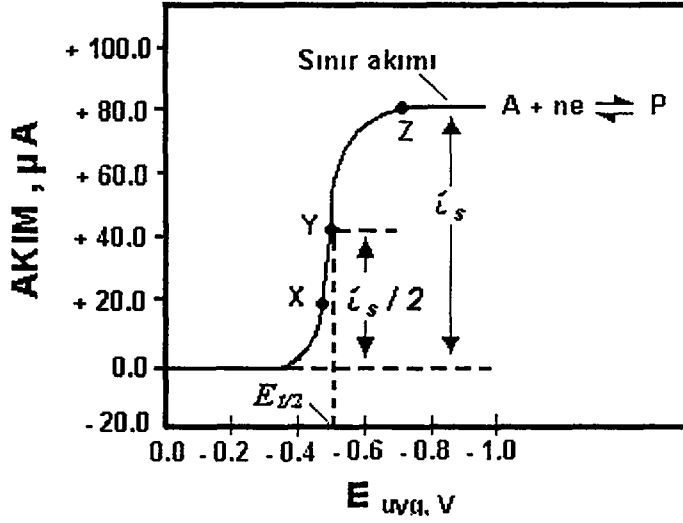
Civa elektrotlarının çeşitleri:

- 1- Disk elektrot
- 2- Asılı civa damla elektrot (ACDE)
- 3- Damlayan civa elektrot
- 4- Durgun civa damla elektrot

1.2.2.Voltamogramlar:

Bir civa mikroelektrot üzerinde bir A türünün P türünü indirgendiği elektroliz için tipik bir doğrusal taramalı voltamogram Şekil-3'te görülmektedir. Burada uygulanan potansiyellerin negatif bir işaret alması için mikroelektrodun doğrusal tarama jeneratörünün negatif ucuna bağlandığı varsayılır. Genellikle katodik akımlar daima pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretle gösterilir. Mikroelektrottaki yarı-reaksiyon aşağıdaki gibi tersinir bir reaksiyondur:





Şekil-3: Bir A türünün bir P türü vermek üzere indirgenmesinde elde edilen doğrusal taramalı voltamogram

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 konsantrasyonuyla 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.

Akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele, *yarı-dalga potansiyeli* denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Yarı-dalga potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilgilidir fakat genellikle ona eşit değildir. Yarı-dalga potansiyelleri bazen bir çözeltideki bileşenlerin belirlenmesi için kullanılır.

Damlayan civa elektrodu kullanıldığında, hızlı bir şekilde tekrarlanabilir sınır akımları elde etmek için; çözelti veya elektrot aynı hızda hareket ettirilmelidir.

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 2 çeşit akım oluşur.

1- Kapasitif akım

2- Faradayik akım

1-Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrolit çözeltisine bir elektrodun daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi sonucu 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 akımın oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f): Analiz edilecek maddeden yani reaksiyondan kaynaklanan akımdır.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalırsa 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.

1.2.4. Elektroliz sırasında elektrot yüzeyindeki konsantrasyon değişimleri:

Eşitlik 1'de verilen elektrot reaksiyonunun, aşırı miktarda bir destek elektrolit içeren bir A çözeltisindeki civa kaplı elektrot üzerinde gerçekleştiği varsayılmıştır. Ayrıca A'nın başlangıç konsantrasyonunun C_A , P'nin civada çözünmediğini kabul edelim. Elektrodun hemen yanındaki çözelti filminde bulunan A ve P konsantrasyonları, indirgenme reaksiyonunun, herhangi bir an için Nernst eşitliği ile hesaplanabilecek şekilde hızlı ve tersinir olduğunu varsayarsak; aşağıdaki bağıntıda görüldüğü gibi yazılır.

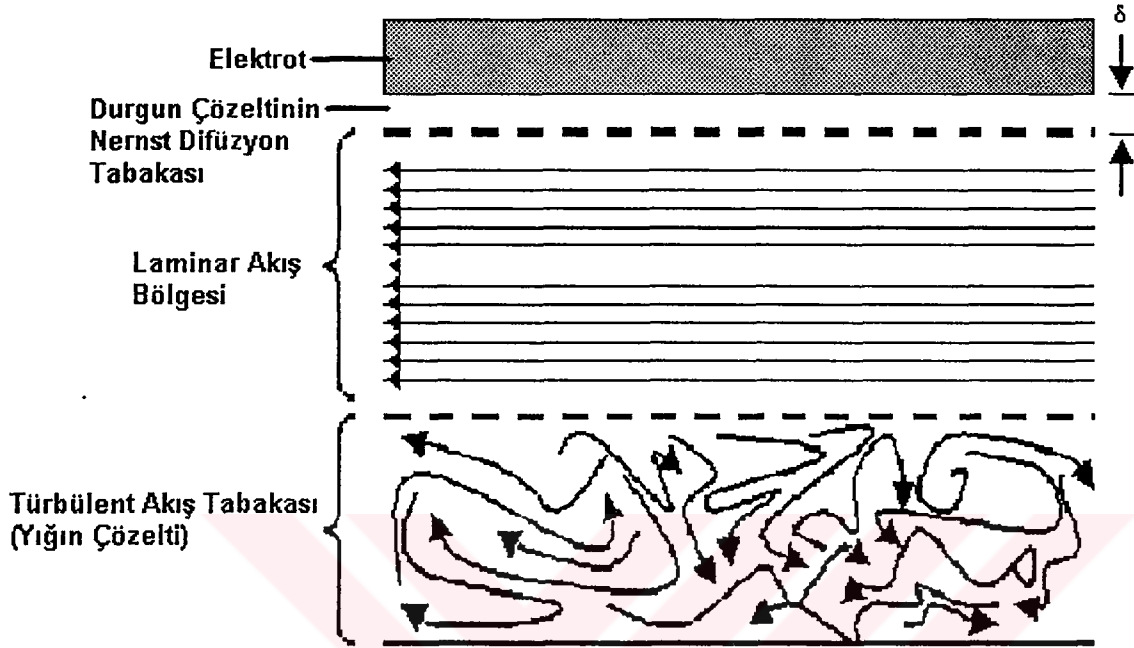
$$E_{uyg} = E_A^0 - \frac{0,0592}{n} \log \frac{C_P^0}{C_A^0} - E_{ref}$$

Bu denklemde E_{uyg} , mikroelektrot ile referans elektrot arasındaki potansiyeli, C_P^0 ve C_A^0 ise, sadece elektrot yüzeyindeki ince çözelti filminde bulunan P ve A konsantrasyonlarıdır. Elektrot çok küçük olduğundan, elektrolizin kısa sürede çözeltinin konsantrasyonunu önemli ölçüde değiştirmedeği de kabul edilir. Sonuç olarak çözeltideki A'nın konsantrasyonu olan C_A elektrolizle önemli ölçüde değişmez ve çözeltideki P'nin konsantrasyonu C_P de pratik olarak sıfır alınabilir ($C_P \approx 0$).

Şekil-4' de gösterildiği gibi, karıştırmanın etkisini anlayabilmek için küçük düzlemsel elektrot içeren karıştırılan bir çözeltide sıvı akışının düzenli olmadığı 3 tip akış vardır:

- (1) *Türbülent akış*: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir.
- (2) *Laminer akış*: Yüzeye yaklaştığında bir laminer akışa geçiş olur. Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerine kayarlar.
- (3) *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.



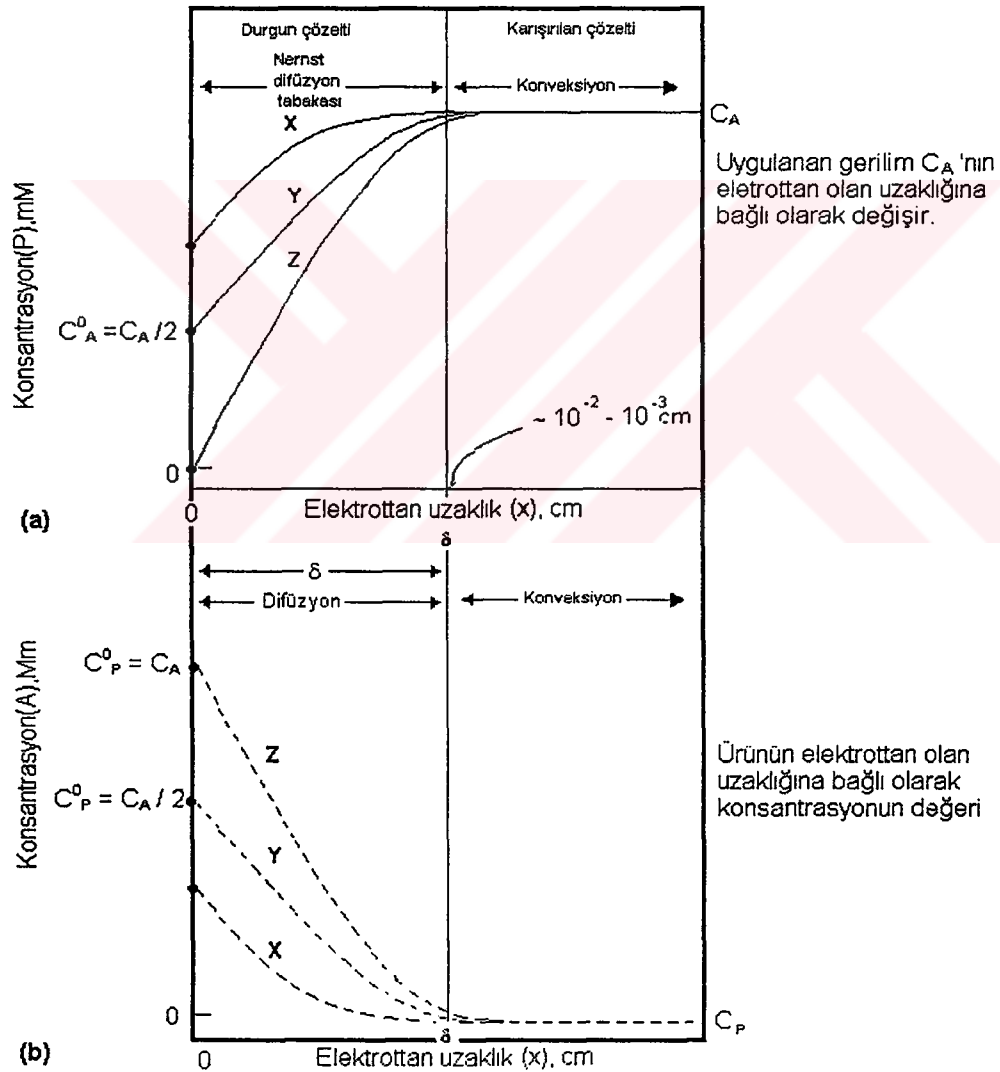
Şekil-4: Hidrodinamik voltametri çalışmada elektrot yüzeyindeki akış tipleri ve bölgeleri

Analizlenecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca Nernst tabakası içinde elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak değişir. Laminer ve türbülent akış bölgelerinde ise konveksiyon, A'nın konsantrasyonunu başlangıç değerinde; P'nin konsantrasyonu da oldukça küçük bir değerde tutar.

Şekil-5 (a)' da, Şekil-3 'de X, Y, Z ile gösterilen üç potansiyel değerinde A'nın konsantrasyonunun uzaklık ile değişimini gösterir. Çözelti iki bölgeye ayrılır. Bu bölgelerden birisi çözelti yığını olup burada kütle aktarımı karıştırıcı tarafından oluşturulan mekanik konveksiyon ile sağlanır. Bu bölgede A'nın konsantrasyonu C_A 'dır. İkinci bölge ise, elektrot yüzeyinin hemen yanındaki δ kalınlığındaki Nernst difüzyon tabakasıdır. Bu difüzyon tabakası içinde kütle aktarımı, aynen karıştırılmayan çözeltilerde olduğu gibi yalnızca difüzyon ile olur. Bununla beraber karıştırılan bir çözeltilerde bile difüzyon dar bir sıvı tabakasında görülür, ve difüzyon

karıştırılmayan çözeltilerde olduğu gibi yalnızca difüzyon ile olur. Bununla beraber karıştırılan bir çözeltide bile difüzyon dar bir sıvı tabakasında görülür, ve difüzyon tamamına yayılmaz; bunun sonucu olarak, bir potansiyelin uygulanmasından kısa bir süre sonra kararlı, difüzyon kontrollü akımlar oluşur.

Şekil-5 (b)' de X, Y, ve Z potansiyellerdeki P'nin konsantrasyon değişimleri verilmiştir. Nernst difüzyon bölgesinde P'nin konsantrasyonu elektrot yüzeyinden olan uzaklık ile doğrusal olarak azalır ve δ uzaklığında sifira yaklaşır.



Şekil-5: A'nın karıştırılan bir çözeltisinde, $A + ne^- \rightarrow P$ elektrolizi sırasında bir elektrot/çözelti ara yüzeyinde konsantrasyon değişimleri.

1.2.5.Voltametrik Akımlar:

Bu elektrolizin herhangi bir noktasındaki akım, A' nın konveksiyonlu Nernst difüzyon tabakasının kenarına kütle taşınma hızı ve A'nın difüzyon tabakasının dış kenarından elektrot yüzeyine taşınma hızı tarafından kontrol edilir.

İncelenen elektroliz deneyindeki akım, A'nın elektrot yüzeyine ne kadar hızlı taşındığının kantitatif bir ölçüsüdür ve bu hız $\partial C_A / \partial X$ ile verilir. Burada X, cm cinsinden elektrottan olan uzaklığı 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.

$$i = \frac{n F A C D^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}}$$

1.2.6. Taramalı voltametrde katı elektrot kullanılarak elde edilen anodik veya katodik pikin maksimum akım değerinin hesaplanması: (3,23)

Taramalı voltametrde elde edilen pikin maksimum akım değeri, i_p , Randles-Sevcik eşitliği ile verilir. Tersinir bir elektrokimyasal tepkime için bu eşitlik verilmiştir:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2}v^{1/2}C$$

i_p = Anodik veya katodik pik akımı (A)

n = Transfer edilen elektron sayısı

A = Elektrot yüzey alanı (cm^2)

D = Elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı (cm^2/sn)

v =Tarama hızı (V/sn)

C = Elektroaktif türlerin konsantrasyonu (mol/cm^3)

Sabit bir tarama hızı uygulandığında, i_p değeri maddenin derişimi ile doğru orantılıdır ve bundan yararlanılarak nicel analiz yapılabilir. Tarama hızının artırılması ile faradayik akım tarama hızının karekökü ile artarken, yükleme akımı tarama hızı ile orantılı olarak artar. Bu nedenle, tarama hızının arttırılmasıyla daha yüksek duyarlılığın elde edilmesi söz konusu değildir.

1.2.7. Polarografi : (2, 23)

Doğrusal taramalı voltametri, ilk bulunan ve kullanılan voltametri tipidir ve hidrodinamik voltametriden iki yönden farklıdır. Bunlardan birincisi konveksiyonun nlenmiş olması, ikincisi ise elektrot olarak damlayan civa elektrodunun kullanılmasıdır. Konveksiyondan kaçınılmasının sonucu olarak, polarografik sınır akımları sadece difüzyonla kontrol edilir. Konveksiyon olmadığı için, polarografik sınır akımları hidrodinamik sınır akımlarından genellikle 10-100 kat daha küçüktür.

Damlayan civa elektrodu içeren bir hücredeki akım, damlama hızına bağlı bir sıklık ile periyodik iniş çıkışlar gösterir. Damla kapillerden kopunca akım sıfıra düşer. Daha sonra yeni bir damlanın yüzey alanı büyüdükçe akım hızlı bir artış gösterir. Damla süresi t'nin tekrarlanabilir olması kaydıyla, ortalama akım (veya maksimum akım) kolaylıkla tayin edilebilir.

Eğer sistemde, -1 V civarında bir akımda keskin artış gözleniyorsa; bunun sebebi, hidrojen iyonlarının hidrojene indirgenmesidir.

Sadece destek elektrolitle ilgili polarogramın incelenmesi, analizlenecek madde yokken bile hücrede *artık akım* adı verilen küçük bir akımın mevcut olduğunu gösterir.

Akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman, sınır akımları gözlenir. Kütle aktarım şekli difüzyon 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.

1.2.8. Damlayan elektrotlardaki difüzyon akımı: (23)

Damlayan civa elektrodu için maksimum sınır akımı, i_d , **İLKOVİÇ eşitliği** ile hesaplanır.

$$(i_d)_{\text{ort}} = 607 nD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C$$

Burada,

$(i_d)_{\text{ort}}$ = Mikroamper olarak ortalama akım,

t = Damla ömrü (sn),

m = mg /s olarak kapilerden civanın akış hızı,

D = cm^2 / s olarak analizlenecek maddenin difüzyon katsayısı,

C = Litrede milimol olarak analizlenecek madde konsantrasyonudur (mM).

Artık akımların oluşma sebepleri:

1-Safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları ve destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar sayılabilir.

2- Civa damlacıklarının çözeltiye göre yüklü olmasına sebep olan elektronların akışından kaynaklanan yükleme akımıdır. Bu akım negatif veya pozitif olabilir. Yaklaşık -0,4 V dan daha negatif olan potansiyellerde, DC kaynağından gelen aşırı miktardaki elektronlar, herbir damlacığın yüzeyini negatif yükle yükler.

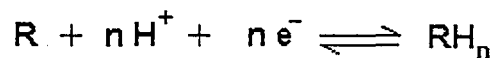
a) Uygulanan potansiyel eğer yaklaşık -0,4 V'dan daha pozitif ise, civa çözeltiye göre daha pozitif olarak yüklenir böylece her damla oluşurken elektronlar yüzeyden civa yığınınına itilir ve negatif bir akım oluşur.

b) Yaklaşık -0,4 V civarında ise, civa yüzeyi yüksüz olup yükleme akımı sıfır olur. Bu yükleme akımı bir bakıma faradayik olmayan bir akım tipidir, çünkü yük, elektrot / çözelti ara yüzeyi boyunca taşınırken, bir yükseltgenme / indirgenme işlemine sebep olmaz.

Dolayısıyla polarografik yöntemin doğruluğu ve duyarlılığı faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğruluk artık akımın etkisini gidermek için yapılan bir düzeltme ile tayin edilebilir.

1.2.9. Polarogramlara pH'nın etkisi: (2)

Organik maddelerle ilgili elektrot reaksiyonlarının çoğu ve hidrojen iyonları ile ilgili birkaç inorganik elektrot reaksiyonu aşağıdaki gibi gösterilir:



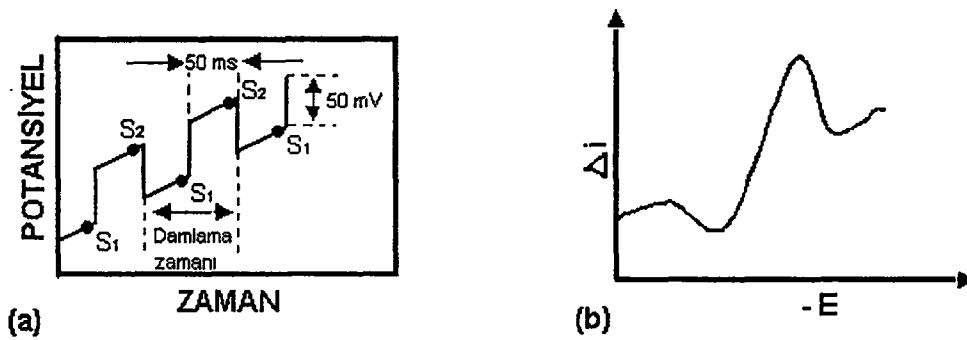
Burada R ve RH_n analitin yükseltgenmiş ve indirgenmiş şekilleridir. Bu yüzden, bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri önemli ölçüde pH' ya bağlıdır; pH'nın değişimi reaksiyon ürününün değişmesine bile sebep olabilir.

Çözelti iyi tamponlanmamış ise, hidrojen iyonları oluşturan veya harcayan bir elektrot reaksiyonunun, elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH' sını çoğunlukla büyük oranda değiştirebileceğini vurgulamak gerekir. Bu değişimler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve yayvan kötü eğrilerinin elde edilmesine sebep olur. Ayrıca, elektrot reaksiyonunun pH tarafından değiştirildiği durumlarda, difüzyon akımı / konsantrasyon ilişkisinde doğrusallıktan sapma gözlenir. Dolayısıyla organik polarografide tekrarlanabilir yarı-dalgalar potansiyelleri ve difüzyon akımları elde etmek için iyi bir tamponlama yapmak genellikle çok önemlidir.

1.2.10. VOLTAMETRİK YÖNTEMLER:

1.2.10.1. Diferansiyel Puls Polarografisi:

Civa damlasına 10 mV' luk veya 50 mV' luk bir puls uygulanır. Damla ile puls arasında uyum sağlamak amacıyla, damla belli bir anda mekanik olarak düşürülür. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır. Tersinir bir reaksiyonda pik potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeline yaklaşık olarak eşittir.



Şekil-6: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

Üstünlükleri:

1-Yarı-dalga potansiyelleri 0,04-0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilmesidir. Klasik polarografiye göre, dalgalarda iyi bir çözüm elde edilir.

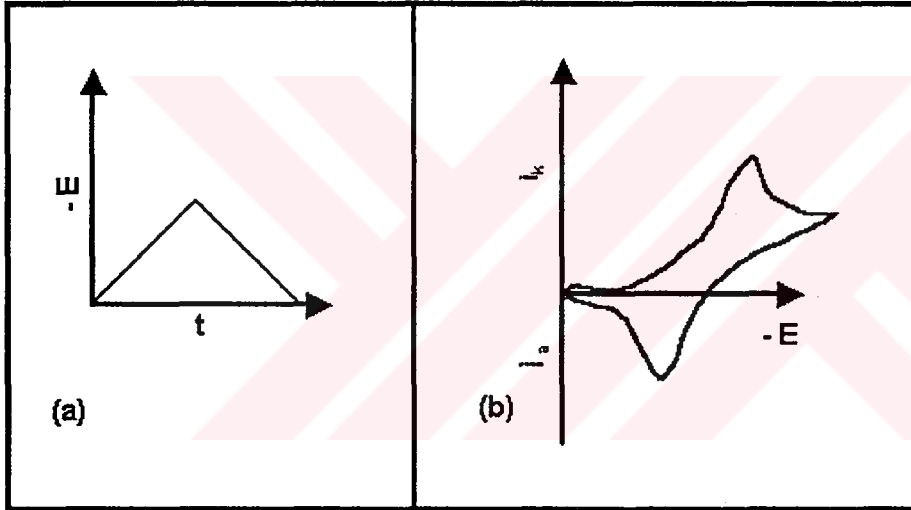
2-Duyarlı bir yöntemdir. Genellikle diferansiyel puls polarografisinin tayin sınırı klasik polarografinin sınırlarından 100-1000 kat daha düşük olup 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

Duyarlılığının yüksek olması, birinci olarak faradayik akımın artmasına, ikinci olarak ise faradayik olmayan yükleme akımının azalmasına bağlanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV arttırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında görülen olaylara bakarsak, bu tabakada 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. Klasik polarografide başlangıçtaki bu akım gözlenmez, çünkü ölçümün yapıldığı süre, bu anlık akımın süresinden büyüktür. Puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından birkaç kat daha büyüktür. Damla düşünce, çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir.

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

1.2.10.2. Dönüşümlü Voltametri:

Dönüşümlü voltametrde, potansiyelin fonksiyonu olarak akım ölçülür. Belirli bir aralıkta sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı akımda olan değişim grafiğe geçirilerek elde edilen voltamograma **Dönüşümlü Voltamogram** denir. Bu voltamogramlarda pozitif potansiyel uygulanarak yürütülen oksidasyon işlemlerinde oluşan oksidatif akım negatif işaretle verilir.



Şekil-7: (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi.

Durgun sistemde çalışılır. Üçlü elektrot sistemi kullanılır. Hızı difüzyon tayin eder. Potansiyel bir maksimuma kadar artıp başlangıç değerine yine doğrusal olarak geri döner. 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. Böylece miktar tayini yönteminin oturtulması daha kolaylaşmış olur. Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının, kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır.

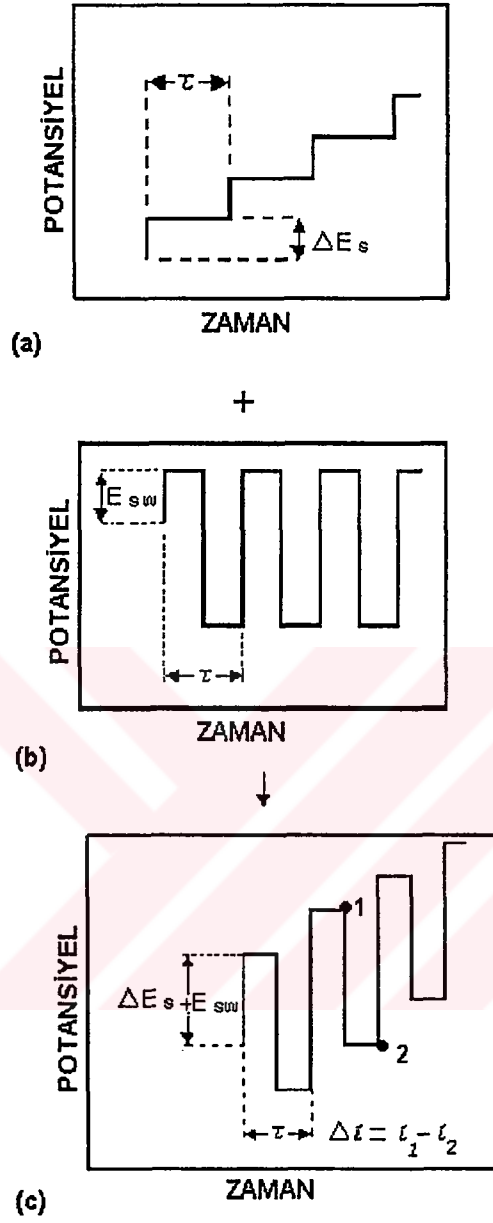
Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir.

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

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

1.2.10.3. Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:

Kare-dalga polarografisi son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Damlayan civa elektrodu ile tarama, bir damla ömrünün son birkaç saniyesi içinde yükleme akımı hemen hemen sabitken gerçekleştirilir. Kare-dalga voltametrisi asılı civa damla elektrodu ile kullanılmaktadır.



Şekil-8: Bir kare-dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu [(a) daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare-dalga uyarma sinyalini elde edecek şekilde toplanıyor].

Şekil-8'de de görüldüğü gibi bir kare-dalga voltametrosinde uyarma sinyalinin oluşumunda elde edilen akım farkı, Δi ; 1 potansiyelindeki akımdan, 2 potansiyelindeki akım değerinin çıkarılması ile 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 bu akımların farkı Δi grafiğe geçirilir. Bu fark konsantrasyonla doğru orantılıdır; pik potansiyeli de polarografik yarı-dalga potansiyeline karşılık gelir.

Kare dalga voltametrisi, son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls voltametri tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az sürede elde edilir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini arttırmak mümkündür. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasındadır.

Puls Polarografisinin Uygulamaları: (2)

Geçmişte doğrusal taramalı polarografi, biyolojik ve biyokimyasal önemi olan birçok madde de dahil olmak üzere çok sayıda inorganik ve organik türün kantitatif tayininde kullanılıyordu. Günümüzde yüksek duyarlılığı, kolaylığı ve seçiciliğinden dolayı, puls yöntemleri, klasik yöntemin hemen hemen tamamen yerini almıştır. Kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri kullanılır. Bazı durumlarda kalibrasyon eğrileri yerine standart katma yöntemleri kullanılmaktadır.

Inorganik Uygulamalar:

Polarografik yöntem, inorganik maddelerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin birçok metal katyonu, damlayan elektrotta indirgenir. Bu katyonların başarılı bir şekilde polarografik tayini, çoğunlukla kullanılan destek elektrolitine bağlıdır. Bu seçimi kolaylaştırmak için, bu elektrolitlerin yarı-dalga

potansiyellerini gösteren tablolardan yararlanılır. Örneğin, destek elektrolit olarak KCl kullanılması durumunda demir (III) ve bakır (II) iyonları için elde edilen dalgalar birbiri üzerine bozucu etki yapar; ancak florür ortamında, demir (III)'ün yarı-dalga potansiyeli $-0,5$ V değişirken, bakır (II) 'in yarı-dalga potansiyeli bir voltun yüzde birkaçı kadar değişir. Dolayısı ile ortamda florür iyonu olduğunda bu metal iyonları için birbirinden iyi bir şekilde ayrılmış iki dalgalı bir polarogram elde edilir.

Organik uygulamalar:

Genellikle organik maddelerin elektrottaki reaksiyonları inorganik türlerinkinden daha yavaş ve daha karmaşıktır. Buna bağlı olarak verilerin teorik yorumlamaları çok daha zordur. Buna rağmen, organik polarografi yapı tayininde, karışımların kantitatif analizinde ve bazen de organik maddelerin kalitatif belirlenmesinde yararlıdır.

1.2.10.4. Sıyırma Yöntemleri:

Sıyırma yöntemlerinde, analizlenecek madde genellikle karıştırılan bir çözeltilde önce bir mikroelektrot üzerinde biriktirilir. Belli bir süre sonra elektroliz ve karıştırma olayı durdurulur ve birikmiş analizlenecek madde analizi için uygun olan voltametik yöntem ile tayin edilir. Analizin bu ikinci basamağında, analizlenecek madde mikroelektrot yüzeyinde çözülür ve sıyırılır; bu yüzden bunlara ***sıyırma yöntemleri*** adı verilir.

Anodik sıyırma yöntemlerinde, elektrot biriktirme basamağı sırasında bir katot olarak, analizlenecek maddenin ilk haline yükselttiği sıyırma basamağında ise, anot olarak davranır.

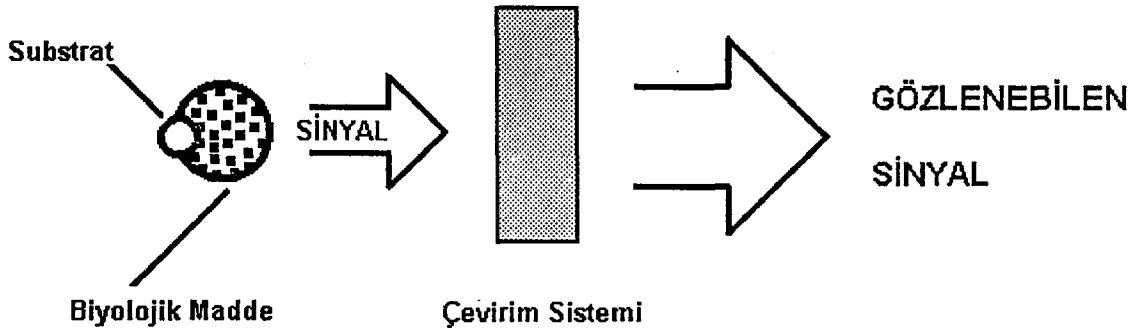
Katodik sıyırma yönteminde elektrot, biriktirme sırasında bir anot, sıyırma sırasında da bir katot olarak davranır. Biriktirme basamağında, analizlenecek madde elektrokimyasal olarak bir önderiştirme işlemine uğrar; yani elektrot yüzeyindeki analizlenecek madde konsantrasyonu yığın çözeltildeki konsantrasyondan çok daha büyüktür.

Sıyırma yöntemleri, eser element tayininde önemli yer tutar, çünkü elektrolizdeki önderiştirme basamağı sayesinde eser miktardaki bir analizlenecek madde başarılı bir şekilde tayin edilebilir. Böylelikle bu basit ve hızlı yöntemlerle 10^{-6} – 10^{-9} M aralığında çözeltilerin analizi yapılabilir.

Elektrokimya'nın bir uygulama alanı olan Biyosensörler hakkında bilgi verecek olursak;

1.3. BİYOSENSÖR

Biyosensörler, iki ana bölümden oluşmuşlardır. Bunlar: 1) Biyokimyasal kısım 2) Elektrokimyasal kısım. Biyosensörlerin tasarımında bu iki kısım içiçe geçecek şekilde tasarlanmıştır. Bu şekilde oluşturulan cihaza **BİYOSENSÖR** adı verilmiştir. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek bir sekonder madde (=biyokimyasal ürün) oluşturmaktır. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısmın görevi ise ortamda oluşturulmuş olan sekonder maddeden okunabilir bir sayısal değer (= elektrokimyasal sinyal) oluşturmaktır (17).



Şema-1: Biyosensörün şematize edilmesi.

1.3.1. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler: (32)

- 1- Seçicilik
- 2- Uzun kullanım ömrü
- 3- Minimum kalibrasyon ihtiyacı
- 4- Örnekten örneğe tekrarlanabilirlik
- 5- Günden güne stabilite
- 6- Yüksek duyarlılık
- 7- Yeterli düzeyde tayin sınırı
- 8- Geniş ölçüm aralığı
- 9- Hızlı yanıt zamanı
- 10- Hızlı geriye dönme zamanı
- 11- Basitlik ve ucuzluk
- 12- Küçültülebilir ve sterilize edilebilirlik

Bu özellikleri kısaca açıklayacak olursak,

Seçicilik: En önemli parametrelerden birisi olan seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiği giderecek uzun ek işlemler eklenmesi gerekir. Ya da zayıf seçicilik nedeniyle aynı anda ölçülen girişimlerin giderilmesi gerekmektedir.

Kullanım Ömrü: Biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalma kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktördür. Bu, 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 teorikte planlanan bu özellik, pratikte günümüzde gerçekleştirilememiştir. Biyosensörlerin kullanım ömürleri boyunca sıkça ya da belirli aralıklarla kalibre edilerek duyarlılıklarından bir şey kaybedip kaybetmedikleri araştırılmalıdır.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı konsantrasyonda ya da aynı özelliklere sahip birden fazla örneklerle daldırılmasıyla yapılan deneylerde aynı sonuçların okunması istenir. Ama pratikte bu pek mümkün değildir. O yüzden biyosensörlerle yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, o biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan bahsedilebilir. Elektrottan elektroda olan tekrarlanabilirlik parametresini sağlayabilmek ise, her elektrodun ayrı ayrı kalibre edilmesi gerektiğinden daha da zordur.

Stabilite: Elektrot stabilitesinin yüksek olduğu durumlar tanım olarak ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığından etkilendiği gibi; pH, ısı, nem, ortam O₂ konsantrasyonu gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek Duyarlılık: İmmobilize edilmiş biyolojik materyale dayalı biyosensörün yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması tanım olarak ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün ideal tanımına

Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Genellikle hızlı cevap zamanı hızlı geriye dönme zamanına tekabül eder. Yani ilk örneğin enjeksiyonundan sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnekte aynı süre sonra enjekte edilebilecektir.

Basitlik ve Ucuzluk: Kullanımı, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler tasarlamak yapımında her zaman hedef alınmış bir düşüncedir. Bu nedenle ilk biyosensör örneklerinin karmaşık ve de pahalı olan yapıları daha sonraları ara basamaklar ortadan kaldırılarak basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır.

Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Biyosensör elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi önemlidir. Bununla birlikte biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.3.2. Biyosensör Çeşitleri:

Tasarlanabilecek biyosensör çeşitleri şu şekilde sınıflandırılabilir :

ÇEVİRİCİ	ÖLÇÜM PRENSİBİ ve ÖLÇÜLEN ÖZELLİK
Elektrokimyasal	Voltametri, Potansiyometri, Amperometri e Alan etkili (ISFET, chem FET)
Elektriksel	Yüzey etkinliği (MOS), Elektrolit İletkenliği
Optik	Fluoresans, Absorpsiyon, Yansıma, Luminesans, Kırılma İndeksi
Manyetik	Paramanyetizm
Kütleye duyarlı	Piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, Yüzey akustik dalgaları
Termal	Reaksiyon ısısı, Adsorpsiyon ısısı

1.4. Nükleik Asitlerin Yapısı: (21,98)

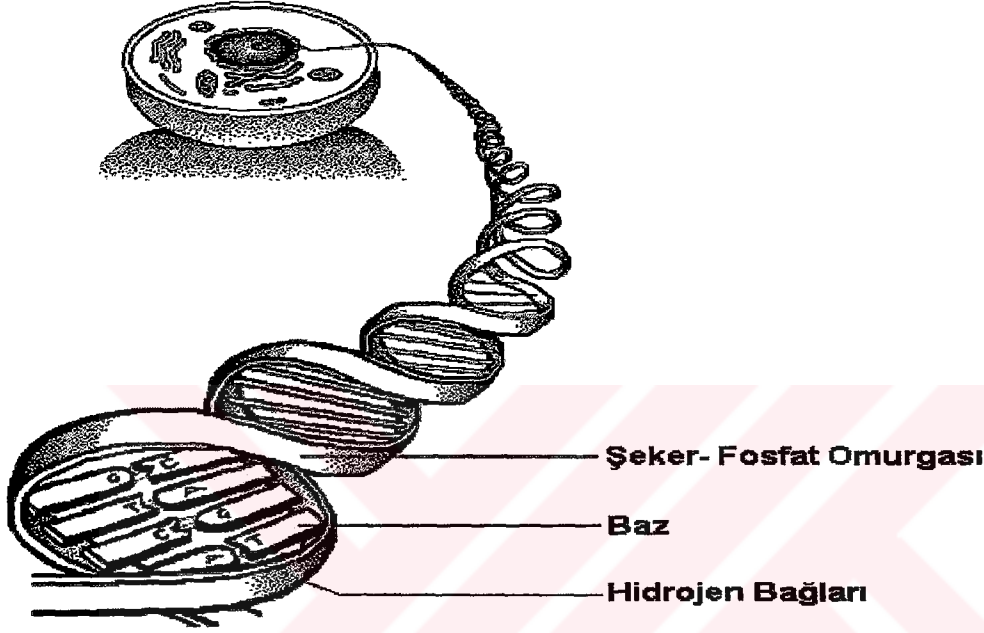
Nükleotit monomerlerinin bir polimeri olan nükleik asitlerin primer yapısı, belirli tür ve sayıdaki nükleotidin belirli bir diziliş sırasına göre 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucu meydana gelmektedir. Nükleotitler arasındaki fosfodiester bağları, kimyasal olarak veya deoksiribonükleaz ve ribonükleaz gibi nükleazların etkisiyle hidrolitik olarak koparılabilmektedir. Zincir içi nükleotid bağlarını parçalayan nükleazlara **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 miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğunun belirlenmesi, 1950 yıllarında Watson, Crick ve Wilkins tarafından DNA yapısı için çift zincirli heliks şeklinde sekonder yapı modelinin önerilmesine yol açmıştır. Transfer RNA yapısında da hidrojen bağları ile sabit tutulan bir sekonder yapı gözlemlenmektedir.

1.4.1. DNA yapısı

Çift zincirli sarmal molekülünün iki zinciri, pürin ve pirimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T, G karşısında C bulunduğu için son derece spesifikdir. Bu nedenle çift zincirli heliks DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğu için bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi hesaplanabilmektedir. DNA ısıtıldığında, heliks yapısının yarısının bozulduğu sıcaklık, erime sıcaklığı (T_m) olarak tanımlanmaktadır. Denatürasyon adı verilen DNA heliks yapısının bozulması, 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı

(G≡C) bulunduğundan yüksek konsantrasyonda G ve C taşıyan 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.



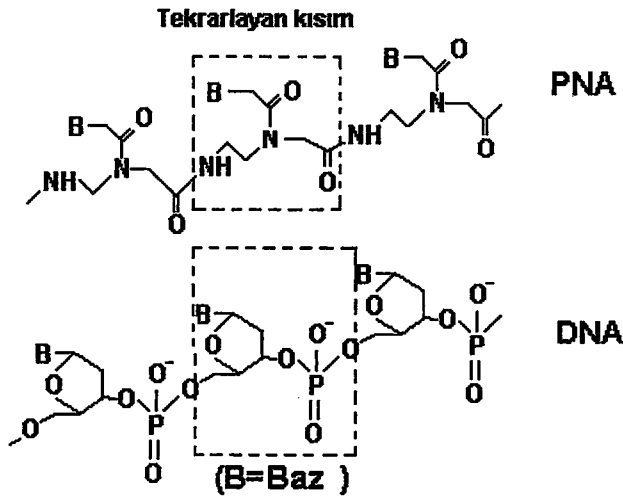
Şekil-9: DNA çift sarmal yapısı

Bir eksen etrafında dönen 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 arasında uzaysal ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmaktadır. DNA, nükleotid dizisine ve çevresel değişimlere dayalı olarak çeşitli yapısal değişikliklere uyum gösterebilen polimorfik bir makromoleküldür. Çift sarmal DNA (dsDNA), iki zincirden meydana gelmektedir. Bu zincirlerin her biri çift sarmalın dış yüzeyinde bulunmakta ve kovalent devamlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. Çift sarmalın iki zinciri, pürin ve pirimidin bazlarının arasındaki hidrojen bağları ile bir arada bulunmaktadır.

Watson ve Crick tarafından öne sürülen ilk DNA yapısı, B-formu olarak bilinmektedir. Sağa doğru yönelmiş, her dönüşte 10 nükleotidi bulunan ve küçük oluğa mükemmel yerleşen bağlı su ile stabilize olabilen yapıya sahiptir. Daha sonra DNA'nın dehidrate edildiği zaman, fosfat grupları arasında çoğalan elektrostatik etkileşim sayesinde bir yapısal değişikliğe uğradığı gözlenmiştir. Bu yapıya A-DNA adı verilmiştir. Bu yapı da sağa doğru yöneliktir ve her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Pentoz gruplarının yapılanması, çift sarmalın çapını genişletmekte ve boyunu kısaltmaktadır (70).

1.3.1. Peptik Nükleik Asitler (PNA):

PNA, nötral N-(2-aminoetil)-glisin'e dayalı psödopeptid omurgası içeren bir DNA analogudur ve daha kısa problemler kullanılarak DNA ile sadece tamamen birbirlerinin tamamlayıcısı oldukları zaman, çok daha seçimli hibritleşebilmekte, yüksek sıcaklıkta stabil olan ve düşük iyonik kuvvette oluşabilen hibritler meydana getirebilmektedir.

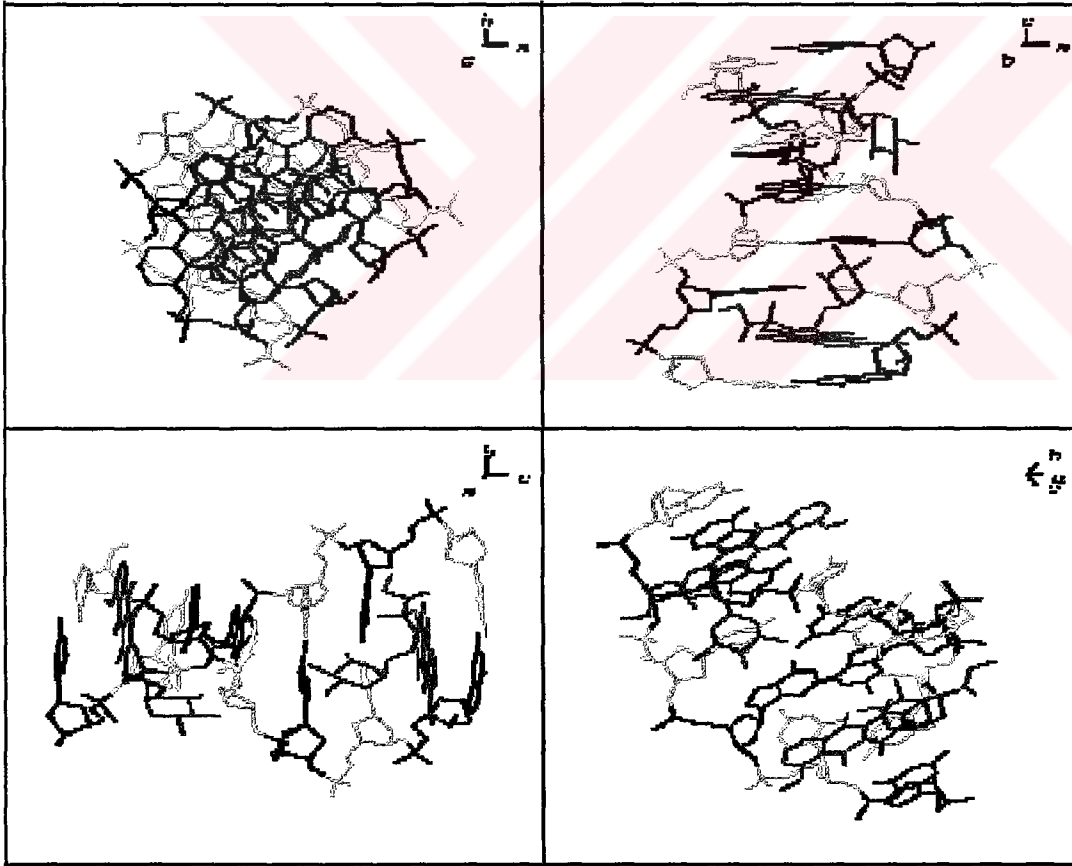


Şekil-10: PNA ve DNA'nın yapısal olarak kıyaslamalı olarak gösterilmesi.

1.4.3. DNA ile ilgili sıkça kullanılan bazı terimlerin tanımlamaları:

* **İnterkalasyon:** Moleküler yapısında düzlemsel bir halka sistemi bulunan bazı maddelerin, DNA baz çiftleri arasına yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır (6, 27). Bu etkileşimin dönüşümlü veya dönüşümsüz olması, maddenin yapısına bağlıdır (124). İnterkalasyon, DNA sentezini ve DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozarak DNA' da zincir kırılmasına yol açar. İnterkale olabilen ilaçların etki mekanizmaları bu olaya dayanmaktadır.

Şekil-11' de interkalasyon olayı görülmektedir.



Şekil-11: İnterkalasyon'un farklı açılardan gösterimi.

*** DNA baz dizilerinin yazılımının tanımlanması (21)**

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

Oligonükleotid: Birden fazla bazın yan yana gelmesiyle oluşur.

a) *Dinükleotidler;* İki bazın yanyana gelmesiyle oluşur. Örneğin; A-T veya AT şeklinde gösterilir.

b) *Trinükleotidler;* Üç bazın yanyana gelmesiyle oluşur. Örneğin, G-A-T veya GAT şeklinde gösterilir.

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan X bazı veya bazlarla, poly (X) şeklinde gösterilir. Örneğin, mononükleotid gösterilişine poly (A), dinükleotid'e poly (AT) (veya poly (dA-dT) şeklinde de gösterilebilir, trinükleotid'e poly (GAT) örnek verilebilir.

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

Örneğin mononükleotid 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.

DNA hibridizasyonu: Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır.

Prob : Baz sıralaması belli olan oligonükleotid.

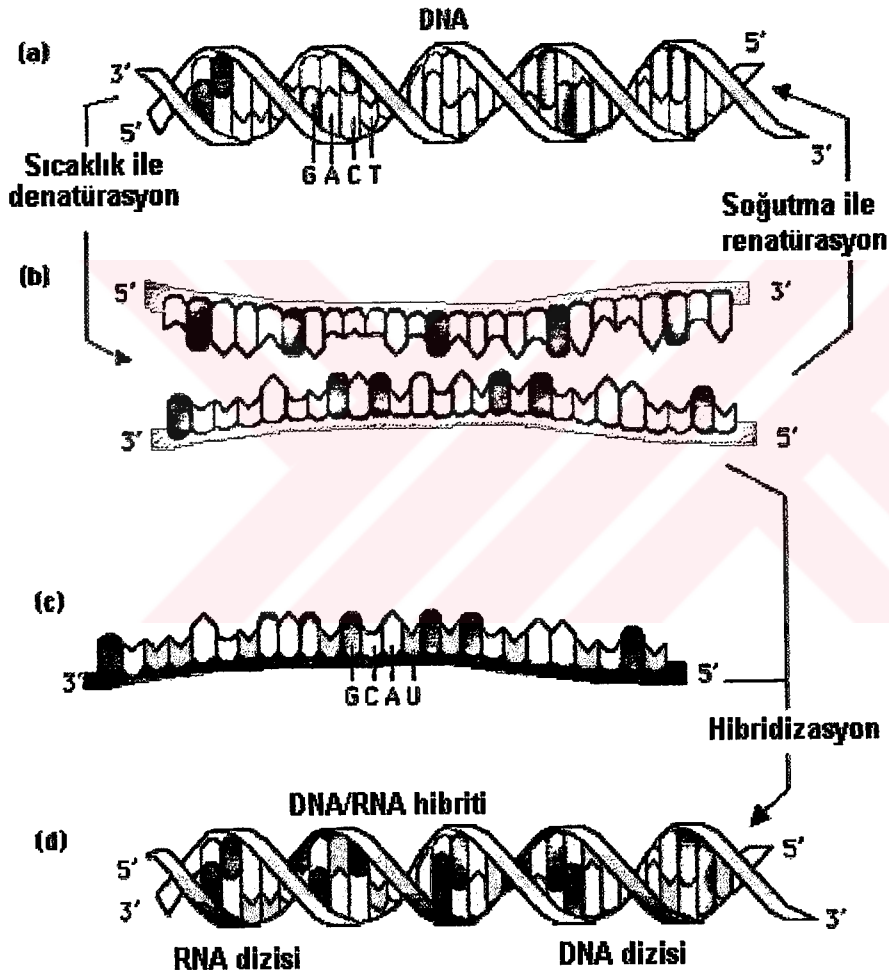
Hedef dizi (Target) : Prob'un dizisinin karşılığını içeren oligonükleotid.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch) : Bir bazı veya birden fazla bazı hedef diziden farklı olan ve dolayısıyla yanlış eşleşen oligonükleotid.

Rastgele dizi (Non complementary) : Hedef diziden farklı bir dizi içeren oligonükleotid.

1.4.4. Nükleik asit hibridizasyonu:

Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır (5).



Şekil-12: Nükleik asit hibridizasyonu

1.4.5.Nükleik asit hibridizasyonlarının kinetiğini etkileyen faktörler: (5)

Sıcaklık : DNA dubleksinin hibrit oluşturma hızı genelde erime sıcaklığının 25°C altındadır ve bu sıcaklık hibridizasyon için *optimum sıcaklık* olarak nitelendirilir. Optimum sıcaklıkta DNA dubleksinin oluşumunu etkileyen bir diğer faktör ise tuz konsantrasyonudur. Örneğin, optimum sıcaklıktaki lambda DNA'nın hibrit oluşturma hızı, Mg²⁺ iyonları varlığında iki kat azalmıştır.

Tuz konsantrasyonu : Hibridizasyon hızı, 1.2 M'a kadar artan NaCl konsantrasyonu ile artmaktadır. Bu konsantrasyon, standart tuz konsantrasyonu olan 0.18 M' ın yaklaşık yedi katıdır.

DNA dizi uzunluğu : Prob dizinin uzunluğu, hedef diziden kısa olduğu zaman, bağlanma hızı hedef dizinin uzunluğuna bağlı olarak artmaktadır. Hedef dizinin, prob dizisinden kısa olduğu zamanlarda ise, bağlanma hızında belirgin bir düşüş gözlenmektedir.

Standard koşullar altında (~ 0.18 M NaCl), RNA - DNA hibritlerinin oluşma hızı, DNA -DNA hibritlerinin oluşma hızıyla aynıdır. Ancak tuz derişimi arttırıldığı zaman, RNA - DNA bağlanma hızı, DNA - DNA bağlanma hızı kadar artmamaktadır. Bu durum, RNA'nın yapısı içindeki moleküllerin kendi aralarındaki etkileşimle meydana gelen ikincil yapıların, yüksek tuz derişiminde hareketsizleştirilmeleriyle açıklanmaktadır.

Nükleik asitlerin yapısı : Hibridizasyon olayında bağlanma hızı, DNA yapısının kompleksliği ve bağlanan dizilerin uzunluğu ile ters orantılıdır.

Baz Kompozisyonu : Toplam GC yüzdesinin varlığı hibridizasyon hızını etkilemektedir. GC baz çiftlerinin, ısıya karşı dayanıklılığı AT baz çiftlerinden daha büyüktür. Bu yüzden, dizilerde GC yüzdesinin artması sonucu, bağlanma hızı artmaktadır.

Formamit : Hibridizasyon tepkimelerinde, % 30 - % 50 aralığında formamit kullanımı, bağlanma hızını etkilememektedir. Örneğin, % 20 oranında formamit kullanımı, katı faz membran hibridizasyonlarında 1 / 3 oranında azaltmaktadır. Aynı zamanda, % 80 oranında formamit kullanımı sulu fazdaki DNA - DNA hibridizasyonu hızında 3 kat azalmaya sebep olduğu görülmüştür.

Dekstran sülfat : Hibridizasyon tepkimelerinde, dekstran sülfat gibi bir inert polimer kullanımı, tepkime hızını yaklaşık on kat arttırmaktadır. İntert polimer, DNA'nın çözelti içinde dağılarak birbirleriyle daha az etkileşmeleri yerine, biraraya gelerek yoğunlaşmalarına sebep olmaktadır; dolayısıyla yoğun bir ortamda toplanmış problemlerin bazlarının hibridizasyona açık kalmasına olanak sağlamaktadır. Bir arada bulunan bu problemlerin, hedef dizilerle hibridizasyonu sonucu, daha kuvvetli hibridizasyon sinyalleri gözlenmektedir. Nitel çalışmalarda, az sayıda hedef dizi bulunan örneklerle çalışıldığında, dekstran sülfat kullanımı hibridizasyon sinyalini arttıracaktır. Nicel hibridizasyon çalışmalarında ise, bu maddenin kullanımından kaçınılmalıdır. Aynı zamanda, dekstran sülfat yüksek yükleme akımlarına da sebep olmaktadır.

İyonik kuvvet : Hibridizasyon tepkimelerinde iyonik kuvvet arttıkça, tepkime hızı da artmaktadır. Hibridizasyon tepkimelerinde sodyum derişimi < 0.1 M'in üstünde iki kat arttırıldığı zaman, hız 5 - 10 kat artmaktadır . Ancak, daha fazla arttırmalardan sonra ve 1.5 M'a kadar hız yavaşça yükselmektedir .

Baz değişimleri : Birçok hibridizasyon tepkimesi, birbirinin tam karşılığı olmayan prob ve hedef diziler arasında olmaktadır. Baz değişimine uğramış diziler arasındaki hibridizasyon, tepkime hızını ve erime sıcaklığını (T_m) azaltmaktadır.

pH : Hibridizasyon tepkimelerinin çoğu 6,8–7,4 arasındaki pH' larda yürütölmektedir. Ancak, eğer tepkime, pH' sı 5 ile 9 arasında olan ve 0,4 M sodyum içeren tampon çözeltilerde yürütölüyorsa, hibridizasyon hızı etkilenmemektedir.

Viskozite : Hibridizasyon çözeltisinin viskozitesi arttıkça, bağlanma hızı azalmaktadır. Örneğin, viskoz bir ajan olan %7'lik SDS'nin yüksek derişimleri çözeltide kullanıldığı zaman, göreceli olarak yüksek bir sıcaklık kullanılması (60⁰ - 65⁰C) önerilmektedir.

1.4.6. DNA BİYOSENSÖRLERİ

DNA ve diğer moleküllerin arasındaki etkileşim, invivo DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu, genlerin ve türlerin mutasyonu, bazı DNA'ya hedeflenmiş ilaçların mekanizmaları, bazı hastalıkların tayini, bazı sentetik kimyasal nükleazların hareket mekanizmaları ile ilgili yaşam bilimlerinde önemli bir ana konudur (58).

Moleküler biyoloji ve biyoteknolojideki son yıllarda görülen gelişmeler, DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler için ümit ve heyecan verici imkanların bir basamağını oluşturmaktadır (117). Antikor ve enzimlerden farklı olan nükleik asit tanıma tabakası, çok stabil ve kolaylıkla oluşturulabilen ve tekrar kullanım için yenilenebilen bir tabakadır (58).

DNA'ya dayalı tanıma yüzeyine sahip olduğu bilinen elektrokimyasal DNA biyosensörleri geçmişte tasarımı yapılmış ve kullanımı gerçekleştirilmiş olan diğer tür biyosensörlere, yeni bir boyut getirmektedir ve gelecekte planlanan nokta bakım analizlerinde de çok önemli bir rol oynayacaktır (106). DNA'ya dayalı tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (58, 60, 61, 111) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin (karsinojenler, ilaçlar vb.) tayininde kullanılabilir (55, 70, 74, 84, 97, 114, 120, 121, 126).

1.4.6.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA Biyosensörleri:

Birçok küçük molekül dönüşümlü bir şekilde, dsDNA ile öncelikli olarak şu üç yolla etkileşir (126):

- a) Nükleik asit yapısındaki negatif yüklü şeker-fosfat grubu ile elektrostatik etkileşim.
- b) DNA çift sarmalının yapısının 2 oluklarına (küçük ve büyük oluklarına) bağlanma ile etkileşim.
- c) Doğal yapılı DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon.

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle (ilaç, çevresel atıklar, metal kompleksleri vb.) etkileşmesi ve farklı yöntemlerle bu etkileşimin incelenmesi veya maddenin tayininin gerçekleştirilmesi eczacılıkta yeni ilaç tasarımı ve tayinine; ayrıca çevre kirliliğine yol açan bazı atıkların tayinine ait yeni bir yöntemin geliştirilmesi açısından önem kazanmaktadır (18-20, 30, 31, 33, 38, 48, 50, 55, 64, 68, 69, 70-72, 74, 81,82, 84, 85, 90, 93, 94, 97, 104, 114,120,121, 126,127).

Birçok antitümör ilaç etkisini DNA'ya bağlanarak göstermektedir. Bu bilgi sayesinde birçok değişik bileşiğin antikanser ilacı olarak kullanılma potansiyeli olup olmadığını incelememize olanak sağlamaktadır. Bileşiklerin nükleik asitlerle olan etkileşimini incelemek için birçok değişik teknik geliştirilmiştir. Bunlar, denge diyalizleri, nükleer magnetik rezonans, in vitro transkripsiyonun inhibisyonu, spektrofotometrik analizler, dairesel dikroizm, floresans sönmesi ve erime sıcaklığı profillerinin alınmasıdır. Bu metotlar arasında en hızlı yanıt verenleri floresans özelliğe sahip bileşiklerdir. Böylece floresans özelliğe sahip olmayan bileşiklerin DNA ile etkileşiminin tayini mümkün olmamaktadır (89).

Yüksek çözünürlüğe sahip X ışını difraksiyon analizi, antikanser ilaçlar ile hücre içindeki hedefleri arasındaki moleküler etkileşimi en ince ayrıntısına kadar açıklayabilecek bir tekniktir. Bu analizler sayesinde, antikanser ilaç molekülünün

değişik kısımlarının olası biyolojik fonksiyonları açıklanabilmektedir. Molekülün bazı kısımları, ilacın DNA'ya, interkalasyon, hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimi veya hepsinin sayesinde bağlanmasını sağlamaktadır. Bazı kısımları ise DNA'nın belirli dizilerine ilgi duymakta ve o bölgeye bağlanmasını sağlamaktadır. Polimerazlar ve topoizomeraz-II gibi hücre enzimlerinin ilaç-DNA kompleksine olan girişimleri, ilaç molekülünün bazı kısımları tarafından engellenebilir. Bu fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi, ilaç moleküllerinde hedeflerine göre yapmamız gerekli olan değişiklikler için önemlidir. Bu yapıların aydınlanması sayesinde, birçok ilacın biyolojik fonksiyonlarını içeren kurallar açıklanabilir. Bu kurallar sayesinde, kullanımda olan ilaçların aktivitelerini arttırmak veya istenen aktiviteyi gösterecek gerekli yapılara sahip yeni bir sınıf bileşikler dizayn etmek mümkün olacaktır (105).

DNA'nın birim parçasını oluşturan oligonükleotidler tedavide kullanılmaya aday bir madde olarak bulunmuştur (88). Antisense ilaçların gelecekteki faydaları düşünecek olursa yeni ilaç tasarımları sırasında DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi ve bunun yanında bir takım hastalıkların tedavisinde bu oligonükleotidlerle tedavi yoluna gidilmesi, örneğin Vitravene-ilk antisense ilaç (63); bu yolda atılmış önemli adımlardır. Ayrıca son yıllarda peptik nükleik asitlerin (PNA) antisense teknolojisinde ve ilaç geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanımları ümit vericidir (66,67).

İlaç-DNA etkileşmesine dayalı benzer elektrokimyasal çalışmalarda (55, 70, 84,97, 114,120,126) , DNA ile etkileşen ilaçların DNA ile etkileştiklerinde yanıtta bir azalma veya artış gözlenmiştir. Örneğin, CPE ile hiç sinyal vermeyen veya sadece çok az sinyal verebilen fenotiyazin grubu bazı ilaçların dsDNA modifiye edilmiş CPE ile nanomolar düzeyde tayinleri mümkündür (114). Bu fark aşağıdaki sebeplere bağlı olabilir (112):

a) Fenotiyazin grubu ilaçların CPE' na adsorpsiyonu daunomisin' inkinden daha zayıftır.

b) Fenotiyazin grubu ilaçlardaki yükseltgenebilen yapı, DNA çift sarmal yapısına saklanamaz. Fenotiyazin grubu ilaçlar, eğer DNA elektroda tutturulmuşsa, DNA'ya interterkalasyon yerine tercihen DNA'nın yüzeyine bağlanır.

Bir antitümör ilaç olan Daunomisin'in karbon pastası elektrodu yüzeyine tutturulmuş veya çözeltide bulunan çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşmesi, dönüşümlü voltametri ve sabit akım kronopotansiyometrik sıyırma teknikleri kullanılarak incelenmiş ve Daunomisin' in dsDNA ile etkileştiğinde ilaç yanıtındaki azalmanın yanında Guanin bazına ait yanıtta artış ve ayrıca adduct oluştuğu gözlemlenmiştir (112).

C. Teijeiro ve arkadaşları (97) , Mitomisin C'nin dsDNA ve denatüre edilmiş DNA (ssDNA) ile olan etkileşmesini asılı civa damla elektrodu kullanılarak dönüşümlü voltametri tekniği ile incelemişlerdir. Ayrıca elektrokimyasal olarak indirgenmiş Mitomisin C ve asit ile aktive edilmiş Mitomisin C'nin yüzeydeki DNA ile etkileşmesi, asılı civa damla elektrodu ile incelenmiş ve yöntem olarak transfer sıyırma dönüşümlü voltametri tekniği kullanılmıştır (84).

DNA-ilaç etkileşiminine dayalı bazı biyosensörlerle, incelenen ilaçların miktar tayinini daha duyarlı bir şekilde yapmak mümkündür (71, 72, 114).

İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA biyosensörlerinin tasarımında amaç gelecekte yeni antibiyotik, antiviral, antitümör ilaç ve antisense oligonükleotitlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına katkıda bulunmak (19, 63) veya bir ilaç hammaddesinin kantitatif tayininin daha duyarlı bir şekilde gerçekleştirilmesini mümkün kılabilme (70-72, 114, 126).

1.4.6.2. DNA hibridizasyonuna dayalı DNA Biyosensörleri:

Hastalık teşhislerinde insan, virüs ve bakteri baz dizi serilerinin tayini gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır. Çok sayıda kalıtsal hastalığa sebep olan mutasyonlar artık tespit edilebilmektedir ve bu konu hakkındaki bilgilerimiz insan genom projesi devam ettikçe artmaktadır. İnsan DNA'sının 6 milyar baz çiftine sahip 46 kromozomu, kanın her ml'sinde yaklaşık 7-8 milyon olan akyuvarlardan ekstre edilebilir. Her hücrenin de belirli bir olaydan sorumlu olan bir veya iki baz dizi kopyası içerdiğini düşünürsek, elimizde bir ml kan örneğinden 12 veya 24 attomol analit DNA olacaktır. Kısacası, şunu belirtmekte fayda vardır ki, DNA testlerine uygulanacak her yöntemin üstün seviyede seçici ve çok düşük tayin sınırlarına sahip olması gerekmektedir.

Nükleik asit analizlerinde kullanılan elektrokimyasal ve immünokimyasal yöntemler, duyarlılık ve hazırlanan örneklerin saf olması konularında birbirlerinden ayrılırlar. Polarografik ve voltametrik teknikler, biyokimyasal yöntemlerle izole edilmiş ve optik metotlar için geçerli olan saflıkta DNA veya RNA örneklerine ihtiyaç duymaktadır. Adsorptif sıyırma analizlerinde, nanogram miktarlarda örneğe ihtiyaç duyulurken, diğer voltametrik tekniklerde mikrogram düzeyinde örneklerle çalışılabilmektedir. Aynı zamanda adsorptif sıyırma analizlerinde, zayıf adsorptiviteye, düşük moleküler kütlede sahip maddeler analizde girişim oluşturmamaktadır. İmmünokimyasal metodlarda, spesifik antikolar sayesinde, safsızlaştırma basamakları olmadan biyolojik materyallerden nükleik asit analizi gerçekleştirilebilir. Ancak, antikoların hücrenin içine girebilmesi ve hedef nükleik asite ulaşabilmesi için hücrelerin durağanlaştırılması çok önemlidir. Yüksek afiniteye sahip antikolar sayesinde submikrogram seviyesinde nükleik asit tayin edilebilmektedir. İmmünokimyasal ve voltametrik metodlar karşılaştırıldığı zaman, birkaç örneğin çalışıldığı zaman voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği söylenebilir, ancak büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlenecekse, daha iyi bir

otomasyona sahip immünokimyasal tekniklerin kullanılması (örn. ELISA) uygun olmaktadır (78).

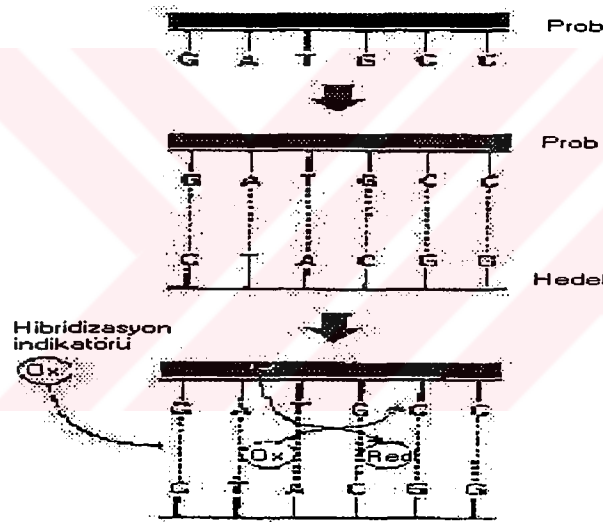
Kan, serum, doku ve vücut sıvıları gibi biyolojik örneklerde özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemli bir yer tutar. Bu tip analiz sonuçları, bakteri ve virütik kökenli hastalıkların tanınmasında kullanılabilir. Bilinen yöntemler rutin analizler için uygun olmayıp radyoizotop kullanımında sonuçların uzun sürede çıkması nedeniyle tercih edilmez. Bilinen bu yöntemlere alternatif olmak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (99). Biyotin ve fluoresan boyalar işaretleme amacıyla kullanılmıştır. Moleküler biyolojide önemli bir gelişme olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), yüksek duyarlılık ve kolay kullanılabilirliği açısından virüs enfeksiyonlarının tanısında kullanılmıştır. PCR yöntemiyle hedef genlerin tayin edilmesi zordur, bu nedenle yüksek duyarlılıkta diziyeye özgün ve nicel gen tayini yapabilecek bir yöntem ihtiyacı vardır.

Elektroforetik ayırmalar ve radyoizotopik (^{32}P) tayinin birleştirilmesine dayalı geleneksel olarak kullanılan DNA hibridizasyonu tayinine yönelik yöntemler, yorucu, vakit alıcı ve sonuç olarak, özellikle tek bakım analiz ünitelerine yönelik olan rutin ve hızlı medikal analizler için uygun değildir. DNA dizileri tayini için yeni geliştirilen hibridizasyon biyosensörleri, uygulama zamanını kısaltabilip uygulanan işlemi de basitleştirebilmektedir (117).

DNA hibridizasyon biyosensörlerinin gelişimi, klinik, çevresel ve adli tanılarla bağlantılı diziyeye özgü tanı bilgisinin sağlanmasında büyük bir kolaylık sağlamaktadır (106).

Dizi-seçimli DNA biyosensörleri, tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştürebilen bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (37, 116, 119).

Hibridizasyona dayalı DNA biyosensörleri, aranan hedefin baz dizimine karşılık gelen 20-40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya "PROB" olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması, elektrot yüzeyinde hibrit oluşmasına neden olur. Bu oluşumun elektrokimyasal veya optik ölçümü, bir çevirici sinyali ile gözlemlenir. Elektrokimyasal ölçümlerde hibritin olduğu elektrot, bir elektroaktif indikatör içeren (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) bir çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (117).



Şekil-13: Prob ve Hedefin arasında hibritin oluşması ve hibridizasyon indikatörü ile hibritleşmenin tayini.

Yüzeyde yeni oluşan hibrit ile birleşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt, hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kabul edilir (58, 60 ,108, 117).

Hibridizasyon indikatörü, ölçülebilir ve değişik bir şekilde tek sarmal ve çift sarmal DNA ile etkileşebilen bileşiktir. Örneğin, *Co(III)* (12, 14, 15, 44, 60, 62,113); *Fe (II)* (15, 42); *Ru(II)* (4, 28, 42, 43) ; *Os (II)*, *Os(IV)* (53, 54, 96) 'nin 1,10-fenantrolin ve 2,2'- bipiridin DNA'ya bağlı klatları voltametrik olarak çalışılmaktadır. En iyi sonuç veren hibridizasyon indikatörü olarak belirtilen *Co(III)*' ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'- bipiridin ile olan komplekslerinin DNA'ya bağlanma özellikleri, voltametrik olarak incelenmiştir (58). En iyi sonuç veren hibridizasyon indikatörü olması ve sıklıkla kullanılmalarının nedeni, bu kobalt komplekslerinin düşük potansiyelde elektrokimyasal cevap vermesi ve hibridizasyon sonucunda oluşan prob-hedef dubleksine etkin bir şekilde bağlanmasıdır (117). K. Millan ve arkadaşları kobalt kompleksleri ile yaptıkları çalışmada (60) elde edilen pik akımlarının difüzyon katsayılarına bağlı olduğunu ve DNA'ya bağlı komplekslerin, serbest komplekslerden daha yavaş difüzyon yapmakta olduğunu rapor etmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı, $[Co(phen)_3]^{3+}$ genellikle DNA biyosensör tasarımında en fazla kullanılan indikatördür (60, 61, 108, 109, 113, 115-117, 119); çünkü dsDNA ve ssDNA ile etkileşen $[Co(phen)_3]^{3+}$ 'in yanıtları arasındaki farklılık büyük olup hibridizasyon indikatörü olarak sıkça kullanılmaktadır.

Özgün DNA dizilerinin tanınması işlemi için, kronopotansiyometrik yöntemlerin (PSA) uygulanmasına ilgi gösterilmektedir (12, 107-109, 116). Bu yöntem, hibrit ile ilgili olan redoks indikatörünün davranışını, elektrota sabit bir potansiyel uygulayarak ve potansiyel değişimini zamanın bir fonksiyonu olarak kaydetmek işlemleriyle incelemektedir. Hibridizasyon olayının bilgisayarla desteklenmiş kronopotansiyometrik tayini, yüksek duyarlılığı, efektif arka plan akım düzenlenmesi ile birleştirmektedir. Diğer analog voltametrik sıyırma yöntemlerine oranla kronopotansiyometrik sıyırma yöntemi, yüksek potansiyelde gözlenmesine rağmen DNA dizisi tayinlerinde çok önemli olan guanin pikinin güvenli ölçümlerine olanak sağlamaktadır (12, 108, 116). Kronopotansiyometrik sıyırma analizleri, karbon

yüzeyinden ileri gelen arka akım gürültülerini en az seviyeye düşürmekte, ve böylece guanin oksidasyon piklerinin ve hibridizasyon indikatörlerinin güvenli ve duyarlı ölçümleri mümkün olmaktadır. Diğer voltametrik ölçümlerle elde edilen ($\mu\text{g/ml}$) tayin sınırına rağmen, PSA ile tayin sınırları (ng/ml) seviyesine inebilmektedir.

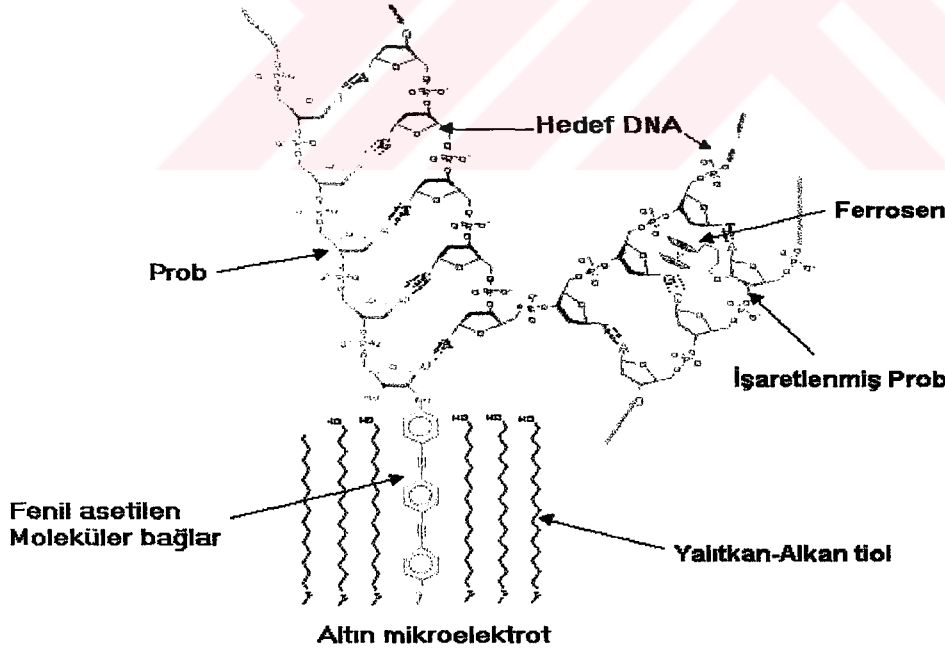
J. Wang ve arkadaşları, karbon pastası kullanarak geliştirdikleri elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri ile E. coli (115) , HIV (108) ve Mycobacterium tuberculosis (116)'e ait DNA dizilerini tayin edebilmişlerdir. Ayrıca DNA biyosensörlerinin seçiciliğini ve duyarlılığını arttıracaklarına inandıkları PNA'ya dayalı yeni çalışmalarında halen devam etmektedirler.

Özellikle mutasyon tayinlerinde yeterli derecede hassas sonuçlar veremeyen DNA yerine kullanabileceğimiz PNA 'dan yararlanarak daha özgün ölçümler, PNA'ya dayalı biyosensörlerle gerçekleştirilmiştir. PNA modifiye edilmiş biyosensörlerin , baz değişikliğine duyarlı hibridizasyon tayinlerinde kullanılması gayet ümit vericidir. DNA ile çift sarmal oluşturabilen peptik nükleik asitler (PNA) " prob " olarak kullanılabilir; nötral ve peptidlere benzeyen omurgasıyla peptik nükleik asitler, hedef DNA'ya daha seçici olarak bağlanırlar. Böylelikle çeşitli hastalıklara sebep olabilecek nokta mutasyonları (mismatch) kolaylıkla tayin edilebilmektedir; çünkü PNA, mismatch'e dayalı hedef dizi ile hibritleşebilmekte ve yüksek sıcaklık koşullarında dahi denatürasyona uğramamaktadır (102, 106, 113).

J. Wang ve arkadaşları ayrıca elektroaktif indikatör kullanılmayan bir DNA biyosensörü tasarımı yapmışlar; guanin bazının oksidasyona uğramasına bağlı sinyale ilişkin bir tayin gerçekleştirmişlerdir (119).

J. Wang ve arkadaşları ayrıca elektroaktif indikatör kullanılmayan bir DNA biyosensörü tasarımı yapmışlar; guanin bazının oksidasyona uğramasına bağlı sinyale ilişkin bir tayin gerçekleştirmişlerdir (119).

K. Millan ve arkadaşları da DNA hibridizasyonuna yönelik çalışmalarında karbon pastası elektrodu kullanmaktadır. Prob hazırlama tekniği farklı olmasına rağmen; elektrokimyasal tayin yöntemi, J. Wang ve arkadaşlarınıninkiyle aynıdır. Sistik fibrozis'e (61) ait DNA dizilerini kullanarak elektrokimyasal tayinlerini başarıyla gerçekleştirmiştir. Ayrıca aynı çalışma grubundan S. Mikkelsen, 1994 yılında kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleri ile tayini projesiyle (59), Amerika Birleşik Devletleri'nden patent almıştır (A.B.D Patent No: 5.312.527-05/17/1994).



Şekil-14: CMS sisteminde kullanılan elektrottaki moleküler bağlantı yardımıyla

DNA kompleksinin birleşmesi .

Klinikte kullanıma uygun olacak kadar küçük ve tüm sağlık ekibinin kullanabileceği kadar kolay cihazların tasarımları; DNA biyoçiplerine ilişkin proje Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı büyük firmalar tarafından başlatılmıştır (91). S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını ise Clinical Micro Sensors Inc. (CMS) adlı bir Amerikan şirketi satın almıştır ve sonrasında DNA mikroçiplerinin hayata geçirilmesi için ilk çalışmalar başlamış olmaktadır. CMS, Mart 1998'de Massachutes Teknoloji Enstitüsü'ndeki bir fuarda ilk DNA çip prototiplerini sunmuştur (124). Hoffman La Roche firmasının, DNA testlerini üretime sokmaya çalışan Affimetrix (CA.) adlı firmayla anlaşma yapması sevindirici bir olaydır (39). Dolayısıyla, bu testler hızlı bir şekilde hastanın hangi ilacı kullanması gerektiğini, hastalığının antibiyotiklere dirençli olup olmadığını veya tümörün tedaviye cevap verip vermediğini öğrenmemizi sağlayacaktır.

II. BÖLÜM

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihazlar

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 (Metrohm 626 Polarecord Analyzer ve ayrıca dönüşümlü voltametri için, EG&G Princeton Applied Research Model 264 A Polarographic Analyzer / Stripping Voltammeter, Powerlab 200 A (ADInstruments) ile birlikte kombine kullanıldı.)

Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)

Ag/AgCl referans elektrot

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

Deneyleerde kullanılan Karbon Pastası Elektrodunun (CPE) hazırlanışı:

Çalışma elektodu, çapı 3 mm olan cam borudan hazırlandı ve iç kısmında karbon pastası içermekte ve elektriksel iletkenlik ise bakır tel ile sağlanmaktadır. Karbon pastası , grafit tozu ile mineral yağın 70:30 oranında homojen bir şekilde karıştırılmasıyla hazırlandı. Elektrot (CPE) hazırlandıktan sonra elektrot yüzeyi, yağlı kağıt ile homojen bir yüzey haline çevrildi (11, 12, 112, 114,116).

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Epirubisin Hidroklorür (Farmarubisin-Carlo Erba İlaç San. ve Tic. A.Ş.)

Mitoksantron Dihidroklorür tuzu (Novantrone-ER-KİM İlaç ve Kimyevi maddeler

Tic. Ve San. Ltd. Sti.)

Kobalt (II) klorür (Sigma)

Kobalt (II) bromür (Sigma)

Perklorik asit (Sigma)

1,10-fenantrolin (Sigma)

Asetik asit (%99-100) (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Di potasyum mono hidrojen fosfat (Riedel-de Haen)

Potasyum dihidrojen fosfat (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)] (Sigma)

Etilen dinitrilotetraasetik asit disodyum tuzu (Merck)

Tüm çalışmalarda sterilize edilmiş deiyonize su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25.0 ± 0.5) °C' de gerçekleştirildi.

Epirubisin (EPR) - DNA etkileşmesinde kullanılan oligonükleotidler :

17-baz sentetik oligonükleotidler (liyofilize toz halinde) Synthegen, LLC Mod. Oligo. ve Genemed Biotechnologies Inc. (Houston, TX, Amerika Birleşik Devletleri) 'dan sağlandı. Bu oligonükleotidler baz dizilimi aşağıdaki gibidir:

Prob (Oligo 2A dizisi):

5'- TCA AAT CAG GTT GCT TA -3'

Hedef (Oligo 2B dizisi):

5'- TAA GCA ACC TGA TTT GA - 3'

Oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı:

17- baz dizi oligo 2A, 17-baz dizi oligo 2B'nin karşılığıdır. Oligo 2A stok çözeltisi, 1458 µg/mL ve Oligo 2B stok çözeltisi, 1855 µg/mL; TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı. (115, 116) .Oligonükleotidler seyreltik çözeltileri, 0,5 M Asetat tamponu (pH 4.8), ile hazırlandı.

Hepatit-B virüsüne (HBV) dayalı oligonükleotidlere ilişkin diziler:

HBV'ye dayalı prob, HBV – DNA subtype adr nükleotit 1734-1754 yerlerinden elde edilmiş (73) bir prob olup, bu çalışmada kullanılan tüm 21-baz sentetik oligonükleotidler (liyofilize toz halinde) Genemed Synthesis Inc. ve Genemed Biotechnologies Inc. (South San Francisco, CA, Amerika Birleşik Devletleri) 'dan sağlandı. Bu oligonükleotidler baz dizilimi aşağıdaki gibidir:

Prob (21-baz dizi B):

5'- GAG GAG TTG GGG GAG CAC ATT- 3'

Hedef (21-baz dizi A):

5'- AAT GTG CTC CCC CAA CTC CTC - 3'

Bir bazı hedeften farklı olan dizi (21-baz dizi A'):5'- AAT GTG GTC CCC CAA CTC CTC-3'**Rastgele dizi (21-baz dizi C):**

5'- AAC GTG TGA ATG ACC CAG TAC-3'

Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı:

21-baz dizi A (hedef), 21-baz dizi B (prob) 'nin karşılığıdır. 21-baz dizi A', 21-baz dizi A'nın altı çizilerek belirtilmiş tek bazı değişmiş şeklidir. Tüm 21-baz dizili oligonükleotid stok çözeltileri, 100 µg/mL konsantrasyonunda TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı (115, 116). Oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri, 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile hazırlandı.

DNA çözeltilerinin hazırlanışı:

Buzağı timus bezinden elde edilen DNA (=Calf Thymus DNA); çift sarmal DNA (dsDNA) stok çözeltileri; 1000 µg/mL , TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı (115, 116). dsDNA seyreltik çözeltisi, 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile hazırlandı.

Denatüre edilmiş DNA (tek sarmal DNA = ssDNA) çözeltisi, dsDNA seyreltik çözeltisinin ısı ile denatüre edilmesiyle hazırlandı. Bunun için dsDNA çözeltisi, 100 °C 'de 6 dakika tutuldu ve sonra buz kabında soğutuldu.

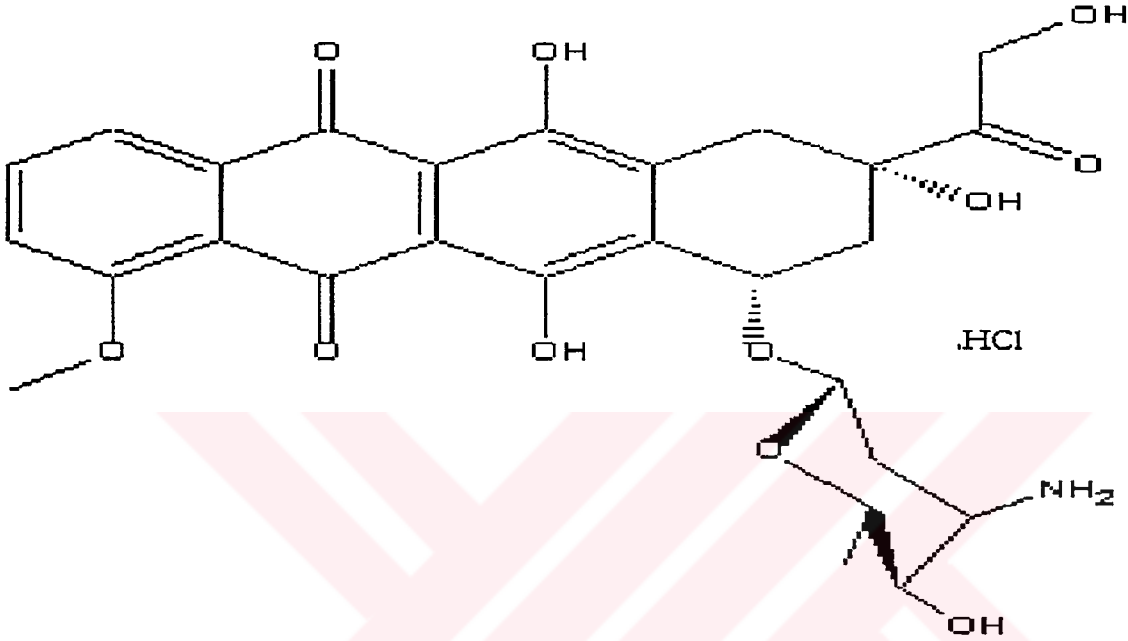
Hazırlanan DNA çözeltilerinin saflık kontrolü: (60)

Bu çalışma için 5 ppm konsantrasyonunda dsDNA seyreltik çözeltisinin UV'de 260 nm ve 280 nm'de okunan absorbans A_{260} ve A_{280} değerleri oranlandı ve bu değerlerin 1,6 ile 1,8 arasında olduğu saptandı.

2.2.1. Kullanılan ilaç hammaddeleri hakkında genel bilgi

Epirubisin Hidroklorür (27, 56,100)

Açık Kimyasal Formül:



Kapalı Kimyasal Formül: $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$

Kimyasal Adlandırma:

(8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoksi- α -L-arabino-hekzopiranosil)oksi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroksi-8-(hidroksiasetil)-1-metoksi-5,12-naftasendion hidroklorür tuzu.

Diğer isimleri: Farmarubisin

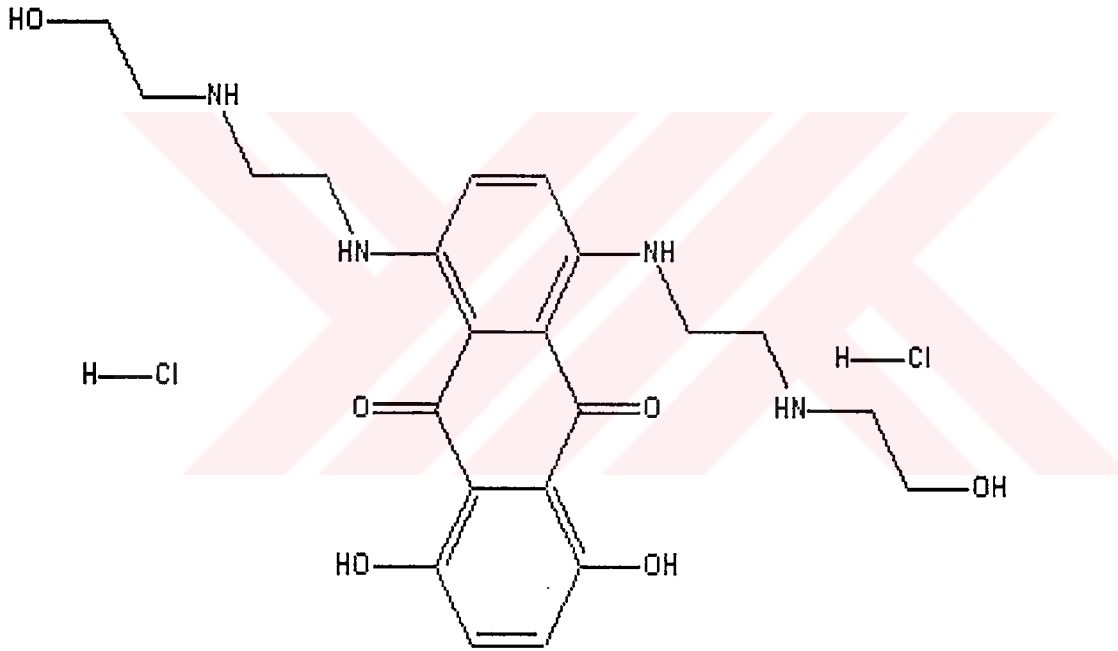
Kimyasal Özellikleri: Kırmızı-turuncu renkte kristallerden oluşmuştur. Çözeltisi ışıktan korunmalıdır. Suda çözünür. Molekül ağırlığı; 580,0 gr/mol 'dür.

Farmakolojik Özellikleri: Epirubisin, Doksorubisin'e benzer olarak antineoplastik etkiler gösteren antrasiklin grubu antibiyotiktir. Etki mekanizması, DNA baz çiftleri arasına yerleşerek; yani interkalasyon yaparak, DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanma

şeklindedir. İnterkalasyon sonucunda DNA sentezini ve DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozarak DNA'da zincir kırılmasına yol açar. Tek başına veya diğer antineoplastik ilaçlarla birlikte kombine olarak kullanıldığı endikasyonlar; akut lösemi, meme kanseri, gastrik kanser, küçük hücreli bronş kanseri, ovaryum adenokarsinomları ve Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalardır.

Mitoksantron dihidroklorür (27, 56,100)

Acık Kimyasal Formül:



Kapalı Kimyasal Formül: $C_{22}H_{30}Cl_2N_4O_6$

Kimyasal Adlandırma:

1,4-dihidroksi-5,8-bis[[2-[(2hidroksietil)amino]etil]amino]-9,10-antrasendion

dihidroklorür tuzu.

Diğer İsimleri: Novantron

Kimyasal Özellikleri: Higroskopik özellikte olup mavi-siyah renktedir.

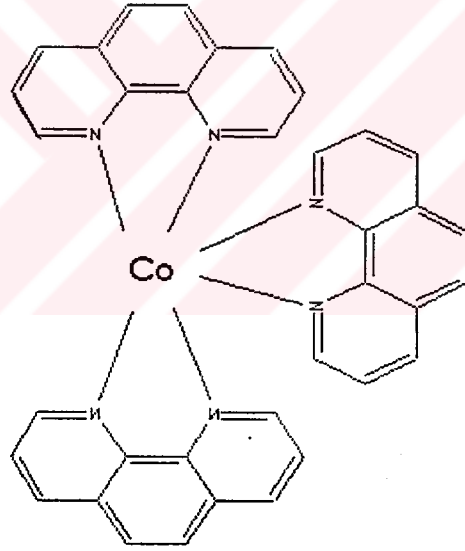
Mitoksantron çözeltileri oda sıcaklığında saklanmalıdır, buzdolabında saklanması durumunda çökelek oluşması söz konusudur. Suda kısmen; metanolde oldukça

çözünür. Asetonitril, kloroform ve Asetonda pratik olarak çözünmez. Molekül ağırlığı; 514,1 gr/mol 'dür.

Farmakolojik Özellikleri: Mitoksantron, antrokinon grubu antineoplastik etki gösteren bir ilaç olup, nükleik asitlerin sentezini inhibe eden bir maddedir. Metastatik meme kanserlerinde, katı tümörlerde ve Hodgkin dışı lenfomalarda tek başına veya kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır.

2.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ hakkında genel bilgi:

Tris (1,10-fenantrolin) kobalt (III) kompleksi; $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$



Metallointerkalasyon ajanları ile DNA arasındaki etkileşimin yapısı öncelikle spektroskopik ve X-ray kristallografisi ile çalışılmıştır (28).

Metallointerkalasyon çalışmalarında ve metal iyonlarının ve kelatların DNA'ya koordinasyonlarının incelenmesinde elektrokimyasal yöntemlerin uygulanması, daha önceden kullanılan UV-görünür spektroskopi gibi yöntemlere bir alternatif oluşturmaktadır. Zayıf absorpsiyon bantlarına sahip olmaları yüzünden veya DNA molekülü ile elektronik geçişlerinin üstüste gelmesinden dolayı bazı küçük

moleküllerin spektroskopik yöntemlerle incelenmeleri mümkün olmamaktadır. Bu moleküller, voltametrik yöntemlerle incelenebilir. Aynı molekülün birçok redoks halinin incelenebilmesinin yanısıra, karışım halinde bulunan ve birbiriyle etkileşen moleküllerle de çalışılabilir. Metal komplekslerinin DNA ile etkileşimi sonucu oluşan denge sabitleri, pik potansiyellerindeki kaymalar ile ve interkalatif, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimlerde rol oynayan baz çiftleri ile hesaplanabilir (14).

[Co(phen)₃]³⁺, dsDNA'nın bazları arasına interkale olabilme yeteneğine sahip bir metal kompleksidir ve bu özelliğine bağlı olarak ssDNA ve dsDNA ile etkileşmesindeki farklılık, bu metal kompleksinin güvenilir bir şekilde ve sıklıkla kullanılan bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmasını sağlamaktadır (60, 61, 108, 109, 113, 115-117, 119).

Tris (1,10-fenantrolin) kobalt (III) perklorat sentezi ve çözeltisinin hazırlanışı:

L. S. Dollimore ve arkadaşlarının çalışmalarında (22) kullandıkları tekniğe göre kobalt (II) klorür ve bromür, perklorik asit ve ligand 1,10 fenantrolin kullanılarak sentezlendi ve bu kompleks kullanılmadan önce, sudan iki kez kristalize edilerek hazırlandı. (**Bu maddenin sentezi E.Ü Fen Fakültesi'nde **Sayın Prof. Dr. Bekir Çetinkaya** tarafından gerçekleştirilmiştir)

2.3. Kullanılan yöntem

CPE'un aktivasyonu, CPE yüzeyine dsDNA veya ssDNA'nın modifiye edilmesi, CPE yüzeyine prob tutturulması, CPE yüzeyine tutturulmuş prob ile hedefin CPE yüzeyinde hibrit oluşturması ve CPE yüzeyine modifiye edilmiş DNA'nın veya oligonükleotidin madde ile etkileşmesine ilişkin yöntemlerde J. Wang ve arkadaşlarının çalışmalarında (112, 116) rapor edilen yol izlenmiştir.

2.3.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalar:

2.3.1.1. Epirubisin Hidroklorür (EPR) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:

Diferansiyel puls voltametri tekniğinde kullanılmak üzere 0,17 mM EPR stok çözeltisi distile suyla hazırlandı. Dönüşümlü voltametri tekniğinde kullanılan 0,17 mM EPR stok çözeltisi 0,5 M Asetat Tamponuyla (pH 4.8) hazırlandı. Çalışma ortamı olarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ve 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,4) kullanıldı.

2.3.1.1.1. EPR'nin dsDNA ile etkileşmesinin Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

2.3.1.1.1-a) Asetat tamponu (pH 4,8) ortamında;

A) CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-EPR içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan asetat tamponu (pH 4,8) içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde, asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 5 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle; 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genişliğinde asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

2.3.1.1.1-b) Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında;

A) CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7,4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-EPR içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle; 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan fosfat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genişliğinde, fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen fosfat tamponunda yapıldı.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 5 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan

fosfat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm:* +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen fosfat tamponunda yapıldı.

2.3.1.1.2. EPR'nin dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

A) CPE'u kullanılarak EPR'nin dönüşümlü voltamogram çalışması:

-*CPE ' nun aktivasyonu:* CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-*EPR içeren çalışma tamponunda çalışılması:*

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle; 0,17 mM EPR çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm:* +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanılarak EPR'nin dönüşümlü voltamogram çalışması:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- *CPE yüzeyine dsDNA tutturulması:* Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

- *Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi:*

dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle; 0,17 mM EPR çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm*: +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

B) ssDNA modifiye edilmiş CPE kullanılarak EPR'nin dönüşümlü voltamogram çalışması:

- *CPE ' nun aktivasyonu*: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- *CPE yüzeyine dsDNA tutturulması*: Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm ssDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

- *Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi*:

dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle; 0,17 mM EPR çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm*: +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

2.3.1.1.3. EPR'nin dönüşümlü voltametrisinde tarama hızının değiştirilerek yanıt etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve yöntem 2.3.1.1.2 'deki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi. Çalışma ortamı olan asetat tamponunda bulunan EPR, tarama hızı artırılarak, herbirinde elde edilen akım değerleri hesaplanarak, tarama hızının kareköküne karşılık akım değerlerini içeren grafik çizildi.

2.3.1.1.4. EPR konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu çalışmada CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve çalışma ortamı olan asetat tamponunda bulunan EPR miktarı artırılarak her iki tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Yöntem 2.3.1.1.1-a'daki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki EPR miktarı artırıldı.

2.3.1.1.5. CPE'na tutturulan dsDNA konsantrasyon değişiminin EPR yanıtına etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu alışmada CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve CPE yüzeyine tutturulan dsDNA miktarı arttırılarak her iki tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Yöntem 2.3.1.1.1-a'daki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece CPE yüzeyine tutturulan dsDNA miktarı arttırıldı.

2.3.1.1.6. EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresindeki değişimin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu alışmada CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve ortamdaki EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresi arttırılarak her iki tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Yöntem 2.3.1.1.1-a'daki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresi arttırıldı.

2.3.1.1.7. EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

***Bu çalışmada kullanılan 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8), 20 mM NaCl içermektedir.

A) CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu zeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-EPR içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm:* +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde, asetat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

B) Oligo 2A modifiye edilmiş CPE ile EPR tayini:

-*CPE ' nun aktivasyonu:* CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-*CPE yüzeyine Oligo 2A tutturulması:* Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm Oligo 2A çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki Oligo 2A ile etkileşmesi: Oligo 2A tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde asetat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

C) Yüzeyinde hibrit oluşturulmuş CPE ile EPR tayini:

-*CPE ' nun aktivasyonu:* CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-*CPE yüzeyine Oligo 2A tutturulması:* Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm Oligo 2A çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

- *CPE yüzeyindeki oligo 2A'nın karşılığı olan Oligo 2B ile hibrit oluşturması:* CPE'un karışan 15 ppm Oligo 2B çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki hibrit ile etkileşmesi: CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Ölçüm: +0,2 V ile +0,8 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde asetat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

2.3.1.1.8. EPR–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tekrarlanabilirlik ve tayin sınırı parametrelerinin incelenmesi:

Tekrarlanabilirlik:

A) CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-EPR içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-**Ölçüm:** +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde , asetat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 5 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Çözeltideki EPR' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 1,7 μ M EPR içeren ve karışmakta olan 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde, asetat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

Her iki çalışma her seferinde yüzeyi yenilenen CPE ile, ardarda 5 kez tekrarlandı ve akım değerleri ölçüldü.

Tayin sınırları hesaplanırken sinyal/gürültü oranı (S/N) 3 olarak alındı.

2.3.1.2. Mitoksantron dihidroklorür (MTX) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesi:

2.3.1.2.1. MTX'nun dsDNA ile etkileşmesinin Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

2.3.1.2.1-a) Asetat tamponu (pH 4,8) ortamında:

A) CPE ile MTX tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-MTX içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 4,5 μ M MTX içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,3 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde, asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile MTX tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 5 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Çözeltideki MTX' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 4,5 μ M MTX içeren ve karışmakta olan asetat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,3 V ile +0,8 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen asetat tamponunda yapıldı.

2.3.1.2.1-b) Fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında:**A) CPE ile MTX tayini:**

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-MTX içeren çalışma tamponunda çalışılması: Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 4,5 μ M MTX içeren ve karışmakta olan fosfat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,1 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde, fosfat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi.

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen fosfat tamponunda yapıldı.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile EPR tayini:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 5 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Çözeltideki MTX' in CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 4,5 μ M MTX içeren ve karışmakta olan fosfat tamponu içine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

Ölçüm: +0,1 V ile +0,7 V arasında 5 mV/s tarama hızıyla 10 mV' luk puls genliğinde fosfat tamponu ortamında tarama yapılarak gerçekleştirildi

Ayrıca aynı çalışma aynı koşullarda ilaç içermeyen fosfat tamponunda yapıldı.

2.3.1.2.2. MTX'un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında Dönüşümlü Voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

A) CPE'u kullanılarak MTX'un dönüşümlü voltamogram çalışması:

-CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-MTX içeren çalışma tamponunda çalışılması:

Aktive edilmiş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 0,45 mM MTX çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-Ölçüm: +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanılarak MTX'un dönüşümlü voltamogram çalışması:

- CPE ' nun aktivasyonu: CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm dsDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

- *Çözeltideki MTX' un CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi:*

dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 0,45 mM MTX çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm:* +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

B) ssDNA modifiye edilmiş CPE kullanılarak MTX'un dönüşümlü voltamogram çalışması:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE , 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- *CPE yüzeyine dsDNA tutturulması:* Aktive edilmiş CPE, karışan 10 ppm ssDNA çözeltisinde, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilmesiyle dsDNA tutturuldu. Sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

- *Çözeltideki MTX'un CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi:*

dsDNA tutturulmuş CPE, +0,2 V 'da 3 dakika süreyle 0,45 mM MTX çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra CPE, 10 saniye süreyle distile suyla yıkandı.

-*Ölçüm:* +0,2 V ile +1,20 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla asetat tamponu (pH 4,8) ortamında tarama yapılarak ölçüm gerçekleştirildi.

2.3.1.2.3. MTX'un konsantrasyon değişiminin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu çalışmada CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve çalışma ortamı olan asetat tamponunda bulunan MTX miktarı artırılarak her iki tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Çalışma 2.3.1.2.1-a'daki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki MTX miktarı artırıldı.

2.3.1.2.4. MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresindeki değişiminin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu çalışmada CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve ortamdaki MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresi artırılarak her iki tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Çalışma 2.3.1.2.1-a'daki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'nın etkileşme süresi artırıldı.

2.3.1.2.5. MTX–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tayin sınırı parametresinin incelenmesi:

Asetat tamponu (pH 4,8) ortamında yöntem 2.3.1.2.1-a'ya göre yapılan çalışmada sonucu voltamogramda elde edilen tayin sınırı, sinyal/gürültü oranı (S/N) 3 alınarak hesaplandı.

2.3.2. DNA hibridizasyonuna dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalar:

Diferansiyel puls voltametri ve dönüşümlü voltametri tekniğinde kullanılmak üzere, 0,0192 M $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ stok çözeltisi distile suyla hazırlandı. Çalışma ortamı olarak, 0,5 M asetat tamponu (pH 4,8) ve 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,4) ve 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) kullanıldı.

2.3.2.1. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in DNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniğiyle incelenmesi:

A) CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:

-CPE'un Aktivasyonu: 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren çalışma ortamında çalışılması: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümülyasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7,0) 5 saniye süre ile yıkandı.

-Ölçüm: Akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ diferansiyel puls tekniği (10 mV Genlik) kullanılarak (+0,5 V) – (-0,1 V) arasında, 5 mV/s'lık tarama hızıyla, 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) ölçüldü.

Aynı çalışma, aynı koşullarda ancak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirildi.

B) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:

-CPE'un Aktivasyonu: 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine dsDNA tutturulması: 10 ppm dsDNA, 20 mM NaCl içeren ve karışan asetat tamponu çözeltisinde, 5 dakika süreyle +0.5 V potansiyel uygulanarak

aktive edilmiş CPE yüzeyine immobilize edildi. Daha sonra elektrot, 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümüülasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7,0) yla 5 saniye süre ile yıkandı.

-*Ölçüm*: Akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ diferansiyel puls tekniği (10 mV Genlik) kullanılarak (+0,5 V) – (-0,1 V) arasında, 5 mV/s'lik tarama hızıyla, 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) ölçüldü.

Aynı çalışma, aynı koşullarda ancak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirildi.

C) ssDNA modifiye edilmiş CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:

-*CPE'un Aktivasyonu*: 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-*CPE yüzeyine ssDNA tutturulması*: 10 ppm ssDNA, 20 mM NaCl içeren ve karışan asetat tamponu çözeltisinde, 5 dakika süreyle +0.5 V potansiyel uygulanarak aktive edilmiş CPE yüzeyine immobilize edildi. Daha sonra elektrot, 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin CPE yüzeyindeki ssDNA ile etkileşmesi: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümüülasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7,0) 5 saniye süre ile yıkandı.

-*Ölçüm:* Akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ diferansiyel puls tekniği (10 mV Genlik) kullanılarak (+0,5 V) – (-0,1 V) arasında, 5 mV/s'lık tarama hızıyla, 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) ölçüldü.

Aynı çalışma, aynı koşullarda ancak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen Tris-HCl tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirildi.

2.3.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri tekniğiyle incelenmesi:

A) *CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:*

-*CPE'un Aktivasyonu:* 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren çalışma ortamında çalışılması: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümüülasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7,0) 5 saniye süre ile yıkandı.

Aküümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 50 mV/s tarama hızıyla (+0.5 V) - (-0.5 V) arasında aynı ortamda ölçüldü.

B) *dsDNA modifiye edilmiş CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:*

-*CPE'un Aktivasyonu:* 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-*CPE yüzeyine dsDNA tutturulması:* 10 ppm dsDNA, 20 mM NaCl içeren ve karışan asetat tamponu çözeltisinde, 5 dakika süreyle +0.5 V potansiyel uygulanarak aktive edilmiş CPE yüzeyine immobilize edildi. Daha sonra elektrot, 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin CPE yüzeyindeki dsDNA ile etkileşmesi: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin

akümülyasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7,0) 5 saniye süre ile yıkandı.

Akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 50 mV/s tarama hızıyla (+0.5 V) - (-0.5 V) arasında aynı ortamda ölçüldü.

C) ssDNA modifiye edilmiş CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ tayini:

-CPE'un Aktivasyonu: 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-CPE yüzeyine ssDNA tutturulması: 10 ppm ssDNA, 20 mM NaCl içeren ve karışan asetat tamponu çözeltisinde, 5 dakika süreyle +0.5 V potansiyel uygulanarak aktive edilmiş CPE yüzeyine immobilize edildi. Daha sonra elektrot, 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı.

- $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin CPE yüzeyindeki ssDNA ile etkileşmesi: 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7,0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümülyasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7,0) 5 saniye süre ile yıkandı.

Akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak 50 mV/s tarama hızıyla (+0.5 V) - (-0.5 V) arasında aynı ortamda ölçüldü.

Aynı çalışma, aynı koşullarda ancak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen Tris-HCl tamponunda (pH 7, 0) gerçekleştirildi.

2.3.2.3. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin konsantrasyonundaki değişimin yanıtı olan etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada CPE, dsDNA modifiye edilmiş CPE ve ssDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve çalışma ortamı olan Tris-HCl tamponunda bulunan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ miktarı artırılarak her üç tip elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak çalışma 2.3.2.1'deki gibi aynı koşullarda

gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ miktarı giderek arttırıldı; her biriyle kalibrasyon eğrisi çıkartıldı.

2.3.2.4. Ortamdaki tuz konsantrasyonundaki değişimin yanıtta olan etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve çalışma ortamı olan Tris-HCl tamponunda bulunan NaCl miktarı değiştirilerek, elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Çalışma, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak çalışma 2.3.2.1'deki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki tuz miktarı değiştirildi.

2.3.2.5. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

Bu çalışmada dsDNA modifiye edilmiş CPE kullanıldı ve $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresi arttırılarak , elektrot ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Çalışma, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak çalışma 2.3.2.1'deki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile CPE'na tutturulan dsDNA ile etkileşme süresi arttırıldı.

Bu çalışmaların sonucuna bağlı olarak Hepatit-B virüsüne ait dizi tayini için tasarımı yapılacak olan DNA biyosensörü için optimum koşullar ($[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ konsantrasyonu, tuz konsantrasyonu, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümüülasyon zamanı) belirlendi.

2.3.2.6. Hepatit-B virüsüne ait dizi tayini için tasarımı yapılacak olan DNA Biyosensörünün tasarımına ilişkin çalışmalar:

-CPE'un Aktivasyonu: 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

-Prob'un CPE yüzeyine tutturulması: Prob, +0.5 V potansiyel uygulanarak 5 dakika süre, 20 mM NaCl içeren 10 ppm prob çözeltisinde karışan ortamda, aktive edilmiş CPE yüzeyine immobilize edildi. Daha sonra elektrot, 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı.

- Hibrit'in CPE yüzeyinde oluşturulması: Hibridizasyon, elektrodun 20 mM NaCl içeren ve karışan 15 ppm hedef çözeltisine daldırılmasıyla ve +0.5 V potansiyelde 5 dakika süreyle tutulmasıyla gerçekleştirildi. Daha sonra elektrot 10 saniye süre ile sterilize su ile yıkandı. Yukarıdaki işlemler, hedef dizi yerine tek bazı farklı oligonükleotit ve rastgele diziyeye sahip oligonükleotit kullanılarak tekrarlandı.

-Hibridizasyonun tayini: Hibridizasyon tayininde; 20 mM NaCl ve 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içeren 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.0) içersine daldırılan elektrot, 3 dakika süreyle karışan sistemde tutuldu. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin akümüülasyonundan sonra, elektrot 20 mM Tris-HCl tamponuyla (pH 7.0) 5 saniye süre ile yıkandı. Daha sonra akümüle olan $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ diferansiyel puls tekniği (10 mV'luk Genlik) kullanılarak ölçüldü.

Aynı işlemler, prob ve tek bazı farklı oligonukleotit (mismatch) arasındaki hibridizasyon ve ayrıca prob ve rastgele diziyeye sahip oligonükleotit (non-complementary) arasındaki hibridizasyonun tayini için tekrarlandı.

III. BÖLÜM

BULGULAR

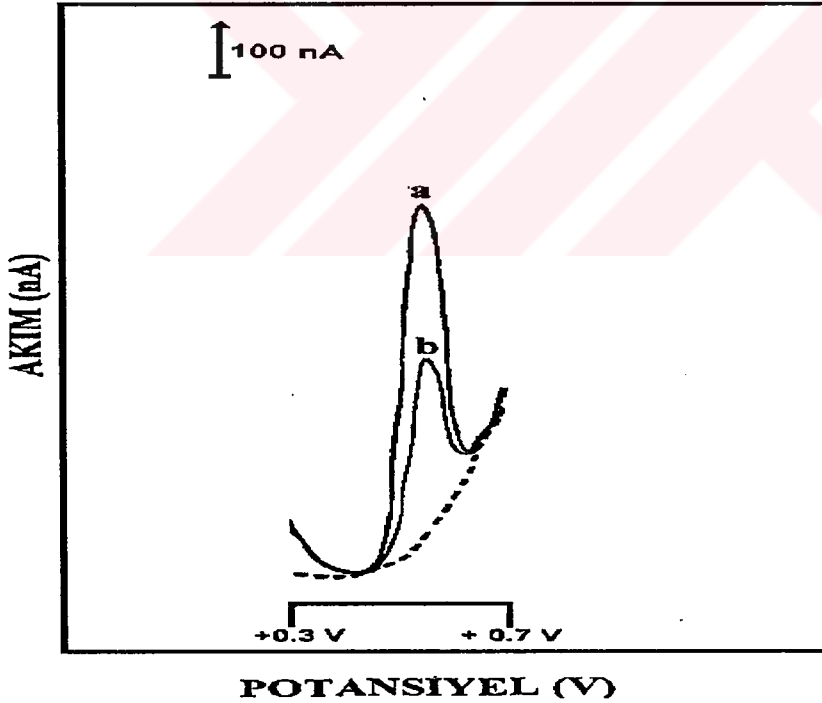
3.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulgular:

3.1.1. Epirubisin Hidroklorür (EPR) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:

3.1.1.1. EPR'nin dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

3.1.1.1.1. Asetat tamponu ortamında (pH 4,8) elde edilen bulgular:

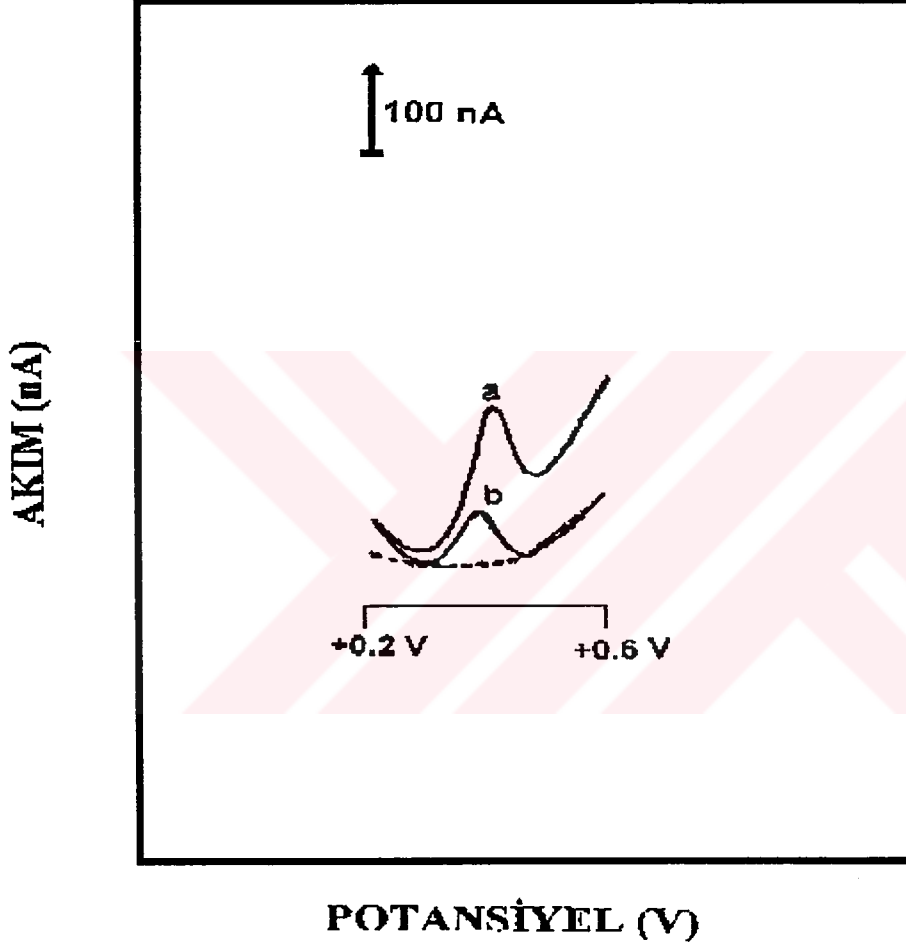
Yöntem 2.3.1.1.1-a 'da anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-15: Asetat tamponu ortamında EPR'nin dsDNA ile etkileşmesi sonucu elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE; (-----) ile gösterilen ilaç içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

3.1.1.1.2. Fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) elde edilen bulgular:

Yöntem 2.3.1.1.1-b 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-16: Fosfat tamponu ortamında EPR'nin dsDNA ile etkileşmesi sonucu elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE; (-----) ile gösterilen ilaç içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

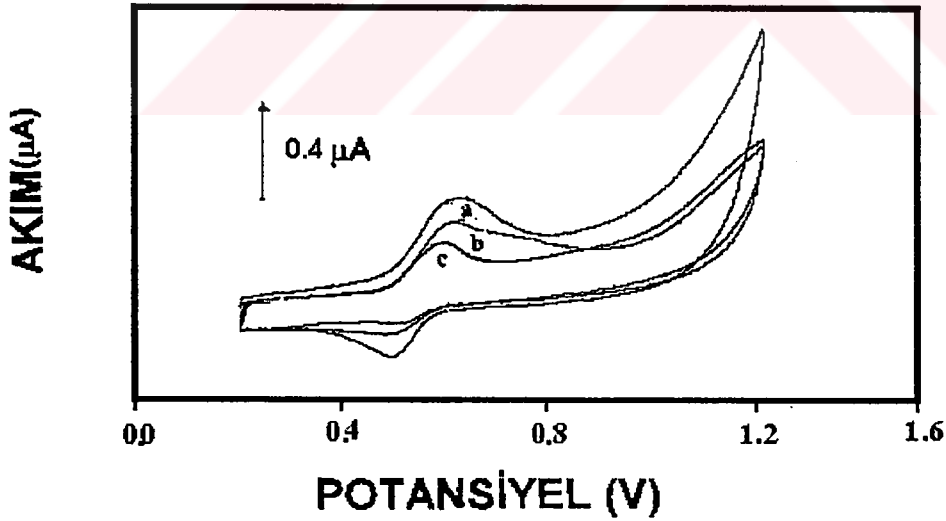
Her iki ortamda elde edilen bulgular aşağıdaki Tablo-1 'de özetlenmiştir.

Tablo-1: EPR 'nin CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE ile diferansiyel puls voltametrisinde asetat ve fosfat tamponunda elde edilen voltamogramlarında bulunan yanıt (nA) ve yükseltgenme pik potansiyelleri (V).

Kullanılan ilacın adı	Asetat tamponunda (pH 4,8) alınan yükseltgenme pik potansiyeli (V) / Yanıt (nA)		Fosfat tamponunda (pH 7,4) alınan yükseltgenme pik potansiyeli (V) / Yanıt (nA)	
	CPE	dsDNA mod. CPE	CPE	dsDNA mod. CPE
EPR	+0,55 / 512	+0,55/ 248	+0,40 / 111	+0,40 / 51

3.1.1.2. EPR'nin DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri ile izlenmesine ilişkin bulgular:

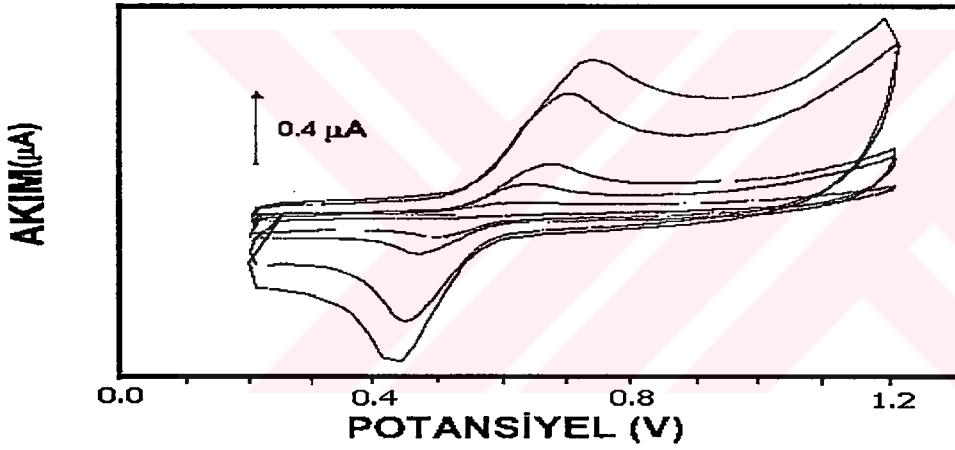
Yöntem 2.3.1.1.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-17: EPR'nin dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında dönüşümlü voltametri kullanılarak elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) ssDNA modifiye edilmiş CPE, (c) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

3.1.1.3. EPR'nin dönüşümlü voltametrisinde tarama hızının değiştirilerek yanıt etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.1.1.2 'de anlatıldığı gibi yapıldı. Dönüşümlü voltametri çalışmada tarama hızı artırılarak (20 mV/s, 50 mV/s, 100 mV/s, 200 mV/s ve 500 mV/s) çalışıldı.



Şekil-18: EPR'nin dönüşümlü voltametrisinde tarama hızının değiştirilerek dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; 20 mV/s, 50 mV/s, 100 mV/s, 200 mV/s ve 500 mV/s.

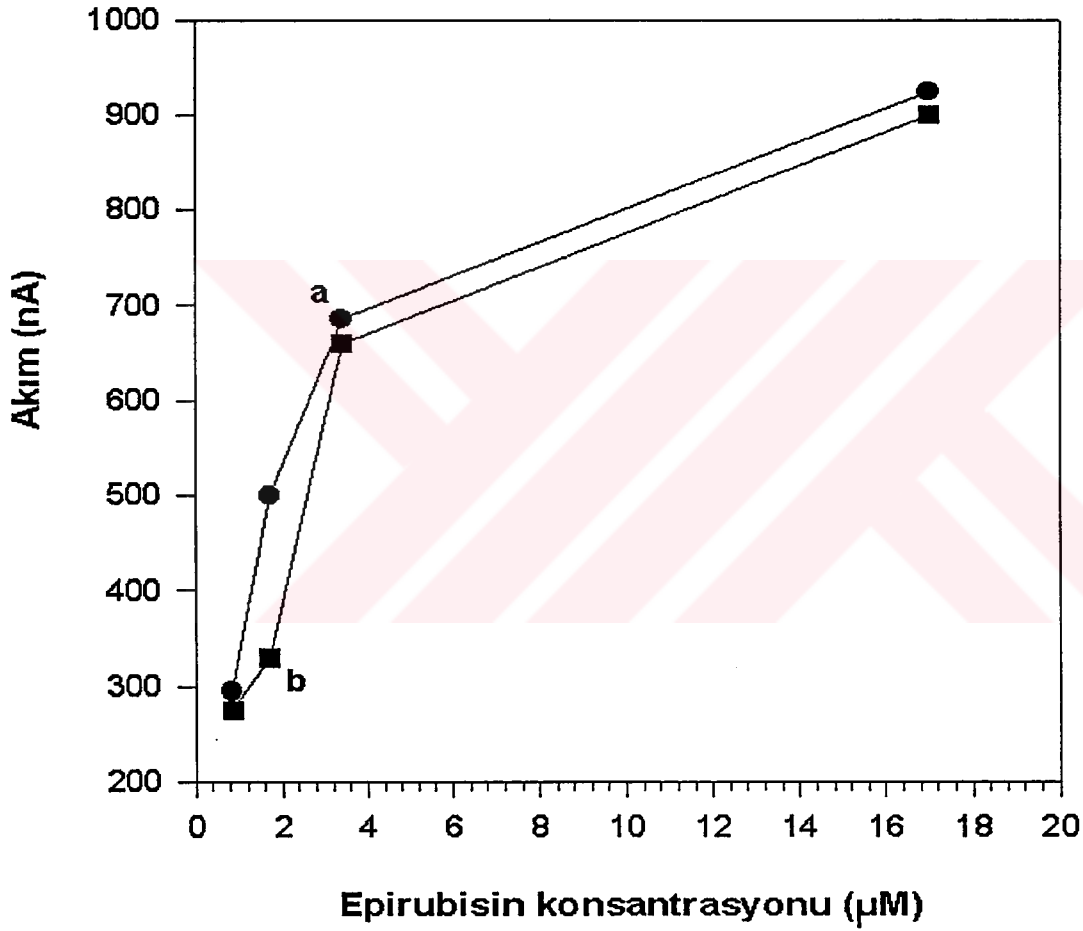
Tarama hızı artırılıp her birinde elde edilen akım değerleri hesaplanarak, tarama hızının kareköküne karşılık akım değerlerini içeren grafik çizildi.



Şekil-19: Tarama hızının karekökü $[(\text{mV} / \text{s})^{1/2}]$ -Akım grafiği

3.1.1.4. EPR konsantrasyon değişiminin yanıtı etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.1.1.1-a 'da anlatıldığı gibi yapıldı; sadece ortamdaki EPR miktarı miktarı artırılarak (0,85 μ M ; 1,7 μ M; 3,4 μ M ve 17 μ M) çalışıldı.



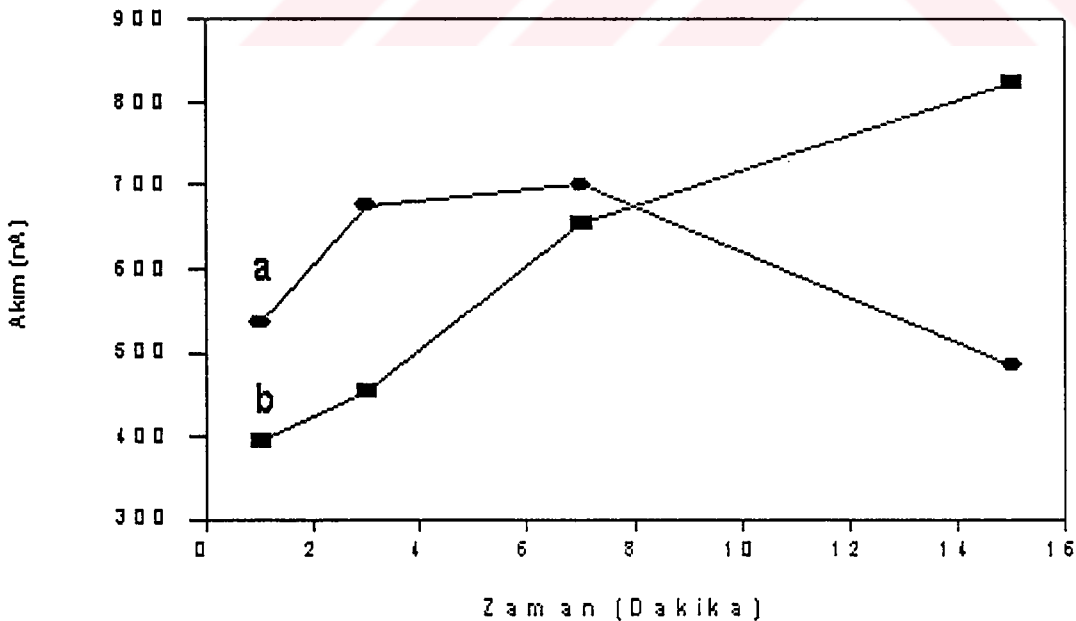
Şekil-20: EPR konsantrasyonundaki değişimin yanıtı etkisi; (a) CPE, (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

3.1.1.5. CPE'na tutturulan dsDNA'in konsantrasyon değişiminin EPR yanıtına etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.1.1.1-a 'da anlatıldığı gibi yapıldı; sadece CPE yüzeyine tutturulan dsDNA miktarı artırıldı ve 2,5 ppm, 5 ppm , 10 ppm dsDNA konsantrasyonlarında çalışıldı. Elde edilen akım değerleri sırasıyla; 540 nA, 390 nA ve 405 nA 'dir. Sadece CPE ile elde edilen akım değeri 795 nA 'dir. Buna göre en uygun dsDNA çalışma konsantrasyonunun 5 ppm olduğuna karar verildi.

3.1.1.6. EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresinde değişimin yanıtı etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

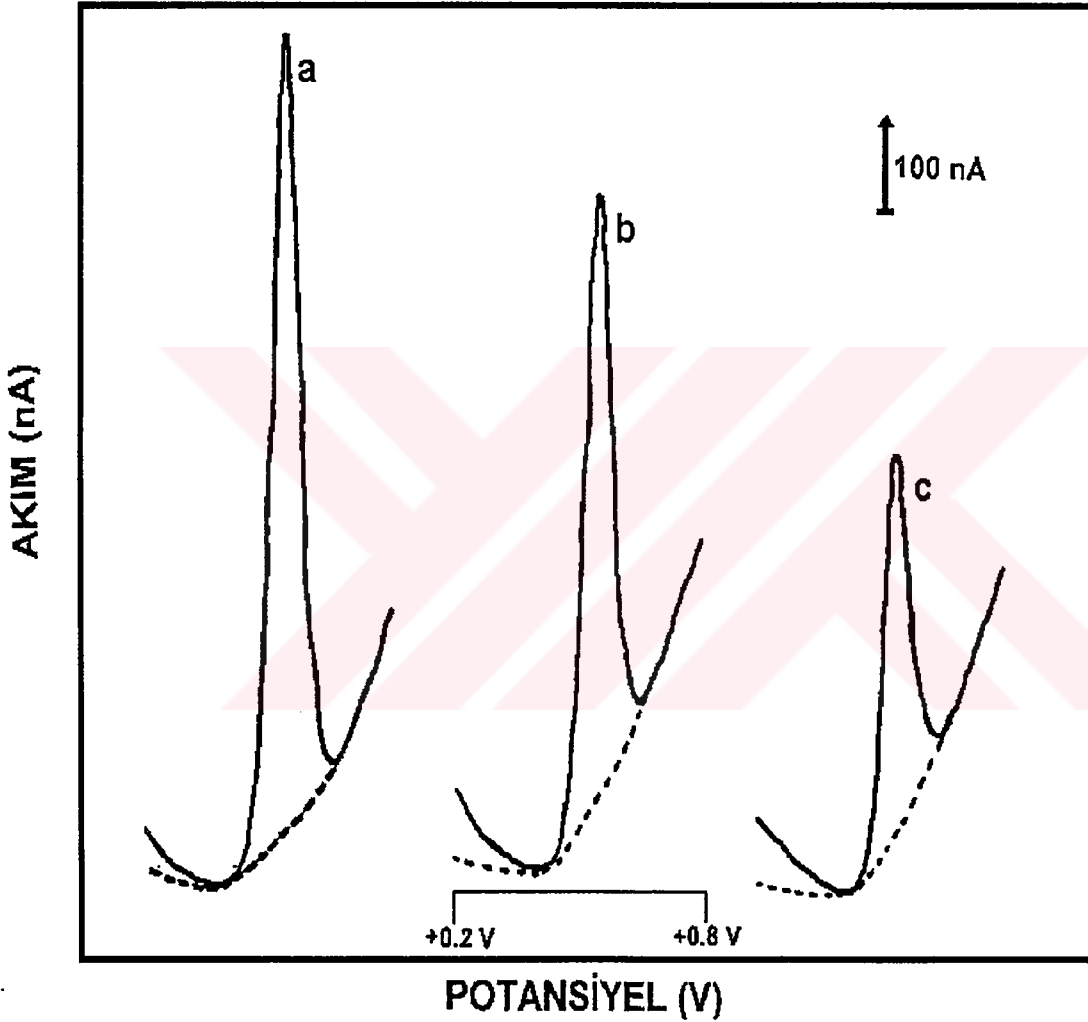
Yöntem 2.3.1.1.1-a 'da anlatıldığı gibi yapıldı; sadece EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresi artırılarak (1 dakika; 3 dakika; 7 dakika ve 15 dakika) çalışıldı.



Şekil-21: EPR ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıtı etkisi; (a) CPE ve (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

3.1.1.7. EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.1.1.7'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-22: EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak elde edile voltamogramları; (a) CPE (b) Prob (Oligo 2A) modifiye edilmiş CPE ve (c) Hibrit modifiye edilmiş CPE; (- - - -) ile gösterilen ilaç içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

3.1.1.8. EPR–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde Tekrarlanabilirlik ve Tayin sınırı parametrelerinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Tekrarlanabilirlik çalışması, yöntem- 2.3.1.1.8'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuç olarak CPE ile yapılan çalışmada varyasyon yüzdesi 8,6 ; dsDNA modifiye edilmiş CPE ile yapılan çalışmada ise 12,8 olarak bulundu (n=5).

Tayin sınırı hesaplanırken S/N oranı 3 olarak alındı. Tayin sınırları CPE için 26 nM ve dsDNA modifiye edilmiş CPE için 50 nM olarak bulundu.

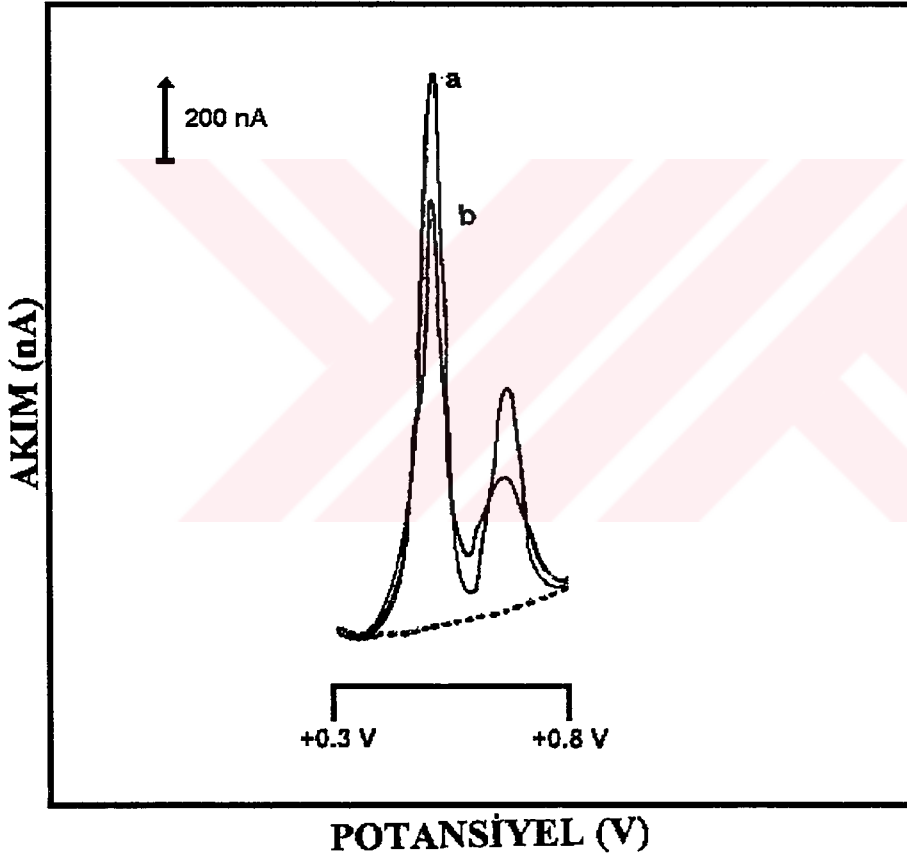


3.1.2. Mitoksantron dihidroklorür (MTX) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulgular:

3.1.2.1. MTX'un dsDNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesi:

3.1.2.1-a) Asetat tamponu ortamında (pH 4,8) elde edilen bulgular:

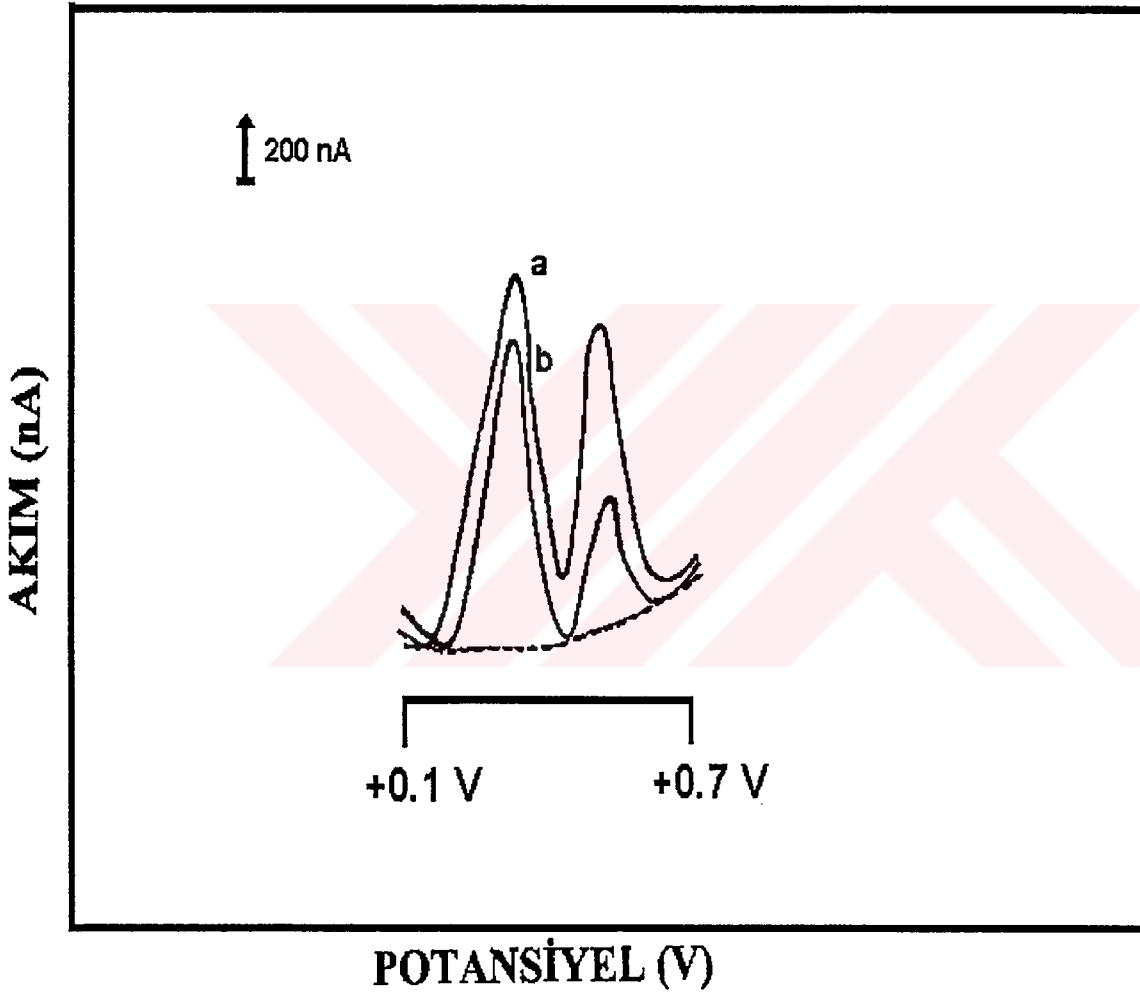
Yöntem 2.3.1.2.1-a 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-23: Asetat tamponu ortamında MTX'un dsDNA ile etkileşmesi sonucu elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE; (- - - -) ile gösterilen ilaç içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

3.1.2.1-b) Fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) elde edilen bulgular:

Yöntem 2.3.1.2.1-b 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-24: Fosfat tamponu ortamında MTX'un dsDNA ile etkileşmesi sonucu elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE; (- - - -) ile gösterilen ilaç içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

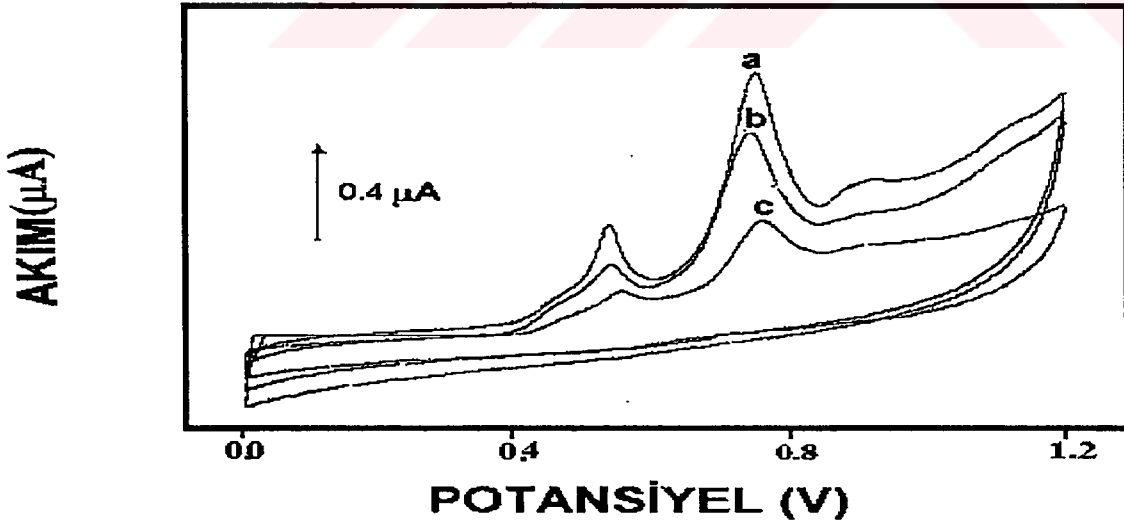
Her iki ortamda elde edilen bulgular aşağıdaki Tablo-2 'de özetlenmiştir.

Tablo-2 : MTX'un CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE ile diferansiyel puls voltametrisinde asetat ve fosfat tamponunda elde edilen voltamogramlarında bulunan yanıt (nA) ve yükseltgenme pik potansiyelleri (V).

Kullanılan ilacın adı	Asetat tamponunda (pH 4,8) alınan yükseltgenme pik potansiyeli (V) / Yanıt (nA)		Fosfat tamponunda (pH 7,4) alınan yükseltgenme pik potansiyeli (V) / Yanıt (nA)	
	CPE	dsDNA mod. CPE	CPE	dsDNA mod. CPE
MTX	+0,50 / 1204	+0,50 / 859	+0,32 / 1060	+0,32 / 975
	+0,66 / 459	+0,66 / 200	+0,52 / 808	+0,52 / 398

3.1.2.2. MTX'un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

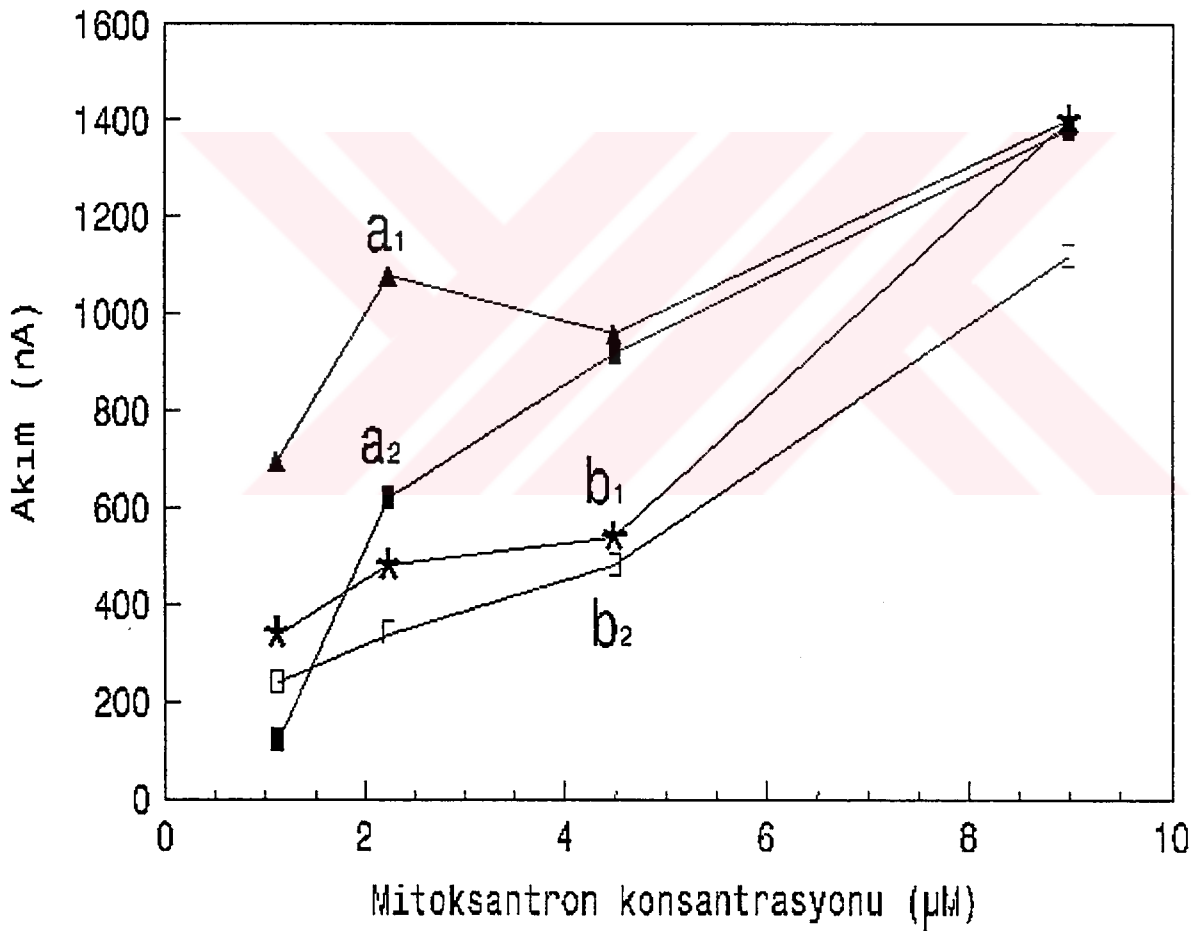
Yöntem 2.3.1.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-25: MTX'un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinin asetat tamponu ortamında dönüşümlü voltametri kullanılarak elde edilen karşılaştırmalı voltamogramları; (a) CPE, (b) ssDNA modifiye edilmiş CPE, (c) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

3.1.2.3. MTX konsantrasyon değişiminin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

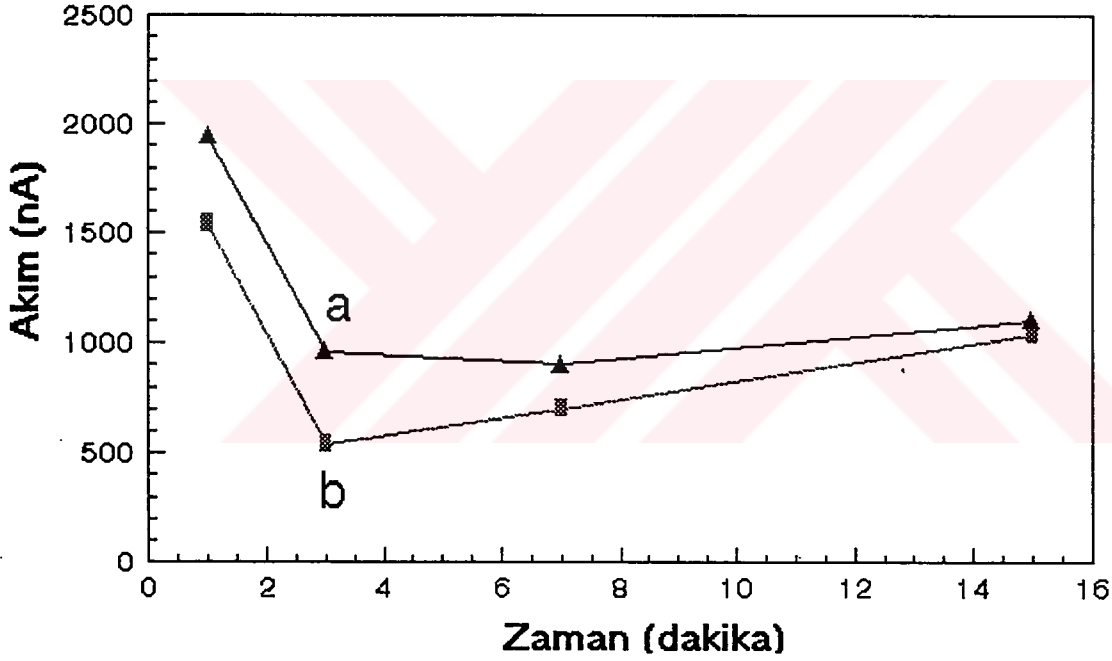
Yöntem 2.3.1.2.1-a ' da anlatıldığı gibi yapıldı; sadece ortamdaki MTX miktarı miktarı artırılarak (1,125 μ M ; 2,250 μ M; 4,5 μ M ve 9,0 μ M) çalışıldı. Her iki pikte (+0,50 V ve +0,66 V) elde edilen akım değerlerine göre MTX konsantrasyon (μ M) - Akım (nA) grafikleri çıkartıldı.



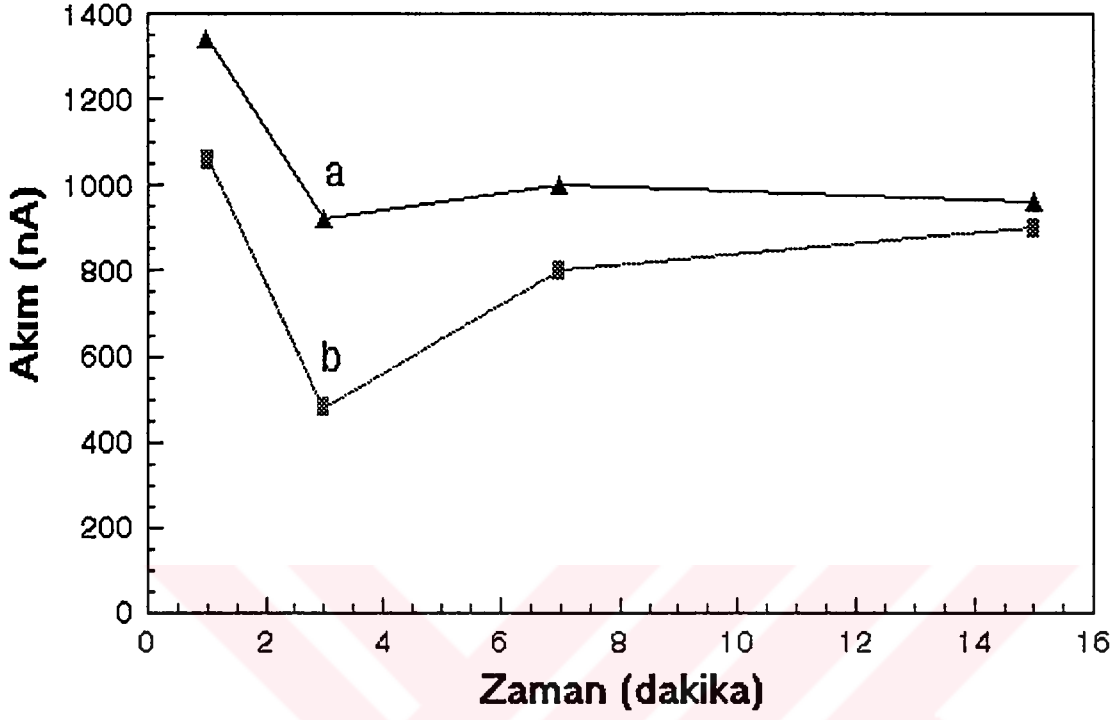
Şekil-26: MTX konsantrasyon değişiminin yanıtta etkisi; + 0,50 V' daki 1. pike göre : (a₁) CPE, (b₁) dsDNA modifiye edilmiş CPE; + 0,66 V' daki 2. pike göre : (a₂) CPE, (b₂) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

3.1.2.4. MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıt etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.1.2.1-a 'da anlatıldığı gibi yapıldı; sadece MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresi artırılarak (1 dakika; 3 dakika; 7 dakika ve 15 dakika) çalışıldı. Her iki pikte (+0,50 V ve +0,66 V) elde edilen akım değerlerine göre zaman (dakika)- Akım (nA) grafikleri çıkartıldı.



Şekil-27(A): MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıt etkisi; + 0,50 V' daki 1. pike göre : (a) CPE ve (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE.



Şekil-27(B): MTX ile CPE'na tutturulan dsDNA'in etkileşme süresindeki değişimin yanıt etkisi; +0,66 V'daki 2.pike göre: (a) CPE ve (b) dsDNA modifiye edilmiş CPE.

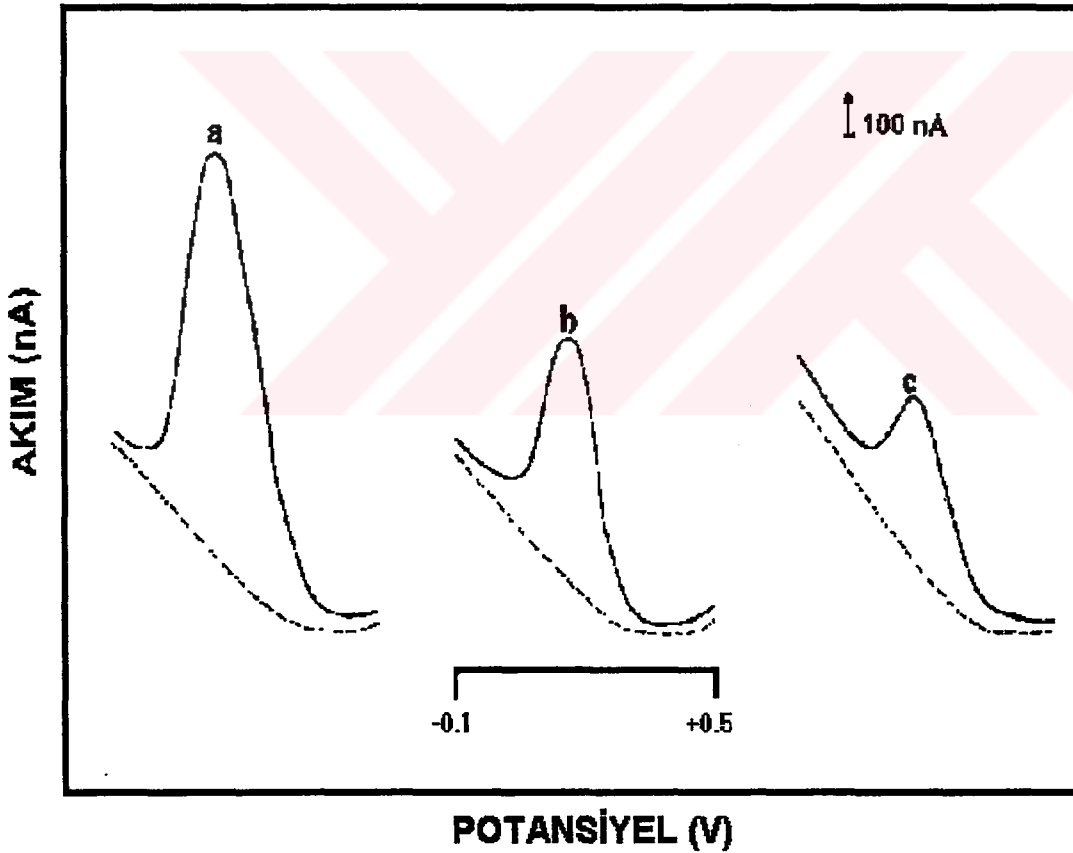
3.1.2.5. MTX–dsDNA etkileşmesinin biyosensörle tayininde tayin sınırı parametresinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Asetat tamponu (pH 4,8) ortamında yöntem 2.3.1.2.1-a'ya göre yapılan çalışmada sonucu voltamogramda elde edilen tayin sınırı (S/N= 3), CPE için 54,8 nM ve dsDNA modifiye edilmiş CPE için 72 nM olarak bulundu.

3.2. DNA hibridizasyonuna dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulgular:

3.2.1. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in DNA ile etkileşmesinin diferansiyel puls voltametri tekniğiyle incelenmesine ilişkin bulgular:

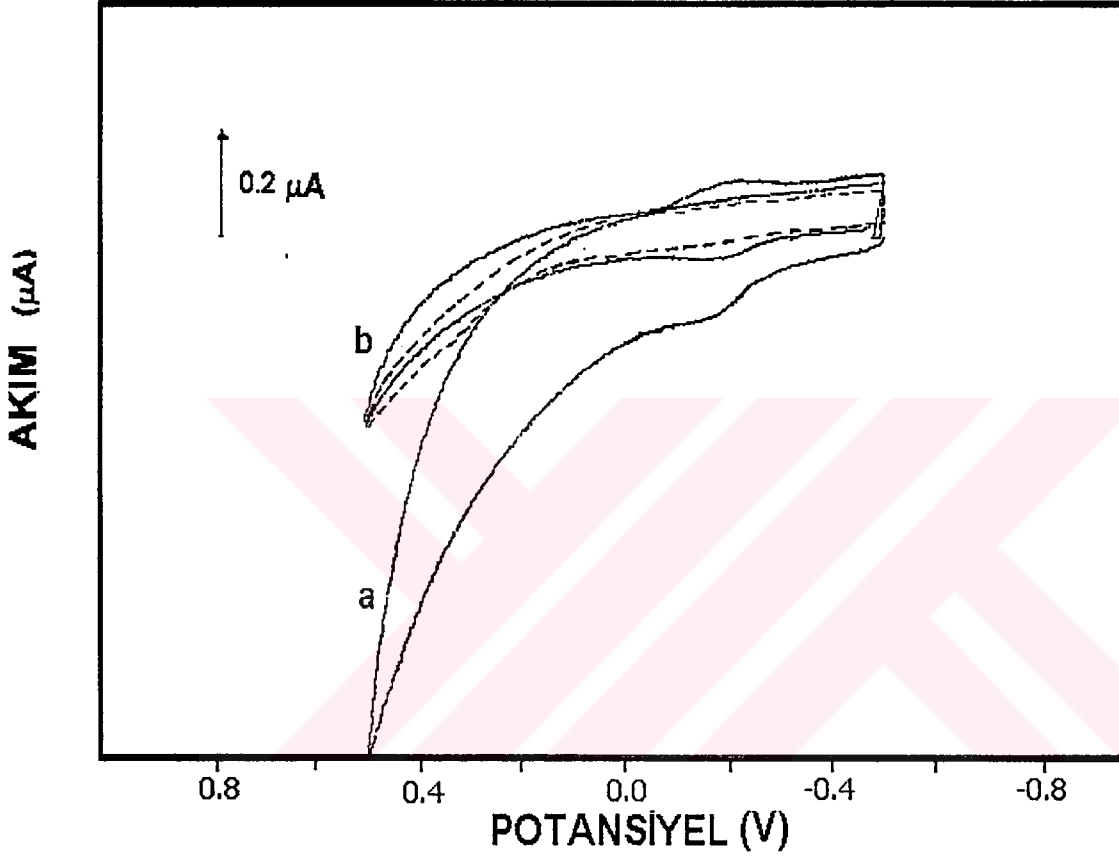
Yöntem 2.3.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-28: 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ nin 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda, 10 mV'luk puls genliği ve 5 mV/s 'luk tarama hızıyla elde edilen diferansiyel puls voltamogramları; (a) dsDNA tutturulmuş CPE, (b) ssDNA tutturulmuş CPE ve (c) CPE; (- - - -) ile gösterilen $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

3.2.2. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılacak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'in DNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri tekniğiyle incelenmesine ilişkin bulgular:

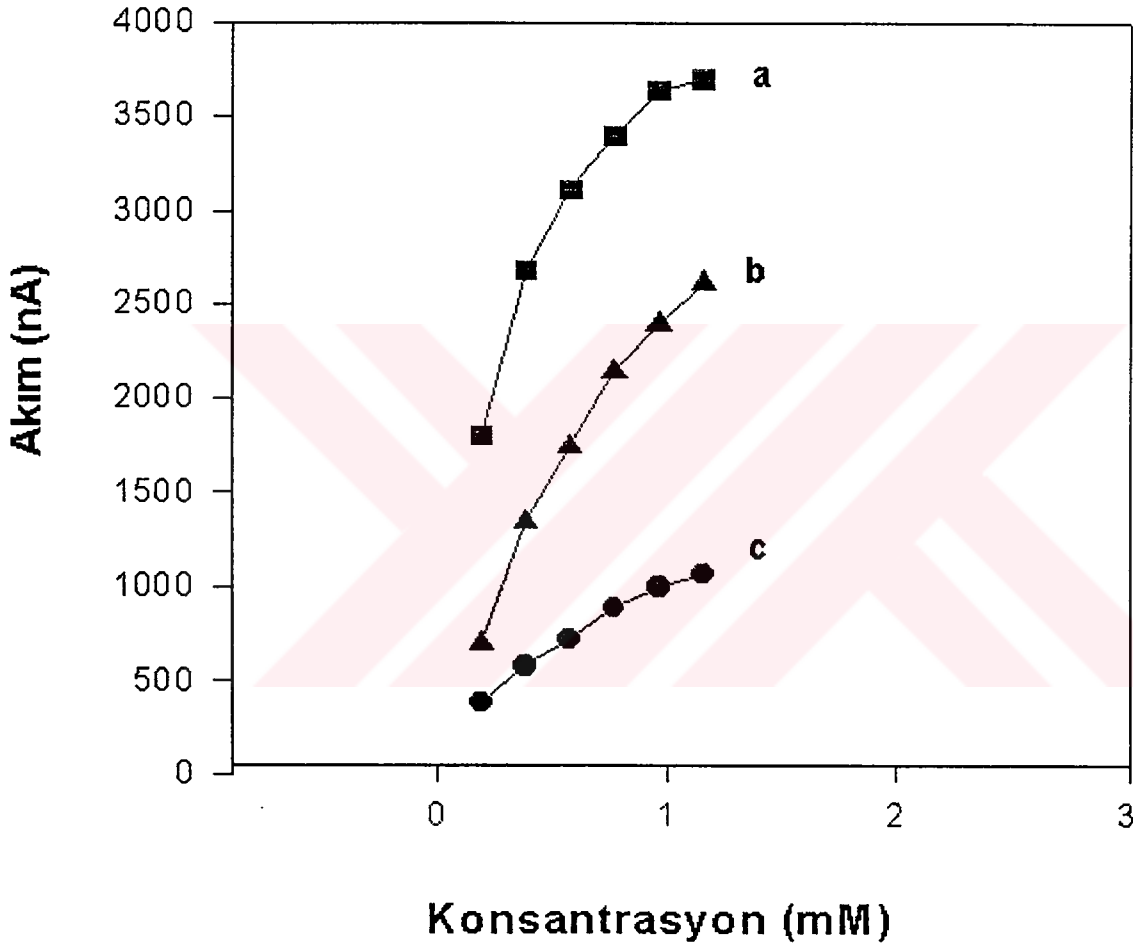
Yöntem 2.3.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-29: 0.192 mM $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) tamponunda, 50 mV/s tarama hızıyla elde edilen dönüşümlü voltamogramları; (a) dsDNA tutturulmuş CPE, (b) ssDNA tutturulmuş CPE; (- - - -) ile gösterilen $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ içermeyen çalışma ortamında alınan voltamogram.

3.2.3. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-30: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak elde edilen katodik pik akımlarının $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ konsantrasyonuna karşı çizilen kalibrasyon grafiği; (a) dsDNA tutturulmuş CPE, (b) ssDNA tutturulmuş CPE ve (c) CPE

3.2.4. Ortamdaki tuz konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

5 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM NaCl konsantrasyonlarını içeren 20 mM Tris-HCl tamponunda dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi. Çalışma, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak çalışma 2.3.2.1'deki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece ortamdaki tuz miktarı değiştirildi. Elde edilen pik akımları sırasıyla 220 nA, 990 nA, 230 nA ve 230 nA 'dir.

3.2.5. $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile CPE' na tutturulan dsDNA' in etkileşme süresindeki değişikliğin yanıtta etkisinin diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmesine ilişkin bulgular:

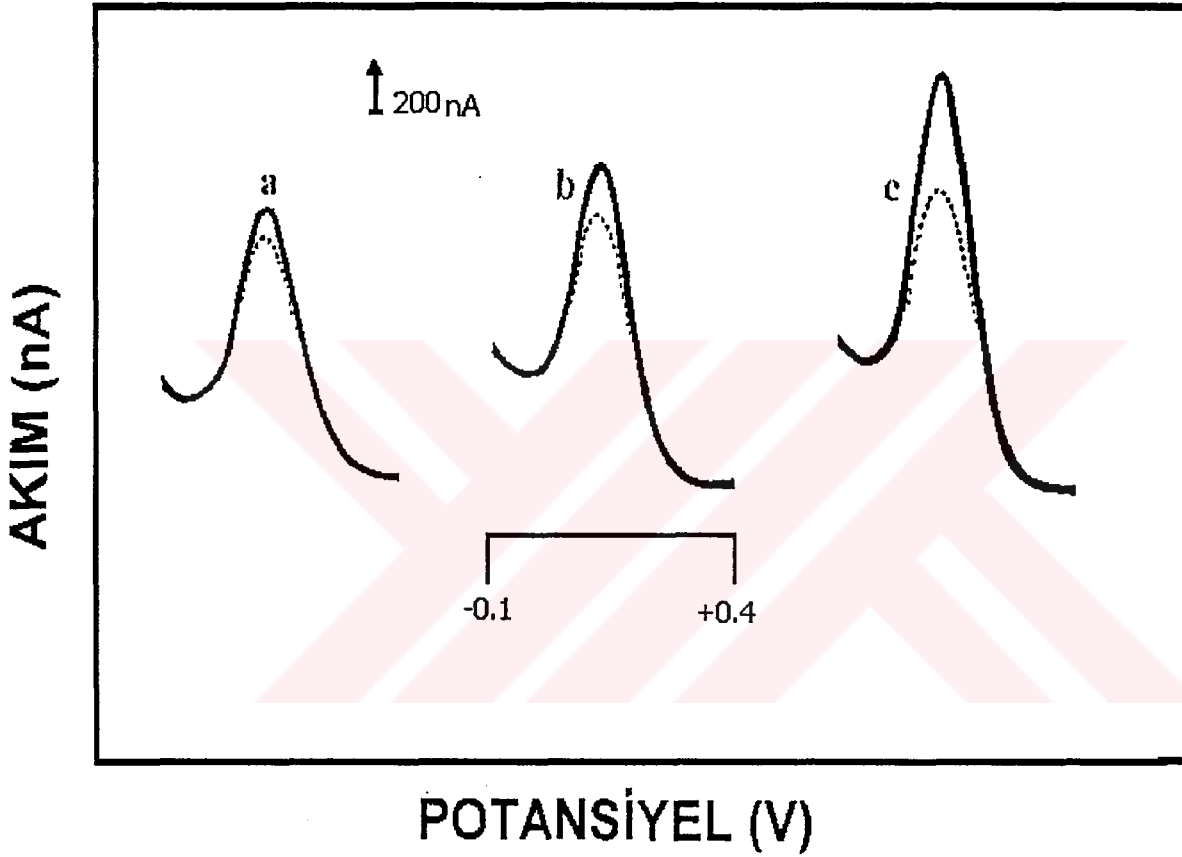
Farklı etkileşme süreleri (veya $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in biriktirme süresi) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtlar arasındaki farklılığa bağlı olarak incelendi. Çalışma, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak çalışma 2.3.2.1'deki gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve sadece $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in biriktirme süresi değiştirildi.

Biriktirme süresi 1 dak, 3 dak ve 5 dak olarak alındı ve gözlemlenen pik akımları sırasıyla 500 nA, 740 nA ve 710 nA 'dir.

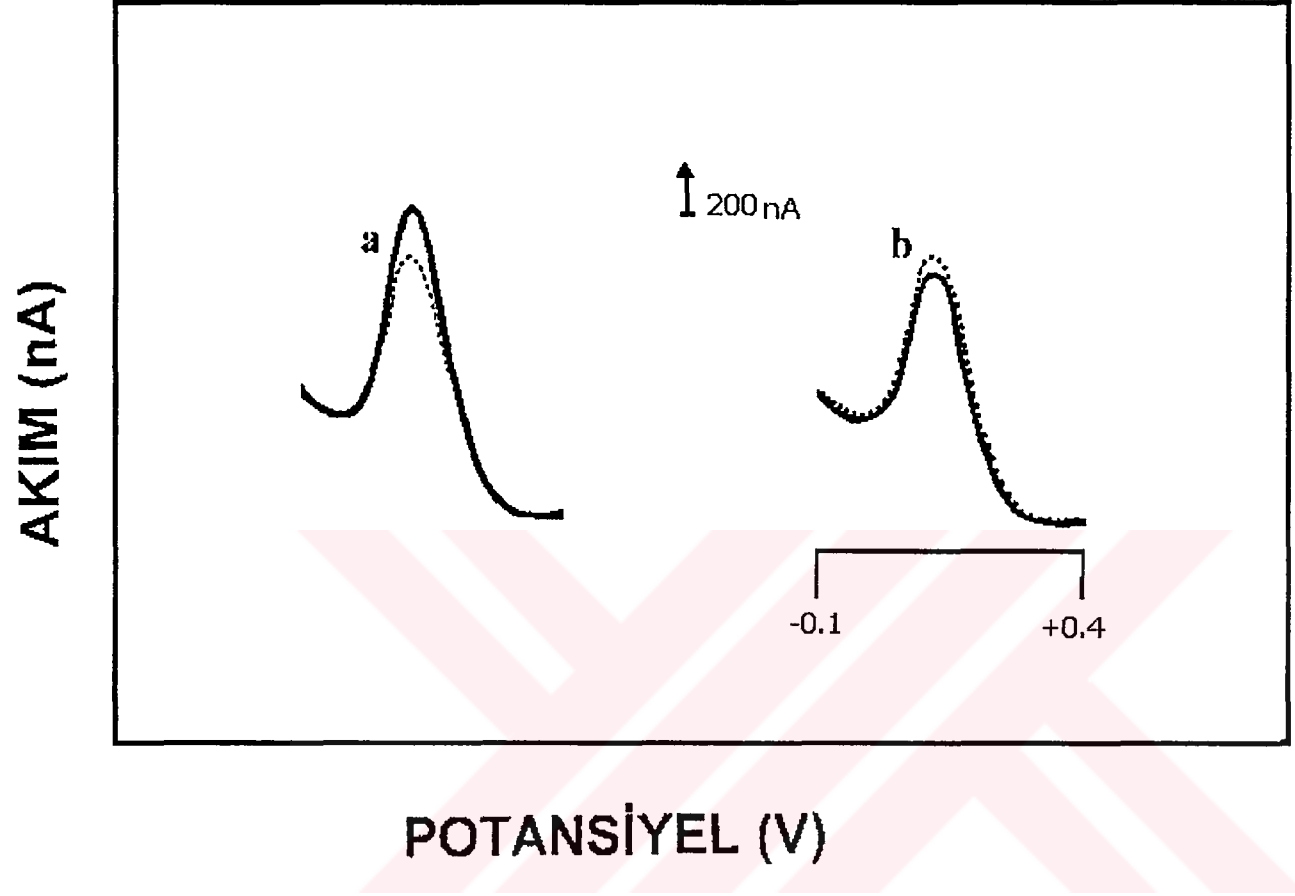
3.2.6. Hepatit-B virüsüne ait dizi tayini için tasarımı yapılacak olan DNA

Biyosensörünün tasarımına ilişkin çalışmalara ilişkin bulgular:

Yöntem 2.3.2.6'da anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil-31: Artan derişimlerle 21 baz hedef dizisi için diferansiyel puls voltamogramları (A dizisi): (a) 10 ppm, (b) 15 ppm ve (c) 20 ppm; 21 baz HBV prob (B dizisi; (- - - -) ile gösterildi) ve elektroaktif indikatör olarak $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ kullanıldı.



Şekil-32: Elektroaktif indikatör $[\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}]$ için diferansiyel puls voltamogramları; 10 ppm 21 baz HBV prob (B dizisi; (- - - -) ile gösterildi) ile (a) 15 ppm 21 baz HBV hedef (A dizisi) ve (b) 15 ppm 21 baz HBV hedef olmayan dizi (C dizisi) hibridizasyon sinyalleri.

IV. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

4.1.1. EPR –DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

EPR molekülüne bakıldığında, paradioksibenzen bölümünün yükseltgendiği açıktır (126). EPR çözeltisi, DNA interkalasyonunun karakteristik özelliği olarak, DNA'ya bağlı ultraviyole ve görünür absorpsiyon spektrumlarında hipokromik ve batokromik kaymalar göstermiştir (95). Dolayısıyla bu çalışmada EPR'nin dsDNA ile etkileşmesi sonucu elektrokimyasal yanıtında azalma beklenmektedir.

EPR ile dsDNA etkileşmesine ilişkin voltamogramlar, şekil-15 ve şekil-16 ' da görülmektedir.

Şekil-15' de, EPR'nin asetat tamponunda (pH 4,8) alınan yükseltgenmesine ait voltametrik ölçümlere bakıldığında gerek CPE, gerekse dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtta pik, +0,55 V 'da görüldü ve dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtın CPE ile alınanınkinden küçük olduğu bulundu. Şekil-16' da, EPR'nin fosfat tamponunda (pH 7,4) alınan yükseltgenmesine ait voltametrik ölçümlere bakıldığında, gerek CPE, gerekse dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtta pik, +0,40 V 'da görüldü ve asetat tamponunda alınan ölçüm sonuçlarına benzer olarak; dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtın CPE ile alınankinden küçük olduğu bulundu.

Çalışmamızdakine paralel olarak benzer sonuç, C. Xia ve arkadaşları tarafından (126) camı karbon elektrot kullanılarak ve dönüşümlü voltametri uygulanarak bulunmuştur ancak DNA ve EPR etkileşmesi, çalışmamızdakinden farklı olarak çözelti bazında incelenmiştir. Asetat (pH 4,8) ve fosfat (pH 7,4) tamponu ortamında gerçekleştirilen CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE yanıtları kıyaslandığı zaman, her iki çalışmada da yarı yarıya bir azalma gözlenmektedir. Her iki ortamda yapılan çalışmalardaki pik potansiyellerine bakılacak olursa, fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) görülen pik potansiyeli, asetat tamponu ortamındakinden (pH 4,8) daha küçüktür ve yanıtlar karşılaştırıldığı zaman küçük ve simetriktir. Fosfat tamponu ortamında (pH 7,4), daha düşük potansiyelde yükseltgenme pikinin görülmesinin nedeni; (-OH) grubundan hidrojeni koparmak daha bazik karakterli ortamda, daha az enerji gerektirdiği için daha kolay olması şeklinde yorumlanabilir.

Şekil-17'de EPR'nin dönüşümlü voltametrisine bakıldığında, sadece CPE ile alınan EPR 'ne ait yükseltgenme piki, hem ssDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan pikten, hem de dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan pikten daha büyüktür; bu da bize EPR'nin DNA ile etkileştiğini göstermektedir.

Hem diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak her iki ortamda alınan voltamogramlar, hem de dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramlar, EPR'nin dsDNA ve ssDNA ile etkileşme sonucunda yanıtta bir azalma olduğunu göstermektedir ki bu sırasıyla; CPE > ssDNA modifiye edilmiş CPE > dsDNA modifiye edilmiş CPE şeklinde ifade edilebilir. C. Xia ve arkadaşlarının sonuçları, çalışmamızda verilen sonuçlarla paraleldir. EPR'nin dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtında azalma olduğu; çünkü EPR, dsDNA çift sarmal yapısı içersine interkale olduğu ve dolayısıyla yükseltgenecek grubun kısmen saklandığı için sinyalin küçüldüğü rapor edilmiştir (126).

ssDNA ile elde edilen yanıt ise dsDNA ile elde edileninkine kıyasla daha büyüktür. Bunun sebebi; EPR'nin ssDNA'ya bağlanması olabilir.

Şekil-18 'de EPR'nin dsDNA modifiye edilmiş CPE ile tarama hızı artırılarak elde edilmiş dönüşümlü voltamogramları bulunmaktadır. Tarama hızlarının kareköküne ($V^{1/2}$; $(mV/s)^{1/2}$) karşılık ölçülen akım değerlerine ilişkin grafik çizildiğinde (Şekil-19), 200 mV/s'ye kadar elektroaktif türlerin CPE yüzeyine taşınmaları difüzyonal, 200 mV/s'dan sonra ise adsorpsiyon ile olduğu görülmüştür. C. Xia ve arkadaşlarının çalışmalarında da rapor edildiği gibi (126), düşük tarama hızlarında elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine taşınımı, difüzyonal kütle taşınımı ile, yüksek tarama hızlarında ise adsorpsiyon ile olmaktadır. Ayrıca K. Millan ve arkadaşlarının bir çalışmasında (60), tarama hızı ile maddenin DNA ile etkileşimine ilişkin olarak şunlar rapor edilmiştir: " Elektrot yüzeyine tutturulan DNA, maddeyi içeren çözeltiye doğru uzanmaktadır ve madde ile etkileştikten sonra, madde iletken özellikteki DNA'dan ayrılıp elektrot yüzeyine ulaşır ; orada yükseltgenir veya indirgenir ". Dolayısıyla tarama hızını arttırdığımızda kompleks yavaşça ayrılır; ayrışma hızı, bu hıza yetişemez; bu yüzden düşük tarama hızlarında bu etkileşimin tayini daha mümkün hale gelmektedir.

dsDNA ile etkileşen EPR miktarı artırılarak, yanıt etkisi incelendi. Şekil-20 'de görülen EPR konsantrasyonu-akım grafiğinden de anlaşıldığı gibi, CPE ile dsDNA modifiye CPE yanıtları arasındaki fark, en fazla 1,7 μ M EPR konsantrasyonunda gözlenmiş ve diğer konsantrasyonlarda çok az fark gözlenmiştir. Bunun nedeni, düşük konsantrasyonda etkileşim, elektrostatik etkileşim gibi davranıyor olabilir. 1,7 μ M 'dan sonra hem CPE hemde DNA modifiye edilmiş CPE ile EPR konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak aradaki fark az olup, doygunluğa ulaştığı söylenebilir. Dolayısıyla çalışmamızda optimum EPR konsantrasyonu olarak 1,7 μ M kullanılmıştır.

EPR'nin etkileşme zamanındaki farklılık ile ilgili çalışmada (Şekil-21), en uygun zamanın 3 dakika olduğu bulunmuştur. C. Xia ve arkadaşları çalışmalarında (126), etkileşme zamanı olarak 1 dakikayı kullanmışlardır. Bu çalışmada ise, en uygun zamanın 3 dakika olduğu görülmüştür; çünkü CPE ile dsDNA modifiye edilmiş CPE yanıtları arasındaki fark en fazladır. 7 dakikadan sonra dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen yanıt daha büyüktür, bunun sebebi, EPR'nin dsDNA modifiye edilmiş CPE yüzeyinde çok fazla birikmesi olabilir.

Bu çalışmada 2,5 ppm, 5 ppm , 10 ppm dsDNA konsantrasyonlarında çalışıldı. Elde edilen akım değerleri sırasıyla; 540 nA, 390 nA ve 405 nA 'dir. Sadece CPE ile elde edilen akım değeri 795 nA 'dir. Elde edilen akım değerlerine baktığımız zaman, DNA konsantrasyondaki artışa bağlı olarak sinyalde bir azalma gözlenmiştir. Çalışmamızda da dsDNA konsantrasyonunun arttırılmasıyla, J. Wang ve arkadaşlarının çalışmalarında daunomisin (112) ve C. Xia ve arkadaşlarının çalışmalarında Epirubisin (126) ile elde ettikleri sonuca paralel olarak, yanıtta bir azalma gözlenmektedir. Ayrıca benzer sonuç, civa elektrodu ile doksorubisin-DNA etkileşmesi inceleyen J. A. Plambeck ve arkadaşlarının sonuçlarında (87) da rapor edilmiştir. Buna göre en büyük fark 5 ppm de gözlendiği için, en uygun dsDNA çalışma konsantrasyonunun 5 ppm olduğuna karar verilmiş ve diferansiyel puls voltametrisinin tüm uygulamalarında bu konsantrasyonda çalışılmıştır.

EPR ile CPE'na tutturulan oligonükleotidlerin etkileşmesinin tayini için diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramlarına bakıldığında (Şekil-22), EPR'nin ssDNA ve dsDNA ile etkileşmesinin dönüşümlü voltametri tekniği ile elde edilen sonuca paralel olarak, en büyük sinyal sırasıyla, CPE > Prob (Oligo 2A) modifiye edilmiş CPE > Hibrit (Oligo 2A- Oligo 2B) modifiye edilmiş CPE ile alınmıştır. Dönüşümlü voltametrde EPR'nin ssDNA ile etkileşme sonucu yanıtındaki azalma, dsDNA ile etkileşme sonucu yanıtındaki azalmadan daha azdır; yani bu çalışmada da aynı sonuç oligonükleotidlerle elde edilmiştir. İnterkalatör

bir maddenin ssDNA'ya göre, dsDNA'ya daha seçimli bağlanabildiği ve ayrıca dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen yükseltgenme pik potansiyeli ile ssDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edileninki arasında fark bulunduğu, K. Hashimoto ve arkadaşlarının bir çalışmasında (36) rapor edilmiştir. Ayrıca daha önce yapılmış hibridizasyona yönelik elektrokimyasal biyosensör tasarımı çalışmalarında (35, 36, 61, 108, 115, 116) sonuçlarımıza paralel olarak proba ve hibritle alınan yanıt arasında farklılık vardır. Ayrıca K. Hashimoto ve arkadaşlarının çalışmalarında (35) kullandıkları hibridizasyon indikatörü, Hoescht 33258 ile çalışmamızda EPR kullanılarak elde edilen sonuçlar, farklı oligonükleotitlerle elde edilmiş olsada, aynı paralelliktedir ve prob ile hibrit ile elde edilen yanıtlar arasında fark, % 39,4 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla EPR'nin belirli koşullar altında ümit verici bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabilceği de söylenebilir.

Tekrarlanabilirlik sonuçlarına bakıldığında, CPE ile yapılan çalışmada varyasyon yüzdesi % 8,6; dsDNA modifiye edilmiş CPE ile yapılan çalışmada ise % 12,8 olarak bulunmuştur (n=5).

EPR ile gerçekleştirilen çalışmada, tayin sınırları CPE için 26 nM ve dsDNA modifiye edilmiş CPE için 50 nM olarak bulunmuştur. dsDNA modifiye edilmiş CPE ile bulunan tayin sınırını, C. Xia ve arkadaşlarının GCE bulduğu sonuç (126) ile kıyaslamak istersek sırasıyla 0,05 μ M ve 21 μ M 'dir. Dolayısıyla dsDNA modifiye edilmiş CPE ile EPR-dsDNA etkileşmesine bağlı olarak EPR'in daha düşük düzeylerini saptayabiliriz.

4.1.2. MTX –DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

MTX, DNA'ya interkalasyon için gerekli olan antrakinon grubu ile birlikte kimyasal aktivitesini göstermesine katkıda bulunan yan gruplardan oluşan düzlemsel bir heterosiklik halka yapısına sahiptir. Molekülden dışarı doğru uzanan pozitif yüklü azot (N) içeren yan zincirler, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgası ile elektrostatik olarak etkileşerek, baz çiftleri arasına interkale olmuş aromatik halkayı daha kararlı hale getirirler (70). MTX' un nükleik asitleri biriktirme özelliğinin, sitotoksik aktivitesine bağlı olarak gerçekleştirdiklerine inanılmaktadır (45). Ayrıca mitoksantron ile DNA etkileşmesinde, molekülünün en azından bir bölümünün, DNA'nın küçük oluşuna bağlandığı genel görüşü bulunmaktadır (52).

MTX ile dsDNA etkileşmesine ilişkin voltamogramlar, şekil-23 ve şekil-24 'de görülmektedir.

Şekil-23' te, MTX' un asetat tamponunda (pH 4,8) alınan yükseltgenmesine ilişkin voltametrik ölçümlere gerek CPE, gerekse dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtta ilk pik, $E_{p1} = +0,50$ V 'da ve ikinci pikte, $E_{p2} = +0,66$ V 'da görüldü ve her ikisinde de dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtın CPE ile alınanınkinden küçük olduğu bulundu. Şekil-24' te, MTX'nun fosfat tamponunda (pH 7,4) alınan yükseltgenmesine ait voltametrik ölçümlere bakıldığında; gerek CPE, gerekse dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtta ilk pik, $E_{p1} = +0,32$ V 'da ve ikinci pik, $E_{p2} = +0,52$ V 'da görüldü ve her ikisinde de, asetat tamponunda alınan ölçüm sonuçlarına benzer olarak, dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan yanıtın CPE ile alınanınkinden küçük olduğu bulundu.

MTX ile DNA' nın etkileşmesini çözelti bazında (70) ve çalışmamızdaki elektrot yüzeyinde gerçekleşen etkileşmesi sonuçları uyum içinde bulunmuştur. MTX' nun dsDNA'ya interkale olması sonucu, yükseltgenebilecek grupların azalması (bu grupların bir kısmının DNA içinde saklanması) veya MTX' un yükseltgenecek gruplarının bu etkileşim sonucunda yükseltgenmeye uygun bir pozisyonda bulunmaması sonucunda yanıtta azalma gözlenmektedir. Her iki ortamda yapılan çalışmalarda pik potansiyellerine bakılacak olursa EPR ile yaptığımız çalışmanın sonuçlarına paralel olarak, fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) görülen pik potansiyeli, asetat tamponu ortamındakinden (pH 4,8) daha küçüktür ve sinyaller kıyaslandığı zaman daha küçük fakat daha simetriktir.

Çalışmamızda sadece CPE ile elde edilen pikler baz alındığında, MTX' un dsDNA ile etkileşmesi sonucu elde edilen yanıt, asetat tamponu (pH 4,8) ortamında, fosfat tamponu ortamına göre oransal bir azalma (iki sinyal arasında farklı büyüme) göstermiştir.

MTX' un voltamogramında elde edilen ilk ve ikinci piklerin hangi fonksiyonel gruplarına ait olduğunu konusunda; ilk pikin ana yapı olan antrakinondaki (-OH) gruplarının; ikinci pikin ise yan zincirdeki (-OH) gruplarının yükseltgenmesine ilişkin olduğu şeklinde yorum yapabiliriz. Dolayısıyla, çalışmamızın bundan sonraki aşamalarında asetat tamponu (pH 4,8), çalışma ortamı olarak kullanıldı.

Şekil-25'de MTX' un dönüşümlü voltametrisine bakıldığında, sadece CPE ile alınan MTX 'na ait anodik pik, hem ssDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan pikten, hem de dsDNA modifiye edilmiş CPE ile alınan pikten daha büyüktür; bu da bize MTX' un DNA ile etkileştiğini göstermektedir.

Hem diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak her iki ortamda alınan voltamogramlar, hem de dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramlar, MTX' un yanıtında dsDNA ve ssDNA ile etkileşme sonucunda bir

azalma olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi, MTX' un interkalasyon ile dsDNA'nın baz çiftleri arasına yerleşmesi ve yapısındaki yükseltgenebilen grupların kısmen mevcut olmasıdır. Bu sonuca paralel olarak, A. M. Oliveira Brett ve arkadaşlarının kare dalga voltametri tekniği ile gerçekleştirdikleri çalışmada da (70) dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen yanıtta, azalma saptandığı rapor edilmiştir.

ssDNA ile elde edilen yanıt ise dsDNA ile elde edileninkine kıyasla daha büyüktür. Bunun sebebi; MTX' un ssDNA'ya bağlanması olabilir.

dsDNA ile etkileşen MTX miktarı artırılarak, yanıt etkisi incelenmiş ve MTX' un her iki pikindeki değişime göre grafikler çizilmiştir. Şekil-26 'da görülen MTX konsantrasyonu-akım grafiklerinden de anlaşıldığı gibi, MTX' a ait her iki pikteki farklılığa bakacak olursak en fazla fark 4,5 μM ' da gözlenmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda optimum MTX konsantrasyonu olarak 4,5 μM kullanılmıştır.

MTX' un etkileşme zamanındaki farklılık ile ilgili çalışmada Şekil-27'de , en uygun zamanın 3 dakika olduğu görülmüştür. A. M. Oliveira Brett ve arkadaşları (70) çalışmalarında etkileşme zamanı olarak 2 dakikadan 73 saate kadar değişen etkileşme zamanlarını (2 dakika, 1 saat, 2 saat, 8 saat, 17 saat, 21 saat, 24 saat, 28 saat, 31 saat, 43 saat, 67 saat ve 73 saat) kullanmışlar ve etkileşme zamanının artmasıyla yanıtta artış olduğunu ve en az etkileşme zamanının 2 dakika olduğunu saptamışlardır. A. M. Oliveira Brett ve arkadaşlarının çalışmalarındaki sonuca (70) paralel olarak, çalışmamızda en uygun etkileşme zamanı, her iki pikteki değişim göze alınarak, 3 dakika olarak bulunmuştur; çünkü CPE ile dsDNA modifiye edilmiş CPE yanıtları arasındaki fark en fazladır. 3 dakikadan sonra CPE ve dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen yanıtlar arasındaki fark giderek azalmaya başlamıştır; bunun sebebi, MTX'nun dsDNA modifiye edilmiş CPE yüzeyinde çok fazla birikmesi ve bunun sonucunda doygunluğa ulaşması olabilir.

MTX ile gerçekleştirilen çalışmada, tayin sınırları CPE için 56 nM ve dsDNA modifiye edilmiş CPE için 80 nM olarak bulunmuştur. Dolayısıyla dsDNA modifiye edilmiş CPE ile MTX-dsDNA etkileşmesine bağlı olarak MTX' un daha düşük düzeylerini saptayabiliriz.

MTX' un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesi sonucunda yanıtta gözlenen değişime bağlı olarak, MTX' un ancak belirli koşullar altında hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabileceği söylenebilir; ancak aradaki değişimin konsantrasyon ve etkileşme süresine bağlı olması nedeniyle, EPR'ye kıyasla daha kısıtlı olarak kullanılabilir.

Hem EPR, hem de MTX' un dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesine ilişkin sonuçlar, her iki ilacın DNA'ya interkalasyon yaptığını ve bunun sonucunda yapılarındaki yükseltgenebilecek fonksiyonel grupların zarar gördüğünü dolayısıyla ilacın yanıtında azalma gözlemlendiğini göstermiştir. Sonuç olarak her iki ilaçla yaptığımız çalışmada, ilaç-DNA etkileşmesi duyarlı bir şekilde tayin edilmiştir. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak elektrot yüzeyindeki etkileşmeye dayalı çalışmamızın getirdiği en önemli avantaj, biyosensör tasarımına daha uygun olmasıdır.

Değişik interkalatörlerin ve küçük oluğa bağlanan maddelerin DNA modifiye edilmiş elektrotlarla yapılacak sistematik bir çalışması yüzeye tutturulmuş DNA' ya bağlanma durumları hakkında değişik bilgiler sağlar ve DNA etkileşme çalışmalarında önemli aletler olarak elektrokimyasal yöntemlerin kurulmasına yardımcı olabilirler (112).

İlaç-DNA kompleksinin fonksiyonlarının incelenmesi ve bu fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi, ilaç moleküllerinde hedeflerine göre yapmamız gerekli olan değişiklikleri için önemlidir. Bu yapıların aydınlanması sayesinde, birçok ilacın biyolojik fonksiyonlarını içeren kurallar açıklanabilir. Bu sonuçlar doğrultusunda, kullanımda olan ilaçların aktivitelerini arttırmak veya istenen aktiviteyi gösterecek gerekli yapılara sahip yeni bir sınıf bileşiklerin tasarımını yapmak mümkün olabilir.

Sonuç olarak; ilaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA biyosensörlerinin tasarımında amaç, gelecekte yeni antibiyotik, antiviral, antitümör ilaç ve antisense oligonükleotidlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına katkıda bulunmak (19, 63) veya bir ilaç hammadesinin daha duyarlı bir şekilde tayininin gerçekleştirilmesini olanaklı kılabilme (70- 72, 114, 126). İlaç-DNA etkileşmesine dayalı bu tür çalışmaların diğer bir sonucu ise, DNA hibridizasyon biyosensörlerinin tasarımında, yeni bir hibridizasyon indikatörüne yönelik araştırma çalışmalarına da katkıda bulunmaktır.



4.2. DNA hibridizasyonuna dayalı biyosensör tasarımında yapılan çalışmalara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

Metallointerkalasyon ajanları ile DNA arasındaki etkileşimin yapısı öncelikle spektroskopik ve X-ray kristallografisi ile çalışılmıştır (28). Metallointerkalasyon çalışmalarında ve metal iyonlarının ve kelatların DNA'ya koordinasyonlarının incelenmesinde elektrokimyasal yöntemlerin uygulanması, daha önceden kullanılan UV-görünür spektroskopi gibi yöntemlere bir alternatif oluşturmaktadır. Zayıf absorpsiyon bantlarına sahip olmaları yüzünden veya DNA molekülü ile elektronik geçişlerinin üstüste gelmesinden dolayı bazı küçük moleküllerin spektroskopik yöntemlerle incelenmeleri mümkün olmamaktadır. Bu moleküller, voltametrik yöntemlerle incelenebilir. Aynı molekülün birçok redoks halinin incelenebilmesinin yanısıra, karışım halinde bulunan ve birbiriyle etkileşen moleküllerle de çalışılabilir. Metal komplekslerinin DNA ile etkileşimi sonucu oluşan denge sabitleri, pik potansiyellerindeki kaymalar ile ve interkalatif, elektrostatik veya hidrofobik etkileşimlerde rol oynayan baz çiftleri ile hesaplanabilir (14).

$[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, dsDNA'nın bazları arasına interkale olabilme yeteneğine sahip bir metal kompleksidir ve bu özelliğine bağlı olarak ssDNA ve dsDNA ile etkileşmesindeki farklılık, bu metal kompleksinin güvenilir bir şekilde ve sıklıkla kullanılan bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmasını sağlamaktadır (12, 60, 62, 113, 117).

DNA ve metaller arasındaki elektron transferi sonucu oluşan elektrokimyasal cevabı etkileyen birçok faktör bulunmaktadır (14, 15, 44, 123). Çözelti içerisinde serbest olan metal kompleksinin ve DNA'ya bağlı bulunan metal kompleksinin

difüzyon katsayıları toplam ölçülen akımı etkilemektedir. Bu iki difüzyon katsayısı farklı olduğundan, bağlı bulunan ve serbest olan metal kompleksi konsantrasyonu önemli bir rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, kobalt fenantrolin $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in DNA ile olan etkileşimi ve karbon pastası elektrodu yüzeyindeki çift sarmal ve tek sarmal DNA ile olan farklı davranışları, dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametrisi kullanılarak incelendi ve hibridizasyon için optimum koşullar belirlendikten sonra HBV'nin tayini biyosensör ile gerçekleştirildi.

Şekil-28 'de $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in CPE, dsDNA modifiye edilmiş CPE ve ssDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen pik akımları gösterilmektedir. dsDNA modifiye ve ssDNA modifiye CPE'ler ile elde edilen pikler daha iyi tanımlı ve CPE ile elde ettiğimiz pikle kıyaslandığında daha büyüktür. ssDNA modifiye CPE ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ arasındaki elektrostatik etkileşimin az olmasından dolayı dsDNA modifiye CPE ile elde ettiğimizden çok daha küçük bir sinyal gözlenmiştir. dsDNA modifiye CPE ile iyi tanımlanmış ve yüksek bir sinyal elde edilmesinin sebebi indikatörün çift sarmal DNA'nın bazlarının arasına interkalasyon yapabilmesi ve bu bazlar arasında birikebilmesidir. Sinyal piklerinin artması $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ in dsDNA ile interkalatif etkileşmesine bağlıdır. CPE ile elde edilen $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ sinyaline göre, aynı potansiyelde yürütülen tüm kalitatif çalışmalar pik yüksekliklerinin farklarının ölçümlerine bağlıdır. Çalışmamızdakine paralel sonuçlar, farklı bir hibridizasyon çalışmasında K. Millan ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (60). Çalışmalarında, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ i hibridizasyon indikatörü olarak kullanarak, belirli DNA dizilerini seçici bir biyosensör tasarımı yapmışlardır. Oligo (dA)₂₀ için düzenlenen dizi seçici

biyosensör, aktive edilmiş camı karbon elektrot yüzeyine tutturulan oligo (dT)₂₀(dG)₉₈ ile hazırlanmıştır. Tutturulan DNA probu hibridizasyon sonucu hedef dizisinin tanınmasını sağlamaktadır. Burada kullanılan kobalt kompleksi de elektrot yüzeyindeki çift sarmal DNA'da birikerek hibridizasyon reaksiyonunun voltametrik tayinine olanak sağlamaktadır (60).

[Co(phen)₃]³⁺ in dsDNA ve ssDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen dönüşümlü voltamogramları Şekil-29 'da gösterilmektedir. Düşük konsantrasyonda dahi gözlenebilen yüksek elektrokimyasal sinyal, [Co(phen)₃]³⁺ in CPE yüzeyindeki dsDNA' ya kuvvetli bir şekilde bağlandığına güçlü bir kanıttır. Dönüşümlü voltametri işleminde elde edilen sinyallerde bir artış gözlenmiştir. Elde edilen voltametrik sinyaller elektrot yüzeyindeki DNA'nın miktarına bağlı olarak oluşan yüksek fon akımdan dolayı iyi tanımlanmamıştır. Bizim gözlemlerimiz, J. Wang ve grubunun DNA tutturulmuş CPE' lerle elde ettiği sonuçlara benzerdir (107).

Şekil-30'da gösterilen kalibrasyon eğrileri, dsDNA ve ssDNA' nın fiziksel olarak modifiye edilmiş elektrotların, elektroaktif türlere karşı CPE' dan daha farklı davrandığını göstermektedir. Benzer sonuçlar camı karbon elektroduyla [Co(phen)₃]³⁺ için, K. Milan ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir (62). dsDNA modifiye edilmiş CPE, elektrot yüzeyinde artan bir metal kompleksi konsantrasyonu ve dolayısıyla artan bir elektrokimyasal sinyal sağlamaktadır. Çalışmamızda ise [Co(phen)₃]³⁺ kullanılarak dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilen veriler, 0.96 mM' ın üzerindeki konsantrasyonlarda pik akımlarının sabit kalmasıyla doygunluk davranışı göstermektedir. Alınan sinyal 0.96 mM [Co(phen)₃]³⁺ konsantrasyonuna kadar hızla artmakta ve 0.96 mM'dan sonra değişim hızı azalmaktadır. Ayrıca bu

çalışmada elde edilen kalibrasyon eğrisinin her bir noktasına bakıldığında; her konsantrasyonda elektrotlarla elde edilen yanıtlar arasında farkın net olduğu gözlenmiştir.

5 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM NaCl konsantrasyonlarını içeren 20 mM Tris-HCl tamponunda (pH 7.0), dsDNA tutturulmuş CPE ile elde edilen pik akımları sırasıyla 220 nA, 990 nA, 230 nA ve 230 nA 'dir. Bizim sonuçlarımız K. M. Millan ve grubunun sonuçları ile paraleldir (62).

DNA modifiye edilmiş CPE, yalnız DNA ve diğer moleküller arasındaki etkileşim hakkında değil, aynı zamanda bu etkileşimin yapısındaki değişiklikler hakkında da bilgi vermektedir (83). Geçiş metal komplekslerinin DNA' ya bağlanması kısmi elektrostatik özelliktedir. Yüksek iyonik kuvvet ortamı, düşük dağılım sabitelerine neden olur ve bundan dolayı hibridizasyon esnasında artan bir pik akımı gözlemleyebilmek için düşük iyonik kuvvete sahip hibridizasyon ortamı kullanılması gereklidir (42). dsDNA ile $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ arasındaki etkileşim artan iyonik kuvvet ile elektrostatik özellikten interkalatif özelliğe değişmektedir. Çalışmamızda optimum tuz konsantrasyonu 20 mM olarak bulunmuştur; yani bu derişimde yüksek birleşme elde edilmiştir. K. M. Millan ve arkadaşlarının çalışmalarında (62) belirtildiği gibi , bağlanma tepkimesi yapısal olarak elektrostatiktir ve elektrostatik birleşme, düşük iyonik kuvvet ortamlarında mümkündür. Ayrıca T. Hard ve arkadaşları çalışmalarında (34), metal komplekslerinin DNA' ya bağlanmasının kimyasal denge çalışmalarında düşük iyonik kuvvette güçlü gerçekleştiğini ancak artan tuz derişimi ile önemli derecede zayıfladığını ve pratik olarak 0,2 M NaCl' de kesildiğini ve iyonik çevreye bağımlı olan etkileşimin önemli oranda elektrostatik olduğunu rapor etmişlerdir.

dsDNA tutturulmuş CPE' nun voltametri ölçümleri, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ biriktirme işleminin görüntülenmesi için kullanılmıştır. Biriktirme süresinin DP_{10} sinyali üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Yanıt, başlangıçta biriktirme süresi ile beraber doğrusal bir şekilde artmaktadır (3 dakikaya kadar), daha sonra yavaşlamakta ve 5 dakikadan sonra azalmaya başlamaktadır. Sinyallerdeki bu azalma, uzun indikatör bağlanma süresiyle artan fon akımına ve yüzey doygunluğuna ulaşılmasına bağlıdır.

Biriktirme süresi 1 dak, 3 dak ve 5 dak arasında değişmektedir ve gözlemlenen pik akımları sırasıyla 500 nA, 740 nA ve 710 nA 'dir. 3 dak optimum biriktirme süresi olarak belirlenmiştir. Kısa biriktirme süreleri yüksek DNA konsantrasyonlarına bağlı olarak tam yüzey kaplanmasının eldesi için yeterlidir.

Elde edilen verilere dayalı olarak , en iyi duyarlılık ve tayin hızını sağlamak amacıyla, 20 mM NaCl içeren tampon çözeltisi ve 5 dakika DNA tutturma süresi, ve 3 dakika indikatör biriktirme süresi, HBV biyosensörünün tasarımında optimum koşullar olarak kullanılmıştır.

Şekil-31 ' de HBV DNA sensörü, derişimi 10-20 ppm aralığında değişen 21 bazlık HBV hedef dizi ile 5 dakika süren hibridizasyon deneylerinde elde edilen voltamogramlar görülmektedir. HBV hedef dizisi içermeyen örneklerle tekrarlanan deneyler sonucunda, voltametrik piklerde hiçbir artış gözlenmedi; örneğin, sadece yüzeye tutturulmuş tek sarmal probun sinyali alınmıştır (Şekil 1'deki kesikli çizgiyle belirtilen pikler). Hedef dizinin derişiminin artması sonucu, iyi tanımlanmış indikatör pikleri elde edilmektedir. Olası bir sterik engellemeyi gidermek amacıyla çalışmamızda prob konsantrasyonu, hedef konsantrasyonundan daha düşük seçilmiştir; benzer bir yaklaşım K. Hashimoto ve arkadaşları (35) tarafından uygulanmıştır.

2.36 μM 21 bazlık hedef diziyle yapılan üç ardışık ölçüm tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir; relatif standart sapma %8,6 olarak bulunmuştur. 2.4×10^{-8} M A dizisi ve 1.5×10^{-8} M B dizisi için, S/N=3 oranına göre hesaplanan tayin sınırları, 15 ve 9 ng/mL'dir.

Şekil-32' de görülen kontrol deneylerinde, HBV biyosensörünün, hedef dizi ile hibridizasyon sonucu seçici olarak cevap verip vermediğini incelemek için yapılmış voltamogramlar görülmektedir. Bu voltamogramlardan biri CPE'ye tutturulmuş probun hedef ile ve rastgele dizi içeren oligonükleotit (non-complementary) ile tepkimesi sonucu elde edilen indikatör piklerine dayalıdır. Hedef olmayan dizi ile tepkime sonucu, proba yaklaşan küçük pikler elde edilmektedir. Bu gözlemler bağlanmanın, sadece hedef dizi ile hibridizasyon sonucu olduğunu ispatlamaktadır.

Tek bazı hedef diziden farklı olan diziyi içeren oligonükleotit (mismatch) ile yapılan çalışma sonucunda; Oligo A- Oligo B ve Oligo A'- Oligo B dizileri arasında yapılan hibridizasyon deneyleri sonucunda ayırt edici bir fark gözlenmedi, çünkü Oligo A' oligonükleotidindeki tek baz farkı dizinin sonuna doğru bulunmaktadır.

Hedef diziye seçimliliğin artırılması aşamasında; duyarlılığın artırılmasına yönelik diğer çalışmalar, nötral yapıya sahip peptik nükleik asitlerin (PNA) prob olarak kullanılmasıyla başarılmıştır. PNA-modifiye edilmiş sensörler, hedef diziye duydukları güçlü afinite sayesinde, tek baz farkı içeren dizilerin tayininde etkili ayırım yapılabilmesini sağlamaktadır (117). Değiştirilen sıcaklıklar (61) ve çözümlerdeki farklılıklar (42) elektrokimyasal tayin ile beraber tek baz farkı belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bugüne kadar rapor edilen DNA hibridizasyon biyosensörlerinin sonuçlarına bakıldığında, belirli DNA dizilerinin, PCR amplifikasyonunu gerektirmeyen bu yöntemler, kullanılan elektrokimyasal biyosensörlerin ümit verici bir geleceği olduğunu göstermektedir. Dünya üzerindeki birçok araştırmacı, DNA tanı testlerini, pahalı radyoizotop maddelerle, uzun zaman alan örnek hazırlama işlemlerinden arındırmaya ve daha ucuz, daha güvenilir, daha basit yapmaya çalışmaktadırlar. Her laboratuvarın DNA işaretlenmesine ve elektrot tasarımlarına değişik bir yaklaşımı vardır, fakat temel amaç aynıdır ve hepsi en büyük kimyasal problemler olan seçicilik ve duyarlılığa çözüm bulmaya çalışmaktadırlar. Bütün girişim kaynaklarının; örneğin prob dizisinin hedef diziden farklı bir diziyle etkileşmesini engellemesi gereklidir. Burada açıklanan deney, HBV'ye ait 21 bazlık model dizi ile sınırlı kalsa da, HBV DNA'sının farklı bölgelerinden değişik DNA dizileri çoklu elektrot yüzeylere ve çoklu hibridizasyon olaylarına uygulanarak yeni gelişmeler sağlanabilir. Geliştirilen yöntem, basit ve ekonomik olup, hızlı tayin sonuçları alınabilmektedir. DNA biyosensörleri, radyoizotop kullanımını ortadan kaldırmakta ve gerekli hibridizasyon süresini çok azaltmaktadır. Hasta başında gerçekleşecek DNA tanı testlerinde kolay kullanılabilir; elde taşınabilir küçük cihazlar şeklinde tasarımılanan DNA biyosensörleri, geleceğin DNA çiplerinin ilk öncüleridir. Biyosensör teknolojisinde görülen büyük gelişmeler sayesinde, çok kısa sürede dizi seçimli DNA biyosensörleri kredi kartı boyutlarında karşımıza çıkacaklardır (39).

Sonuç olarak her iki çalışmada da kullanılan elektrokimyasal yöntem, basit ve güvenilir olması ve az miktarda örnek ile çalışmaya olanak vermesinden dolayı tercih edilmektedir. Özellikle mikrogram düzeydeki dsDNA ile elektroaktif türler arasındaki

etkileşimin incelenmesi için uygundur. Ayrıca, yöntem birçok deneysel parametrenin değerlendirilmesini olanaklı kılmaktadır. Yüzeyine DNA modifiye edilmiş bu elektrotlar; DNA biyosensörleri, nitel ve nicel analiz dışında, bazı maddelerin DNA ile etkileşmesini inceleyebilme olanağı sağlar. Ayrıca elektrot yüzeyinde çalışılan bu elektrokimyasal yöntem, elektroaktif türlerin DNA'ya bağlanmasını etkileyen faktörlerin araştırılmasına olanak sağlayan bir yöntemdir.



ÖZET

Çalışmamızda Epirubisin (EPR) ve Mitoksantron (MTX) gibi bazı antikanser ilaçların ve bir hibridizasyon indikatörü olan metal kompleksi, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ nin DNA ile etkileşmesi, elektrokimyasal yöntemlerle; katı fazda, karbon pastası elektrodu (CPE) kullanılarak incelendi. Bu maddelerin çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşmesi voltametrik yöntemler ile incelendi. Deneysel parametrelerdeki farklılık (ortam ve pH, madde konsantrasyonu, DNA konsantrasyonu, madde-DNA etkileşme süresi) diferansiyel puls voltametri tekniğiyle incelendi; ayrıca tayin sınırı ve tekrarlanabilirlik parametreleride incelendi. EPR ve MTX'nun dsDNA ve ssDNA ile etkileşmesinde, asetat tamponu (pH 4,8) ve fosfat tamponunda (pH 7,4) elde edilen sonuçlara bakıldığında, CPE ile elde edilen yanıtın, dsDNA modifiye edilmiş CPE ile elde edilenden daha büyük olduğu gözlenmiştir. EPR ve MTX'nun DNA ile etkileşmesi sonucunda elde edilen voltametrik sinyaller azalan şekilde sırasıyla; CPE, ssDNA modifiye edilmiş CPE, dsDNA modifiye edilmiş CPE şeklinde bulunmuştur. Buna karşın $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ile DNA'nın etkileşmesi sonucunda elde edilen voltametrik sinyaller azalan şekilde sırasıyla; dsDNA modifiye edilmiş CPE, ssDNA modifiye edilmiş CPE, CPE olarak bulunmuştur. Oligonükleotidlerle yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. EPR, MTX ve $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 'nin DNA ile etkileşme türü elektrokimyasal yöntemlerle saptanıp, ayrıca EPR'nin belirli koşullar altında yeni bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabileceği bulunmuştur.

Hepatit-B virüsüne (HBV) ilişkin DNA dizisinin $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ indikatörü kullanılarak gerçekleştirilen elektrokimyasal tayin çalışmasında, öncelikle hibridizasyon koşulları optimize edildi. Seçimlilik çalışmasında ise, CPE'ye tutturulmuş probun rastgele dizi içeren oligonükleotit ve tek bazı farklı dizi içeren oligonükleotit ile tepkimesi sonucu elde edilen yanıtlar, probun hedef dizi ile elde edilen yanıtı ile kıyaslandı; prob'un hedef olmayan dizi ile verdiği yanıtın sadece prob ile elde edilen yanıtıya yakın olduğu; tek bazı farklı dizi içeren dizi ile verdiği yanıtın ise hemen hemen probun hedef dizisiyle verdiği sinyale yakın olduğu gözlemlendi.

SUMMARY

In this study, the interaction of DNA at the electrode surface in the solid state with some anticancer drugs; Epirubicin (EPR) and Mitoxantrone (MTX) and the metal complex as a hybridization indicator, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, was studied electrochemically by using carbon paste electrode (CPE). The interaction of double-stranded DNA (dsDNA) and single-stranded DNA (ssDNA) with these compounds was studied by using voltammetric methods. The difference in the experimental parameters for this study (buffer solution and pH, the concentration of compound, the concentration of DNA and the interaction time of DNA with the compound) was studied by using differential pulse voltammetry; in addition, the detection limit and the reproducibility was determined. It was observed for the interaction of dsDNA and ssDNA with EPR and MTX in acetate buffer (pH 4.8) and phosphate buffer (pH 7.4) that the signal of bare electrode was higher than the signal of the dsDNA modified CPE. The observed signals caused by the interaction of DNA with EPR and MTX as the decreasing signals, respectively; CPE, ssDNA modified CPE, dsDNA modified CPE were found. However, the observed voltammetric signals caused by the interaction of DNA with $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ as the decreasing signals, respectively; dsDNA modified CPE, ssDNA modified CPE, CPE were found. The similar results were also found with the oligonucleotides. The way in which DNA interacts with EPR, MTX and $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ was determined by using electrochemical methods; as a result, it was also determined that EPR can be used as a hybridization indicator in optimum conditions.

In the study for the detection of the DNA sequence related to the Hepatitis-B virus (HBV) by using $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ indicator, firstly, the conditions for hybridization were optimized. For the study of specificity, the voltammetric signals obtained from the interaction of the probe modified CPE with the non-complementary oligonucleotide modified CPE and from the interaction of the probe modified CPE with the single-base mismatch containing oligonucleotide modified CPE were evaluated in comparison with the voltammetric signal obtained from the hybrid modified CPE. It was observed that the response of the probe modified CPE with the non-complementary oligonucleotide was close to the response of the probe modified CPE and the response of the probe modified CPE with the single-base mismatch containing oligonucleotide was close to the response of the hybrid modified CPE.

KAYNAKLAR

1. Adams, R.N., "Carbon paste electrodes", **Anal. Chem.**, 30, (1958), 1576.
2. Analitik Kimyanın Temelleri, D.A. Skoog, D.M. West ve F. J. Holler, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç ve Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, 1996, Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
3. Bard, A.J., Faulkner, L.R., " Chp. 6: Controlled potential microelectrode techniques-potential sweep methods", **Electrochemical Methods**, Wiley; New York, 1980, s.218.
4. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V. , Turro, N.J., " Binding modes and base specificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity" , **J. Am. Chem. Soc.**, 1986, 108, 2081-2088.
5. Bej, A.K.; " Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies", **Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications**; Ed. Dangler,C.A., 1996, Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.
6. Bertino, J.R., "Antineoplastic Drugs", **Textbook of Pharmacology**, Smith, C.M. and Reynard, A.M., Section IX - Cancer Chemotherapy; (1992), W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
7. Brabec, V., "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, (1983), 245-255.

8. Brabec, V., Dryhurst, G., "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, (1978), 161-173.
9. Brabec, V., Koudelka, J., "Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample", **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 7, (1980), 793-805.
10. Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E., "Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids", **Electroanalysis**, 8 (8-9), (1996), 753-758.
11. Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E., "Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrodes", **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 40, (1996), 41-47.
12. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E., "Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces", **Anal. Chim. Acta**, 344, (1997), 65-76.
13. Camman, K., Lemke, U., Röhen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B., "Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications", **Angew. Chem. Int. De.Engl.**, 30, (1991), 516-539.
14. Carter, M.T. and Bard, A. J.; "Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA", **J. Am. Chem. Soc.**, 109, (1987), 7528-7530.
15. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J.; " 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, (1989), 8901-8911.

16. Collins, F.S., Patrinos, A., Jordan, E. , Chakravarti, A. Gesteland, R., Walters, L. and the members of the DOE and NIH planning groups, " New goals for the U.S. Human Project: 1998-2003", **Science**, 282, (1998), 682-689.
17. Coulet, P. R., "What is a Biosensor?", Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet,(1991), Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
18. Deforce, D.L.D., Ryniers, F.P.K., Van den Eeckhout, E.G., Lemiere, F. Esmans, E.L., "Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry", **Anal. Chem.**, 68, 1996,3575-3584.
19. Dervan, P.B., " Design of Sequence-spesific DNA-binding molecules", **Science**, 232, (1986), 464-471.
20. Dervan, P.B., " 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., (1998), Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
21. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions od DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, sayfa 1-57.
22. Dollimore, L.S., Gillard, R. D.; " Optically active co-ordination compounds. Part XXXII. Potassium (+)Tris-[L-cysteinesulphinato(2-)-SN]cobaltate (III): A versatile agent for resolution of 3+ species " ; **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, 125, (1973), 933-941.
23. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa;289-384.
24. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S. ve Ozsoz, M., "DNA Electrochemical Biosensor for the detection of short DNA sequences related to the Hepatitis B Virus", **Electroanalysis**, 10, (1999), 586-588.

25. Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Dalbastı, T. and Ozsoz, M., "Detection of interaction between metal complex indicator and DNA bu using electrochemical biosensor", **Electroanalysis**, 11, (1999), 1372-1376.
26. Evans; A. "Potentiometry and ISE" , ACOL, (1991), London, s.106-198.
27. Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, "63.Bölüm: Antikanser İlaçlar ", Editör, Prof. Dr. İsmet Dökmeci, Nobel Tıp Kitabevleri, 1992, 819-848.
28. Fleisher, M.B., Mei, H.-Y. and Barton, J.K., " Metal complexes which target DNA sites: coupling recognition to reactivity", *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2, Ed. Eckstein,F. and Lilley, D.M.J., (1998), Springer-Verlag, Berlin, s.65-84.
29. Fojta, M., Doffkova, R., Palecek, E., "Determination of traces of RNA in submicrogram amounts of single- or double-stranded DNAs by means of nucleic acid-modified electrodes", **Electroanalysis**, 8(5), (1996), 420-426.
30. Fox, K. R., Kentebe, E., " Echinomycin binding to the sequence CG(AT)_nCG alters the structure of the the central AT region", **Nucleic Acids Research**, 18 (8), (1990), 1957-1963.
31. Fritzsche, H., Akhebat, A., Taillandier, E., Rippe, K. and Jovin, T.M., "Structure and drug interactions of parallel-stranded DNA studied by infrared spectroscopy and fluorescence", **Nucleic Acids Research**, 21(22), 1993, 5085-5091.
32. Hall, E.A.H., " Biosensors"; Ch.1: Biosensors in context , Open University Press, İngiltere; (1990); s.3-30.
33. Hansen, M., Hurley, L., "Altromycin B threads the DNA helix interacting with both the major and minor grooves to position itself for site-directed alkylation of guanine N7", **J.Am. Chem. Soc.**, 117, (1995), 2421-2429
34. Hard, T., Norden, B., "Enantioselective interactions of inversion-labile trigonal Iron (II) complexes upon binding to DNA", **Biopolymers**, 25, (1986), 1209-1228.

35. Hashimoto, K., Ito, K. and Ishimori, Y., " Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA", **Sensors and Actuators B**, 46, (1998), 220-225.
36. Hashimoto, K.; Ito, K. ; Ishimori, Y.; " Novel DNA sensor for electrochemical gene detection", **Anal. Chim. Acta**, 286, (1994), 219-224.
37. Herne, T.M., Tarlov, M.J., " Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces", **J. Am. Chem. Soc.**, 119, (1997), 8916-8920.
38. Hill, B.T., "The use of anti-tumor antibiotics for simple quantitative assays for DNA", **Anal. Biochem.**, 70, (1976), 635-638.
39. Hodgson, J. , " Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future", **Nature Biotech.**, 16, (1998), 725-727.
40. Jelen, F., Fojta, M., Palecek, E., " Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs ", **J. Electroanal. Chem.**, 427, (1997), 49-56.
41. Jelen, F., Tomschik, M., Palecek, E., " Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA", **J. Electroanal. Chem.**, 423, (1997), 141-148.
42. Johnston, D.H., Glasgow, K.C., Thorp, H.H.; " Electrochemical Measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes", **J. Am. Chem. Soc.**, 117, (1995), 8933-8938.
43. Johnston, D.H., Thorp, H.H.; " Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics"; **J. Physc. Chem.**, 100, (1996), 13837-13843.
44. Johnston, D.H., Welch, T.W., Thorp, H.H.; " Electrochemically activated nucleic acid oxidation"; *Metal Ions in Biological systems*, Ed. Sigel, A., Sigel, H.; Vol. 33, (1996), Marcel Dekker, Inc, NY; 299-324.
45. Kapuscinski, J. and Darzynkiewicz, Z., " Interactions of antitumor agents ametantrone and mitoxantrone (novantrone) with double - stranded DNA", **Biochem. Pharm.**, 34 (24), (1985), 4203-4213.

46. Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K., " Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking", **J. Am. Chem. Soc.**, 119, (1997), 9861-9870.
47. Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y.S., Giannoula, K., Mikkelsen, S.R., "Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay", **Anal. Chem.**, 68, (1996), 1197-1200.
48. Liu, J., Abid, S., Hail, M.E., Lee, M.S., Hangeland, J., Zein, N., " Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions", **Analyst**, 123, (1998), 1455-1459.
49. Liu, S., Ye, J., He, P. ve Fang, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode", **Anal. Chim. Acta**, 335, (1996), 239-243.
50. Low, C.M.L., Drew, H.R. and Waring, M.J., "Sequence-specific binding of Echinomycin to DNA: evidence for conformational changes affecting flanking sequences", **Nucleic Acids Research**, 12 (12), (1984), 4865 – 4879.
51. Lown, J.W., Hanstock, C.C., Bradley, R.D. and Scraba, D.G., " Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy", **Molecular Pharm.**, 25, (1984), 178-184.
52. Lown, J.W., Morgan, A.R., Yen, S.-F., Wang, Y.-H., Wilson, W.D., " Characteristics of the binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids", **Bioelectrochemistry**, 24, (1985), 4028-4035.
53. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E., "Electrochemistry of Osmium-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded

54. Lumbey-Woodyear, T., Campbell, C.N., Freeman, E. Freeman, Georgiou, G. Heller, A., "Rapid Amperometric verification of PCR amplification of DNA", **Anal. Chem.**, 1999, 71, 535-538.
55. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E., "Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C", **Biophysical Chemistry**, 75, (1998), 87-95.
56. Martindale, The Extra Pharmacopoeia, Editör, J.F. Reynolds, The Pharmaceutical Press, London, 29. baskı, 1989.
57. McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P. ve Linn, C.P.; "The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition", **Anal. Chem.**, 67, (1995), 663 A-668 A.
58. Mikkelsen, S.R., "Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review", **Electroanalysis**, 8 (1), (1996), 15-19.
59. Mikkelsen, S., "Sequence-selective DNA Sensors for the diagnosis of inherited diseases (Voltametric)", A.B.D Patent no: 5,312,527 (05/17/1994).
60. Millan, K.M., Mikkelsen, S.R., "Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators", **Anal. Chem.**, 65, (1993), 2317-2323.
61. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., "Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode", **Anal. Chem.**, 66, (1994), 2943-2948.
62. Millan, K.M., Spurmanis, A. J., Mikkelsen, S.R., "Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes", **Electroanalysis**, 4, (1992), 929-932.
63. Modern Drug Discovery, "Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics", Editör, J.F. Ryan, Washington DC, 1-2, 1999, sayfa 68.
64. Molinier-Jumel, C., Malfroy, B., Reynaud, J. A. and Aubel-Sadron, G. "Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 84(2), (1978), 441-449.

65. Nicholson, R.S., Shain, I.; " Theory of stationary electrode polarography: Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems", **Anal. Chem.**, 36 (4), (1964), 706-723.
66. Nielsen, P. E., "Peptide nucleic acids as therapeutic agents", **Current Opinion in Structural Biology**, 9(3), 1999, 353-357.
67. Nielsen, P.E., " Applications of peptide nucleic acids", **Current Opinion in Biotechnology**, 10(1), (1999), 71-75 .
68. Nunn, C.M., Meervelt, L.V., Zhang, S. et al., "DNA-Drug Interactions; the crystal structures of d(TGTACA) and d(TGATCA) complexed with Daunomycin" , **J. Mol. Biol.**, 222, (1991), 167-177.
69. Odani, A., Shimata, R., Masuda, H., Yamauchi, O., " Platinum DNA intercalator-monomonucleotide adduct formation. Cooperativity between aromatic ring stacking and electrostatic interactions", **Inorg. Chem.**, 30, (1991), 2133-2138.
70. Oliveira Brett, A.M., Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P., "Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor ", **Biosensors and Bioelectronics**, 13, (1998), 861-867.
71. Oliveira Brett, A.M., Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A., Cruz, M.L., "Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor", **Electroanalysis**, 9, (1997), 1132-1137.
72. Oliveira Brett, A.M., Serrano, S.H.P., Macedo, T.A., Raimundo, D., Marques, M. H., La-Scalea, M.A., "Electrochemical determination of Carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode", **Electroanalysis**, 8, (1996), 992-995.
73. Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi K., Sugino, Y. ve Nishioka, K., "The complete nucleotide sequences of the cloned Hepatitis B virus DNA: subtype adr and adw", **Nucleic Acids Res.**, 11, (1983), 1747-1757.
74. Palecek, E., " From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes", **Electroanalysis**, 8 (1), (1996), 7-14.

75. Palecek, E., " Probing of DNA structure with osmium tetroxide complexes in vitro and in cells", Editörler; F. Eckstein ve D.M.J. Lilley, *Nucleic acids and Molecular Biology*, Vol. 8, Springer-Verlag Berlin, 1994, 1-13.
76. Palecek, E., "Adsorptive transfer stripping voltammetry: determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface", **Anal. Biochem.**, 170, (1988), 421-431.
77. Palecek, E., "New trends in electrochemical analysis of nucleic acids", **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 20, (1988), 179-194.
78. Palecek, E., "Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods", **Encyclopedia of Analytical Science** (ed. by Alan Townshend), London, Academic press, Vol. 6, (1995), 3600-3609.
79. Palecek, E., Jelen, F., " Interaction of nucleic acids with electrically charged surface. VIII. Dependence of changes in DNA double helical structure on pH and on potential of the mercury electrode", **Bioelectrochem. Bioenerg.**, 7, (1980), 317-332.
80. Palecek, E., Postbieglova, I., "Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer", **J. Electroanal. Chem.**, 214, (1986), 359-371.
81. Pandey, P.C., Weetall, H.H. , " Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation", **Anal. Chem.**, 1994, 66, 1236-1241.
82. Pandey, P.C., Weetall, H.H., " Detection of aromatic compounds based on DNA intercalation using an evanescent wave sensor", **Anal. Chem.**, 1995, 67, 787-792.
83. Pang, D. And Abruna, H. D. ; "Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules", **Anal. Chem.**, 70, (1998), 3162-3169.

84. Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D., " Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C ", **Chemico-Biological Interactions**, 117, (1999), 65-81.
85. Perrin, L.C., Cullinane, C., Kimura, K. and Phillips D.R., " Barminomycin forms GC-specific adducts and virtual interstrand crosslinks with DNA", **Nucleic acids research**, 27(8), (1999), 1781-1787.
86. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W., "Analytical Chemistry", 2. Baskı, Academic press, (1979), s.226- 239.
87. Plambeck, J.A., Lown, J.W.; " 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), 1984, 2556-2563.
88. Reyderman, L. ve Stavchansky, S.; " Quantitative determination of short single-stranded oligonucleotides from blood plasma using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence", **Anal. Chem.**, 69, (1997), 3218-3222.
89. Richardson, C. L., Springfield, G.E.S. et al., "Intercalation inhibition assay for compounds that interact with DNA or RNA", Amerikan patent no; 4,257,774 / 24 Mart 1981).
90. Ridge, G.S., Bailly, C. Graves D. E., Waring, J., "Daunomycin modifies the sequence-selective recognition of DNA by actinomycin", **Nucleic Acids Research**, 22(24), (1994), 5241-5246.
91. Service, R.F., "New focus: Microchip arrays put DNA on the spot", **Science**, 282, (1998), 396-399.
92. Steel, A. B., Herne, T.M. , Tarlov, M.J.; " Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold", **Anal. Chem.**, 70, (1998), 4670-4677.

93. Su, H., Williams, P., Thompson, M., " Platinum Anticancer drug binding to DNA detected by thickness-shear-mode acoustic wave sensor", **Anal. Chem**, 1995, 67, 1010-1013.
94. Tabernero, L., Bella, J. and Aleman, C., " Hydrogen bond geometry in DNA-minor groove binding drug complexes", **Nucleic Acids Research**, 24(17), 1996, 3458-3466.
95. Takenaka, S., Ihara, T., Takagi, M; " Bis-9 acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA", **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, 21, (1990), 1485-1487.
96. Takeuchi, K.J., Thompson, M.S., Pipes, D.W., Meyer, T. J., " Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media", **Inorg. Chem.**, 23, (1984), 1845-1851.
97. Teijeiro, C., Perez, P., Marin, D., Palecek, E.," Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA ", **Bioelectrochem. & Bioenergetics**, 38, (1995), 77-83.
98. Temel Biyokimya 2, Bölüm 8: Bilgi Kaynağı olan Makromoleküller; Editörler, Prof. Dr. Taner Onat, Prof. Dr. Kaya Emerk; Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı, 1997, sayfa 565-567.
99. Thayer, A.M., " Deciphering Diseases", **Chemical & Engineering News**, Ed. by M. Jacobs, American Chemical Society, North Carolina, 30 Ağustos 1999, 19-28.
100. The Merck Index, Editör, S. Budavari, Merck and Co. Inc., 11. baskı, 1989.
101. Tiollais, P., Pourcel, C. ve Dejean, A.; "The Hepatitis B virus: review article", **Nature**, 317, (1985), 489-495.
102. Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E.; " Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes", **J. Electroanal. Chem.**, 476, (1999), 71-80.

103. Turner, A.P.F., "Biosensors: Fundamentals and Applications", Editörler; Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S.; Oxford University Press, 1987, Oxford, sayfa v-vii.
104. Wakelin, L. P.G. and Waring, M. J., " The binding of Echinomycin to deoxyribonucleic acid", **Biochem. J.**, 157, (1976), 721-740.
105. Wang, A.H.-J., "Interactions between antitumor drugs and DNA", **Nucleic Acids and Molecular Biology**, Vol.1, (1987), 52-69. (Editörleri; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany)
106. Wang, J., " DNA biosensors based on Peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review ", **Biosensors and Bioelectronics**, 13, (1998), 757-762.
107. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., " Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes", **Anal. Chim. Acta**, 326, (1996), 141-147.
108. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N., " DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus", **Anal. Chem.**, 68, (1996), 2629-2634.
109. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T., "Polishable and renewable DNA hybridization biosensors", **Anal. Chem.**, 70, (1998), 3699-3702.
110. Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R., "Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes ", **Anal. Chim. Acta**, 349, (1997), 77-83.
111. Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., "Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance", **Anal. Chem.**, 69, (1997), 5200-5202.
112. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E., " Interactions of antitumor drug

- daunomycin with DNA in solution and at the surface", **Bioelectrochem. And Bioenerg.**, 45, (1998), 33 - 40.
113. Wang, J., Palecek, E., Nielsen, P.E., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Farias, P.A.M., " Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors", **J. Am. Chem. Soc.**, 118, (1996), 7667-7670.
114. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., , Shiraishi, H., Farias, A.M.P., Dontha, N., Luo, D., " Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes ", **Anal. Chim. Acta**, 332, (1996), 139-144.
115. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., " Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the Escherichia coli pathogen", **Electroanalysis**, 9(5), (1997), 395-398.
116. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S., " Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA", **Anal. Chim. Acta**, 337, (1997), 41-48.
117. 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., " DNA electrochemical biosensors for enviromental monitoring-A review ", **Anal. Chim. Acta**, 347, (1997), 1-8.
118. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., ""Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes ", **Electroanalysis**, 10(8), (1998), 553-556.
119. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., " Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor", **Anal. Chim. Acta**, 375,(1998), 197-203.
120. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., "DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines", **Anal. Chem.**, 68, (1996), 4365-4369.

121. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., " DNA Biosensor for the detection of hydrazines", **Anal. Chem.**, 68, (1996), 2251-2254.
122. Wang, J., Rivas, G., Ozsoz, M., Grant, D.H., Cai, X., Parrodo, C., "Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage", **Anal. Chem.**, 69, (1997), 1457-1460.
123. Welch, T.W., Thorp, H.H., " Distribution of metal complexes bound to DNA determined by normal pulse voltammetry", *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 13829-13836.
124. Wilson, E.K., "Instant DNA detection", **Chem.& Eng. News**, 76 (21),(1998), 47.
125. Wright, T. L. , Lau, J. Y. N. ; " Clinical aspects of hepatitis B virus infection", **The Lancet**, 342, (1993), 1340-1344.
126. Xia, C., Guoli, S., Jianhui, J., Ruqin, Y., "Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications", **Anal. Lett.**, 32 (4), (1999), 717-727.
127. Zunino, F., Gambetta, R., Di Marco, A. and Zaccara, A., " Interaction of Daunomycin and its derivatives with DNA", **Biochimica Et Biophysica Acta**, 177, (1972), 489-498.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında İzmir'de doğdum. İlk öğrenimimi Duatepe İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi İzmir Karataş Lisesi'nde tamamladım. 1989 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde üniversite eğitimime başladım ve 1993 yılında *üçüncülükle* mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün açtığı Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programını kazandım ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 1996 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan sonra, aynı Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 1994 yılından beri Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Bekarım.