



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN TAYİNİNE YÖNELİK

ELEKTROKİMYASAL NANOBIYOSENSÖRLERİN

TASARIMI VE UYGULAMALARI

Suzan YANIK

Kimya Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

İLAC-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN TAYİNİNE YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL NANOİYOSENSÖRLERİN
TASARIMI VE UYGULAMALARI

Suzan YANIK

Kimya Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğı Tarih: 31/01/2020

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

İkinci Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

ANAkkALE

Suzan YANIK tarafından Prof. Dr. Selehattin YILMAZ yönetiminde ve Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL ikinci danışmanlığında hazırlanan ve **31/01/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**İlaç-DNA Etkileşimlerinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Nanobiyosensörlerin Tasarımı Ve Uygulamaları**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Özlem SÖĞÜT

.....

Başkan

Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

.....

Üye

Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

.....

Üye

Prof. Dr. Sema BAĞDAT

.....

Üye

Doç. Dr. Gülşen SAĞLIKOĞLU

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FDK-2018-2459

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Suzan YANIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Selehattin YILMAZ ve ikinci danışman hocam Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren hocam Prof. Dr. Yusuf DİLGİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında anlayış, akedemik bilgi ve manevi dekteklerini esirgemeyen Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bölümü, Analitik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Özlem SÖĞÜT ve Prof. Dr. Pınar KARA KADAYIFÇILAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın yardım ve desteklerini benden esirgemeyen her zaman bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Dilek ÜLKER ÇAKIR'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışma sürem boyunca her ihtiyacımda yardımına koşan ve mutlu anılar biriktirmemi sağlayan değerli komşu laboratuvar arkadaşlarım Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Kimya Bölümü Doktora Öğrencisi Şahin DEMİRCİ ve Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Ezgi KIVRAK'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın ve hayatımın her aşamasında büyük bir sabır göstererek ve her zor durumda beni motive ederek, maddi ve manevi destek ile hep yanımda olan canım annem Ulviye YANIK'a teşekkür ederim.

Suzan YANIK
Çanakkale, Ocak 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

μA	Mikroamper
μL	Mikrolitre
A	Amper
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
BRT	Britton Robinson Tamponu
C	Derişim
CH_3COOH	Asetik asit
CV	Dönüşümlü voltammetri (Cyclic voltammetry)
DPV	Diferansiyel puls voltametri (Differential pulse voltammetry)
dsDNA	Çift sarmal DNA (Double stranded DNA)
ssDNA	Tek sarmal DNA (Single stranded DNA)
H_3BO_3	Borik asit
H_3PO_4	Fosforik asit
PGE	Kalem grafit elektrot
LOD	Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ	Kantitatif Tayin sınırı (Limit of quantification)
M	Molar
MgCl	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mV	Milivolt
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp(Multiwalled carbon nanotube)
NaOH	Sodyum hidroksit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer solution)
ABS	Asetat tampon çözeltisi (Acetate buffer solution)
PGE	Kalem grafit elektrot (Pencil graphite electrode)
SPE	Perde baskılı elektrot (Screen printed electorde)
TAM	Tamoksifen
AdSDPV	Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametrisi

ÖZET

İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMLERİNİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL NANOBIYOSENSÖRLERİN TASARIMI VE UYGULAMALARI

Suzan YANIK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

31/01/2020, 111

Günümüzde biyosensörlerin tasarımı analitik kimyanın en önemli alanlarından biridir ve madde-DNA etkileşimi ile ilgili uygulamaları incelemek için geliştirilen DNA tabanlı biyo (nano) sensörlere ilgi son yirmi yıldır artmaktadır. Terapötik amaçlar için olsa bile, DNA yapısındaki değişiklik insan sağlığı üzerinde ciddi etkilere neden olabilmektedir. Bu çalışmada, 1970'lerin başlarından beri kanser tedavisinde kullanılmakta olan antikanser ilacı Tamoksifen (TAM)'in tek kullanımlık kalem grafit elektrot hemde karbon ve çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) perde baskılı karbon elektrotlarla kullanılarak dsDNA, ssDNA ve sentetik oligonükleotid dizileriyle olan etkileşim yolları incelenmiştir. Bu amaçla TAM ve guanin oksidasyon sinyalleri etkileşim öncesi ve etkileşim sonrasında diferansiyel puls voltametri (DPV) sinyalleri akım farklanmaları değerlendirilmiştir. Uygulanan voltametrik yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini kontrol etmek için TAM'in ilaç tabletinden geri kazanım çalışmaları da ayrıca gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ilk kez kalem grafit elektrot (PGE), perde baskılı karbon elektrotlar (SPE'ler) kullanılarak, meme kanseri (BRCA1) geni ile ilgili spesifik DNA dizilerinin, bu hastalığın tedavisinde kullanılan antikanser ilaç TAM ile olan etkileşiminin araştırılmasına yönelik elektrokimyasal nanobiyosensör oluşturulmuştur. TAM ve DNA arasındaki biyomoleküler etkileşim, sadece guanin sinyaline değil, aynı zamanda TAM oksidasyon cevabına dayanarak DPV ile araştırılmıştır. TAM'in tek sarmal (ss)-DNA (veya prob DNA) ve çift sarmal (ds)-DNA (veya hibrit DNA) üzerindeki etkisi, çift sarmal ve tek sarmal yapıya bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. TAM'in ds-DNA ile ss-DNA'dan daha güçlü etkileşime girdiği bulunmuştur. Benzer şekilde Prob DNA'dan veya hibrit DNA'dan elde

edilen yaklaşık + 1.00V'deki guanin sinyalinin, TAM ile etkileşimden sonra önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Ek olarak, TAM'ın guanin bazları ile etkileştiği ve guanin oksidasyon alanına yakın olan TAM sinyalinin DNA ile etkileşimin ardından da arttığı bulunmuştur. Gözlenebilme limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ), DPV için sırasıyla 3.19×10^{-7} M ve 1.06×10^{-6} M olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan biyosensör DNA hibridizasyonu ve TAM-DNA etkileşiminin hassas bir şekilde analizi için uygun bir platform sunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Elektrokimyasal DNA Biyosensörü, DNA, Nanomalzeme, İlaç-DNA Etkileşimi, Kalem Grafit Elektrot, Perde Baskılı Karbon Elektrot.



ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL DNA NANOBIOSENSOR FOR THE DETECTION OF ANTICANCER DRUGS AND DNA INTERACTIONS

Suzan YANIK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Selehattin YILMAZ

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL

01/31/2020, 111

Today, the design of biosensors is one of the most important areas of analytical chemistry, and interest in DNA-based bio (nano) sensors developed to study applications related to substance-DNA interaction has been increasing for the past two decades. Even for therapeutic purposes, the change in DNA structure can have serious effects on human health. In this study, the anticancer drug Tamoxifen (TAM), which has been used in the treatment of cancer since the early 1970s, is used with both disposable pencil graphite electrodes, screen printed carbon electrodes and multi-walled carbon nanotube (MWCNT) screen printed electrodes in order to examine the ways of interaction with dsDNA, ssDNA and synthetic oligonucleotide sequences. In order to check the authenticity and accuracy of the applied voltammetric method, TAM's recovery from the drug tablet was also carried out. In this study, for the first time, an electrochemical nanobiosensor was developed for investigating the interaction of specific DNA sequences related to the breast cancer (BRCA 1) gene with the anticancer drug TAM which was used in the treatment of this disease by using the pencil graphite electrode (PGE), screen printed carbon electrodes (SPEs). The biomolecular interaction between TAM and DNA was investigated by DPV based on not only the guanine signal but also the TAM oxidation response. The effect of TAM on single stranded (ss)-DNA (or probe DNA) and double stranded (ds)-DNA (or hybrid DNA) varied depending on the double stranded and single stranded structure. TAM has been found to interact with dsDNA more strongly than ssDNA. Similarly, it was determined that the guanine signal at about + 1.00V from probe DNA or hybrid DNA showed a significant increase after interaction with TAM. In addition, it was found that TAM interacts with

guanine bases and the TAM signal, which is close to the guanine oxidation site, increases after interaction with DNA. The Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were determined as 3.19×10^{-7} M and 1.06×10^{-6} M for DPV, respectively. As a result, the prepared biosensor provides a suitable platform for DNA hybridization and precise analysis of TAM-DNA interaction.

Keywords: Electrochemical DNA Biosensor, DNA, Nanomaterial, Drug-DNA Interactions, Pencil Graphite Electrode, Screen Printed Carbon Electrode.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Elektrokimya	1
1.1.1. Voltametri.....	2
1.1.2. Voltametik Cihazlar	4
1.1.3. Voltametik Çalışma Elektrotları	5
1.1.4. Voltametik Referans Elektrotları	9
1.1.5. Voltamogramlar	9
1.1.6. Voltametik Akımlar	9
1.1.7. Voltametik Teknikler	10
1.2. Sensörler.....	17
1.2.1. Biyosensör	18
1.3. Elektrokimyasal Biyosensörler	25
1.3.1. Amperometrik Biyosensörler	26
1.3.2. Potansiyometrik Biyosensörler	26
1.3.3. İmpedimetrik Biyosensörler	26
1.3.4. Kondüktometrik Biyosensörler	27
1.4. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri.....	27
1.4.1. Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensörleri (Elektrokimyasal Genosensörler)	27
1.4.2. Nükleik Asit Etkileşimine Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörler	28
1.4.3. DNA Biyosensörleri (Genosensörler)'in Sınıflandırılması.....	28
1.4.4. DNA Biyosensörlerinde Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine Tutturulma Yolları	31
1.4.5. İdeal Biyosensörün Özellikleri.....	32

1.4.6. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları	33
1.5. Biyosensörler Tasarımında Kullanılan Malzemeler.....	36
1.5.1. Nanomalzemeler.....	36
1.6. Lab-on-a-Chip Teknolojisi.....	37
1.6.1. Elektrot Fabrikasyon Yöntemleri	37
1.7. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)	38
1.8. Kanser	39
1.9. Tamoksifen.....	40
1.9.1.İlaç ile İlgili Genel Bilgi.....	41
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	42
2.1. Elektrokimyasal DNA Biyosensörü Çalışmaları	42
2.1.1. Kalem Grafit Elektrotla Yapılan Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları.....	42
2.1.2. Perde Baskılı Elektrotla (SPE) Yapılmış Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları	43
2.1.3. Antikanser İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları.....	44
2.1.4. Tamoksifen İle Yapılmış DNA Etkileşim Çalışmaları	46
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	48
3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	48
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.3. Sentetik DNA Dizileri.....	48
3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	49
3.5.Oligonükleotit, dsDNA ve ssDNA Çözeltilerinin Hazırlanışı	50
3.6. BRCA 1 Gen Bölgesine Ait Oligonükleotid Çözeltilerinin Uygun Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi	50
3.6.1. Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi	50
3.6.2. Prob Hibrit Konsantrasyonlarını Belirlenmesi.....	51
3.7. Deneylerde Kullanılan Yöntemler	51
3.7.1. Guanin Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi	52
3.7.2. Çözelti ortamında PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki Oligonükleotid, ssDNA ve dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini....	52
3.7.3. Yüzey Ortamında PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki Oligonükleotid, ssDNA ve dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini....	52

3.7.4. Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile Çözelti ortamında Gerçekleştirilen Çalışmalar	53
3.8.TAM'ın Boş PGE'de Yükseltgenme Mekanizmasının İncelenmesi.....	53
3.8.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi.....	53
3.8.2. PGE Aktivasyonu.....	53
3.8.3. Voltametrik Yöntemin Tabletlere Uygulanması	54
3.8.4. Tamoksifen İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları.....	54
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	55
4.1. TAM'ın PGE'deki Elektrokimyasal Davranışı.....	55
4.1.1. TAM'ın PGE'de Çalışma Ortamının Belirlenmesi.....	56
4.1.2. Akım Türünün Belirlenmesi.....	56
4.1.3. Analitik (Çalışma) Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi	58
4.1.4. TAM'ın Analitik Tayin Parametrelerinin Belirlenmesi	60
4.1.5. TAM'ın PGE'de İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi ve Geri Kazanımı ..	60
4.2. TAM'ın DNA Materyalleriyle Etkileşim Çalışmaları.....	61
4.2.1. Çözelti Ortamında Etkileşim Çalışmaları	61
4.2.2. Yüzey Ortamında İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları.....	77
4.3. Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile Yapılan Çalışmalar.....	85
4.3.1. Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (SPE) ile Yapılan Çalışmalar.....	85
COMT Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:	85
4.3.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Perde Baskılı Elektrotlar (MWCNT/SPE) İle Yapılan Çalışmalar.....	88
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	94
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması (Yazar tarafından çizilmiştir.)	2
Şekil 2. Elektrokimyasal kütle aktarım yolları (Topkaya, 2009).....	3
Şekil 3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi; a) Kalem grafit elektrot (PGE), b) Perde baskılı karbon (grafit) elektrot (SPCE) (Yazar tarafından çizilmiştir).....	4
Şekil 4. Voltametrik çalışma elektrotlarının çeşitleri (Yılmaz, 2016).....	6
Şekil 5. Camsı karbonun yapısı (Mercan, 2010)	7
Şekil 6. Polarografide akım potansiyel grafiği (Yılmaz, 2016).....	11
Şekil 7. Diferansiyel Puls Voltametri tekniğinde uygulanan uyarma sinyali (Yazar tarafından çizilmiştir)	12
Şekil 8. Dönüşümlü voltametri için potansiyel uyarma sinyali ve elde edilen voltamogram (Bogdan ve diğerleri, 2014).....	13
Şekil 9. Biyosensörün temel bileşenleri (Yazar tarafından çizilmiştir).....	18
Şekil 10. Biyosensörün sınıflandırılmasının şematik gösterimi (Karakaya, 2019)	20
Şekil 11. Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi(Yazar tarafından çizilmiştir)	25
Şekil 12. DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyonu (Polat, 2016)	30
Şekil 13. 1953 yılında çekilen Watson ve Crick DNA sarmal yapısının ilk modeli	34
Şekil 14. DNA biyosensörleri kullanılarak bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin elektrokimyasal tayini. (Yazar tarafından çizilmiştir)	51
Şekil 15. PGE ile yapılan çalışmaların şematik gösterimi (Yazar tarafından çizilmiştir) ...	55
Şekil 16. 100 µM TAM'ın pH=4.50 B-R tamponunda, farklı pH'larda kaydedilen DPV voltamogramları ve elde edilen histogramları (a:pH=4.50, b:3.00, c:pH=2.50, d:pH=2.00, e:pH=7.40, f:pH=8.00). (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında)	56
Şekil 17. 5 µM TAM çözeltisi ile PGE kullanılarak yapılan CV ölçümlerinde değişen tarama hızlarında ölçülen TAM yükseltgenme sinyallerinin ortalama değerlerine ait voltamogramlar (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60 mV/s.	57
Şekil 18. 5µM TAM'ın DPV voltamogramlarından elde edilen pik akımı- karekök tarama hızı ($v^{1/2}$ -ip) grafiği.	57
Şekil 19. 5µM TAM'ın voltamogramlarından elde edilen pik akımının logaritması- tarama hızının logaritması (log v -log ip) değişimi	58
Şekil 21. TAM'ın artan derişime bağlı DPV voltamogramı; (a) 2.5, (b) 5, (c) 7.5, (d) 10, (e) 30, (f) 50, (g)70µM TAM (+0.75 V da 60 s biriktirme, +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).....	59
Şekil 22. TAM'ın B-R (pH=4.50) tamponundaki pik akımı-konsantrasyon (C-ip) grafiği.	59
Şekil 23. Tamoksifen etken maddesinin dsDNA ile etkileşim süresini gösteren voltamogram; (a)10ppm dsDNA, (b) 5µM TAM, (c) 20dk etkileşim, (d) 60dk etkileşim, (e) 24 saat etkileşim sonunda elde edilen voltamogramlar (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	62
Şekil 24. Çözelti ortamında 10ppm dsDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren voltamogram; (a) 10ppm dsDNA, (b) 5µM Tamoksifen etken maddesi, (c) etkileşime ait DPV voltamogram (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	63
Şekil 25. Çözelti ortamında 10ppm dsDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren histogram.	63

Şekil 26. Çözelti ortamında 10ppm ssDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini voltamogram; (a)ssDNA, (b) Etkileşim sinyali, (c) 5µM TAM etken maddesi (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).....	64
Şekil 27. Çözelti ortamında 10 ppm ssDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim öncesi ve sonrası guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren histogram.	65
Şekil 28. A) 10ppm dsDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim voltamogramı; (a) 10ppm dsDNA, (b) 5µM TAM, (c) etkileşim voltamogramı. B) 10ppm ssDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim voltamogramı (a) 10ppm ssDNA, (b) 5µM Tamoksifen, (c) etkileşim voltamogramı (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	65
Şekil 29. Çözelti ortamında COMT sentetik dizilerine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyallerini gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (c) tek başına ilaç sinyali, (d) tek başına prob, (e) ilaçla etkileştirilmiş prob sinyali (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	66
Şekil 30. Çözelti ortamında COMT sentetik dizilerine ait ilaçla etkileşim sonunda guanin oksidasyon ve ilaç oksidasyon ortalama sinyallerini belirten histogram	67
Şekil 31. Çözelti ortamında INF-B sentetik dizilerine ait ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b) tek başına ilaç sinyali, (c) tek başına prob, (d) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (e) ilaçla etkileştirilmiş prob sinyali (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	68
Şekil 32. INF-B sentetik dizilerine ait etkileşim guanin oksidasyon sinyallerini gösteren histogram	68
Şekil 33. BRCA-1 prob konsantrasyonu çalışmasını gösteren çizgi grafiği.....	70
Şekil 34. BRCA-1 prob konsantrasyonu çalışmasını gösterir histogram	70
Şekil 35. BRCA-1 hedef konsantrasyonu çalışmasını gösterir çizgi grafiği	71
Şekil 36. BRCA-1 hedef konsantrasyonu çalışmasını gösterir histogram.....	71
Şekil 37. BRCA-1 hibridizasyon tamponuna ait tuz konsantrasyonu çalışması.....	72
Şekil 38. Prob dizisi üzerine hedef diziyle gerçekleştirilen hibridizasyon sonucunu gösterir voltamogramlar; (a) tek başına prob sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.	73
Şekil 39. Hedef dizisi üzerine prob diziyle gerçekleştirilen hibridizasyon sonucunu gösterir voltamogramlar; (a) tek başına hedef sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.	74
Şekil 40. Prob dizisi üzerine hedef diziyle gerçekleştirilen hibridizasyon ve hedef dizisi üzerine prob dizisiyle gerçekleştirilen hibridizasyon sinyallerini belirten histogram sonuçları; (a) tek başına prob sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.	74
Şekil 41. Çözelti ortamında BRCA-1 sentetik dizilerine ait 5µM ilaç etken maddesiyle etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b)tek başına hedef, (c)tek başına ilaç etken maddesi, (d) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (e) ilaçla etkileştirilmiş hedef sinyali.....	75
Şekil 42. Çözelti ortamında BRCA-1 sentetik dizilerine ait 5µM ilaç etken maddesiyle etkileşim sonucunda guanin oksidasyon ve ilaç oksidasyon sinyallerinin ortalamalarını belirtir histogram.	76
Şekil 43. Elektrot yüzeyinde 10ppm dsDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sinyalini gösteren voltamogram; (a) 5µM Tamoksifen etken maddesi, (b) 10ppm dsDNA, (c) etkileşime ait voltamogram.....	77
Şekil 44. Elektrot yüzeyinde 10 ppm dsDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyalini gösteren histogram.	78
Şekil 45. Elektrot yüzeyinde 10ppm ssDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sinyalini gösteren voltamogram; (a) 10ppm ssDNA, (b) 5µM	

Tamoksifen etken maddesi, (c) etkileşime ait voltamogram.....	79
Şekil 46. Elektrot yüzeyinde 10 ppm ssDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyalini gösteren histogram.	79
Şekil 47. Elektrot yüzeyinde COMT sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) etkenle etkileştirilmiş hedef, (b) etkenle etkileştirilmiş hibrit, (c)tek başına hedef, (d) tek başına ilaç etken maddesi, (e) tek başına hibrit.	80
Şekil 48. Elektrot yüzeyinde COMT sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.	81
Şekil 49. Elektrot yüzeyinde INF-B sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına hibrit, (b) etkenle etkileştirilmiş hibrit, (c)tek başına ilaç etken maddesi, (d) tek başına hedef, (e) etkenle etkileştirilmiş hedef.	82
Şekil 50. Elektrot yüzeyinde INF-B sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonucunda elde edilen ortalama guanin ve ilaç oksidasyon sinyallerini belirtir histogram.	82
Şekil 51. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına hibrit, (b)tek başına hedef, (c)etkenle etkileştirilmiş hedef, (d)etkenle etkileştirilmiş hibrit, (e)tek başına ilaç etken maddesi.	83
Şekil 52. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren guanin oksidasyon sinyaline ait histogram.....	84
Şekil 53. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren adenin oksidasyon sinyaline ait histogram.....	84
Şekil 54. COMT sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren DPV voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c)etkenle etkileştirilmiş hedef, (d)tek başına hedef, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali (+0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).....	85
Şekil 55. COMT sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyonve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram	86
Şekil 56. INF-B sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına hibrit, (b)tek başına etken madde, (c)etkenle etkileştirilmiş hedef, (d)tek başına hedef, (e)ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali.	86
Şekil 57. INF-B sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.....	87
Şekil 58. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hedef, (c) etken ile etkileştirilmiş hedef, (d) tek başına hibrit, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali.	87
Şekil 59. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.....	88
Şekil 60. COMT sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren DPV voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c) etken ile etkileştirilmiş hedef, (d) tek başına hedef, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali (0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).	89
Şekil 61. COMT sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE, SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.....	89

- Şekil 62. INF-B sentetik dizilerine ait MWCNT SPE ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c) etken ile etkileştirilmiş hibrit, (d) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hedef sinyali, (e) tek başına hedef sinyali..... 90
- Şekil 63. INF-B sentetik dizilerine ait SPE, MWCNT/SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram..... 91
- Şekil 64. BRCA-1 sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına prob, (c) etken ile etkileştirilmiş prob, (d) tek başına hibrit sinyali, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali. 92
- Şekil 65. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE, MWCNT/SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram..... 92



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1 Antikanser ilaç DNA etkileşiminin elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle incelendiği başlıca çalışmalar (Şengiz, 2016), (Ariksoysal, Doğan Topal, Topkaya, 2018).....	31
Tablo 2 Tamoksifen'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	41
Tablo 3 Araştırmada kullanılan sentetik oligonükleotid dizilerinin listesi.....	49
Tablo 4 TAM'ın pH=4.50 Britton-Robinson tamponunda DPV yöntemi kullanılarak elde edilen analitik tayin parametreleri	60
Tablo 5 TAM tabletlerinden TAM'ın belirlenen miktarı ve geri kazanımı.....	61



BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Elektrokimya

Madde ile elektrik enerjisinin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan kimyasal enerjinin fiziksel enerjiye dönüşümü gibi enerji değişimlerini inceleyen bilim dalı elektrokimya olarak tanımlanmaktadır (Skoog ve Leary, 1996). Elektrokimyasal tepkimeler, elektron transferi yoluyla ve yükseltgenme-indirgenme yoluyla gerçekleşen tepkimelerdir.

Elektroanalitik kimya, elektrokimyasal hücrenin bir parçası olan analit çözeltisinin elektrokimyasal özelliklerine yönelik çeşitli analitik yöntemleri kapsamaktadır. Elektroanalitik teknikler incelenen maddeye spesifik olduğundan, oldukça düşük tayin sınırlarına ulaşılabilir. Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılmalarında çeşitli yollar izlenmektedir. Bu yollardan en yaygın kullanılan sınıflandırma metodu Şekil 1.'de gösterilmiştir.

Elektroanalitik teknikler temel olarak statik ve dinamik olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Bu tekniklerden dinamik tekniklerde akım yokluğunda, statik tekniklerde ise akım varlığında ölçümler gerçekleştirilmektedir.

Potansiyometrik ölçümleri içeren statik yöntemler, analizdeki seçicilik ve hızlarından dolayı oldukça önem taşımaktadır.

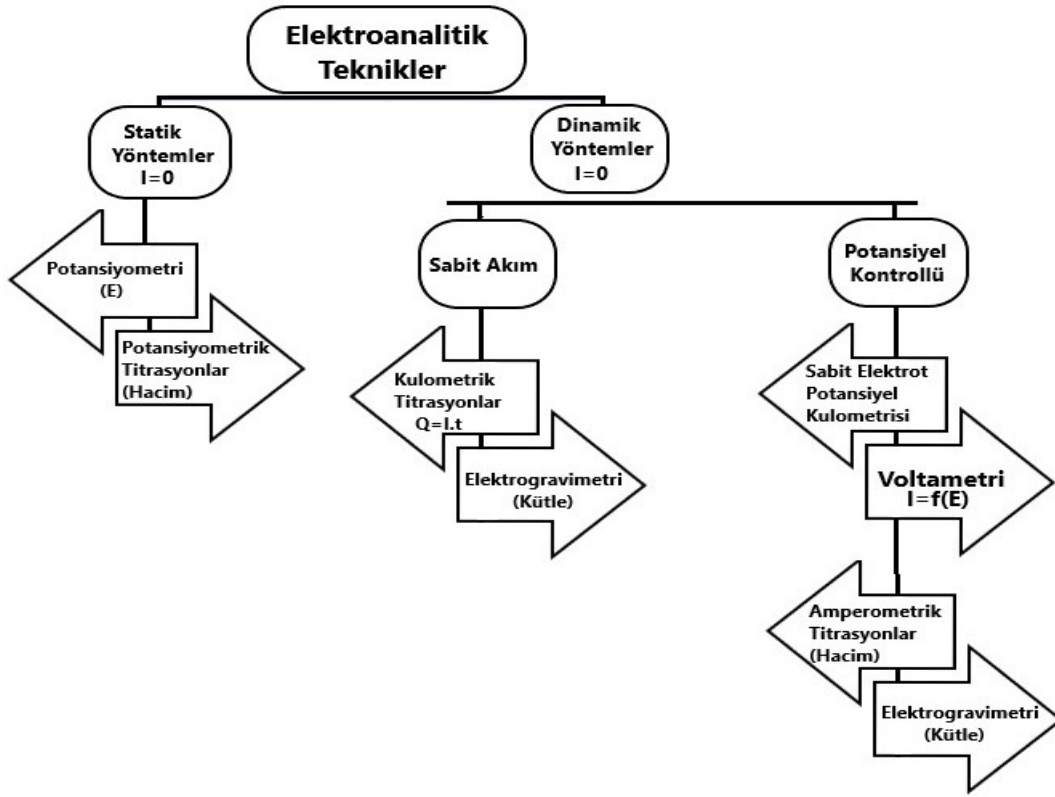
Elektrokimyasal hücrelerdeki akımlar gerçekleştirilen analiz için oldukça önem taşımaktadır. Bu tekniklerde, ölçüm yapılırken, hücre potansiyelinin kontrol edilmesi gerekmektedir. Duyarlılığı yüksek olan bu teknikler geniş çalışma aralığı sağlamaktadır.

Ayrıca bu analizler özellikle düşük derişimlerde (nano veya mikro boyuttaki konsantrasyonlara) da uygulanabilmektedirler. Gözlenebilme sınırları pikomol seviyesinde olabilir. Şekil 1.'de gösterilen elektroanalitik tekniklerden birçoğu çeşitli kromatografik işlemlerde dedektör olarak kullanılmaktadır (Skoog ve Leary, 1996).

Elektrokimyasal tepkimenin gerçekleştiği bir sistemde, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin elektrokimyasal tepkimeye girdiği bir elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve elektrotları birbirine bağlayan bir çevrim sistemi bulunmaktadır.

Bahsedilen çözelti (destek elektrolit) olarak tampon çözeltiler kullanılmaktadır. Bu tampon çözeltiler aynı zamanda elektriksel iletkenliği de sağlamaktadır. Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Doğru akım (DC), Difarensiyel Puls (DP), Dönüşümlü voltametri (CV) vb. de çalışma elektrodunun ve incelenen maddenin izin verdiği

potansiyel aralığında tarama yapılarak reaksiyon sonrası ortaya çıkan akım şiddeti ölçülmektedir.



Şekil 1. Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması (Yazar tarafından çizilmiştir.)

1.1.1.Voltametri

Tez kapsamında uygulanan yöntem olan voltametri; yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen (elektroaktif, elektrot tepkimesine giren) organik ve inorganik maddelerin çeşitli ortamdaki çözeltilerinden uygun koşullarda elde edilen akım şiddeti-gerilim eğrilerinin (voltamogram) karakteristik özelliklerini inceleyen ve değerlendiren analiz tekniğidir (Yıldız ve Genç, 1993).

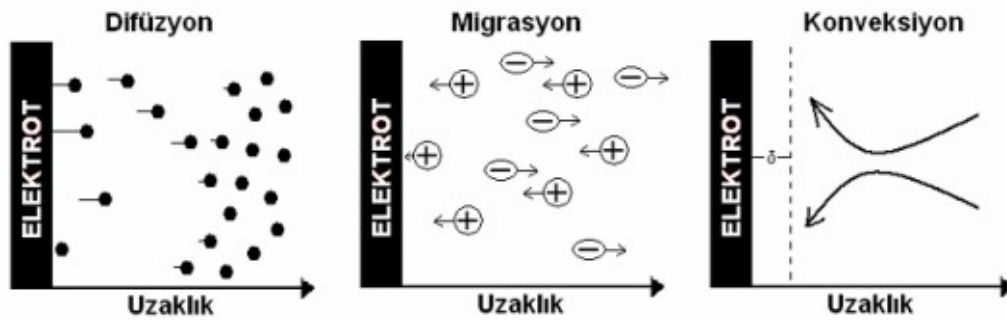
Voltametrimin temeli akım, potansiyel, elektriksel yük miktarı ile madde miktarı arasındaki ilişkiye dayanmaktadır. Voltametri, elektroaktif tüm kimyasal maddelerin akım şiddeti-gerilim eğrilerinin karakteristiklerini inceleyip değerlendiren bir analiz tekniğidir. Voltametrimin en önemli özelliği, uygun elektroanaliz teknikleri ile kullanılan elektrodun özelliğine göre çok düşük derişimlerde dahi yüksek duyarlık ve hızlı bir analizle yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. Bu yöntemde bir çalışma elektrodunun polarize olması esnasında potansiyele karşı akım ölçülür ve böylece analit hakkında bilgi edinilir. Bu yöntemde elektroaktif özelliğe sahip bir maddenin çözeltisinin bulunduğu bir hücrede

çalışma elektrodu, referans elektrot ve karşıt elektrot olmak üzere üçlü elektrot sistemi kullanılır ve değişken potansiyelden oluşan bir uyarma sinyali uygulanır (Yıldız ve Genç 1993). Bu uyarma sinyali sisteme özgü bir akım cevabı oluşturur ve yöntemde ölçülen bu akımdır. Gerilim – akım grafiği voltamogram olarak isimlendirilmektedir. Eğer çalışma elektroduna uygulanan gerilim negatif yönde değiştirilirse burada gerçekleşen indirgenme tepkimesi hızlanır ve elektrot katot gibi davranır. Böylece katodik akım meydana gelir. Voltametrde en çok kullanılan uyarma sinyalleri dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametri ve kare dalga voltametridir. Bu voltametrik yöntemler arasından özellikle diferansiyel puls ve kare dalga voltametri yöntemleri kolay uygulanabilme, düşük maliyet ve kısa analiz süresine sahip olma avantajlarıyla farmasötiklerden analizde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metotlar, redoks reaksiyonu üzerinden yürüdüğünden diğer analitik metotlara göre oldukça seçicidir (Bard ve Faulkner, 1980; Skoog ve Leary, 1996; Tural, Gökçel ve Ertaş, 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

Elektrokimyasal Taşınma Yolları: Elektroaktif maddenin elektroda taşınması ve oluşan ürünün de elektron aktarımıyla elektrottan uzaklaşmasıyla Faradaik akımın elektroliz devresinden geçebilmektedir. Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvet uygulanması gerekmektedir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel ya da mekanik bir kuvvetten meydana gelmektedir. Şekil 2.'de taneciklerin elektrot yüzeyine taşınma yolları belirtilmiştir.

Elektroaktif maddeler elektrokimyasal bir olayda elektrot yüzeyine üç şekilde taşınabilir:

- a) Migrasyon
- b) Konveksiyon
- c) Difüzyon



Şekil 2. Elektrokimyasal kütle aktarım yolları (Topkaya, 2009)

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları, üç şekilde gerçekleşmektedir (Turner, 1987). Bu kütle aktarım yolları:

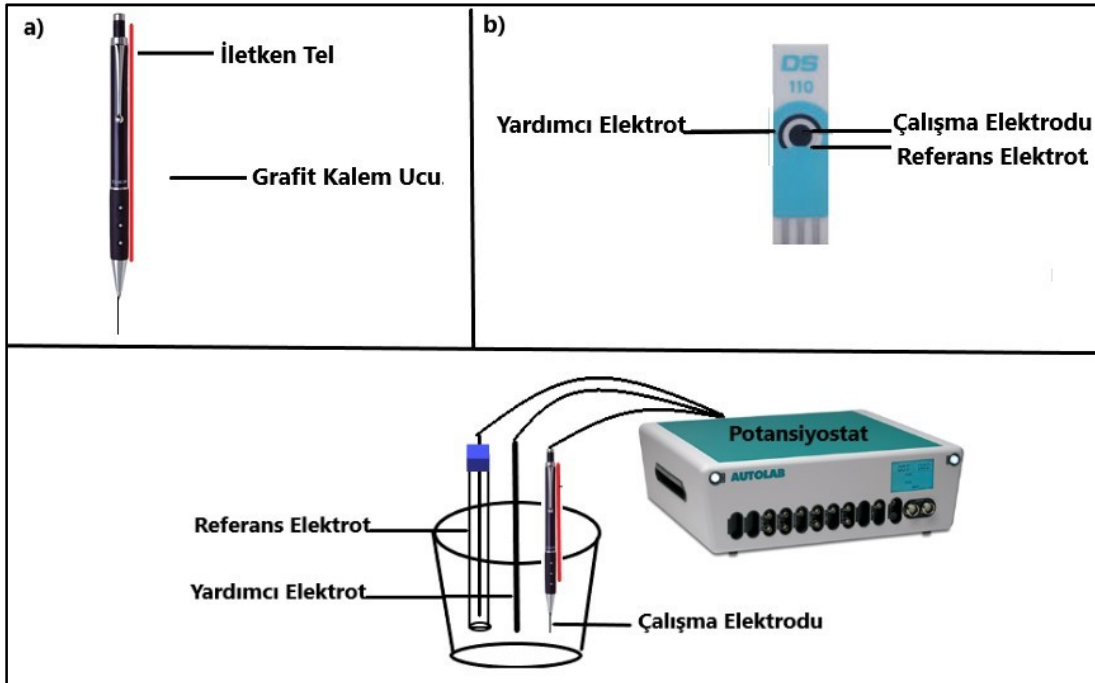
1-Elektriksel göç (Migrasyon): Elektriksel alan etkisi ile harekete geçen iyonların bu hareketi, dışarıdan elektriksel alan uygulandığında meydana geldiği gibi, çözeltide herhangi bir nedenle yük eşitliği bozulduğunda da oluşabilir. Anyonların anoda katyonların katoda taşınması oluşan bu kuvvetle gerçekleşmektedir. Oluşan bu tür taşınmaya denir.

2-Karıştırma (Konveksiyon): Mekanik kuvvetlerden (karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi) kaynaklanan kütle aktarım yoludur.

3-Difüzyon: Elektrot yüzeyindeki derişim farkından (sıvı film ile çözelti arasındaki) dolayı meydana gelen kütle aktarım yoludur. Deneysel koşullara bağlı olarak bunlardan bir tanesi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.1.2. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre ile içinde analiti içeren ve destek elektrolit adı verilen derişimi yüksek bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır. Şekil 3.'de voltametrik analizlerde kullanılan üçlü elektrot sistemi şematize edilmiştir.



Şekil 3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi; a) Kalem grafit elektrot (PGE). b) Perde baskılı karbon (grafit) elektrot (SPCE) (Yazar tarafından çizilmiştir)

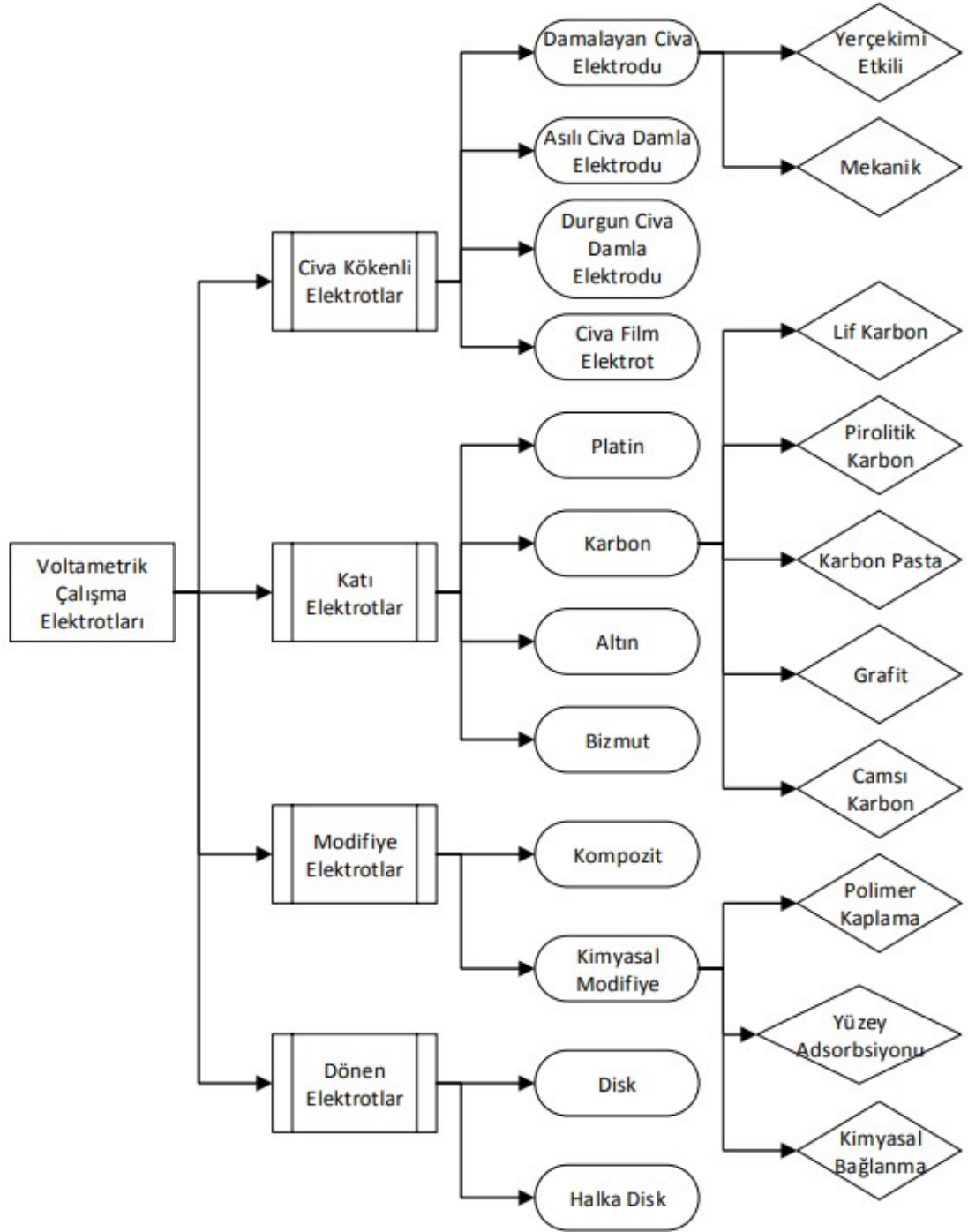
Çalışma elektrodu: Referans elektroda bağı olarak çalışan ve elde edilen sinyali (potansiyeli) analit derişimine bağı olan elektrottur. Yüzeyinde analitin yükseltgenmekte veya indirgenmektedir.

Referans elektrot: Deney süresince potansiyeli sabit kalan elektroda denir. Bu potansiyel çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsızdır. Referans elektrot olarak en çok Ag /AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılmaktadır.

Yardımcı elektrot: Genellikle bir platin telden oluşan ve elektronların çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlamaktadır.

1.1.3. Voltametrik Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrotları genellikle 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 metalden meydana gelmektedir. (Herne ve Tarlov, 1997). Bu tür elektrotların çalışma potansiyel aralığı tespiti çok önemlidir. Çünkü her birinin çalışma potansiyel aralığı farklıdır. Bu aralığı değıştiren birçok sebep vardır. Bunlar; pH, çözücü, elektrot tipi ve elektrolit tipidir. Suyun yükseltgenmesi sonucu oluşan büyük akımlar, pozitif potansiyel sınırlarını belirler. Bu belirleme genellikle moleküler oksijen verecek şekilde olur. Suyun indirgenmesinden kaynaklanan hidrojenler ise negatif potansiyel sınırlarını belirler (Bauer, Birenbaum ve Meyer, 2004). Voltametrinde kullanılan çeşitli çalışma elektrotları Şekil 4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Voltametrik çalışma elektrotlarının çeşitleri (Yılmaz, 2016).

Karbon Elektrotlar: Geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına imkan sağladığından ve düşük maliyete sahip olduğundan elektrokimyasal analizlerde oldukça sık kullanılmaktadır. Ayrıca yapısındaki hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmesi modifikasyon işlemlerinde avantaj sağlamaktadır.

Karbon elektrotların çeşitleri:

a) Karbon Pastası Elektrodu (CPE): Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri aralarında bulunan zayıf bağlar sayesinde hızlı elektron transferine imkan sağlamaktadır. Grafit tozlarını bağlamak amacıyla, nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı gibi organik sıvılar kullanılmakta ve bu organik sıvıların miktarı arttıkça, elektron transfer hızı azalmaktadır. Susuz destek elektrolitlerde ve organik çözügen miktarının fazla olduğu destek elektrolit çözeltilerinde karbon pastasının çözelti içerisinde dağılmasından dolayı kullanım imkanı kısıtlıdır.

b) Camsı Karbon Elektrot (GCE) : Camsı karbon, fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000- 3000 °C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir (Özcan, 2015). Fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle camsı karbon, ilginç ve yaygın olarak uygulanan bir elektrot malzemesi haline gelmiştir. Oldukça küçük gözenek boyutları ve küçük bir gaz ve sıvı geçirgenliği ile birlikte camsı karbonu uygun bir inert elektrot haline getiren oldukça düşük bir yükseltgenme oranı ve oldukça yüksek bir kimyasal inertlik sağlaması ve bu özelliklerin getirdiği mekanik ve elektriksel özellikler ile sıklıkla kullanılmaktadır (Van der Linden ve Dieker, 1980). Camsı Karbon yapısı Şekil 5.' te verilmiştir.



Şekil 5. Camsı karbonun yapısı (Mercan, 2010)

c) Perde Baskılı Karbon (Grafit) Elektrotlar (SPCE): Perde baskılı elektrotlar genel olarak plastik veya seramik bir tabaka üzerine perde baskı tekniği ile bir film elektrodun tutturulmasıyla imal edilir. Perde baskı tekniğinde bir mürekkep bir perde kalemi yardımıyla yüzeye püskürtülür. Karbon ve platin bazlı mürekkepler çalışma elektrotlarında, gümüş baskı mürekkepler ise referans elektrotlarda kullanılır. Genellikle

küçük bir damla çözelti tüm elektrot yüzeyini kaplamaya ve analiz edilecek maddenin tayinine yeterlidir. Perde baskısında elektrot çözünürlüğü 1 mikrometreye kadar çıkabilen bu elektrotlar elektrokimyasal biyosensör yapımında da sıklıkla kullanılmaktadırlar (Bard, Inzelt ve Scholz, 2008).

Perde baskılı elektrotların önemli avantajları arasında kolay imal edilebilir olmaları, yine kolay bir şekilde modifiye edilebilmeleri ve ucuz olmaları sayılabilir (Metters ve Banks, 2013). Daha da önemlisi bu elektrotlar tek kullanımlık olduğundan kirlenmeye maruz kalmazlar ve yüzey problemlerinin daha az yaşanmasını sağlarlar. Bu özellikleri biyosensör olarak kullanımlarını da kolaylaştırır; çünkü kirlenme riski en aza indirgenmiş olur (Bagni ve Mascini, 2010). Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olarak görülmekte olan perde baskılı elektrotlar son dönemlerde yaygın kullanım göstermektedir. Gerçekleştirilen çalışmalarda perde baskılı elektrotlar ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. (Lucarelli ve diğerleri, 2002; Marazza, Chianella ve Mascini 1999). Tek kullanımlık bu elektrotların fabrikasyon üretim şartlarından dolayı iyi tekrarlanabilirliğe sahip olması ve oldukça küçük örnek miktarlarıyla çalışılması en büyük avantajlarındanır.

d)Kalem Grafit Elektrot (PGE): Kalem grafit elektrotların kullanımının yaygın olmasının en büyük sebepleri arasında; tekrarlanabilirliğinin diğer çalışma elektrotlarına kıyasla daha iyi olması gelmektedir. Ayrıca diğer elektrotlarla kıyaslandığında daha düşük belirtme alt sınırına sahiptirler. Ucuz ve tek kullanımlık olmaları kalem grafit elektrotların kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Ariksoysal, 2006). Ayrıca kalem grafit elektrotların maliyetinin düşük olmasından dolayı analiz maliyetlerini düşürmektedir. Bundan dolayı tek kullanımlık olarak kullanıma olanak vermektedir. Ardarda yapılan ölçümlerde diğer elektrotların yüzeylerinin temizlenmesi gerekirken, PGE yüzeylerinin temizlenmesine gerek yoktur. Bu sebeple, analiz öncesinde uzun süren temizleme ve parlatma işlemleri içermemetedirler. Ön hazırlık aşamasının (temizleme ve parlatma işlemleri gibi) kısa olmasından dolayı PGE ile ilgili çalışmalarda önemli bir zaman kazanımı da söz konusudur. PGE'ler sonuç olarak; diğer elektrotlarla kıyaslandığında, yüksek hassasiyet, iyi tekrarlanabilirlik, iyi mekanik sertlik, tek kullanımlık, modifikasyon kolaylığı, geniş potansiyel aralığı, ticari kullanılabilirlik, düşük teknoloji, düşük maliyet, kolay erişebilirlik, gibi birçok üstün özelliklere sahiptirler.

e)Metal Elektrotlar: Platin ve altın (Carpini ve diğerleri, 2004; Herne ve Tarlov 1997; Kara ve diğerleri, 2002a) en çok tercih edilen elektrotlardır. Bu elektrotlar yüksek elektron transfer kinetiklerine ve geniş bir pozitif potansiyel aralığına sahiptirler.

1.1.4. Voltametrik Referans Elektrotları

Deney boyunca sabit potansiyele sahip elektrotlardır. Analit konsantrasyonundaki değişimlerden veya destek elektrolitten etkilenmezler. Küçük akım değerleri referans elektrotların polarlanmasını sağlayamaz fakat yüksek akım değerlerinde ideal konumlarından sapmalar gözlenir. En yaygın kullanılan referans elektrotlar Ag/AgCl ve kalomel elektrotlardır. Bu çalışmada kullanılan Ag/AgCl referans elektrodu, doymuş kalomel elektroda göre daha yüksek sıcaklıklarda çalışmayaimkan vermesi, sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olması, kolay hazırlanabilmesi özelliklerinden dolayı tercih edilmiştir.

1.1.5. Voltamogramlar

Voltametrik dalga olarak bilinen doğrusal taramalı voltamogramlar sigmoidal (s şekilli) şeklindedir. Uygulanan gerilim karşısında meydana gelen akım sonucunda elde edilen eğrilere voltamogram denir. Aşamalı artış sonrasında akım sabit kalmaktadır ve bu sabit akıma sınır akımı, I_s denir. Analizlenecek maddenin kütle aktarımı ve elektrot yüzeyine taşınma hızı analiz sonucu meydana gelen akımla orantılıdır. Analizi yapılacak maddenin derişimi sınır akım ile doğru orantılıdır.

Aralarındaki bağlantı;

$i_s = k C_A$ şeklinde yazılmaktadır.

Bu denklemde; C_A analit derişimi ve k ise bir sabittir.

Analit derişimi genellikle 10^{-3} M ve daha büyük ise; $I_c < I_f$ 'dir ve doğru bir kantitatif analiz yapılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve daha düşük ise; $I_c > I_f$ olacağı için doğru sonuç alınamaz.

1.1.6. Voltametrik Akımlar

Voltametriye uygulanan gerilimin belli bir değerinde devreden geçen akım, analitin difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine taşınma hızı ile kontrol edilir ve bu hız $\partial C_A / \partial x$ ile verilir.

Burada x , cm cinsinden elektrottan olan uzaklığı göstermektedir. Düzlemsel bir elektrot için, akım;

$I = nFAD_A(\partial C_A / \partial x)$ şeklinde ifade edilir.

I = Amper cinsinden akımı,

N = Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

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

$A = \text{cm}^2$ cinsinden elektrot yüzey alanını,

$D_A = A'$ 'nın difüzyon katsayısını, (cm^2s^{-1})

$C_A = \text{mol/cm}^3$ cinsinden A 'nın derişimini göstermektedir.

Kapasitif akım (I_c): Elektrotelektrolit-analit çözeltisi içeren hücreye daldırıldığında negatif yükle yüklenir. Hücrede bulunan pozitif yüklü iyonlar negative yüklü elektroda doğru çekilmeye başlar. Bunun sonucunda ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Zıt yüklere sahip iyonlar ara yüzeyin her iki tarafında da birikerek elektriksel çift tabakanın oluşmasına sebep olurlar. Oluşan bu tabaka kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörün yüklenmesiyle ortamda negatif ya da pozitif iyon olmasa bile akım oluşur. Reaksiyona bağlı olmayan sistem kaynaklı bu akıma kapasitif akım adı verilir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır.

Faradayik akım (I_f): Analiz edilen madde ve elektrot arasında elektrokimyasal etkileşim yoluyla meydana gelen akımlar faradaik akım olarak ifade edilmektedir. Elektrot ve elektrolit ara yüzeyindeki elektronların hareketi boyunca yükseltgenme veya indirgenme işlemlerinin meydana geldiği ve Faraday Yasalarıyla (Bir elektrottaki kimyasal madde ne kadar fazla ise geçen akım da o kadar fazladır.) uyumlu olduğundan faradayik akım adını alır (Wang, 2006).

$I = I_f + I_c$ olduğundan I_c azaldığında duyarlılık artmaktadır.

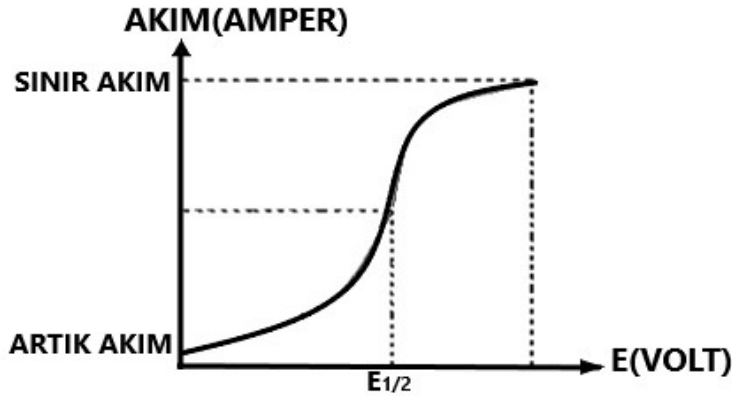
1.1.7. Voltametrik Teknikler

Polarografi: Polarografi, akım-voltaj eğrilerindeki akımın uygulandığı potansiyeli bir fonksiyon olarak irdeleyen ve çalışma (indikatör) elektrodunun polarize olduğu koşullarda gerçekleşen voltametrik bir yöntemdir. Bu yolla elde edilen akım – gerilim eğrisine de polarogram denir. Elektroanalitik kimyanın babası olarak kabul edilen Çekyalı kimyager Jaroslav Heyrovsky'nin 1920'li yılların başında polarografiyi buluşu ile başlayan süreçte elektrolitik bir hücredeki akım-potansiyel ilişkileri, ilk kez bu yöntemle ortaya koyulmuştur. Daha sonra bu teknik geliştirilerek voltametri yönteminin doğması sağlanmıştır. Polarografi, özellikle doğrusal taramalı voltametrik yöntemin temelini oluşturan bir tekniktir. Zaman içerisinde geliştirilince artık voltametrinin bir alt dalı olarak karşımıza çıkmaktadır; ancak bu yöntemin diğer voltametrik tekniklerden ayrıldığı nokta çalışma elektrodu olarak damlayan cıva elektrodun kullanılmasıdır. Temelde her element, ne tür bir durumda olursa olsun, polarografik yöntemle analiz edilebilir. Herhangi bir maddenin polarografik davranışı kendine özgü olduğundan yöntem, seçiciliğin gerektiği

analizlere gayet uygunluk gösterir (Skoog, Holler ve Nieman, 1998; Tural, Gökçel ve Ertaş, 2003).

Şekil 6.'daki polarogramda belirtildiği üzere belirli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılmaktadır. Ulaşılan plato bölgesindeki bu akıma sınır akımı adı verilmektedir. Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçükte olsa bir akım gözlenmektedir Bu akıma artık akım denir. Sınır akım ile artık akım arasındaki yüksekliğe dalga yüksekliği adı verilir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile doğrusal olarak arttığından polarografi, aynı zamanda kantitatif analizlerde de kullanılabilir (Yılmaz, 2016).

Derişimden bağımsız olan ve sınır akımının yarısına eşit olan akıma karşılık gelen potansiyele yarı dalga potansiyeli denir ve $E_{1/2}$ şeklinde gösterilir. Bu değer elektroaktif maddenin konsantrasyonuna bağlı olmamakla birlikte standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir. Yarı dalga potansiyelinin her madde için karakteristik olmasından dolayı polarografi kalitatif analizlerde de kullanılabilir (Yılmaz, 2016).

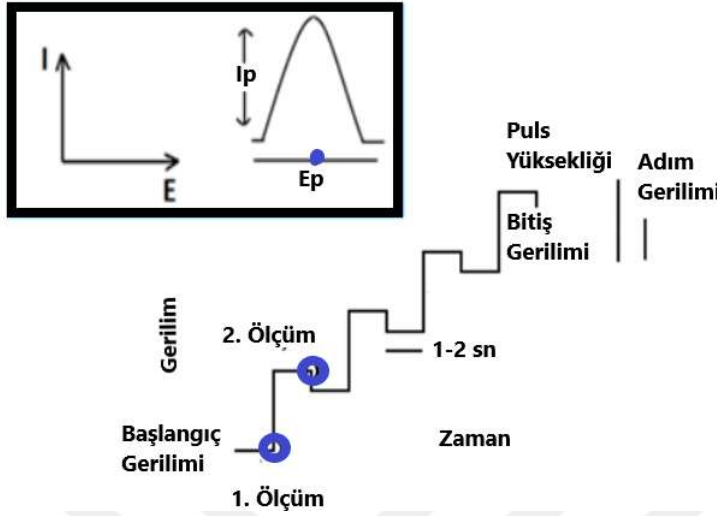


Şekil 6. Polarografide akım potansiyel grafiği (Yılmaz, 2016).

Diferansiyel puls voltametri (DPV): Sabit ya da değişen doğru akım sinyali üzerine bir kare dalganın çakıştırılması ile oluşan bir uyarıcı sinyalin uygulandığı voltametri tekniğidir. Sıvı ve dokulardaki elektroaktif maddelerin miktar tayininde geniş kullanım alanına sahiptir.

Akım, uyarma sinyalinden hemen önce ve uyarma sinyalinin sonuna doğru iki kere ölçülür. Bu durum Şekil 7.'de ölçüm 1 ve ölçüm 2 olarak gösterilmektedir. İki nokta arasındaki akım farkı, uygulanan artan gerilimin fonksiyonu olarak kaydedilmektedir. Uygulanan gerilime karşı elde edilen akımdaki fark grafiğe geçirildiğinde oluşan diferansiyel eğri pik şeklindedir ve yüksekliği analitin derişimiyle doğru orantılıdır.

Her bir analite ait pik potansiyeli (E_p), yarı-dalga potansiyeline ($E_{1/2}$) bağılı olarak;
 $E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$ Şeklinde ifade edilmektedir.



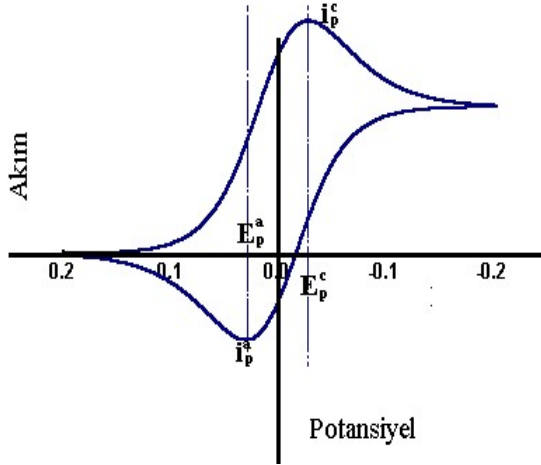
Şekil 7. Diferansiyel Puls Voltametri tekniğinde uygulanan uyarma sinyali (Yazar tarafından çizilmiştir)

Eşitlikte; ΔE , uyarma sinyalinin genliğidir ve genliğin ve gerilimin dikkatli seçilmesiyle duyarlılık daha da artırılabilir. Bazen 50 mV'luk bir gerilim farkı ile pikler birbirinden ayırt edilebilir. Dönüşümsüz redoks sistemlerinde daha düşük ve daha geniş akımlar (duyarlılık daha zayıf) elde edilmektedir.

Yöntem duyarlılığı 10^{-8} M'a kadar düşmektedir, bunun sebebi ise faradayik akımın artması, faradayik olmayan yükleme akımının ise azalmasıdır. Yani sinyal/gürültü oranı iyileştirilerek, analizdeki hassasiyet ve duyarlılık artırılmıştır (Bard ve Faulkner, 2001; Skoog ve West, 1982).

Kare dalga voltametrisi (SWV): Kare dalga voltametrisi, uygulanan gerilim şeklinden dolayı pulslara benzerlik gösterir fakat bu yöntem bir puls tekniği olarak ifade edilemez. Akım sinüsoidal akım gibi değişir zaman içinde değişimi kare şeklindedir. Periyodun bir yarısında potansiyel negatif değer alırken, diğer yarısında pozitif değer alır. Bu teknik diğer voltametrik tekniklerden çok daha hızlı tarama imkanı sağlar. Voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha kısa bir sürede bitirilir. Ölçüm hızı son derece yüksek olduğu için analizin kesinliğini artırma amaçlı birkaç voltametrik taramanın ortalaması alınabilmektedir. Hızlı, yüksek duyarlılıklı bir teknik olması dolayısıyla Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC) daha çok kullanılmaktadır (Skoog ve Leary, 1996; Thiel ve diğerleri, 1997; Tural, Gökçel ve Ertaş, 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

Dönüşümlü voltametri (CV): En yaygın kullanılan voltametri yöntemidir. Genel olarak kalitatif tayinde tercih edilir. İndirgenme ve yükseltgenme tepkimlerinin aydınlatılmasında ve elektrotlarda oluşan tepkime sonucu oluşan ürünlerin piklerini saptamada sıkça uygulanmaktadır. Tayinde çalışma elektroduna uygulanan gerilim sabit bir değere ulaşana dek arttırılır, daha sonra aynı hız ve eğimde başlangıç noktasına kadar indirilir (Skoog ve West, 1982; Wang, 2006). İleri ve geri yönde tarama, birden fazla uygulanabilmektedir. İleri yönde tarama sırasında bir indirgenme tepkimesi olmuşsa, geri yöndeki pik indirgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden yükseltgenmesinden dolayı oluşur (Bard ve Faulkner, 2001). Analitin hangi potansiyelde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal olarak tersinir olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir (Şekil 8.).



Şekil 8. Dönüşümlü voltametri için potansiyel uyarma sinyali ve elde edilen voltamogram (Bogdan ve diğerleri, 2014)

Sıyırma voltametrisi (SV): Sıyırma analizleri en hassas elektrokimyasal tekniklerden biridir ve bu nedenle özellikle eser miktardaki metallerin miktar tayininde kullanılır. Bu büyük hassasiyetin nedeni etkili bir ön biriktirme aşamasının son derece iyi bir sinyal yaratan gelişmiş ölçüm işlemleri ile birleştirilmesidir. Metaller elektrotta önceden biriktirildiği için çözelti fazlı voltametrik ölçümlere göre daha düşük tayin sınırlarına, 10^{-10} M'lık bir düşük tayin sınırına, ulaşmak mümkündür (Wang, 2006).

Temel olarak sıyırma analizi iki aşamalı bir tekniktir ve civa elektrotlarla (asılı damla civa elektrot veya ince civa film elektrot) kullanılır. İncelenecek malzeme ya civa içinde indirgenir ve amalgamlar oluşturması sağlanır; ya da çözünemeyen bir civa tuzu oluşturmak üzere adsorplanır. Yöntemin ilk aşamasında çözeltideki metal iyonların küçük bir kısmının civa elektrot üzerinde depozisyonu sağlanır; böylelikle metalin önbiriktirme

işlemi gerçekleştirilmiş olur. Bu işlemi sıyırma aşaması (ölçüm aşaması) takip eder; bu aşamada da elektroliz sona erdirilir, karıştırma durdurulur, depozisyonu sağlanan birikintinin çözünmesi (sıyırma) sağlanır. Depozisyon ve ölçüm aşamalarının doğasına göre farklı sıyırma analizleri uygulanabilir (Wang, 2006).

Ön biriktirme işleminde çözelti içinde mevcut olan analiz edilecek maddenin küçük bir yüzey alanına sahip elektrot yüzeyinde biriktirilmesi amaçlanmaktadır. Bu işlem maddenin elektrot yüzeyine taşınmasını gerektirir ve genellikle kullanılan tekniğe göre değişen sürelerde (30 sn ile 30 dk arasında) gerçekleşir. Her ne kadar ön biriktirme daha düşük tayin sınırlarına ulaşmaya imkan tanısa da sürecin uzunluğu pratik bazı zorluklar yaratmaktadır. Düşük tayin sınırına ulaşma ve analitik pratiklik arasındaki dengeye nitekniklerle daha etkin bir biçimde sağlanabilmektedir (Von Wandruszka, 1992).

Ön biriktirme işlemi iki şekilde yapılabilir. İlki ve daha eski olanı çoğunlukla metal iyonları için uygulanmakta olup bir civa elektrot üzerinde katodik depozisyon yoluyla biriktirme sağlanır. Analiz edilecek madde civa damla veya film ile amalgam hale getirilir ve anodik sıyırma yoluyla metal iyonları elektrot yüzeyinden kurtarılarak yeniden çözeltiye döndürülür. Ortaya çıkan anodik sıyırma akımı analitik sinyali oluşturur. İkinci ve daha yeni olan teknik ise analiz edilecek maddenin elektrot yüzeyine adsorplanmasıdır. İlk yöntemin aksine bu faradayik olmayan bir işlemdir ve açık devre şartlarında veya en uygun adsorpsiyonu sağlayan potansiyellerde gerçekleştirilir. Biriktirme işleminden sonra yine ilk yöntemin aksine katodik sıyırma uygulanarak adsorbe edilen maddenin indirgenmesi ve böylece yeniden çözünmesi sağlanır. Bu işlemde yalnızca sıyırma kısmı faradayiktir (Von Wandruszka, 1992).

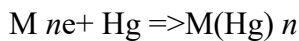
Sıyırma voltametriyi çok farklı alanlarda uygulanabilmektedir. Bu alanlardan ilki ilaç analizleridir. Son yıllarda pek çok ilaç etken maddesinin tayininde sıyırma voltametriyi kullanılmaktadır. Bu alandaki uygulamalara örnek olarak adsorptif sıyırma voltametriyi yöntemiyle Tadalafil'in elektrokimyasal davranışının analizi (Demir ve diğerleri, 2014), aynı yöntemle metildopa'nın miktar tayini (Rezaei, Askarpour ve Ensafi, 2013), katodik adsorptif sıyırma voltametriyi yöntemiyle nimodipin'in miktar tayini (Gupta ve diğerleri, 2011) ve anodik sıyırma voltametriyi yöntemiyle farmasötik tabletlerde eser elementlerin tayini gösterilebilir.

Bu yöntemin ikinci bir uygulama alanı çevre analizleridir. Sıyırma voltametriyi özellikle deniz suyu ve içme suyunda metal kirliliği analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak deniz suyunda bulunan çinkonun miktar tayini için kullanılan deneysel parametrelerin optimizasyonu (Arancibial ve diğerleri, 2010), yine deniz

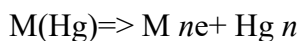
suyunda bulunan sub-nanomolar derişimlerdeki kurşunun miktar tayini (Wu ve Batley, 1995), içme suyunda kurşun ve antimon tayini (Fang., Zhang ve Zhou, 2015) sayılabilir. Dört çeşit sıyırma voltametrisinden söz etmek mümkündür; bunlar anodik sıyırma voltametrisi, katodik sıyırma voltametrisi, potansiyometrik sıyırma voltametrisi ve adsorptif sıyırma voltametrisidir.

Sıyırma voltametrisi aynı zamanda klinik uygulamalarda da kullanılmakta ve insan kanında, idrarında ve dokularında çeşitli analizlerin yapılmasına imkan tanımaktadır. İnsan kanında bakır, kurşun ve kadmiyum gibi metallerin miktar tayininin yapıldığı çalışmalar (Attar, Harek ve Larabi 2013; Attar ve diğerleri, 2012), yine insan kanında kaptopril gibi ilaç etken maddelerinin tayininin yapıldığı analizler (Ensafi ve Hajjan, 2008), idrarda ilaç etken maddelerinin tayininin yapıldığı incelemeler (Ardila ve diğerleri, 2013) ve biyolojik dokularda kurşun, çinko, kadmiyum ve bakır tayininin yapıldığı çalışmalar sıyırma voltametrisinin klinik uygulamalarına örnek gösterilebilir.

Anodik Sıyırma Voltametrisi (ASV): Tüm sıyırma voltametrisi teknikleri içinde en sık kullanılan teknik ASV'dir. Bu teknikte çalışma elektrodu depozisyon işlemi süresince katot, sıyırma işlemi süresince anot davranışı göstermektedir ve analit orjinal formuna geri dönecek şekilde yükseltgenir (Skoog, Holler ve Nieman 1998). Bu teknikte incelenecek malzemeler küçük hacimli civa elektrotlar üzerinde önbiriktirme işlemine tabi tutulur. Önbiriktirme işlemi kontrol edilen bir süre ve gerilim altında katodik biriktirme ile gerçekleştirilir. Biriktirme potansiyeli genellikle 0.3 – 0.5 V aralığında ve en zor indirgenen metal iyonunun belirlenebileceği potansiyelden daha negatif potansiyeldedir. Metal iyonları civa elektroda difüzyon veya konveksiyon yoluyla ulaşır, orada indirgenir ve amalgam olarak birikirler. Bu birikimi gösteren formül aşağıdadır (Wang, 2006):



Konveksiyonel taşınım elektrot rotasyonu veya çözeltinin karıştırılması ile elde edilir. Depozisyon süresi metal iyonlarının derişimine bağlı olarak seçilir; $10^{-7}M$ 'lık bir seviye için 0,5 dakikadan daha az bir süre yeterliyken $10^{-10}M$ 'lık bir seviye için yaklaşık 20 dakikalık bir süreye ihtiyaç vardır. Depozisyonun önceden seçilen süresini takiben, konveksiyon durdurulur ve potansiyel anodik, doğrusal veya daha hassas potansiyel-zaman (puls) dalga formları ile ölçülür. Anodik tarama süresince, amalgam oluşturan metaller yeniden yükseltgenir ve elektrot yüzeyinden sıyrılır; oluşan yükseltgenme (sıyırma) akımı şöyledir (Wang, 2006):



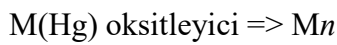
ASV'nin en önemli avantajı çok küçük miktarda analitin çok düşük derişimlerde

tain edilebilmesine imkan sağlamasıdır. İyi kesinlik ve doğruluk $0,1 \times 10 \mu\text{g L}^{-1}$ kadar düşük aralıklarda sağlanabilir. Bu nedenle bu teknik özellikle hava, su, gıda, toprak ve biyolojik örneklerde eser miktarda metallerin saptanmasında sıklıkla tercih edilen bir tekniktir (Cummings, 2010).

Katodik Sıyırma Voltametrisi (KSV): Katodik sıyırma voltametrisi ASV'nin tam tersi bir yöntemdir. Bu yöntemde elektrot depozisyon sürecinde anot olarak, sıyırma sürecinde ise katot olarak davranır (Skoog, Holler ve Nieman, 1998). Analitin anodik depozisyonunu içeren bu yöntem negatif giden bir potansiyel taramasında sıyırma ile devam eder (Wang, 2006). Diğer bir deyişle önce analizi yapılacak madde elektrot üzerinde yükseltgenir ve çözünmeyen bir film oluşturur (önderişim basamağı); ardından bu madde negatif bölgede indirgenerek ölçümü yapılır (sıyırma basamağı). Sonuçta ortaya çıkan indirgenme pik akımı istenen kantitatif bilgiyi ortaya koyar. KSV genellikle organik ve inorganik bileşiklerin ölçümünde kullanılır; ölçüm için bu bileşiklerin civa ile çözünmeyen tuzlar oluşturması gerekir. Bu bileşikler arasında çeşitli tiyoller veya penisilinler, siyanür ve sülfid sayılabilir. Bu yöntemle oldukça hassas sonuçlara ulaşılabilir. Bu yöntemde gümüş disk elektrot veya bakır bazlı elektrotlar gibi farklı türlerde elektrotlar kullanılabilir (Wang, 2006).

Potansiyometrik Sıyırma Voltametrisi (PSV): Sıyırma potansiyometrisi veya kronopotansiyometrik sıyırma voltametrisi adlarıyla da anılan bu yöntemde ASV'de civa elektrot üzerinde elektrodpozisyonu yapılan metalleri oksitlemek için kullanılan potansiyel süpürme işlemi yerine, yükseltgenmeyi sağlamak için kimyasal olarak yükseltgeyici ve miktarı belirli bir çözelti eklenir. Daha sonra da sistemin potansiyeli zamanın bir fonksiyonu olarak görüntülenir. Her bir metal yükseltgendiğinde, mevcut miktarı yansıtacak zaman aralıklarındaki elektropotansiyelini kontrol eder. Bu yöntemin temel avantajı örnekte bulunan oksijenin analizden önce ortadan kaldırılmasına gerek duyulmamasıdır. Ayrıca bu yöntemde kullanılan işlem indirgenebilir veya yüzey aktif organik maddelerin varlığına daha az duyarlıdır (Pickering, 2002, 26-27).

PSV'de önderişim aşamasından sonra potansiyostatik kontrole son verilir ve konsantr edilmiş metaller çözeltide bulunan bir yükseltgeyici ile (örneğin, O_2 veya Hg (II)) yeniden yükseltgenir (Wang, 2006):



Sıyırma aşamasında ise yükseltgeyicinin taşınımını kolaylaştırmak için karıştırılmış bir çözelti kullanılır veya yükseltgenme elektrottan sabit bir anodik akım geçirilerek sağlanır. Yükseltgenme aşamasında çalışma elektrodunun potansiyelindeki değişimler

kaydedilir ve bir sıyırma eğrisi elde edilir. İncelenen metalin yükseltgenme potansiyeline ulaşıldığında, potansiyel taraması yükseltgeyici veya akım sıyırma için kullanıldığından yavaşlar. Elektrottaki her bir metalin tükenmesine keskin bir potansiyel basamağı eşlikeder. Elde edilen potansiyogram bir redoks titrasyon eğrisinde olduğu gibi sıyırma platoları içerir. Analiz edilen metalin yükseltgenmesi için gereken zaman (t_M) metalin örnek derişiminin kantitatif ölçümüdür (Wang, 2006).

Adsorptif Sıyırma Voltametrisi (AdSV): AdSV yöntemi de genellikle eser elementlerin ölçümün de kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde hem voltametrik, hem de potansiyometrik sıyırma teknikleri, negatif yönlü potansiyel taraması veya sabit katodik akımla beraber adsorplanmış kompleksin ölçümünde kullanılabilir. Bu yöntemin işlemlerinin çoğunda adsorplanmış kompleksin içindeki metal indirgenir. Maksimum adsorpsiyon yoğunluğu ise adsorplanmış kompleksin boyutuna ve yüzey derişimine bağlıdır (Wang, 2006). Yöntem, kullanılan elektrotların analitin karıştırılan bir çözeltisine belirli bir süre daldırılarak fiziksel adsorpsiyon yoluyla analitin elektrot yüzeyinde biriktirilmesi ile başlar. Yeterli miktarda analitin biriktirilmesinin ardından bu birikim farklı voltametrik yöntemlerle tayin edilir (Bard, Inzelt ve Scholz, 2008).

Her ne kadar adsorpsiyon süresi biriktirilecek maddenin ürüne göre değişse de, genellikle 1 – 5 dakikalık kısa adsorpsiyon süreleri ile etkin sonuçlar alınabilmektedir. Bu iki özelliği bu Yöntemle uranyum, vanadyum, alüminyum ve molibden gibi metaller için oldukça düşük tayin sınırlarına ulaşılabilmesini mümkün kılar (10^{-10} – 10^{-11} M). Bu tayin sınırı platin, titanyum, kobalt gibi metallerde adsorptif biriktirme katalitik tepkimelerle birleştirildiğinde 10^{-12} M'a kadar çıkabilmektedir (Wang, 2006). İzmetallerin yanısıra AdSV yöntemi yüzey aktif özellik gösteren bazı organik bileşiklerin (örneğin kardiyak veya antikanser ilaçlar, nükleik asitler, vitaminler, pestisitler) tayininde de kullanılır. Redoks aktivitelerinin türüne göre bu maddelerin tayini yükseltgenme veya indirgenmeyle belirlenir (Wang, 2006).

1.2. Sensörler

En basit tanımıyla sensör mekanik hareket, ısı, ışık, ses, manyetik veya elektriksel bir etkiyi ölçülebilir ve kaydedilebilir bir elektrik sinyaline dönüştüren aygıtlardır (Khanna, 2011). Diğer bir tanımla sensör farklı formlardaki enerjileri (bunlar termal, mekanik, optik, elektrik, manyetik, radyoaktif, kimyasal veya biyokimyasal olabilir) başka bir enerji formuna, özellikle de elektrik enerjisine dönüştürmeye yarayan aygıtlardır (Andreu ve diğerleri, 2010).

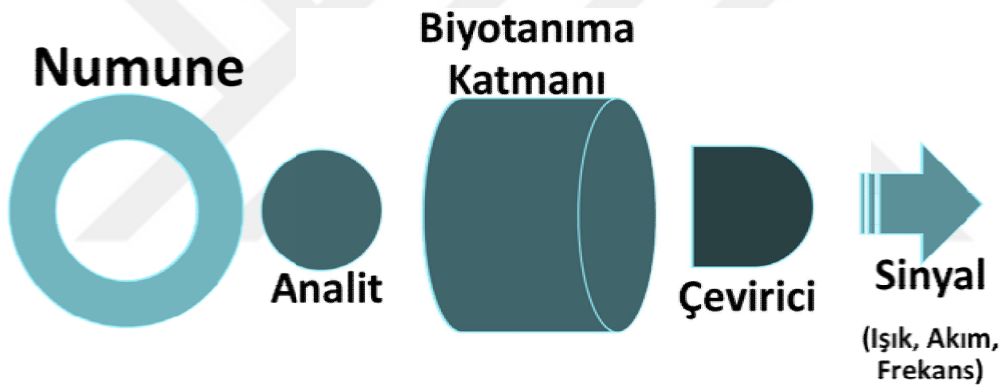
1.2.1. Biyosensör

Son yıllarda, birçok farklı tipte biyosensör, biyomedikal, çevresel, araştırma ve birçok alanda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Uluslararası saf ve uygulamalı kimya (IUPAC) tarafından biyosensör için yapılan tanım şöyledir; “Biyosensler izole edilmiş enzimler, immunosistemler, organlar, organeller veya tüm hücrelerce meydana getirilen spesifik biyokimyasal reaksiyonları kullanarak kimyasal bileşikleri elektriksel, termal veya optik sinyaller aracılığıyla algılayan cihazlardır”.

Bundan dolayı, genel bir tanım olarak biyosensörleri iki-bileşenli sistemlerden oluştuğunu söyleyebiliriz (Şekil 9.).

1) Hedefle spesifik bağlanma yapan veya biyokimyasal reaksiyona giren bir biyolojik tanıma elementi (ligand).

2) Bir sinyal çevirici ünitesi (transduser, çevirici).



Şekil 9. Biyosensörün temel bileşenleri (Yazar tarafından çizilmiştir)

Biyosensörler, biyolojik işlemlerin yapısına bağlı olarak iki ana sınıfa ayrılır.

1) Enzimlerin, hücrelerin, bakteri veya dokuların immobilize bileşenler olarak kullanıldığı aygıtlar, yani enzim metaboliksensörler,

2) Antikor/antijen, membran alıcılar veya nükleik asitlerin kullanıldığı afinite sensörleri.

Çeviriciye Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması:

- 1) Optik,
- 2) Piezoelektrik,
- 3) Termal ve
- 4) Elektrokimyasal biyosensörler olarak dört gruba ayrılır.

Optik biyosensörler, etkileşim sonucunda meydana gelen absorplanan ya da açığa

çıkan ışık şiddetinin ölçülmesi temeline dayanır. Bu biyosensörler temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi prensipler çerçevesinde çalışırlar. Piezoelektrik biyosensörler, analit ile biyobileşen arasındaki etkileşim sonrası meydana gelen kütle değişiminin ölçülmesi temeline dayanır.

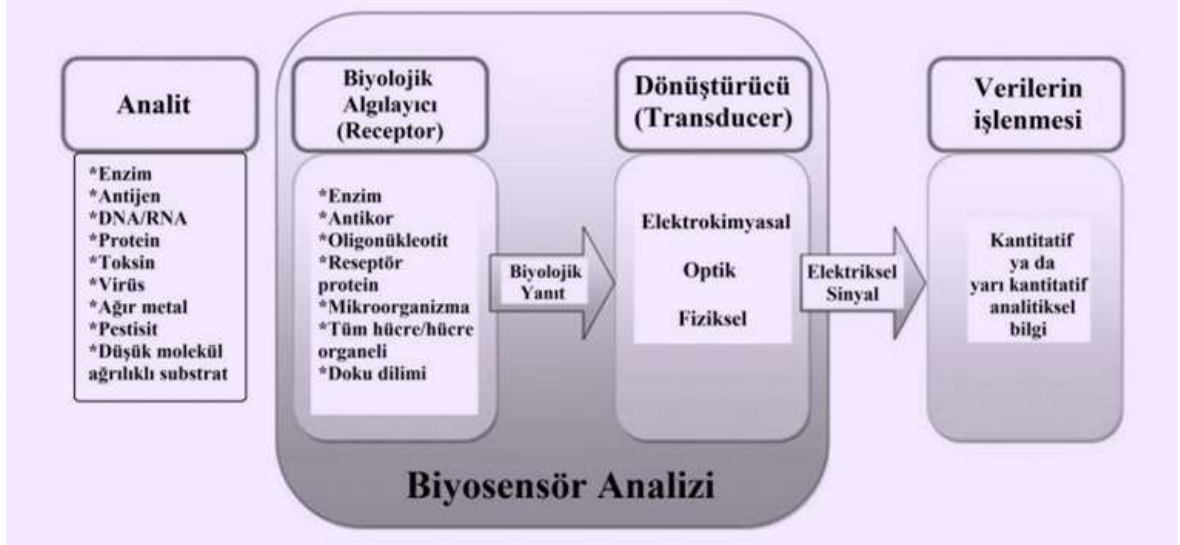
Piezoelektrik bir kristal yüzeyinde analit biriktiği zaman kristalin rezonans frekansında farklanma meydana gelir ve bu farklanmanın ölçülmesi sinyal olarak kabul edilir. Kalorimetrik (termal) biyosensörler, analit ile biyobileşen arasında meydana gelen enzimatik reaksiyondaki ısı değişiminin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Enzimatik reaksiyonların ekzotermik özelliğinden faydalanılır. Elektrokimyasal biyosensörler, etkileşim sırasında elektrokimyasal türlerin harcanıp oluşurken ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeline dayanır. Literatüre ilk kazandırılan biyosensör bir elektrokimyasal biyosensördür (Clark Jr, 1962). Farklı biyosensör türlerinin kullanım alanlarına göre farklı dezavantajları ortaya çıkmaktadır. Örneğin, optik sensörler bulanık ortamlarda kullanılamazlar. Piezoelektrik biyosensörlerin kullanım alanları kısıtlıdır.

Termal biyosensörler ise küçük ısı değişimlerinin meydana geldiği sistemlerde yüksek hassasiyette kullanılamazlar. Bu tip olumsuzlukların çoğu elektrokimyasal biyosensörlerde yaşanmamaktadır.

Özellikle, tek kullanımlık elektrot teknolojisi kullanım kolaylığını oldukça artırmaktadır. Bu elektrotlar düşük maliyet ve seri analiz sistemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca, elektrokimyasal ölçüm sistemleri küçük boyutlarda, taşınabilir ve ekonomiktir. Bulanık ortamlarda çalışılabilme elektrokimyasal sensörlerin en önemli avantajlarından biridir (Thevenot ve diğerleri, 2001). Bu sebeplerden dolayı elektrokimyasal biyosensörler oldukça ilgi çekmektedir (Kuralay ve Demirci, 2014).

Günümüzde en yaygın kullanım alanına sahip olan elektrokimyasal sensörler, üzerinde bir veya birden fazla biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde meydana gelen biyo-etkileşim sonucunda analiz edilen türler harcanır ya da üretilmektedir. Böylece elektrokimyasal sinyal farklanması meydana gelmektedir. Bu biyosensörler, oldukça düşük duyarlılığa sahiptirler, küçük boyutlardadırlar ve ucuzdurlar. Klasik elektrokimyasal yöntemlerde sadece elektroaktif maddelerin analizleri gerçekleştirilirken, teknolojinin gelişimiyle beraber sensör sistemlerine biyolojik materyallerinde dahil olmuştur. Biyolojik materyallerin sensör sistemlerine dahil olmasıyla diğer birçok maddenin tayinini gerçekleştirmek mümkün olmuştur. Bununla birlikte biyomateriyalin çeşitli ortam koşulları, örneğin; pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi etkilenmesi durumunda biyosensörün çalışma ömrü

kısalabileceğinden dezavantaj oluşturmaktadır. Biyosensörlerin tanıyıcı katmanında görev alan biyomateryaller, çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar ve geniş kullanım alanına sahiptirler (Şekil 10.).



Şekil 10. Biyosensörün sınıflandırılmasının şematik gösterimi (Karakaya, 2019)

Kullanılan Biyotanıma Elementine Göre Sınıflandırma: Biyotanıma elementleri, hedef analitleri tanımadaki rolünden dolayı biyosensörlerin önemli parçalarıdır. Bu yüzden biyotanıma elementinin seçimi tamamen hedef analite bağlıdır ve tanıma elementinin hedefe yüksek bağlanma affinitesine ve stabilitesine dikkat edilir. Klasik tanıma elementleri enzimler, antikorlar, nükleik asitler ve hücrelerdir. Fakat son zamanlarda fajlar, aptamerler, moleküler baskılanmış polimerler (MIP) ve affikorlar dikkat çekmektedir (Justino ve diğerleri, 2015).

Enzimler: Enzimatik biyosensörlerde, enzim substratı ile seçici bir şekilde etkileşime girer. Enzimatik biyosensör sistemleri enzimlerin katalizini ve/veya hedef tarafından inhibisyonunu ölçebilirler.

a) Enzim analiti metabolize edebilir, böylece analit konsantrasyonu analitin katalitik transformasyonu ile ölçülür.

b) Enzim analit tarafından inhibe edilebilir, böylece analit konsantrasyonu enzimatik ürün oluşumunun azalması ile ilişkilidir (Wang ve diğerleri. 2004).

Bu durumda, biyosensör sırasıyla üretilen veya tüketilen türleri tespit eder. Genellikle, enzimatik biyosensörlerde sadece bir enzim kullanılır fakat multi-enzim sistemlerinde kombine enzimler aynı platformda birleştirilir (Crew ve diğerleri, 2011).

Antikorlar: Antikorlar biyosensörlerde kullanılan popüler affinite tanıma

elementlerindendir. Gıda güvenliği, çevresel izleme, klinik analizler ve mekanik teşhis gibi bir dizi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Justino, Rocha-Santos ve Duarte, 2013).

Nükleik Asitler: Biyokimyasal bileşeni nükleik asitler olan biyosensörlerdir. Bu biyosensörlerde bütün bir DNA zinciri değil, küçük parçaları kullanılır ve DNA probu olarak adlandırılan bu parçalar, DNA yapısının özgünlüğünü bir bütün olarak yansıtacak şekilde seçilirler. DNA problemleri, polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla DNA amplifikasyonu ile sentezlenir. DNA sensörlerinde ayrıca; doğal analogu olmayan, belirli biyomoleküllerle etkileşime girme yeteneklerine göre seçilen oligonükleotit dizileri de kullanılabilir. Bu sentetik nükleik reseptörler aptamerlerin adını almıştır. Aptamerler neredeyse antikorlar kadar seçicidir ve kararlılığı antikorlardan daha fazladır. Aptamerlere dayanan DNA biyosensörleri aptasensörler olarak adlandırılır. Bu tip biyosensörler, genetik bozuklukların tayini ve genetiği değiştirilmiş organizmalarla elde edilen ürünlerin tayini gibi amaçlar için kullanılabilirler (Rafique ve diğerleri, 2019).

Hücreler: Canlı organizmalar örneğin bakteri, fungi, maya, alg ve doku-kültür hücreleri tanıma elementi olarak biyosensörlerde kullanılırlar. Hücre temelli biyosensörlerde, analitik sinyal yaşayan canlı organizmanın genel metabolik durumunun ölçülmesi ile tespit edilmektedir. Böylece, büyümenin inhibisyonu, hücre canlılığı ve substrat alımı analitik sinyal olarak değerlendirilir. Biyotanıma elementi olarak hücrelerin enzimlere göre; yüksek stabilite, azaltılmış saflaştırma basamakları gereksinimi, ucuz hazırlama maliyeti, yeterli kofaktör rejenerasyonu gibi çeşitli avantajları vardır.

Fajlar: Fajlar, bakterileri enfekte eden virüslerdir ve yüzeylerinde peptid ve protein bulundurlar, böylece patojenleri tespit etmede biyotanıma elementi olarak kullanılır. Ev sahibi bakteri üzerinde bulunan spesifik reseptör moleküllerin tanınması ile olay gerçekleşir. Fajbiyosensörleri, immunosensörlere göre çevre koşullarına daha dayanıklıdır (Subramanian ve diğerleri, 2013). Bununla birlikte fajlar bakterilerin tespitinde bakterilere olan spesifikliğinden dolayı oldukça başarılıdır. Çünkü, fajlar bakterilere spesifik olacak şekilde genetik mühendislenmiştir ve sağlam, düşük maliyetli ve üretimi ucuzdur.

Aptamerler: Aptamerler kısa zincirli 30-40 nükleobazdan oluşan in vitro ortamda hayvan ve hücre kültürüne gereksinim duyulmadan sentezlenen oligonükleotidlerdir (RNA ve tek iplikli DNA). Aptamerlerin hedeflere yüksek affinitesi vardır. Aptamerler tipik olarak benzersiz 3 boyutlu yapıya katlanır ve bu katlanma hedef analitlere spesifik bağlanmaya izin verir. Aptamerler, termal olarak stabil olmaları, tekrar kullanılabilir olmadan immobilizasyon için kolay modifiye edilebilir olmaları gibi avantajlara

sahiptirler. Kimyasal modifiye edilebilir olması analitin stabilitesini, affinitesini ve spesifikliğini artırır. Ek olarak, çok yönlülüğü ve üretim sırasında hayvan kullanımından kaçınması antikorlarla kıyaslandığında en büyük avantajlarından biridir. Aptamerler bir dizi hedef analitlere örneğin toksinler, antibiyotikler ve biyomarkernlara bağlanabilir (Justino ve diğernleri, 2015).

Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP): Son yıllarda biyosensörlerin birçok prototipi örneğin, enzim ve antikorların ekstrem koşullarda düşük stabiliteden dolayı ticari hale gelememektedir. Bu yüzden biyotanıma elementi olarak MIP gibi sentetik matrikslerin kullanımı dikkat çekmektedir. MIP'ler yüksek seçicilik, stabilite, sentezinde kısa süre gereksinimi, yüksek termostabilite ve ucuz maliyet gibi avantajlara sahiptir. MIPler, fonksiyonel monomerlerin elektrokimyasal polimerizasyonu ile hedef analit ve çapraz bağlayıcı içeren karışım içinde üretilir. Bu yüzden, MIP'ler geometrilerden dolayı hedef moleküllerle olan etkileşimlerinde spesifiktir ve bağlanma spesifikliğı tipik antikor-antijen etkileşimi ile aynıdır. Hedef analiti taklit eden kalıp molekül, moleküler oyuklara tanıma yerlerinin varlığında seçici olarak bağlanır. Bu durumda MIP'ler moleküler baskılanmış boşluklar ile sentetik çapraz bağlanmış materyaller olarak düşünülebilirler. Bu boşluklarda yapay tanıma yerleri mevcuttur ve bu sayede doğal reseptörün (örneğin, antikor) biyolojik aktivitesini taklit ederler (Chen ve diğernleri, 2011).

Kullanılan Biyotanıma Elementlerinin İmmobilizasyon Yolları: Biyosensörlerin güvenilir bir şekilde çalışması için, biyolojik tanıma bileşeni çevirici yüzeyine bağlanması gerekir. Bu işleme biyolojik bileşenin immobilizasyonu denir. İmmobilizasyon, biyomoleküllerin, inert bir ortam içine hapsedilerek ya da kimyasal veya fiziksel olaylarla çevirici yüzeyine bağlanması anlamına gelir. Biyomoleküllerin immobilizasyonunun yapılabilmesi için beş temel yöntem vardır (Korotkaya, 2014):

Adsorpsiyon: Bu yöntem, biyosensör bileşenlerine önemli bir ön işlem yapılmasına veya özel amaçlı kimyasalların kullanılmasına ihtiyaç duyulmayan en basit immobilizasyon yöntemidir. Bu yöntemde hem fiziksel hem de kimyasal adsorpsiyon kullanılabilir. Fiziksel adsorpsiyonda, biyomolekül yüzeyde van der Waals kuvvetleri, iyonik etkileşimler veya hidrojen bağları ile tutulur. Biyomoleküller ile çevirici arasında daha kuvvetli bir bağlanma sağlamak için kimyasal bağlar ile kimyasal adsorpsiyon yapılır. Adsorpsiyon ile immobilizasyonun etkinliğı genel olarak, çevirici yüzeyinin yükü, polar grupların varlığı, homojenliğı ve redoks potansiyeli gibi özellikleri ile belirlenir. Adsorpsiyon ile biyomolekül, çevirici yüzeyine yüksek derişimlerde immobilize edilemez. Adsorbe edilen biyomolekül miktarını arttırmak için yüzey modifikasyonu ile veya çeşitli

fonksiyonlaştırıcı yöntemler ile çeviricinin yüklü veya polar gruplara sahip olması sağlanır. Biyomoleküllerin adsorpsiyonu ile hazırlanan biyosensörler pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve substrat derişimi gibi değişimlere karşı oldukça duyarlıdır. Bu yöntem genellikle biyomolekül ile çevirici arasında zayıf bir bağlanmanın bile yeterli olduğu, uzun süre çalışma gerektirmeyen durumlarda kullanılır (Korotkaya, 2014).

Mikrokapsülleme: biyomoleküllerin immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Biyomalzeme, çözeltinin geri kalanından, analit moleküllerinin ve katalitik reaksiyonun ürünlerinin geçmesine izin veren yarı geçirgen bir zar ile ayrılır. Bu amaçla, organik çözücü içinde bulunan polimer çözeltisi ve biyobileşenin sulu çözeltisinden bir emülsiyon hazırlanır. Bu emülsiyon, polimerik matriksi içinde biyomolekülleri ve elektrolit iyonları barındıran mikrokapsüller içeren bir zar elde etmek için kurutulur. Bu immobilizasyon yöntemi, biyopolimerin hidrofilik ortamının, tüm immobilizasyon aşamalarında bozulmadan kalmasını sağlar, böylece biyobileşenin aktivitesi azalmaz. İmmobilize edilmiş biyobileşen serbest halde olmakla birlikte, ölçüm hücresinin belirli bir bölümünde sınırlandırılmıştır. Bu yöntemde çok çeşitli membranlar kullanılmakta, ancak özellikle glukoz biyosensörlerinde nasyon polimeri gibi negatif yüklü membranlar tercih edilmektedir. Bu immobilizasyon yöntemi, çeşitli sensör modellerine kolayca uygulanabilir, enzimi kirlenmeye ve bozulmaya karşı korur. Genel olarak, mikrokapsüllenmiş enzimler, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve ortamın kimyasal bileşimindeki değişikliklere karşı dirençlidir. Bu yöntemle immobilizasyonda, gaz ve elektrolit gibi küçük moleküller membrandan geçebilir (Korotkaya, 2014).

Hapsetme: polimer matrise biyomolekül hapsedilmesi yaygın yöntemlerden biridir. Polimer, organik çözücüdeki çözeltisinin çözeltinin suyla seyreltilmesi veya sensör yüzeyinde kurutulması ile elde edilebilir. Polimer ayrıca jelatin, ağar, poliakrilamid veya aljinat çözeltisinden jelleşme ile veya bazı organik esterlerin veya kloroanhidridlerin polikondensasyonu ile de elde edilebilir. İkinci tekniğe sol-gel immobilizasyonu denir. Biyomalzeme varlığında sentetik bir polimerden oluşan bir matriks hazırlanır. Ayrı polimer ipliklerini üç boyutlu bir ağda birleştirmek için genellikle bir çapraz bağlama maddesi eklenir. Biyolojik olarak aktif moleküller kendilerini polimer içinde hapsolmuş halde bulurlar. Bu yöntemin dezavantajı, ağın difüzyonu engellemesi ve analitin nüfuz etmesini zorlaştırmasıdır. Biyomoleküllerin poliyonik komplekslere hapsedilmesi, polielektrolitlerin çözeltiden tabaka tabaka biriktirilmesinde oluşan kompleksleşmeden kaynaklanmaktadır. Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) da bu yöntem içine dahil edilebilir. Tek tabaka oluşumu, ayrı moleküllerin polar (baş) kısmı ile destek yüzeyi

arasındaki etkileşimle başlar. Destek yüzey olarak silikon, metaller ve oksitler gibi çeşitli malzemeler kullanılabilir. Moleküllerin tek tabaka halinde sıralanması, moleküllerin hidrofobik (kuyruk) kısımları arasındaki van der Waals etkileşimlerine bağlıdır. SAM'ler, biyopolimerlerin ve makromoleküler olmayan hidrofobik bileşiklerin hapsedilmesi için matriks olarak kullanılabilir (Korotkaya, 2014).

Çapraz bağlama: Bu yöntemde biyomolekülün bağlanması, glutaraldehit gibi bifonksiyonel bir reaktif kullanılarak gerçekleştirilir. Glutaraldehitin çapraz bağlama işlemine etkisine, proteinlerin ve nükleik asitlerin amino, hidroksil ve tiyol grupları ile Schiff bazları oluşturma örnek olarak verilebilir. Bu yöntemin en büyük dezavantajlarından biri, substrat difüzyonunun yavaş olabilmesidir. Ayrıca biyolojik olarak aktif bileşikler zamanla bozulabilir. Ancak yöntem, adsorbe edilmiş biyomalzemenin kararlılığının artırılmasında kullanılabilir (Korotkaya, 2014).

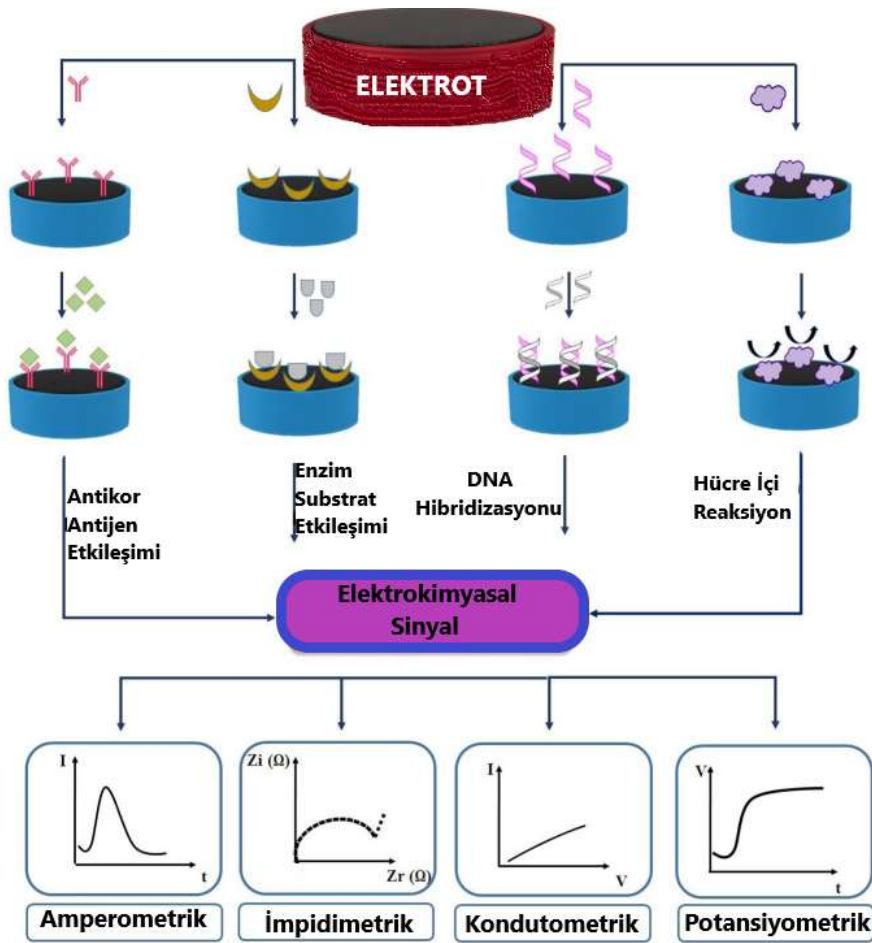
Kovalent Bağlama: Bu yöntem, biyomalzeme ve destek arasında kovalent bir bağ oluşumu anlamına gelir. Bu immobilizasyon yönteminde kullanılacak kimyasalların seçimi, bağlanacak olan moleküllere ve destek malzemeye bağlıdır. Kovalent bağlama genellikle üç adımda gerçekleştirilir: ilk adım, destek yüzeyinin temizlenmesi ve gerekli gruplarla fonksiyonlaştırılması, ikinci adım biyomalzemenin biriktirilmesi ve üçüncüsü zayıf bağlanmış moleküllerin saf bir çözücü ile uzaklaştırılmasıdır. Destek malzemelerin yüzeyini modifiye etmek için genellikle serbest $-NH_2$, $-SH$ veya $-COOH$ grupları içeren malzemeler kullanılabilir. Proteinler genellikle, yan aminoasit zincirlerinde bulunan ve biyolojik aktivitelerini etkilemeyen nükleofilik fonksiyonel grupları vasıtasıyla kovalent olarak bağlanırlar. Kovalent bağlamanın en büyük avantajı, biyomalzeme ile destek arasında güçlü bir bağlanma sağlayarak hem biyomalzeme kaybını önlemesi hem de uzun ömürlü sensörler üretilmesini sağlamasıdır (Korotkaya 2014).

Kullanılan İletici Sisteme Göre Sınıflandırma: Biyosensörler ayrıca kullanılan iletici sisteme göre sınıflandırılabilir. Transduser, biyosensörün bir bileşenidir ve sinyal tespit etme prosesinde önemli bir role sahiptir. Transduser, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileri elektriksel sinyale yüksek hassasiyet ve minimum bozulma ile dönüştüren cihazlar olarak tanınırlar. Literatürde dört temel transduser tipi bulunmaktadır; elektrokimyasal, kolorimetrik, piezoelektrik, optik (Whitcomb ve Lowe, 2007). Elektrokimyasal transduserlar, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucu üretilen akımı ölçer. Ölçülen bu akımın, elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile ilişkisi vardır. Optik transduser, biyotanıma elementi sonunda oluşan absorpsiyon, floresans, fosforesans, refraksiyon ve dispersiyondaki değişimleri ölçer. Piezoelektrik transduser, piezoelektrik

materyalden yapılır ve biyomateriyal piezoelektrik materyal ile kaplanır. Bu materyal belli bir frekansta titreşir. Bu frekans dış kaynaklı elektriksel sinyal ile kontrol edilir ve bu sinyal belli bir değerde akım üretir ve hedef analitin biyomateriyale bağlanması frekansta kaymaya neden olur ve ilgili analitin kütlesi değişir. Kalorimetrik transduser, oluşan kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar sonucu oluşan ısı değişimini ölçmektedir.

1.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörlerin temel prensibi, immobilize biyomolekül ile hedef analit arasındaki kimyasal reaksiyona dayanmaktadır (Şekil 11.).



Şekil 11. Elektrokimyasal biyosensörlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi (Yazar tarafından çizilmiştir)

Elektrokimyasal biyosensörler genel hatlarıyla biyolojik tanıma sürecine göre iki kategoriye ayrılabilir: biyokatalitik cihazlar ve afinite sensörleri. Biyokatalitik sensörler, hedef analiti tanıyan ve katalize edilmemiş bir reaksiyona bağlı reaksiyon hızını seçici olarak arttıran sensörlerdir. Enzimleri, hücreleri ve doku dilimlerini içerir. Afinite

biyosensörleri, hedef analit ve antikorlar, nükleik asitler (DNA/MicroRNA) gibi biyokimyasal elementler arasındaki etkileşime dayanır. İmmünoensörler ve elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri, iki tipik afinite sensörü örneğidir (Wang, 2006).

Elektrokimyasal biyosensörler son birkaç on yıldır hastalıkların erken tanısına yönelik kullanımlarıyla oldukça ilgi çekici olmuştur. Hassasiyeti ve seçiciliği, çok küçük konsantrasyonlardaki analite yanıt verebiliyor olması, ucuz ve kolay hazırlanır olması gibi avantajlarının bulunması bu yöntemin tercih sebeplerindendir. Bu reaksiyon sırasında üretilen veya tüketilen elektronlar, destek elektrolitin elektrik akımı veya potansiyel gibi ölçülebilir elektriksel özelliklerini etkiler. Elektrokimyada reaksiyon ölçülebilir bir akım üretiyorsa (amperometrik), ölçülebilir potansiyel üretiyorsa (potensiyometrik), ortamın iletkenlik özelliklerini değiştiriyorsa (kondüktometrik), ortamın impedansını değiştiriyorsa (impedimetrik) olarak isimlendirilmektedir.

1.3.1. Amperometrik Biyosensörler

Biyosensörlerin en yaygın sınıfından biridir. Amperometrik ölçümlerde, akım elektroaktif türlerin oksidasyon ve redüksiyon sonucunda oluşur. Bu tip ölçümler, çalışma elektrodunun (altın, platin, karbon) referans elektroda karşı sabit genlik voltajında, sabit potansiyelde akım numuneden geçerken gerçekleşir. Akım sabit potansiyelde ölçülür ve amperometri olarak isimlendirilmektedir. Eğer akım, potansiyelin kontrollü değişimlerinde ölçülürse voltammetri denir. Amperometrik algılamanın basitlik ve düşük maliyet gibi çeşitli avantajları mevcuttur.

1.3.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel fark, bu iki elektrot arasında önemli bir akım yoksa voltammetre ile ölçülür. Potansiyel fark, örnek solüsyonundaki türlerin oksidasyon ve redüksiyonundan kaynaklanır.

Ek olarak, potansiyometri, elektrokimyasal reaksiyonda iyon aktivitesi ile ilgili bilgi verir. İletici sistemde, iyon seçici elektrot (ISE) bazlı ince film veya seçici membran kullanılmaktadır (RK ve Kallichurn 2012).

1.3.3. İmpedimetrik Biyosensörler

İmpedimetrik ölçümler, modifiye elektrot yüzeyinde gerçekleşen biyotanıma olaylarının sonucunda oluşan elektriksel değişimlerin izlenmesinde oldukça kullanışlıdır.

Bu tip biyosensörler hedef moleküllerin ve yük transfer direncinin karakterizasyonunda etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

1.3.4. Kondüktometrik Biyosensörler

Kondüktometrik ölçümlerde, biyotanıma olayı ile iletkenlik arasında bir ilişki bulunmaktadır. İyonik türlerin konsantrasyonundaki değişim çözeltinin elektriksel iletkenliğinde veya akımda değişime neden olur. Kondüktometrik biyosensörler iki metal elektrottan oluşur. Genellikle platin veya gümüş elektrotlar kullanılır. Ohm metre, metal elektrotlar arasındaki iletkenlikdeğişimini ölçmek için kullanılmaktadır (Conneely ve diğerleri, 2007).

1.4. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı ve seçimli olarak etkileşime giren biyosensörlere DNA Biyosensörleri denir. DNA tanıma yüzeyleri ile yeni sentezlenen birçok maddenin, ilacın ve özellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaçların tasarımına yardımcı olurken, bu maddelerin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve etkin bir şekilde aydınlatılması tedavide oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde de kullanılmaktadır. Biyosensör tasarımında kullanılan DNA tanıma yüzeyleri gelecekte büyük rol oynayacaktır. Yeni ve ilgi çekici bir konu olması nedeniyle bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandırmaktadır.

1.4.1. Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensörleri (Elektrokimyasal Genosensörler)

Algılayıcı biyolojik molekül olarak nükleik asitlerin kullanıldığı biyosensörlere **nükleik asit biyosensörleri** veya **genosensörler** adı verilmektedir. Elektrokimyasal tekniklerle nükleik asit analizlerinin yapıldığı biyosensörlere ise **elektrokimyasal genosensörler** denir. DNA biyosensörleri günümüzde kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısında, gıdayı ve çevreyi tehdit eden mikroorganizmaların ve biyolojik silahların tayininde oldukça sık kullanılır hale gelmiştir. Özellikle sağlık alanında kullanılan DNA biyosensörleri ilgi çekicidir. Nükleik asitlerin elektroaktivitesinin Palecek tarafından 1960'lı yıllarda keşfi (Palecek, 1960) ile gelişen süreçte, elektrokimyasal DNA analizleri alanında pek çok çalışma yapılmıştır. DNA biyosensörleri dizi seçimli hibridizasyona dayalı (Wang ve diğerleri, 2001a, 2001b, 2004) veya nükleik asit etkileşimlerine (ilaç-

DNA, toksin-DNA, protein-DNA gibi) dayalı olarak (Ariksoysal, 2006) geliştirilebilir. Elektrokimyasal analiz yöntemleri diğer yöntemlere kıyasla daha ucuz, pratik ve minyatürize edilmeye elverişli olduğundan son zamanlarda yapılan çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedirler.

1.4.2. Nükleik Asit Etkileşimine Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörler

Doğadaki pek çok madde nükleik asitlerle, özellikle DNA ile etkileşim içerisinde. Proteinler (Paleček and Fojta, 2007; Erdem ve diğerleri 2009) toksinler gibi biyomoleküller, Co, Cu gibi metaller (Chiorcea-Paquim ve diğerleri, 2009) ve antikanser ilaçlar (Rauf ve diğerleri, 2005; Erdem ve Özsoz, 2001a, 2001b; Ariksoysal, 2006) DNA ile etkileşimi sıklıkla incelenen gruplardır. Antikanser ilaçlar ve antibiyotiklerin DNA'ya bağlanma mekanizmasının açıklanması, ilaç-DNA kompleks yapısının dinamiklerinin incelenmesi tıp ve eczacılık alanında büyük önem taşımaktadır.

Etkileşim halindeki maddenin düzlemsel ve halkalı yapısı nedeniyle çift sarmal yapıdaki bazların arasına yerleşerek bağlanması *interkalasyon* olarak tanımlanmaktadır (Erdem ve Özsoz, 2002). Protein-DNA etkileşimleri de interkalasyon prensibine dayanır. Proteinler büyük moleküller olduğundan genel olarak DNA'nın major oyuğuna interkale olurlar. Pek çok antikanser ilaç ise DNA'nın minor oyuğuna interkale olur ve spesifik bir baz dizisine bağlanarak DNA ile kompleks oluşturur.

İlaç-DNA etkileşimlerini elektrokimyasal biyosensörlerle tayin ederken; etkileşim öncesi ve sonrası ilaç sinyalindeki ve/veya DNA'nın elektroaktifbazları guanin ve adenin sinyalindeki değişimler ölçülür ve bu değişimlerden yola çıkılarak yorum yapılır (Erdem and Özsoz, 2001a, 2001b). DNA-ilâç etkileşimlerinden faydalanılarak ilaç tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirilmiştir. Örneğin, Erdem ve arkadaşları, tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyini tek duvarlı karbonnanotüp (SWCNT) ile modifiye ettikten sonra, antikanser ilaç daunorubisin (DNR)-DNA etkileşimini SWCNT-PGE yüzeyinde diferansiyel puls voltametri (DPV) ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile incelemişlerdir (Erdem ve diğerleri, 2008).

1.4.3. DNA Biyosensörleri (Genosensörler)'in Sınıflandırılması

DNA Biyosensörlerinin (genosensörler) sınıflandırılmasını alt başlıklar halinde aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

Madde-DNA etkileşmesine dayalı DNA biyosensörleri: İlaç, toksik maddeler vb. gibi bazı kimyasal maddelerin DNA ile etkileşimini inceleyerek ilaç tasarımı, çevresel toksik madde analizleri ve çeşitli kimyasal savaş ajanlarının tayininde kullanılmaktadır.

İlaç molekülleri ile DNA arasındaki etkileşimin incelendiği çalışmalar hem etkileşimin mekanizmasını anlamada hem de yeni ilaç tasarımlarında oldukça önemli bir aşamadır. İlaç molekülleri DNA ile kovalent ve kovalent olmayan bağlanmalar olarak temelde iki şekilde etkileşebilir.

Kovalent bağlanmalarda; molekül, DNA ile tersinmez şekilde etkileşerek DNA'nın yürüttüğü süreçlerin inhibisyonuna ve sonuçta hücre ölümüne neden olur. Kovalent bağlanan moleküller, kanser tedavisinde DNA yapısına alkil grupları bağlayarak görev aldığı için alkilleyici ajanlar olarak da adlandırılmaktadır. Alkilleyici ajanlar DNA yapısındaki Guanin ile etkileşirken bazı alkilasyon ajanları en güçlü etkiyi çapraz bağlardaki diğer pozisyonlarda alkilasyon yaparak gösterirler (Yunus ve diğerleri, 2013; Sirajuddin ve diğerleri, 2013).

Alkilasyon ajanları üç mekanizma üzerinden etki ederler:

i) DNA bazlarına alkil gruplarını bağlayarak DNA'yı parçalar.
ii) DNA çift sarmalını ve atomları arasındaki bağları parçalar. Bu şekilde DNA'nın bağlanma bölgelerine sahip olan alkilleyici ajan iki bazın yeniden birbirine bağlanmasına neden olur. Kimyasal bileşiklerin büyük bir kısmı fizyolojik şartlar altında alkilleyici ajan olarak davranırlar ve bu şekilde antitümör aktivite gösterirler.

iii) Yanlış eşleşen nükleotitler mutasyona neden olur (Yunus ve diğerleri, 2013). Alkilasyon ajanları kimyasal etkileşimlerle DNA'ya kovalent olarak bağlanır. Sonuç olarak yanlış eşleşmiş bazlar, yer değiştirmeler ya da yapıdan ayrılan gruplar gibi sebeplerle DNA sentezi durur ya da apoptozis gerçekleşmektedir.

Kovalent olmayan bağlanmalar; tersinir bağlanmalardır. DNA konformasyonunu ve bükülme gerginliğini değiştirirler, protein-DNA etkileşimini inhibe eder ve DNA sarmallarını kırarlar. Bu şekilde gen yapılarında deformasyona neden olurlar (Alberti, Zampakou ve Donghi, 2016).

Kovalent olmayan bağlanmalar kendi içinde üç grupta toplanır:

1. DNA çift sarmal yapısındaki büyük ve küçük oluklara bağlanması
2. Elektrostatik etkileşimler
3. DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapması

1) DNA çift sarmal yapısındaki büyük ve küçük oluklara bağlanması:

DNA sarmalının büyük ve küçük olukları ile etkileşen moleküller genellikle bu

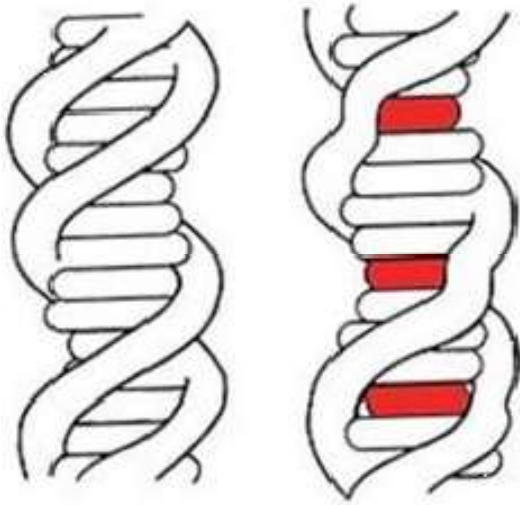
oyukları tamamlayacak şekilde hilal formundadır ve DNA'ya Van Der Waals bağları ile bağlanırlar. Ayrıca Adenin N_3 ve Timin O_2 atomları ile hidrojen bağları da oluştururlar. Bazı sentetik leksitropin ve imidazol pirolpoliamit türevleri bu tür etki gösteren gruplar içinde yer alırlar (Rajendiran ve diğerleri, 2012).

2) Elektrostatik etkileşimler:

Molekölün, nükleik asitin negatif yüklü şeker-fosfat omurgasının etkisiyle elektrostatik olarak etkileime girmesidir. Rutenyum (II) gibi bazı metal kompleksleri DNA'ya bu şekilde bağlanırlar (Karacan ve Okay 2013). Bağlanma genelde spesifik değildir.

3) DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yapması:

İnterkalasyon, bir molekülün ya da grubun iki molekül ya da grup arasına tersinir şekilde girmesidir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak, DNA senteziyle DNA'ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Eğer molekülün şekli ve kimyasal yapısı uygunsa, DNA'daki baz çiftleri arasına girebilir (Şekil 12.). Bu tür moleküller tersinir bağlandıkları için ligand olarak adlandırılırlar.



Şekil 12. Bazı maddelerin DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyonu (Polat, 2016)

İnterkalasyon yapısal distorsiyonlara (yani bir nesnenin şeklinin değişime uğraması) neden olur. Solda, normal DNA ikili sarmalı. Sağda, üç yerde interkalasyon olan bir DNA (koyu bölgeler) (Teles ve Fonseca, 2008). İnterkalasyon yapan ligandlar çoğunlukla çok halkalı, aromatik ve düzlemseldir ve bu yüzden nükleik asitlerin boyanmasında sıklıkla kullanılırlar. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak bazı DNA hedefli

maddelerin ve antikanser ilaçların DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Son yıllarda yapılan bu çalışmalar Tablo 1.' de özetlenmiştir (Şengiz, 2016).

Tablo 1.

Antikanser ilaç DNA etkileşiminin elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle incelendiği başlıca çalışmalar (Şengiz, 2016), (Ariksoysal, Doğan Topal, Topkaya, 2018)

İlaç	Kullanılan Elektrot	Elektrokimyasal Yöntem	DNA Sinyali	İlaç Sinyali	Kaynak
Mitomisin C	PGE	DPV	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	Karadeniz vd., 2007
	CSPE, CPE	DPV, SWN	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	İlaç sinyalinde azalma	Ozkan ve diğerleri, 2004
Epirubisin	CPE	CV, DPV	-	İlaç sinyalinde azalma	Erdem ve Özsöz 2001a
Taksol	AuE	DPV, CV, EIS	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	-	Mehdinia vd., 2008
Ekinomisin	HMDE	CV	-	İlaç sinyalinde azalma	Jelen ve diğerleri, 2002
Mitoksantron	GCE	DPV, SWV	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	-	Erdem ve Özsöz 2001b
cis- DDP ve cis- BAFDP	PGE	DPV	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	-	Erdem ve diğerleri, 2005b
Bitkisel ilaç Emodin	GCE	CV, DPV	-	İlacın indirgenme sinyalinde azalma	Wang, 2006
Siprofloksasin	GCE	DPV	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	-	Nawaz vd., 2006
Tamoksifen	PGE, SPE	CV, DPV	Guanin yükseltgenme sinyalinde artma	-	Yanık ve diğerleri, 2020

1.4.4. DNA Biyosensörlerinde Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine Tutturulma Yolları

DNA biyosensörlerinde 15-30 bazlık DNA dizileri (oligonükleotitler), prob olarak elektrot yüzeyine tutturulmaktadır. Hibridizasyon tayinin daha kolay gerçekleşmesi için, prob dizisinin elektrot yüzeyine güçlü ve düzenli bir şekilde bağlanması hedeflenmektedir (Ariksoysal, 2006)

Pasif Adsorbsiyon Yoluyla Prob Tutturulması (ıslak adsorbsiyon yöntemi);

Yöntemin ilkesi şu şekildedir; prob içeren analiz çözelti içerisinde kullanılan elektrodun daldırılarak probun elektrot yüzeyine adsorbe olmasıdır. Bu yöntemin basit ve

otomasyona uygulanabilirliği kolaydır. Pahalı kimyasal madde kullanımı ve elektrokimyasal potansiyel uygulama basamaklarının ortadan kaldırılması nedeniyle ucuzdur ve tayin süresi de kısalmaktadır (Özsöz ve diğerleri, 2003), (Ariksoysal, 2006).

Elektrostatik Yolla Prob Tutturulması;

Elektrot yüzeyine pozitif (+) potansiyel uygulanarak, negatif (-) yüklü fosfat omurgasına sahip olan DNA'nın elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde, elektrot yüzeyine paralel olarak tutunması ilkesine dayanır (Özsöz ve diğerleri, 2002). Pahalı kimyasal maddeler kullanılmaması nedeniyle maliyeti düşük bir yöntemdir.

Kovalent Yolla Prob Tutturulması;

Prob dizilerinin elektrot yüzeyine kovalent bağlanma ajanları kullanılarak, kovalent olarak tutturulması ilkesine dayanır. Bu şekilde yapılan tutturma işlemi ile elektrot yüzeyinde daha düzenli ve daha dayanıklı bir prob tabakası oluşmaktadır, bu da hibridizasyon tayininde çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak pahalı kimyasal maddeler kullanılması ve diğer yöntemlere oranla daha uzun bir işlem olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Radhika ve Maha, 2008).

1.4.5. İdeal Biyosensörün Özellikleri

Biyosensörler kullanılan biyoaktif materyallere göre ve çevirici sistemlerinden yola çıkarak yuradaki bölümlerde sınıflandırılmıştır. Biyosensörlerde birçok parametre söz konusudur. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler (Hall, 1990):

Seçicilik: İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken en önemli özelliktir. Biyosensörün sadece incelenen analize özgün olduğunu göstermektedir. Biyosensör başka reaksiyonlara ilgi göstermemelidir. Böylece biyosensör, yeterli seçiciliğe sahip olduğundan yanlış sonuç alınmasını engellenmektedir.

Kullanım ömrü: Biyosensörün performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü belirtir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı deneysel koşullarda, ard arda yapılan ölçümlerde, elektrodun birbirine çok yakın değerleri okuması istenir. Bu durum teorik olarak mümkün gibi gözükse de, pratikte pek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Kararlılık: Analiz süresince biyosensörde kullanılan bileşenlerin tam anlamıyla bozulmadan kalması beklenir. Kararlılık, kullanılan biyoaktif maddenin fiziksel dayanıklılığına, ortam pH'sı, ısı, nem, O² konsantrasyonu gibi parametrelere bağlı olarak

değişiklik gösterebilmektedir.

Duyarlılık: Sensör yüzeyindeki immobilize materyalin sadece hedef analite duyarlı olması gerekmektedir. Nükleik asit biyosensörlerinden beklenen en büyük özellik hazırlanan biyosensörün yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır.

Tayin sınırı: Biyosensörün tespit edeceği en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Tayin sınırı, elektrot yüzey genişliği, analitin sensör afinitesi, immobilize edilen madde gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Ölçüm aralığı: Ölçüm aralığı biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin doğrusal olduğu konsantrasyon aralığını belirtmektedir. Cihazın ölçebildiği analiz çözeltisi konsantrasyonunu ifade etmektedir.

Ölçüm zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım zaman eğrilerinden anlaşılmaktadır.

Kalibrasyon: İdeal bir biyosensörde hiç kalibrasyona ihtiyaç duyulmaması istenmektedir. Fakat teorikte beklenen bu olsada pratikte mümkün olamamaktadır. Biyosensörün kalibrasyonu sıklıkla yapılmalıdır.

Hızlı geriye dönme zamanı: Hızlı geriye zamanı bir biyosensörde en önemli özelliklerden birisidir. Analiz sonrasında ikinci bir örneğin ne kadar süre sonunda verimli bir şekilde ölçülebileceğinin göstergesidir.

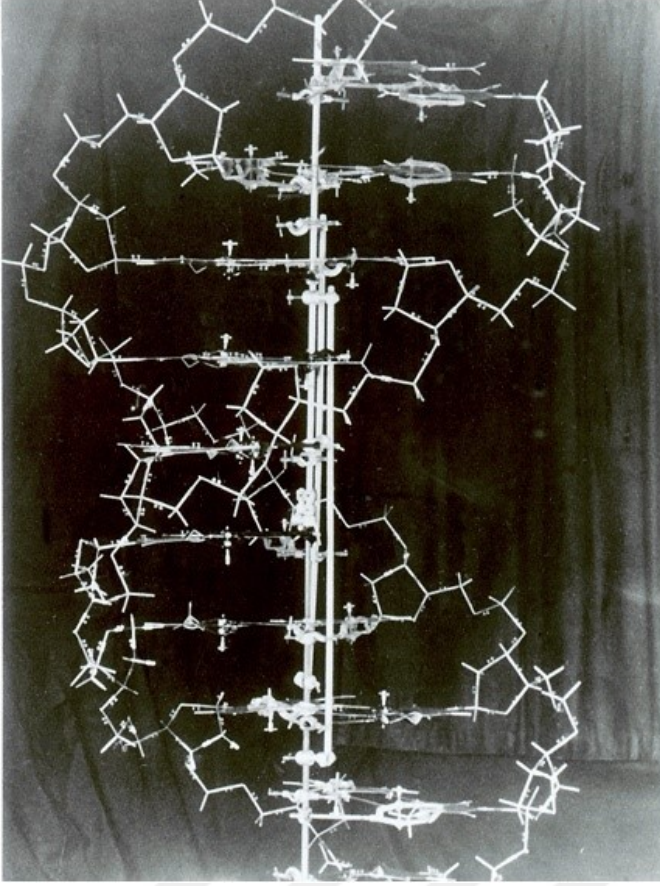
Basitlik ve ucuzluk: Tasarımı kolay ve basit, ekonomik olarak elde edilmiş biyosensörler ideal bir biyosensördür.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Biyolojik malzemelerle kontaminasyon riskini azaltmak için biyosensör ve kısınımlarının kolay sterilize edilmesi ve kullanım ile taşınım için yeterli küçüklükte olması önemlidir.

1.4.6. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları

Nükleik asitler ve DNA (Brett ve diğerleri, 1997; Dervan 1986, 1998; Vaseashta, 2005; Plambeck ve Lown, 1984)

Watson ve Crick adlı araştırmacılar 1953 yılında organizmanın genetik bilgisini içeren ve kalıtımda rol oynayan organik bir molekül olan DNA'nın yapısını, hazırladıkları modeller üzerine açıklamaya çalışmışlardır (Şekil 13.). Buna göre DNA molekülü, sarmal şeklinde kıvrılmış, iki kollu bir ip merdivenine benzemektedir.



Şekil 13. 1953 yılında çekilen Watson ve Crick DNA sarmal yapısının ilk modeli

Biyolojik olarak fonksiyonu; genetik bilginin saklanması, çoğaltılması ve genleri nesiller boyunca aktarmak olan nükleik asitler, ribonükleik asit ve deoksiribonükleik asit yapısındadır ve nükleotit adı verilen monomerlerden oluşmaktadır. Nükleotitler pürin ve pirimidin olarak ikiye ayrılırlar. Pürin nükleotitleri; adenin ve guanindir, ayrıca yapısal olarak çift halka taşımaktadır. Pirimidin nükleotitleri; timin, sitozin ve urasildir, yapısal olarak tek halkaya sahiptirler (Geçkil, 2012).

Pürin ve pirimidin nükleotitlerine bir şeker molekülünün bağlanmasıyla nükleozit yapıları meydana gelmektedir. İçerdiği şeker molekülüne göre oluşan nükleik asidin adı belirlenir buna göre RNA'da 5 karbonlu D-riboz şekeri, DNA'da ise 5 karbonlu 2-deoksi-D-riboz bulunmaktadır. Pürin nükleotitleri 9 numaralı azot (N); pirimidin yapılarında ise 1 numaralı N; 5 karbonlu şeker yapılarında bulunan 1 numaralı karbon atomuyla N-glikozidik bağ ile bağlanmaktadır (Wang, 2002). Nükleozit yapısına bir fosfat grubunun katılmasıyla nükleotit yapısı oluşmaktadır. Pürin bazları, sadece pirimidin bazlarıyla bağ yapabilir bu yüzden DNA sarmalı simetrik bir yapıya sahiptir. Buna göre DNA'da; adenin ve timin, guanin ve sitozin birbirleriyle hidrojen bağıyla bağlanabilir. Adenin ve timin arasında ikili, guanin ve sitozin arasında ise üçlü hidrojen bağı oluşur (Geçkil, 2012).

DNA sarmalında, bazlar genetik bilgiden sorumludur ve sarmala bazik özellik kazandırır, şeker ve fosfat grupları ise sarmalın yapısından sorumludur ve yapıya fosfat grupları özellikle asidik özellik kazandırır. Sarmalda adenin ve timin sayısı ve guanin ve sitozin sayısı birbirine eşittir. Bu kurala CHARGAF kuralı denmektedir. Yani pürin sayısı pirimidin sayısına eşittir (Geçkil, 2012; Passarge, 1995).

Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu:

Birbirine eşlenik iki adet tek sarmal nükleik asit (DNA) dizisinin çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesi işlemidir. Günümüzde çeşitli hibridizasyon yöntemleri mevcuttur. En çok kullanılan hibridizasyon yöntemleri; Southern blot, Northern blot, Dot blot ve PCR'dır.

DNA hibridizasyon kinetiğini etkileyen faktörler (Palecek ve Fojta, 2001):

Nükleik Asitlerin Yapısı: Hibridizasyon hızı arttıkça, hibrit oluşturan dizilerin uzunluğu ve DNA yapısının karmaşıklığı artar.

Baz Kompozisyonu: Dizilerde GC (Guanin-Sitozin) yüzdesi ile hibridizasyon hızı doğru orantılı olarak değişir. Çünkü GC baz çiftleri, AT (Adenin-Timin) baz çiftlerine göre ısıya karşı daha dayanıklıdır.

DNA dizi Uzunluğu: Prob dizinin uzunluğu hedef dizinin uzunluğundan kısa ise, bağlanma hızı hedef dizinin uzunluğu arttıkça artar. Ancak prob dizinin uzunluğu hedef dizinin uzunluğundan uzun ise, bağlanma hızında düşüş meydana gelir.

Sıcaklık: DNA için optimum sıcaklık 25°C'dir. Çünkü bu derecenin altında DNA hibrit oluşturmamaktadır.

Tuz Derişimi: Hibritleşme hızı 1.2 M'a kadar artan NaCl derişimi ile artış göstermektedir.

Formamit: Hibridizasyon tepkimelerinde, formamit kullanımı belirli aralıklarda olduğu sürece bağlanma hızını etkilememektedir. Bu aralık %30- %50'dir.

Dekstran Sülfat: Hibridizasyon tepkimelerine inert polimer ilavesi, hibridizasyon hızını 10 kat artırır. Dekstran sülfat ise yüksek yükleme akımlarına sebep olmaktadır.

İyonik Kuvvet: Hibridizasyon hızı iyonik kuvvetle doğru orantılıdır.

pH: İnsan hücre pH'ı ve kan pH'ı arasındaki (6.8-7.4) değerler yani nötr pH'lar hibridizasyon tepkimeleri için ideal pH'lardır.

Viskozite: Viskozite artışı ile hibridizasyon hızı azalır.

1.5. Biyosensörler Tasarımında Kullanılan Malzemeler

Biyosensör sistemleri alanına nanoboyutta malzemelerin kullanılabilir hale gelmesiyle birlikte, biyosensörlerin minyatürize edilmesi, aynı zamanda daha hızlı ve daha ucuz elektrokimyasal analiz yöntemlerinin oluşturulması mümkün olmuştur. Biyosensör yüzeylerinin nano boyuttaki çeşitli malzemelerle kaplanmasıyla farklı özelliklerde üretilen nanoelektrotlar ile daha seçimli ve spesifik analiz platformları geliştirilmektedir.

1.5.1. Nanomalzemeler

Nükleik asit biyosensörleri alanında daha hassas analiz sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadırlar. Boyutları ayarlanabilir yarı iletken yapıdaki yüksek mekanik ve termal stabiliteye sahip metal oksit nanopartikülleri ile modifiye edilmiş analiz yüzeyleri, hibridizasyona dayalı nükleik asit analizlerinde kullanılmaya başlanılmışlardır. Altın, platin, paladyum gibi metal yapısındaki nanopartiküller;

(1) immobilizasyonları sonucunda kullanılan çevirici sistemlerin yüzey alanını genişleterek biyomoleküllerin daha hassas ve seçimli bir şekilde analizlerini mümkün kılarlar (Yumak ve diğerleri, 2011).

(2) yüzeyin iletkenliğini arttırırlar (Fang, Zhang ve Zhou, 2015),

(3) yüzeyin büyüklüğü ve morfolojisi üzerinde modifikasyon yapabilmeyi sağlarlar (Wang J. ve diğerleri, 2001a; 2001b),

(4) hibridizasyona dayalı DNA analizlerinde sinyal amplifikasyonunu sağlarlar (Ozsoz ve diğerleri, 2003; Karadeniz ve diğerleri, 2007)

Karbon nanotüpler: Karbon nanotüpler, elektron transferi kolaylaştıran, yüksek biyoyumumluluğa sahip, mekanik direnci yüksek ve geniş yüzey alanı sağlayan nanomateriyallerdir. Klasik karbon elektrotların karbon nanotüplerle modifiye edilmesiyle, yüzeyinde gerçekleşen kinetik olaylara hızlı cevap verebilen daha hassas analiz platformları geliştirilmiş olunur. Tek duvarlı ve çok duvarlı olmak üzere iki tip karbon nanotüp yapısı bulunmaktadır. Tek bir nanotüp yapısı tek duvarlı karbon nanotüpleri oluştururken, iç içe geçmiş çok sayıdaki nanotüpler çok duvarlı karbon nanotüpleri oluşmaktadır. (Literatürde karbon nanotüplere dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirilmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır (Çubukçu ve Anık, 2008; Karadeniz, Erdem ve Caliskan, 2008; Ariksoysal, 2017; Ariksoysal, 2019).

1.6. Lab-on-a-Chip Teknolojisi

Analitik kimyanın ilgi alanlarından biri de analitik sistemlerin minyatürize edilmesi, entegre edilmesi ve otomatikleştirilmesidir. İçeriğinde filtrasyon, ekstraksiyon, karıştırma, ayırma ve tayin gibi klasik yöntemleri gerçekleştirebilen sistemler Lab-On-a-Chip sistemleri (LOC) ya da Toplam Analiz Mikrosistemleri (μ TAS) olarak adlandırılmaktadır (Dittrich ve Manz, 2006).

Transistör ve silikon teknolojileri oluşturulduğundan beri, minyatürize sistemlerin geliştirilmesinde hızlı ilerlemeler olmuştur. Başlangıçta, elektronik alanındaki bu teknoloji, farklı türlerde giriş, uygulama ünitesi ve çıkış bulunduran sistemler dizayn etmek ve geliştirmek için üretilmiştir. Mikroelektronik teknoloji geniş çaplı tespit ve veri işleme cihazları geliştirmeye olanak sunmaktadır.

İlk LOC'ler Stanford Üniveristesinde, 1975 yılında, S.C. Terry tarafından icat edilen gaz kromatografi sistemleridir. Fakat, asıl büyük gelişmeler, mikro pompaların ve akış sensörlerinin üretimi ile entegre sistemler konseptinin, yöntemin bütün adımlarını entegre etmesi, ayırma, örneğin temizlenmesi ve tüm analizin tek bir cihazdan alınması konularını derinlemesine incelemesi sonrasında 90'lı yıllarda olmuştur.

Mikro toplam analiz sistemlerinin (μ TAS) önemli avantajları, örnek ve reaktiflerin hacimlerinin kullanımını pikolitrelere kadar düşürmek ve moleküler difüzyon gibi reaksiyonların süresini mikrokanalların boyutlarına bağlı olarak azaltma imkanını sunmalarıdır. Bir diğer avantaj ise mikro akışkanlara uygunluğundan dolayı yüzeye bağlı deneylerde imkanlar sağlayan geniş yüzey-hacim oranıdır.

En fazla kullanılan mikro akışkan sistem cihazları düz plastik veya cam substratlar üzerine yapılan mikrokanal ağlarının bir araya getirilmesiyle oluşmaktadır.

1.6.1. Elektrot Fabrikasyon Yöntemleri

Screen-Printed Teknolojisi (SPE) iletken veya iletken olmayan özel mürekkeplerin istenilen geometride üretilmiş bir maske aracılığıyla inerts substratlar üzerine art arda transferine dayalıdır. Son zamanlarda screen-print fabrikasyon teknolojisi, yaygın bir şekilde biyolojik ya da kimyasal sensörlerin üretiminde kullanılan kalın film elektrotlarının imalatında kullanılmaktadır (Fanjul-Bolado, 2008). SPE bu teknolojinin yüksek imalat verimi ve düşük maliyetinden dolayı en önemli ürünlerinin birini temsil eder.

Genellikle screen-printed fabrikasyonunda kullanılan inert substratlar seramik ya da polimeriktirler. Polimerik substratlardan poliester substratlar, çoğunlukla dirençliliği, berraklığı termal ve hidrokopik kararlılığı ve sertliği için kullanılmaktadırlar. Baskı

mürekkeplerinin gerçek kompozisyonunu ticari ve patentli olduklarından dolayı tam olarak bilinmemektedir.

1.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Serbest elektronlarla yüklü partiküller elektromanyetik veya elektrostatik alanda diğer yüklü partiküller gibi yön değiştirilebilir. Bu elektronlar aynı zamanda çok kısa boylu dalgalar gibi davranır ve kırınımına uğrayabilir, absorplanabilir veya saçılabilir ve karşılaştığı noktaya bir miktar enerji taşırlar (Chamot ve Mason, 1958). Bu prensiplerden yola çıkılarak Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) (SEM), 1950'li yıllarda geliştirilmesi ile birlikte birçok bilim dalında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Çünkü SEM büyük çeşitlilikte numunenin incelenebilmesine olanak sağlamıştır. Bir maddeye ait birçok özelliğinin cihazın yardımcı tekniklerle birlikte kullanılmasıyla elde edilebilmesinin yanında numune yüzeyinin görüntülenmesi ve bileşiminin belirlenmesi de sağlanmıştır. Taramalı elektron mikroskopta, katı numune, bir katot ışınları tüpü veya bir televizyondaki tarama düzeni ilkesine benzer bir tarama şeklinde taranarak görüntü elde edilmektedir. Bu tarama işlemi sırasında yüzey üstünde (z yönü) bir sinyal alınır ve görüntüye dönüştürüleceği bir bilgisayar sisteminde toplanır (Skoog ve Leary, 1996). Bütün mikroskoplarda ana unsur büyütme derecesi ve görüntü netliğidir. Bir optik mikroskopta ışık dalgalarının odaklanmasında lensler kullanılır. SEM'de ise ekrandaki görüntüyü oluşturan elektron demetinin odaklanmasında elektromıknatıslar kullanılır. Elektromıknatısların kullanımı operatöre daha yüksek büyültme derecelerinde çalışma olanağı sağlar. Aynı zamanda elektron demeti daha net bir görüntü oluşturur. SEM, katı madde yüzeylerinde direkt olarak çalışmak için tasarlanmış bir cihazdır. Cihaz tarafından sağlanan ve odaklanan elektron demeti ile yapılan tarama ile TV'dekine benzer bir görüntü oluşur. SEM optik mikroskoplara nazaran daha derin bir odaklama sağlar. Bu özellikleri nedeniyle, SEM ile bir numunenin üç boyutlu görüntüsü elde edilebilir. SEM, daha çok görüntüleme amacı ile üretilmiştir. Çözünürlük topografik 10 nm ve kompozisyonda 100 nm'den daha iyi düzeyde elde edilebilir. İyi bir görüntü ve çalışması için numunelerin elektriksel olarak iletken olmaları tercih edilir. Ayrıca elektrikçe iyi iletken numuneler genellikle ısıyı iyi ilettilerinden ısısal bozunma olasılığı en az düzeydedir. İletken olmayan numunelerin SEM görüntülerini elde etmek için numune yüzeyine vakumlu bir ortamda ince bir metalik film tabakası kaplanır (Skoog ve Leary, 1996).

1.8. Kanser

Her gün dünyada 1500'den fazla insanın ölümüne sebep olma KANSER insan yaşamını tehdit eden en önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilmektedir. 200'e yakın kanser çeşidi tespit edilmiştir ve araştırmalar devam etmektedir. Günümüzdeki teknolojik gelişmelere rağmen ileriki evrelerde tespit edilen kanser hastalığının tedavisi ve kurtulma oranı oldukça zor ve düşüktür (Jayanthi, Das ve Saxen, 2017). Kanser, anormal ve kontrolsüz hücre büyümesi sonucu oluşan bir hastalıktır. Kontrolsüz hücre büyümesi, tümör kütlelerinin büyümesine neden olmaktadır (Bohunicky ve Mousa 2010).

Kanserin meydana geliş süreci oldukça karmaşıktır ve tüm kanser türlerinde, temel patolojik mekanizmalar benzer olsa da kanserler farklı şekilde ilerler ve hastalığın gelişimi ve tedavisi, başlangıç yaşına, büyüme hızına, tutulan organa, yayılım hızına, evrelerine ve tedaviye verdikleri cevaba göre büyük farklılıklar gösterir (Can, 2005). Ancak tüm kanser hücreleri anormal hücre çoğalması ve yayılması (metastaz) olmak üzere iki temel özelliğe sahiptirler.

Tüm vücudu etkileyebilen bu hastalık, organları meydana getiren en küçük birim olan hücrelerin içinde başlar. Kanser hücresinin en temel özelliği, hızlı çoğalma, planlı hücre ölümünden korunma ve farklı organ ya da dokuları da etkilemesidir. Sağlıklı bir hücrenin yaşam döngüsü üç temel parametre içerir; büyüme, bölünüp çoğalma ve hücre ölümü. Kanserli hücre, hücrenin normal döngüsünün dışına çıkmasıyla meydana gelir. Normal süreçteki hücre bölünmesinin engellenmesi durumunda ise anormal fonksiyonlara sahip hücreler oluşur. Bu anormal hücreler ya ölür ve bağışıklık sistemi tarafından yok edilir ya da çevresine uyum gösterir. Hücre ölümüne neden olabilecek süreçlerden biri olarak adlandırılan “apoptozis (programlanmış hücre ölümü)” süreci, hücre organellerinin hücreye ölme talimatı vermesiyle başlar ve hücre bileşenlerini parçalayan enzimler üretilerek hücrenin içyapısı parçalanır.

Kanser; hücre içi fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak meydana gelen mutasyonlar, radyasyon, kimyasal etmenler ya da ultraviyole gibi kanserojen ajanlara maruz kalma sonucunda ortaya çıkar. Kanserli hücrelerin sağlıklı hücrelerden en önemli farkı, çevreden gelen normal büyüme sinyalleri olmadan da yaşayabilmeleri ve sınırsız bir replikasyon potansiyeline sahip oldukları için kontrolsüz olarak büyüyüp çoğalmalarıdır (Apetoh ve diğerleri, 2008).

Meme kanseri ise tüm kadın kanserlerinin dörtte birinde görülmektedir. Kadınlarda gözlenen kansere bağlı ölümler içinde ilk üç sırada yer almaktadır (Parkin ve diğerleri, 2005). 1985 yılına kadar kansere bağlı ölümlerde ilk sırayı alan meme kanserinin son

dönemlerde kadınlarda görülme sıklığının azalma sebeplerinden en önemlisi erken saftada meme kanseri teşhisinin artmasıdır. Bu artışlar ve cerrahi işlemlerden sonra son günlerde üçüncü sıraya düşmüştür. Bu gelişmelerden en ilgi çekici olanı 1973 yılında klinik kullanıma sunulan mmem kanseri erken dönem ve cerrahi sonrası önleyici etkisi olan tamoksifendir. Tamoksifen nonsteroid yapıda bir antiöstrojen ajandır (Jordan, 1988).

1.9. Tamoksifen

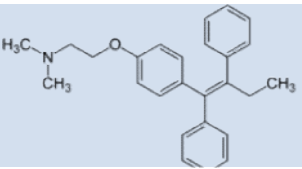
Tamoksifen, (2-[4-(1,2-Diphenyl-1-butenyl) phenoxy]-N,N-dimethylethanamine), son 30 yılı aşkın östrojen reseptör (ER) pozitif meme kanserinin tedavisinde kullanılmakta olan bir ilaçtır. Tamoksifen tedavisinin meme kanserinden ölümleri üçte bir oranında azaltacağı iddia edilmektedir (Kouchakzadeh, Shojaosadati ve Shokri 2014). Tamoksifen seçici östrojen reseptör modülatörüdür (SERM) (Lorizio ve diğerleri, 2012). Endokrin terapisi gerekli olduğunda hem premenopoz hem de postmenopoz dönemindeki kadınlarda en yaygın kullanılan ilaçtır (Lumachi, Santeufemia ve Bass., 2015). Tamoksifen'in kimyasal yapısı Tamoksifen'in meme kanseri tedavisinde kullanılmaya başlanması, 1958 yılında Dr. Elwood Jensen'in östrojen reseptörlerini keşfetmesine dayanmaktadır (Moore, 2012). Jensen'ın bu buluşu birçok kadının hayatını kurtarmıştır (O'Malley, Khan ve Jensen, 2013). İlk keşfedildiği yıllarda Tamoksifen, postmenopoz dönemdeki kadınların metastatik meme kanserinin tedavisi gibi limitli alanda kullanılmıştır. Ancak daha sonradan yapılan çalışmalar, yüksek meme kanseri riskine sahip kadınlarda Tamoksifen sayesinde bu risk oranının düştüğünü göstermiştir. 1970'lerde yapılan çalışma sayesinde, Tamoksifen'in östrojen reseptör meme kanserlerini uzun dönemde tedavi ettiği keşfedilmiştir (Maximov, Lee ve Jordan, 2013). Östrojen, normal ve kanserli meme epitel hücrelerindeki östrojen reseptörüne (ER) bağlanarak reseptörü aktive etmekte ve bu da hücre bölünmesi, hücre ölümünün baskılanması, yeni kan damarı oluşumu ve proteaz aktivitesinden sorumlu olan genlerin aktivasyonuna yol açmaktadır (Fabian, 2007). Bu nedenle hormon reseptör pozitif (HR+) hastalarda endokrin terapi (ET), tedavinin temelini oluşturmaktadır (Reinert ve Barrios, 2015). TAM, östrojen reseptörü pozitif (ER+) meme kanseri olan kadınlarda ölümü ve hastalığın tekrarlanmasını azaltır. Ayrıca, yüksek meme kanseri riski taşıyan kadınlarda primer önlem yöntemidir. Tamoksifen, meme dokusunda ER antagonisti olarak davranarak (Lorizio ve diğerleri, 2012), östrojen reseptörüne bağlandığında tümör hücre ölümünü başlatıp, gelişmeyi durdurarak, metastazı önleyerek, anjiyogenezi azaltarak etkisini göstermektedir.

(Shin ve Choi, 2009) Tamoksifen zayıf bir baz olup (pKa 8.8) erime noktası 100 °C ve sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Ticari olarak satılmakta olan Tamoksifen suda çözünürlüğünü arttırılması amacıyla sitrat tuzu formundadır. Sitrat tuzu halindeki TAM'ın suda çözünürlüğü arttığı da biyoyararlanımı da artmış olacağından sitrat tuzuna dönüştürülmektedir (Torne ve diğerleri, 2013). Bütün bu sebeplerden dolayı Tamoksifen için uzun süreli salım ve biyoyararlanım formulasyonlarının geliştirilmesi gerekmektedir (Torne ve diğerleri, 2013).

1.9.1.İlaç ile İlgili Genel Bilgi

Aşağıda Tablo 2' de tez kapsamında DNA ile etkileşimi araştırılmış olan Tamoksifen etken maddesinin fiziksel ve kimyasal özellikleri listelenmiştir. Listelenen fiziksel ve kimyasal özellikler ışığında ilaç etken maddesinin elektrokimyasal analizi ve DNA ile etkileşimi araştırılmıştır.

Tablo 2
Tamoksifen'in fiziksel ve kimyasal özellikleri

TAMOKSİFEN	
İlaç Sınıfı	Antineoplastik Nonsteroidal Seçici Östrojen Reseptörü Modülatörü
CAS Numarası	10540-29-1
Kimyasal İsmi (IUPAC)	(2-{4-[(1Z)-1,2-diphenylbut-1-en-1-yl]phenoxy}ethyl)dimethylamine
Kimyasal formülü	C ₂₆ H ₂₉ NO
Yapısal formülü	
Moleküler ağırlığı (g/mol)	371.515 g/mol
UV spektrumu dalga boyu (nm)	204, 238 ve 276 nm
Erime noktası (°C)	97 °C
Buhar basıncı (mmHg)	3.46X10 ⁻⁸ mm Hg (25 °C)
Henry yasası sabiti (atm-m³/mol)	4.49x10 ⁻¹⁰ atm-m ³ /mol (25 °C)
pKa	8.87
Plazma yarılanma ömrü (gün)	5-7 gün
Suda Çözünürlüğü	0.000167 mg/mL (25 °C)
Fiziksel görünümü	Beyaz kristalize toz
Kokusu	Kokusuz

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Elektrokimyasal DNA Biyosensörü Çalışmaları

2.1.1. Kalem Grafit Elektrotla Yapılan Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları

Kimyasal inertlik, düşük maliyet, çeşitli algılama ve saptama uygulamaları için uygunluğundan dolayı karbon elektrotların çeşitli formları ve modifikasyonları elektroanalitik uygulamalar için kullanılmaktadır (McCreery, 1991; Rice, 1983). Bunlar arasında kalem grafit elektrot, ucuzluk, kolay ulaşılabilirlik, yüksek elektrokimyasal reaktivite, modifikasyon ve kolay minyatürize edilebilme özelliğinden dolayı elektrokimyasal sensör tasarımında ve DNA etkileşimlerine dayalı biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmıştır (Gao, Song ve Wu, 2005).

Özcan ve Şahin (2011), vücut sıvılarında ürik asit varlığında parasetamol'ün (PC) basit ve hızlı elektrokimyasal tayini için, yeni bir yaklaşım önerilmiştir. PC'nin voltametrik belirlenmesi ölçüm sırasında elektrokimyasal işlemde kalem grafit elektrot üzerinde aynı anda oluşan N-asetil-p-benzokinonimin'in elektrokimyasal olarak indirgemesine dayanmaktadır.

Dilgin ve diğerleri. (2012), hematoksin ile modifiye kalem grafit elektrot (PGE/HMT) kullanarak sülfürün elektrokatalitik oksidasyonunu araştırmak için yeni bir yaklaşım geliştirmişlerdir. PGE/HMT elektrodun sülfür oksidasyonuna karşı önemli bir elektrokatalitik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Önerilen yöntem, başarılı bir şekilde atık sularda sülfür iyon tayini için uygulanmış ve spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırmışlardır.

Ensafi, Heydari-Bafrooei ve Amini (2012), kalem grafit elektrot kullanarak adenin ve guaninin azalan oksidasyon sinyali ve somon balığı spermalarının çift sarmallı DNA'sı ile riboflavin etkileşimine dayalı elektrokimyasal bir çalışma tasarlamışlardır. Çalışmada riboflavin ile etkileşim sonrası guanin ve adenin oksidasyon sinyallerinin yoğunluğundaki azalma riboflavinin hassas belirlenmesi için bir gösterge sinyali olarak kullanılmıştır.

Mirmoghtadaie ve diğerleri (2013), somon balığının çift sarmallı DNA'sı ile modifiye edilmiş kalem grafit kullanarak folik asit tayini yöntemi önermişlerdir.

2.1.2. Perde Baskılı Elektrotla (SPE) Yapılmış Elektrokimyasal Biyosensör Çalışmaları

Perde baskılı elektrotlarla elektrokimyasal araştırmasını gerçekleştirdiğimiz tamoksifen etken maddesi ve tabletle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Perde baskılı elektrotlar (SPE); basit, hızlı ve ucuz biyosensör üretimine yönelik üzerinde en çok durulan gelecek vaadeden yaklaşımlardan biridir. Mikroelektrotları ve modifiye elektrotları içeren SPE dayalı tek kullanımlık biyosensörler, biyomoleküllerin, pestisitlerin, antijenlerin, DNA'nın, mikroorganizmaların ve enzimlerin saptanmasında ve nicelenmesinde yeni araştırmalara yol göstermiştir. Gelişen teknolojiyle SPE tabanlı sensörler, taşınabilir veya mobil cihazlara artan ihtiyaçlarla ayrıca hızlı ve doğru analiz sonuçlarıyla büyük gelişim potansiyeline ulaştığını belirtmişlerdir.

Martínez-Paredes, Costa-García ve González-García (2010), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada tek kullanımlık altın nanoyapılı SPE ile pnömoni için hibridizasyon bazlı genosensör geliştirmişlerdir. Tek kullanımlık altın nano-yapılı perde-basılmış karbon elektrotlar kullanılarak üç farklı elektrokimyasal genosensör hazırlamışlardır. Bu sensörler tiyol prob- biyotin target , tiyol prob-floresan etiketli target ve biyotinli prob- floresan etiketli target'tan meydana gelmiştir. En iyi sonuçlar, streptavidin-biotin etkileşiminin gerçekleştiği, biyotinli prob- floresan etiketli target ile elde etmişlerdir. Hibridizasyon sinyalinin tespiti, bir anti-flüoresan antikoruna işaretlenmiş alkalın fosfataz yardımıyla enzimatik yolla gerçekleştirmişlerdir. Genosensör yanıtının, incelenen bakteri sekansına bağlı olarak değişen, geniş bir aralıkta floresan işaretli hedef konsantrasyon ile doğrusal olarak ilişkili olduğu bulmuşlardır. Tayin limitleri, tüm bakteri sekansları için 10 pM'den daha düşük olarak belirlemişlerdir. Bundan dolayı toplum kökenli pnömoni ile ilişkili ana bakteri patojenlerinin sekansları arasında net bir şekilde ayırım yapmanın mümkün olduğu önermişlerdir.

Labuda, Ovádeková ve Galandová (2009), tek kullanımlık bir elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Sentetik olarak hazırlanmış bir kinazolin türevinin yüzeye bağlı çift sarmal DNA üzerindeki etkisi SPE ve çok duvarlı karbon nanotüpmodifiye perde baskılı karbon elektrotlar ile araştırmışlardır. DNA ile kinazolin etkileşimi, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]$ gibi DNA bağlı elektrokimyasal indikatörler kullanılarak voltametrik olarak araştırmışlardır. Etilen mavisi, çözelti fazında ve ayrıca elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile etkileşim öncesi ve etkileşim sonrası olmak üzere araştırılmıştır. Kinazolin çözeltisinde biyosensörün inkübasyonunda DNA'ya ciddi bir hasar verdiği görülmüş ve burada elektrot yüzeyinden DNA kaybına neden olduğunu belirlemişlerdir.

Elde edilen sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile doğrulamışlardır.

Arıksoysal ve Topkaya (2016), çalışmalarında, ilk kez Karbon ve MWCNT SPE'lerin uygun bir şekilde kullanıldığını belirtmişlerdir. GSTP-1 geninin hipermetilasyonunun etiketsiz elektrokimyasal tespiti için transdüksiyon materyali. CNT'lerin modifiye edilmiş elektrotları, yüksek yüzey/hacim oranını sağlayarak, DNA'nın yüzey ile etkileşimini güçlendirerek ve elektron transfer reaksiyonlarını teşvik ederek guanin oksidasyon sinyallerini arttırdığını rapor etmişlerdir. SPE'lerin ve CNT'lerin kombinasyonu, elektrotların elektron transfer özelliklerini destekleyerek, düşük algılama potansiyelleri sınırlandırarak azalttığını belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlar ile hem karbon hem de MWCNT SPE'leri, yüzeyinde probun etkin bir şekilde immobilizasyonunu, hedef ile probun sağlam bir hibritleşmesini ve hibridizasyonun hassas bir şekilde tespit edilmesini sağladığını göstermişlerdir. DNA hipermetilasyonu, aynı zamanda, metillenmemiş ve metillenmiş dizilerin elektrokimyasal tepkilerinin başarılı bir şekilde ayırt edilmesi için de kullanıldığını belirterek, geliştirmiş oldukları biyosensör ile oligonükleotitlerin aktivitesini bir pikomolar saptama seviyesi ile 40 güne kadar kararlılık elde etmişlerdir. Ek olarak, tasarlamış oldukları biyosensör, hedef DNA'nın daha fazla ölçümü için yeniden üretilebilir özellikte olduğunu belirtmişlerdir. Temel bir elektrot rejenerasyon protokolü kullanarak ve uygun maliyetli bir algılama elde etmişlerdir. Yeni geliştirilen bu biyosensörün diğer taşınabilir sensörlerin tasarımını desteklemesi ve çeşitli kit tipi biyosensörler oluşturmuşlardır.

2.1.3. Antikanser İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları

Antikanser ilaçların tayini, DNA ile etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin türünün belirlenmesine yönelik analitik metotlara olan gereksinim son derece önemlidir. Ortaya çıkan değişikliklerin saptanması ve açıklanması giderek zorlaşmaktadır. Bu nedenler, yenilenmiş analitik tekniklerin ve metodolojilerin uygulanmasına temel oluşturmaktadır. DNA-ilaç etkileşimlerini araştırmak için çoğunlukla spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemler kullanılmakla beraber, kromatografik yöntemlerden de bu amaçla yararlanılmaktadır.

Doğan Topal ve Özkan (2011), PGE kullanarak dsDNA ile anti kanser ilacı olan fulvestrantın etkileşimini DPV yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Guaninin oksidasyon sinyallerinin yoğunluğundaki azalma temelli etkileşim mekanizması fulvestrant'ın hassas belirlenmesinde kullanmışlardır.

Mirmomtaz, Zirakbash ve Ensafi (2016), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, 6-

Tiyoguaninin (6-TG) elektrokimyasal davranışı ve ds-DNA ile etkileşimini, asılı damla cıva elektrot (HMDE) ile incelemişlerdir. Analizler, gerçek numunelerde, 6-Tiyoguanin tabletlerde ve ayrıca 6-TG kan serumunda 6-TG'nin belirlenmesi prosedürü kullanılarak araştırılmıştır. 6-TG'nin nötral tamponda ds-DNA ile etkileşimi, sonucunda yeni bir indirgeme pikinin ortaya çıkmasıyla etkileşim gerçekleşmiştir. Bu etkileşimi araştırmak için, birikme süresi ve potansiyeli ile ds-DNA konsantrasyonu gibi çeşitli parametreleri, adsorptif sıyırma voltametrisi (AdSV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) teknikleriyle optimize etmişlerdir. 6-TG anti-kanser ilacı ve ds-DNA arasındaki etkileşim mekanizmasını daha iyi anlamak amacıyla döngüsel voltametri ve UV-Vis spektroskopisi ölçümleri de ayrıca gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda 6-TG'nin ds-DNA ile etkileşimini açıklayan bir mekanizma önermişlerdir.

Muti ve Muti (2018), gerçekleştirmiş oldukları çalışmada, kafeik asit antioksidanın DNA-antikanser ilacı daunorubisin (DNR) etkileşimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. DNR ve DNA arasındaki etkileşimi, antioksidan, kafeik asit varlığında ve yokluğunda aynı potansiyelde guanin (1.0 V) ve DNR (0.5 V) oksidasyon sinyallerini değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda kafeik asit yokluğunda DNA'nın DNR ile etkileşimi sonucunda %S değeri, %81 orta derecede toksik olarak elde edilirken, kafeik asit varlığında %S, %122.4 yani toksik olmayan olarak elde etmişlerdir. Bunun sebebi olarak kafeik asitin, DNA'nın minör oluklarına bağlanarak etkileşen DNR ile yarışmalı olarak reaksiyona girdiğini önermişlerdir.

Karimi-Maleh ve diğerleri (2018), farmasötik numunelerde didanosin (DDI) tayini için bir DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Bu amaçla, polipirrol (PPy) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) (PGE / PPy / rGO) modifiye edilmiş bir kalem grafit elektrot yüzeyine dsDNA immobilize edilmiştir. Daha sonra DDI'nın DNA ile etkileşimi, diferansiyel puls voltametrik (DPV) yöntemiyle guanin ve adenin oksidasyon sinyalleri üzerinden değerlendirilmiştir. DDI, 0.02-50.0 µM aralığında doğrusallık elde etmişlerdir. Modifiye elektrodun, LOD değeri DDI için 8.0 nM olarak belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen metod gerçek numunelerde uygulanmış ve elde edilen veriler HPLC yöntemiyle karşılaştırılmıştır. İki farklı yöntemi doğrulamak amacıyla F-testi ve t-testi kullanmışlardır.

Aydoğdu Tığ , Zeybek ve Pekiardımcı (2016), yapmış oldukları çalışmada poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) (P(PDCA)) modifiye camı karbon elektrot (GCE) ile antikanser ilaç gemcitabine (GEM)'in dsDNA ile etkileşim mekanizmasını DPV yöntemiyle incelemişlerdir. GEM etkileşimi sonrasında dsDNA guanin oksidasyon sinyallerinde belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Guanin oksidasyon sinyallerindeki

etkileşim sonrasındaki bu azalma sonrasında GEM 'in selektif bir indikatör olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. 1-30 mg/L konsantrasyon ralığında guanin oksidasyon sinyallerinide lineerlik gözlenmiştir. Sırasıyla LOD ve LOQ değerleri 0.276 mg/L ve 0.922 mg/L olarak belirlenmiştir. Ayrıca tekrar elde edilebilirlik, tekrar edilebilirlik ve geri kazanım değerleri tablet ve kan serumunda belirlenmiştir. Kullanılan DPV metoda ek olarak, ilaç DNA etkileşim mekanizmasını aydınltma amacıyla UV–vis ve viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Geliştirilmiş olan DNA biyosensörünün, GEM'in hassas, doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

2.1.4. Tamoksifen İle Yapılmış DNA Etkileşim Çalışmaları

Guo ve diğerleri (2008), TAM'ı doğrusal tarama voltametrisi yardımıyla karbon pasta elektrot ile elektrokimyasal olarak incelemişlerdir. Oksidasyon çalışmaları için en uygun tampon çözelti olarak pH=4.1 ABS'ı belirlemişlerdir. Ayrıca analitik tayin parametreleri belirlenmiştir. Buna göre 7.0×10^{-10} - 3.0×10^{-8} mol/L'de lineerlik elde etmişlerdir. Tabletten geri kazanım çalışmaları yaptıkları TAM'ın çeşitli interfazlar içerisinde (glikoz, üre, askorbik asit, dopamin, serin, arginin) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Kumar ve Mahesh (2017), Tamoxifen (TAM) ve Herring Sperm DNA (Hs-DNA) arasındaki etkileşimi, Britton-Robinson pH: 7.40 tamponunda voltametrik (CV ve DPV) UV-vis, spektrofolorimetrik ve viskometrik yöntemlerle DNA ile etkileşim yolunu incelemiştir. Ayrıca absorpsiyon ve floresans spektrumlarında söndürme emisyonu araştırılmıştır. Karbon pastası elektrot (CPE) kullanarak voltametrik yöntem ile gerçekleştirilen araştırma sonucunda, tamoksifen etken maddesinin elektrostatik ve DNA oluklarına bağlanma etkileşimi gösterdiği yönünde sonuç elde edilmiştir. Spektroskopik analiz sonuçları incelendiğinde tamoksifen etken maddesinin baskın olarak küçük oluklara bağlanma eğilimi gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. UV absorpsiyonu, spektrofluorimetri ve voltammetrik ölçümlerden elde edilen bağlanma sabitlerinin değerleri birbirine yakın olduğundan. Elde edilen sonuçlar mevcut yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Moghaddam, Beitollahi ve Dehghannoudehd (2017), meme kanserinin önlenmesi ve tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan; oral, steroid olmayan bir antiöstrojen ilaç olan TAM'ın DNA ile etkileşimini DPV yöntemiyle elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Tamoksifen'i belirlemek için grafen pasta elektrodu (GPE), somon-sperm çift sarmallı DNA (ds-DNA) ile modifiye edilmiştir. DNA modifiye karbon pasta elektrot ile gerçekleştirilen tamoksifen etken maddesi kalibrasyon analizinde 8.0×10^{-7} ve 8.5×10^{-5}

aralığında lineerlik elde edilmiştir. DNA modifiye karbon pastası elektrot ayrıca tamoksifen tabletinde, serum ve idrarda uygulanmıştır.

Literatürdeki sonuçlar ve tez kapsamında gerçekleştirilen araştırmalar neticesinde guanin oksidasyon sinyalindeki artışın hem elektrokimyasal hem de interkalatif yönde DNA ile etkileştiği sonucuna varılmıştır. TAM'ın sudaki çözünürlüğünün az olması ve seçiciliğinin de düşük olması uzun süreli kullanımlarda hastaların çeşitli kanserlere yakalanma riskini arttırdığı çalışmalar mevcut olduğundan (How ve diğerleri, 2013; Lazzeroni ve diğerleri, 2012) ve ilaca karşı direnç risklerinin mevcut olmasından dolayı oluşan yan etkilerin (Hashem, Nasr ve Khairy, 2014) minimum düzeye indirgenmesi için doza bağlı hasta başı analizlerde kullanılacak bir DNA biyosensör meme kanseri tedavisinde TAM'ın uygulandığı hastalarda ciddi önem arz etmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Elektrokimyasal ölçümler için; Kalem Grafit Elektrot (PGE) ve Perde baskılı karbon elektrot (SPE), Çok duvarlı karbon nanotüp modifiye karbon elektrot (MWCNT/PGE) (Çalışma elektrodu); Rotring 0.5 Tombo 2B model, 0.5 mm , Dropsense. Ag/AgCl (Referans elektrot), Platin Tel (Yardımcı elektrot) 3' lü Elektrot Sistemini içeren ve Yazılım Programı; GPES 4.9 olan AUTOLAB tip II; Metrohm Potansiyostat kullanılmıştır. Maddelerin tartımı için; Metler Toledo Classic AB-54s, Hassas Terazisi; pH ölçümleri için Inolab WTW model pH-metre; Çözeltilerin karıştırılması için, Thermo Shaker TS-100, Boeco model Karıştırma Hızı ve Sıcaklık Ayarlı Karıştırıcı; Thermo EC 330 model Elektroforetik Jel Sistemi; çözeltilerin hazırlanması için Otomatik Mikropipetler ve Eppendorf tüpler kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Asetik Asit (CH_3COOH) (%99–100); Riedel-de Haen
- Hidroklorik Asit (HCl) (%37); Riedel-de Haen
- Sodyum Klorür (NaCl); Sigma
- Sodyum Hidroksit (NaOH); Riedel-de Haen
- Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4); Merck
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4); Merck
- Sitrik Asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); Sigma-Aldrich
- Glasiyel asetik asit (%99-100); Merck
- Magnezyum klorür (MgCl_2); Sigma-Aldrich
- Borik asit (H_3BO_3); Sigma
- H_3PO_4 (Fosforik asit); Sigma

3.3. Sentetik DNA Dizileri

Çalışmada kullanılan sentetik diziler ve bu dizilere ait nükleotid sıralaması Tablo 3'de belirtilmiştir. BRCA-1 dizisi tedavisinde TAM'ın kullanıldığı meme kanserine sebep olan gen bölgesine ait sentetik oligonükleotit dizisidir.

Tablo 3

Araştırmada kullanılan sentetik oligonükleotid dizilerinin listesi

Sentetik Oligonükleotid Dizileri	Baz Sayısı	Kısaltma
5'- GATTTT CTCCT TTTGTT C-3'	19	BRCA-1 PROB
5'- GAACAA AAG GAA GAA AAT C -3'	19	BRCA-1 HEDEF
5'-TTG TCCTTCATG CCA GCG AA-3'	20	COMT PROB
5'-TTCGCTGGCATGAAGGACAA-3'	20	COMT HEDEF
5' -ACC TTC GGC AAA AGC TTC AAT ACT CCA-3'	27	INF-B PROB
5'-TGG AGT ATT GAA GCT TTT GCC GAA GGT-3'	27	INF-B HEDEF

Tablo 3'de listelenmiş sentetik oligonükleotidler, aşağıdaki kaynaklardan seçilmiştir.

COMT sentetik dizileri gen bankası Val108/158 Met polimorfizm (rs4680) bölümünden seçilmiştir (Lotta, 1995), (Ariksoysal, 2008).

INF-B sentetik dizileri ise HA geni, B/ Kobe/1/94 (GenBank accession no. D38646) bölümünden seçilmiştir (Schweiger, 2000).

Meme kanseri hastalık gen bölgesine ait sentetik BRCA-1 oligonükleotidleri gen bankasının E908X WT breast cancer 1 bölümünden seçilmiştir (Tong ve diğerleri, 1999).

3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılmak üzere hazırlanan tüm çözeltilerde 18 Mega-ohm'luk ultra saf su kullanılmıştır. Deneylerde asetat, fosfat ve Britton–Robinson tampon çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan tampon çözeltiler, bir sonraki kullanıma kadar steril cam şişelerde, buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

0.05 M Fosfat tamponu çözeltisinin (PBS) hazırlanışı (pH:7.40):

0.05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1.36 g (0.01 mol) potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) ve 6.96 g (0.04 mol) dipotasyum monohidrojen fosfat (K₂HPO₄) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'ı yaklaşık 7.40 olacak şekilde ayarlanıp, üzerinederişimi 0.02 M NaCl olacak şekilde 1.168 g NaCl eklenmiştir.

0.5 M Asetat tamponu çözeltisinin (ABS) hazırlanışı (pH:4.80):

0.5 M ABS litresinde 0.5 mol glasiyel asetik asit olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı 4.80 değerine, 0.1 M NaOH ve/ya da 0.1 M HCl ilavesiyle pH metre ile ölçülerek ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon çözelti tuz (NaCl) derişimi 0.02 M olacak şekilde (1.168 g) NaCl eklenmiştir.

Britton – Robinson tampon çözeltisinin hazırlanışı:

2.47 gr H_3BO_3 , 2.7mL derişik H_3PO_4 ve 2.3mL glasiyel CH_3COOH kullanılarak hazırlanmıştır. 1000 mL balon jojeye bir miktar distile su eklendikten sonra asit karışımı eklenerek çözelti tamamlanmıştır. Elde edilen asit çözeltisinin pH'ını ayarlamak amacıyla 0.2 M NaOH çözeltisi kullanılarak istenilen pH değeri ayarlanmıştır. B-R tampon çözeltisi pH:2.09–12.00 civarında geniş çalışma aralığına sahiptir (Yılmaz, 2016).

3.5.Oligonükleotit, dsDNA ve ssDNA Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tüm oligonükleotit stok çözeltileri Mili Q distile su ile 1000 μ g/mL derişiminde olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler kullanıma kadar $-20^{\circ}C$ 'de saklanmıştır.

3.6. BRCA 1 Gen Bölgesine Ait Oligonükleotid Çözeltilerinin Uygun Hibridizasyon Koşullarının Belirlenmesi

COMT ve INF-B sentetik oligonükleotid dizileri, tez kapsamında deneysel uygulamaların gerçekleştiği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilimdalı 1 nolu Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda daha önce optimize edilmiş çalışmalardır.

COMT sentetik dizileri gen bankası Val108/158 Met polimorfizm (rs4680) bölümünden seçilmiştir (Lotta, 1995), (Ariksoysal, 2008).

INF-B sentetik dizileri ise HA geni, B/ Kobe/1/94 (GenBank accession no. D38646) bölümünden seçilmiştir (Schweiger, 2000).

Meme kanseri hastalık gen bölgesine ait sentetik BRCA-1 oligonükleotidleri gen bankasının E908X WT breast cancer 1 bölümünden seçilmiştir (Tong ve diğerleri, 1999). Araştırmanın gerçekleştirildiği laboratuvarında optimize edilerek diğer sentetik dizilerle aynı deney şartlarında çalışılmıştır.

3.6.1. Tuz Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Farklı iyonik kuvvete ve baz konformasyonuna sahip hedef ve prob dizilerinin optimum tuz konsantrasyonuna sahip tampon içerisinde hibridizasyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir (Subak ve Ariksoysal, 2018). Bu sebeple uygun hibridizasyon tamponunu belirlemek amacıyla, PBS tamponunun 20-50-130-250-500-1000 mM'lık NaCl çözeltileri hazırlanarak prob ve hedef sentetik oligonükleotidler bu çözeltiler içerisinde hibritleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 36.'da verilmiştir.

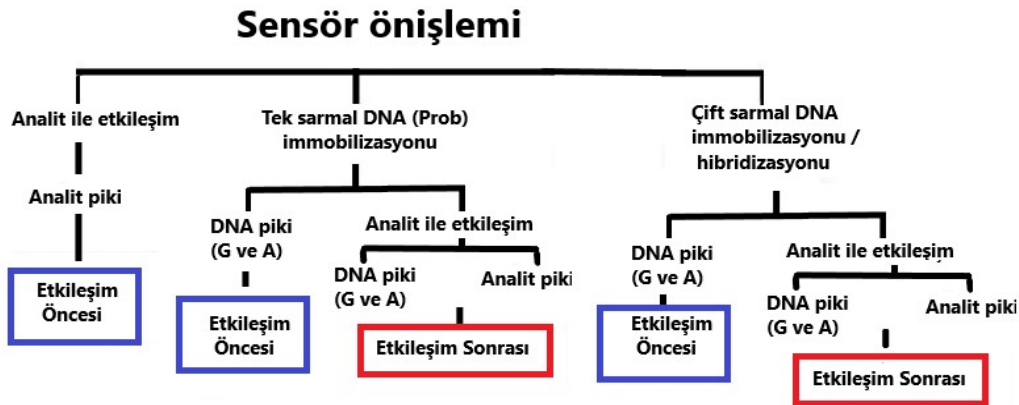
3.6.2. Prob Hibrit Konsantrasyonlarını Belirlenmesi

Hastalık gen bölgesine ait sentetik hedef oligonükleotid ile hibritleşecek en uygun prob sentetik oligonükleotid derişiminin belirlenmesi amacıyla en yüksek sinyalin belirlendiği elektrot yüzey doygunluğuna ulaşılan ilk konsantrasyon olan 4ppm hedef modifiye PGE ile etkileştirilmek üzere artan derişimlerde prob çözeltileri ile hibridizasyon sağlanmıştır. Bu deneyde en yüksek guanin oksidasyon sinyalindeki farklanma amaçlanmıştır. Bunun için 4 ppm hedef derişimli PGE modifiye elektrotlara pasif adsorbsiyon yoluyla 20 dk süreyle, 1-2-4-6-8-10 ppm prob çözeltileri ile 20 dakika boyunca hibridizasyon sağlanmış ve Britton-Robinson pH=4.50 tamponunda guanin oksidasyon sinyalleri değerlendirilmiştir.

3.7. Deneylerde Kullanılan Yöntemler

Elektrot yüzeyi tüm prosedürlerden önce pH=4.50 ABS çözeltisi içinde aktive edilmiştir. Daha sonra çözelti ortamında etkileşimi incelemek amacıyla adsorpsiyon tekniği ile elektrot yüzeyine sabitlenmiş ilaç/dsDNA, ilaç/ssDNA ve ilaç/oligonükleotidlerin aşağıda belirtilen şartlarda ölçümü yapılmıştır.

Yüzey fazındaki ilaç-DNA etkileşimi, hibridizasyondan önce ve sonra incelenmiştir. Etkileşim sonrası prosedür için, elektrot yüzeyinde hibridizasyonu gerçekleştirilmiş oligonükleotidler ilaç ile etkileştirilmiş ve ölçüm alınmıştır. Etkileşim öncesi prosedür için, prob oligonükleotid immobilize edilmiş elektrot yüzeyi ilaçla etkileşime sokulduktan sonra hedef oligonükleotid ile hibridizasyona tabi tutulmuştur (Şekil 14.). Etkileşim sonucunu incelemek amacıyla aynı şartlarda ölçümler alınmıştır. Ayrıca ilacın elektrokimyasal davranışı CV ve DPV teknikleri ile de araştırılmıştır.



Şekil 14. DNA biyosensörleri kullanılarak bazı antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin elektrokimyasal tayini. (Yazar tarafından çizilmiştir)

3.7.1. Guanin Sinyali için Optimum Şartların Belirlenmesi

Kullanılan elektrotların aktivasyonu, elektrot yüzeyine dsDNA, ssDNA ve oligonükleotidlerin immobilize edilmesi (tutturulması), DNA materyalinin madde ile elektrot yüzeyinde ve/veya çözelti fazında etkileşmesinde, mevcut literatürlerde (Erdem ve Ozsoz, 2001a; Erdem ve Ozsoz, 2001b; Ozsoz ve diğerleri, 2002) belirtilen basamaklar izlenmiştir.

3.7.2. Çözelti ortamında PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki Oligonükleotid, ssDNA ve dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini

PGE aktivasyonu: Kalem grafit elektrot yüzeyi, 0.50 M ABS tamponu (pH=4.80) içinde +1,40 V uygulanarak 30 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edilmiştir (Subak ve Arıksoysal, 2018).

PGE yüzeyine ssDNA ve dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive edilmiş PGE, ABS tamponu (pH=4.80) içinde hazırlanmış olanilac (5µM) ve ssDNA (10ppm) ve dsDNA(10ppm) çözeltisine daldırılmıştır (Subak ve Arıksoysal, 2018).

Oligonükleotidler, 5µM ilac çözeltisi ile aşağıdaki derişimlerde etkileştirilmiştir.

	PROB (ppm)	HEDEF (ppm)
COMT	10	15
INF-B	7	12
BR	4	6

Karışmayan ortamda elektrot yüzeyine immobilize edilen DNA materyalleri adsorbe olmamış materyallerin elektrot yüzeyinden uzaklaştırılması için Britton–Robinson tamponu (pH 4.80) ile 5 sn boyunca karışan ortamda yıkanmıştır.

Ölçüm: +0.5V ile +1.60V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genişliğinde tarama yapılarak, Britton–Robinson tamponu (pH=4.80) ortamında ölçüm gerçekleştirilmiştir. +1.00V civarında gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalindeki değişim incelenmiştir.

3.7.3. Yüzey Ortamında PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen Farklı Derişimlerdeki Oligonükleotid, ssDNA ve dsDNA'ya Ait Guanin Yükseltgenme Sinyalinin Tayini

PGE aktivasyonu: PGE yüzeyi, 0.50 M ABS tampon çözeltisi içinde (pH=4.80) +1.40 V uygulanarak 30 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

PGE yüzeyine oligonükleotid, ssDNA ve dsDNA immobilizasyonu: Yüzeyi aktive

edilmiş PGE, ABS tamponu (pH=4.80) içinde hazırlanmış olan ilaç, ssDNA ve dsDNA çözeltisine daldırıldı. Prob dizisi immobilize olan elektrotlar, etkileşim öncesi ilaç etkileşimini araştırmak amacıyla hedef dizisiyle hibritleştirilmeden önce; etkileşim sonrası etkiyi araştırmak amacıyla ise hibritleştirildikten sonra ilaçla etkileşime sokulmuştur.

Oligonükleotidler, 5 μ M ilaç çözeltisi ile aşağıdaki derişimlerde etkileştirilmiştir.

	PROB (ppm)	HEDEF (ppm)
COMT	10	15
INF-B	7	12
BR	4	6

Ölçüm: ABS tamponu içerisinde hazırlanan dsDNA ve ssDNA B–Rn tamponuyla karışan ortamda 5 sn boyunca yıkandıktan sonra tekrar Britton–Robinson tamponunda, +0.60V ile +1.50V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak ölçümü alınmıştır.

3.7.4. Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile Çözelti ortamında Gerçekleştirilen Çalışmalar

SPE aktivasyonu: SPE yüzeyi, 0.50 M ABS çözeltisi içinde (pH=4.80) +1.80V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi. Aktivasyon işlemi için, üçlü elektrot sistemini içeren sensör yüzeyine 70 mL ABS damlatıldı. Daha sonra, karbon elektrot yüzeyinde bir karboksil grubu tabakası oluşturmak amacıyla +1.80 potansiyel uygulanmıştır (Topkaya ve Ozkan-Ariksoysal, 2016), (Ariksoysal, 2017), (Ariksoysal, 2019).

Analiz edilmek istenen ilaç–DNA çözeltisi aktive edilmiş elektrot yüzeyine immobilize edilerek +0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür.

3.8.TAM'ın Boş PGE'de Yükseltgenme Mekanizmasının İncelenmesi

3.8.1. Standart Maddelerin Stok Çözeltisi

Boş kalem grafit elektrot ile yapılan deneylerde kullanılan tamoksifen, 46 mg tartılarak, 5mL metanol içerisinde 5mM derişimde olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

3.8.2. PGE Aktivasyonu

PGE yüzeyi, 0.50 M ABS tampon çözeltisi içinde (pH=4.80) +1.40 V uygulanarak 30 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi (Subak ve Ariksoysal, 2018).

3.8.3. Voltametrik Yöntemin Tabletler Uygulanması

5 adet Tamoksifen® film tablet hassas olarak tartılmış ve bir havanda ince toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 5mM 'a eşdeğer miktarda tam tartılmış ve 15mL'lik plastik tüpte 5 mL metanol eklenerek hazırlanmıştır. Ultrasonik banyoda 1 saat karıştırılmıştır. Sonikasyon sonunda üstte kalan berrak çözeltiden piyasadaki tabletten stok çözeltiler elde edilmiştir. Stok çözeltiden uygun miktarlarda alınıp seçilmiş destek elektrolitleri (yüzeyde ve çözelti ortamında etkileşim için pH=4.50 ABS) ile tüpte gerekli hacimlere tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin B–R tamponunda voltamogramları alınmıştır.

3.8.4. Tamoksifen İçin Yapılan Geri Kazanım Çalışmaları

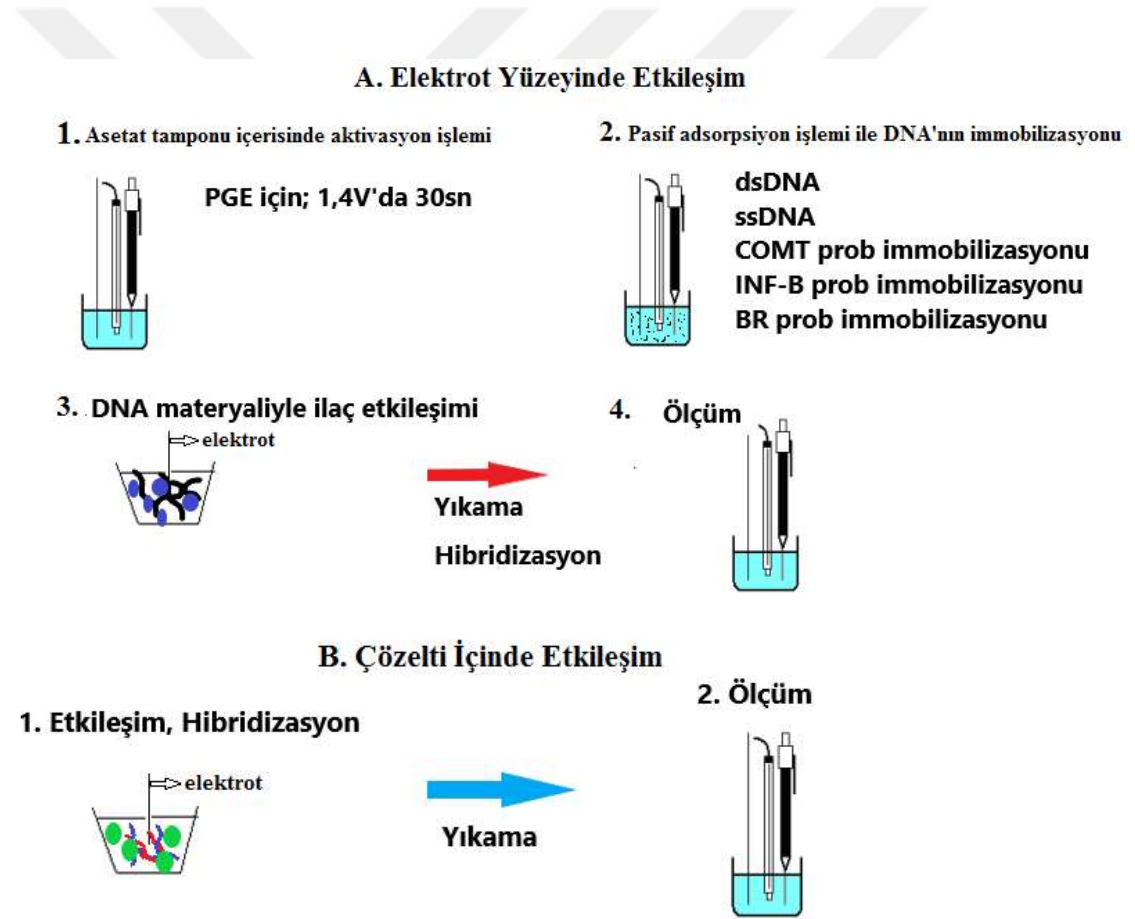
Tablet içerisindeki katkı maddelerinin girişim yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla tabletlerden geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 5 adet ticari halde satılan Tamoksifen® tabletleri elde edilip havanda homojenize toz haline getirilmiştir. TAM etken maddesiyle önceden belirlenmiş kalibrasyon aralığında belirli konsantrasyona denk gelen toz edilmiş tablet (TAM miktarı önceden tayin edilen) istenilen konsantrasyona karşılık gelecek hacimde metanol içinde çözüldükten sonra TAM etken maddesine uygulanan işlemler uygulanmıştır. Hazırlanan çözelti ultrasonik banyoda bir saat boyunca bekletilmiştir. Sonikasyon sonrasında üstte kalan berrak çözeltiden alınarak istenilen hacimlere seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi destek elektrolit çözeltisiyle yapılmış ve etken madde ile aynı şartlarda voltametrik analizi gerçekleştirilmiştir. Voltamogramları kaydedilen etken madde analiz edilen tablet çözeltisi ortamına bilinen miktarlarda eklenerek, standart etken maddenin kalibrasyon grafiğinden elde edilen değerle kıyaslanarak % geri kazanım miktarı belirlenmiştir. Bu yöntemle tablet içerisindeki katkı maddelerinin analiz sistemine etkisi araştırılmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. TAM'ın PGE'deki Elektrokimyasal Davranışı

PGE elektrotla yapılan çalışmalarda öncelikle ilgilenilen antikanser ilaç olan TAM'ın elektrokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla yükseltgenme özelliği gösterdiği belirlenen TAM'ın maksimum pik akımı verdiği destek elektrolit araştırılmıştır. En uygun destek elektrolit ortamı belirlenen TAM'ın akım türü dönüşümlü voltametri tekniğiyle incelenmiştir. Ayrıca piyasadaki etken madde içeren tabletlerden temin edilip geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Adsorbsiyon kontrollü olduğu belirlenen TAM'ın DNA materyalleriyle etkileşim yolu araştırılmıştır.



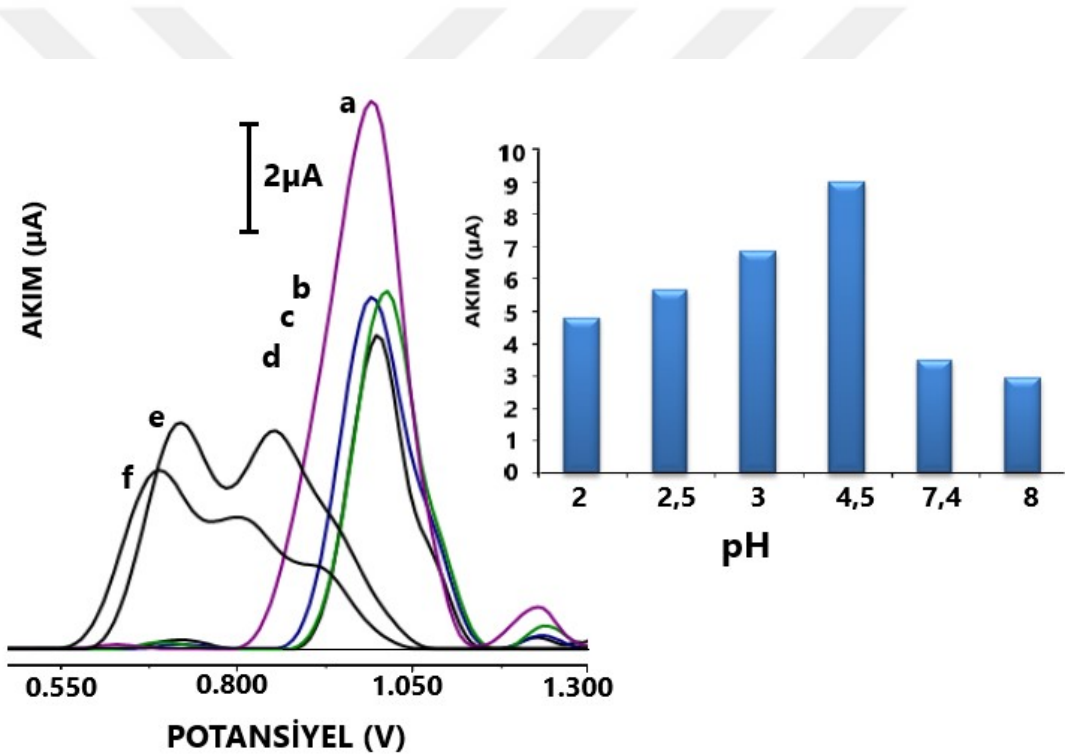
Şekil 15. PGE ile yapılan çalışmaların şematik gösterimi (Yazar tarafından çizilmiştir)

DNA etkileşim yolunu belirlemek amacıyla pasif adsorpsiyon yöntemiyle çözelti ve elektrot yüzeyi ortamında dsDNA, ssDNA ile incelenmiştir. Aralarında tamoksifen'in tedavisinde kullanıldığı meme kanseri gen bölgesinin de bulunduğu 3 farklı sentetik

oligonükleotid dizileriyle DNA etkileşim ilişkisi incelenmiştir. Bu etkileşim Şekil 15.'de şematize edildiği gibi hem çözelti ortamında hem de elektrot yüzeyinde incelenmiştir.

4.1.1. TAM'ın PGE'de Çalışma Ortamının Belirlenmesi

TAM'ın elektrokimyasal davranışını araştırmak amacıyla çeşitli tampon çözeltilerle (Fosfat Tamponu, Asetat Tamponu ve Britton-Robinson Tamponu) PGE kullanılarak DPV voltametrik ölçümleri alınmış, maksimum ve en keskin pik akımının gözlemlendiği pH=4.50 B-R tamponu destek elektrolit olarak seçilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar bu ortamda gerçekleştirilmiştir. PGE yüzeyinin maksimum doygunluğa ulaştığı konsantrasyon olan 100 μ M TAM'ın pH=4.50 B-R tamponunda, farklı pH'larda elde edilen voltamogramları ve histogramları Şekil 16.'da verilmiştir.

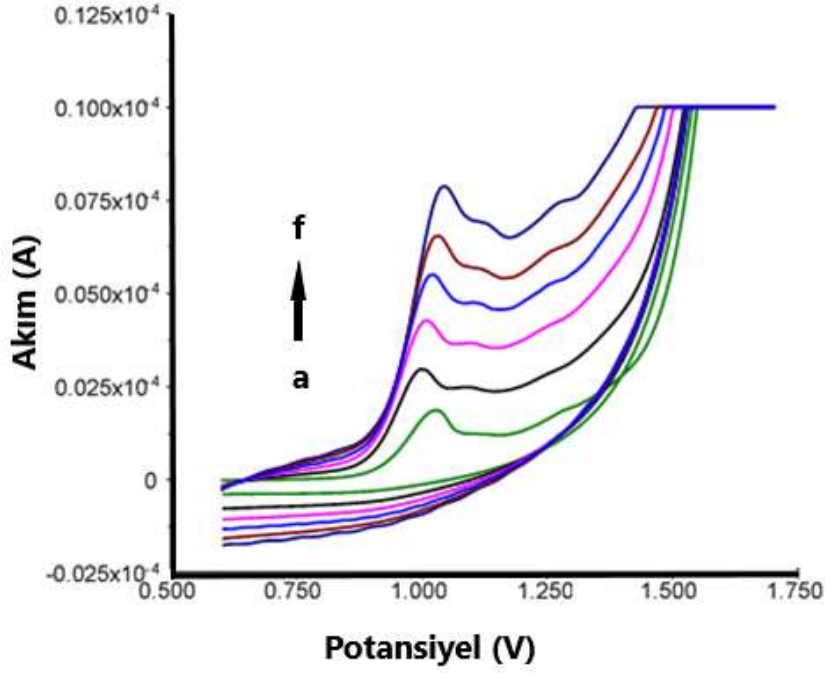


Şekil 16. 100 μ M TAM'ın pH=4.50 B-R tamponunda, farklı pH'larda kaydedilen DPV voltamogramları ve elde edilen histogramları (a:pH=4.50, b:3.00, c:pH=2.50, d:pH=2.00, e:pH=7.40, f:pH=8.00). (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında)

4.1.2. Akım Türünün Belirlenmesi

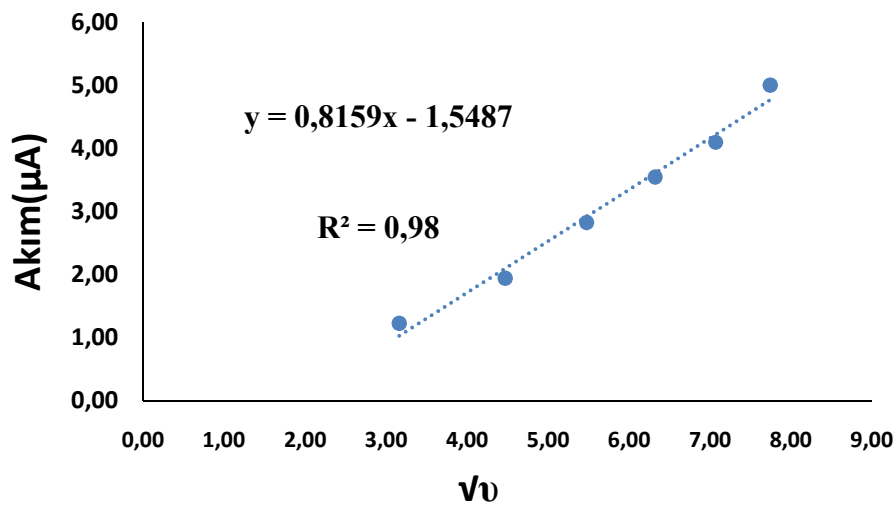
Destek elektrolit çözeltisi pH=4.50 B-R tamponu olarak belirlenen TAM, akım türünü belirlemek amacıyla anodik oksidasyon sonucunda pik akımının belirgin gözlemlendiği minimum konsantrasyon olan 5 μ M TAM etken maddesi ile incelenmiştir. 5 μ M çözeltisi hazırlanan TAM etken maddesinin 10, 20, 30, 40, 50, 60 mV/s tarama hızlarında TAM'ın

yükseltgenme sinyali dönüşümlü voltametri (CV) ile incelenmiştir (Şekil 17.).



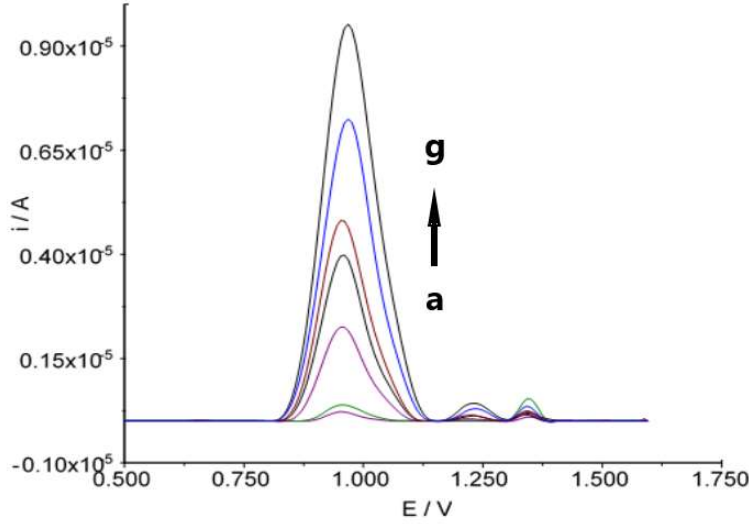
Şekil 17. 5 µM TAM çözeltisi ile PGE kullanılarak yapılan CV ölçümlerinde değişen tarama hızlarında ölçülen TAM yükseltgenme sinyallerinin ortalama değerlerine ait voltamogramlar (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60 mV/s.

Tarama hızı-akım değerleri kullanılarak, tarama hızının kare kökü-akım grafiği ($v^{1/2}$ -ip) ve logaritma tarama hızı-logaritma akım (logv-logi) grafiği çizilmiştir (Şekil 18. ve Şekil 19.).

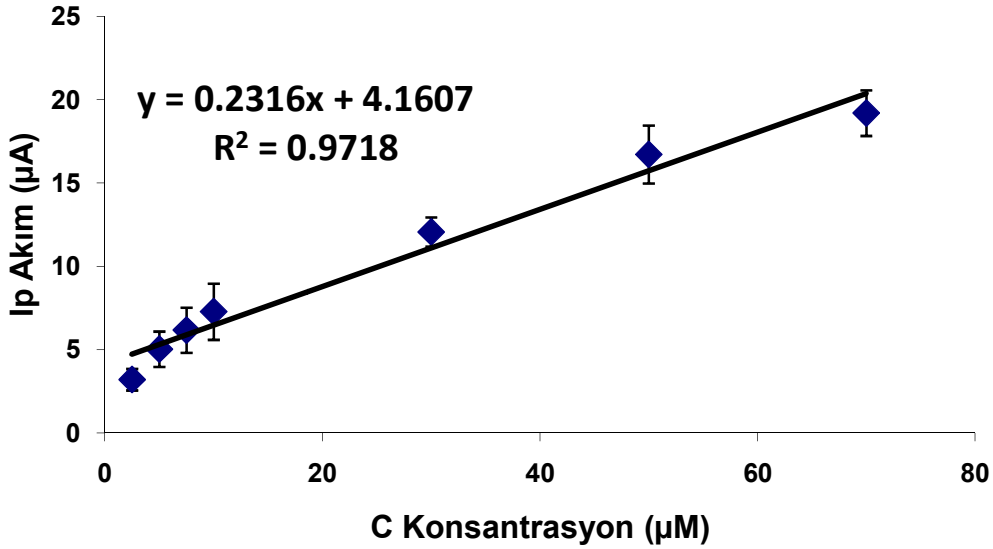


Şekil 18. 5µM TAM'ın DPV voltamogramlarından elde edilen pik akımı- karekök tarama hızı ($v^{1/2}$ -ip) grafiği.

ölçülmüştür. 2.5-70 μM arasındaki konsantrasyon değerlerinde lineerlik elde edilmiştir. Şekil 21.'de AM'in artan derişimine bağı akım değerlerini belirten DPV voltamogramları verilmiştir.



Şekil 21. TAM'ın artan derişime bağı DPV voltamogramı; (a) 2.5, (b) 5, (c) 7.5, (d) 10, (e) 30, (f) 50, (g)70 μM TAM (+0.75 V da 60 s biriktirme, +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında)



Şekil 22. TAM'ın B-R (pH=4.50) tamponundaki pik akımı-konsantrasyon (C-ip) grafiğı.

Şekil 22.'de belirtildiğı gibi analitik konsantrasyon aralığı 2.5-70 μM olarak belirlenen etken maddenin konsantrasyon-akım grafiğinin eğimi 0.2316, korelasyon katsayısı ise 0.9718 olarak hesaplanmıştır.

4.1.4. TAM'ın Analitik Tayin Parametrelerinin Belirlenmesi

Şekil 21.'de görüldüğü gibi artan derişimlerle kalibrasyon grafiğı oluşturulan TAM'ın analitik tayin parametreleri grafik değerlerinden elde edilen verilerle hesaplanmıştır. Buna göre ve sinyalin guanin oksidasyon sinyali bölgesinde olması değerlendirilerek, kalibrasyon grafiğindeki en düşük konsantrasyonun bir üstündeki konsantrasyon olan 5 M'da voltamogram alınarak akım değerlerinin standart sapması s, 4.46×10^{-3} olarak hesaplanmıştır. Bu değer 3s/m ve 10s/m eşitliklerinde yerine konularak belirme sınırı LOD, 8.66×10^{-8} ve kantitatif tayin sınırı LOQ, 2.88×10^{-7} M olarak hesaplanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4

TAM'ın pH=4.50 Britton-Robinson tamponunda DPV yöntemi kullanılarak elde edilen analitik tayin parametreleri

PARAMETRELER				SONUÇLAR
Ölçülen Potansiyel				1.000 V
Konsantrasyon Aralığı				2.5x10 ⁻⁶ - 7.0x10 ⁻⁵ M
Eğim				0.237
Eğimin Standart Sapması				0.012
Kayma				3.556
Kaymanın Standart Sapması				0.499
Ölçüm Sayısı				9
Korelasyon Sayısı				0.979
Gözlenebilme Sınırı, LOD (M)				1.51µM
Kantitatif Tayin Sınırı, LOQ (M)				5.06 µM
Gün	İçi	Pik	Akımının	5µM için, 2.17
Tekrarlanabilirliği, %RSD				
Günler	Arası	Pik	Akımın	5µM için, 3.50
Tekrarlanabilirliği, %RSD				

4.1.5. TAM'ın PGE'de İlaç Formundan Miktarının Belirlenmesi ve Geri Kazanımı

Tablet içerisinde yer alan katkı maddelerinin optimize edilmiş biyosensör sistemine etkisini araştırmak amacıyla piyasadaki TAM etken maddesi içeren tabletler temin edilmiştir. Bunun için bölüm 3.8.1.'de anlatıldığı gibi saf etken madde çözeltileri hazırlanarak bölüm 3.8.4.'de ifade edildiği şekilde geri kazanım çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. Tablo 5'de piyasadaki tabletlerden elde edilmiş geri kazanım çalışma sonuçları listelenmiştir.

Tablo 5
TAM tabletlerinden TAM'ın belirlenen miktarı ve geri kazanımı

PARAMETRELER		SONUÇLAR
Tablette belirtilen Tamoksifen Miktarı (mg)		20.00
Bulunan Tamoksifen Miktarı (mg)		20.55
Bağıl Standart Sapma, % RSD		3.99
Doğruluktan Sapma, % Bias		0.90
Eklenen Tamoksifen (mg)		20.00
Bulunan Tamoksifen (mg)		21.15
Geri Kazanım (%)		105.74

Analitik tayin parametreleri hesaplanmış ve PGE yüzeyi ile etkileşimi optimize edilmiş TAM etken maddesinin DNA ile etkileşim çeşidini aydınlatmak amacıyla DNA materyalleriyle etkileşim çalışmalarına geçilmiştir.

4.2. TAM'ın DNA Materyalleriyle Etkileşim Çalışmaları

DNA materyalleriyle etkileşim yolunu aydınlatmak amacıyla guanin oksidasyon bölgesiyle aynı noktada oksidasyon sinyali veren TAM etken maddesinin çözelti ortamında ve elektrot yüzeyinde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Adsorbsiyon kontrollü akım türü olduğu ve analitik tayin parametreleri belirlenmiş olan Tamoksifen etken maddesinin DNA ile etkileşim yöntemini belirlemek amacıyla öncelikle dsDNA ve ssDNA ile optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Optimize edilen parametreler sentetik oligonükleotidlere de uygulanarak etkileşim yolu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

4.2.1. Çözelti Ortamında Etkileşim Çalışmaları

Çözelti ortamında yapılan çalışmalarda bölüm 3.1 de belirtildiği şekilde hazırlanan ABS çözeltisi içinde 10ppm dsDNA ve 10 ppm ssDNA ayrı ayrı eppendorf tüpleri içinde çözeltileri hazırlanmıştır. Bölüm 3.6.2.'de belirtildiği şekilde analizler gerçekleştirilmiştir.

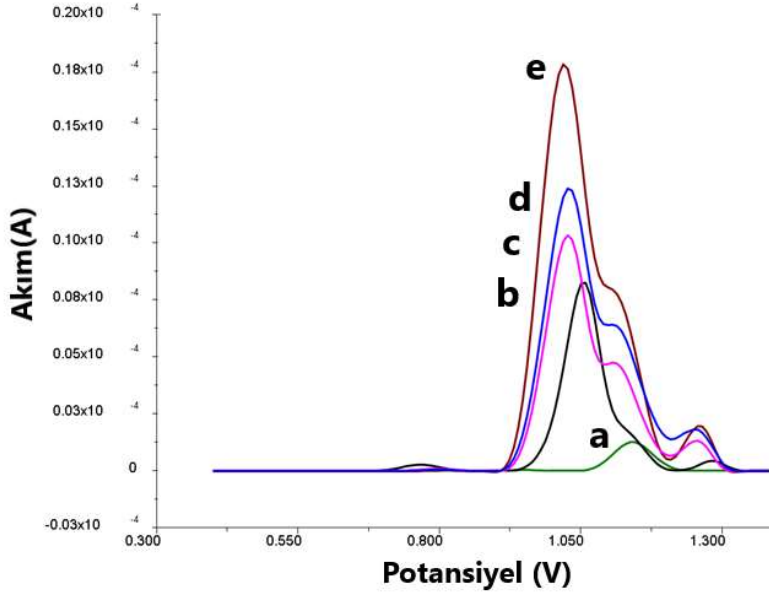
Öncelikle TAM etken maddesiyle etkileşim süresi araştırılan DNA materyalleri ayrı ayrı incelenmiştir.

dsDNA ve ssDNA ile Yapılan Çalışmalar:

Sentetik oligonükleotidlerle çalışılmaya başlamadan önce uygun derişimler ve etkileşim süreleri çözelti ortamında optimize edilmiştir.

dsDNA- TAM Etkileşim Çalışmaları:

Bölüm 3.6.2.'de belirtildiği şekilde dsDNA, TAM etken maddesi ve karışımlarını içeren çözeltiler ayrı ayrı hazırlanmıştır. Farklı sürelerde oda sıcaklığında etkileşimleri için aşağıda belirtilmiş sürelerde bekletilmiştir. Etkileşim sonunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

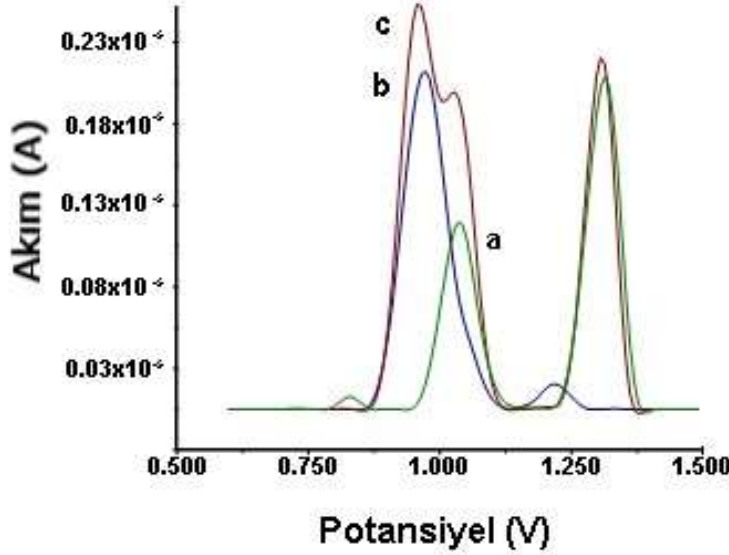


Şekil 23. Tamoksifen etken maddesinin dsDNA ile etkileşim süresini gösteren voltamogram; (a)10ppm dsDNA, (b) 5µM TAM, (c) 20dk etkileşim, (d) 60dk etkileşim, (e) 24 saat etkileşim sonunda elde edilen voltamogramlar (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

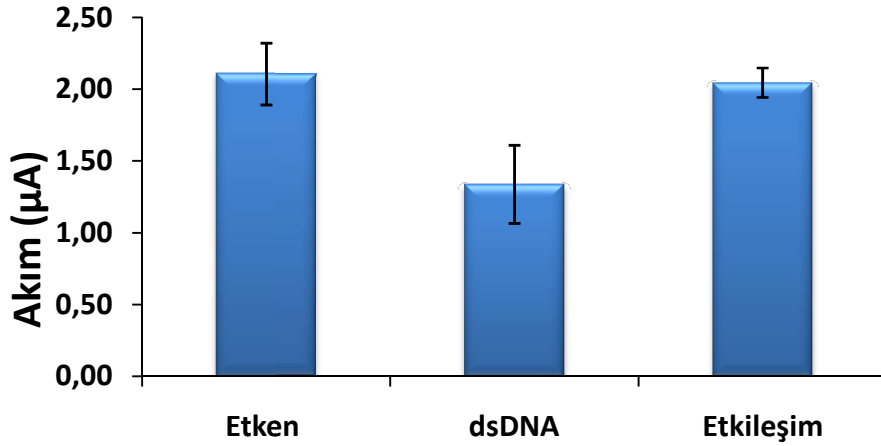
Şekil 23.'de gözlemlendiği üzere etkileşim süresi arttıkça guanin oksidasyon bölgesinde ve etken maddenin oksidasyon bölgesinde sinyal artışı meydana gelmektedir. Analiz süresini kısa tutmak amacıyla 60dk ve 20dk etkileşim sonunda ciddi farklanma söz konusu olmadığından deneysel uygulamalara 20dk etkileşim ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında 10ppm dsDNA ve 5µM TAM etken maddesinin +0.6/+1.5 V potansiyel aralığında çözelti ortamında ölçülmüş etkileşim sonucu DPV

voltamogramları Şekil 24.'de ve histogramları Şekil 25.'te belirtilmiştir. Etkileşim sonucuna göre ayrıca dsDNA'daki adenin oksidasyon bölgesinin etkilenmediği gözlenmiştir.



Şekil 24. Çözelti ortamında 10ppm dsDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren voltamogram; (a) 10ppm dsDNA, (b) 5µM Tamoksifen etken maddesi, (c) etkileşime ait DPV voltamogram (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

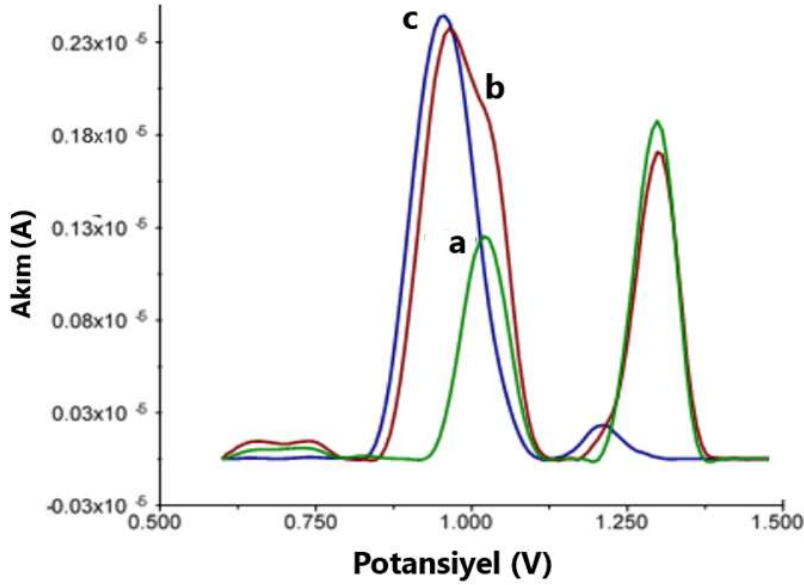


Şekil 25. Çözelti ortamında 10ppm dsDNA ile 5µM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren histogram.

Çözelti ortamı etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini voltammogramları sırasıyla dsDNA etkileşimi için a: dsDNA=1.34µA, b:TAM=2.11µA, c:Etkileşim = 2.05 µA (n=5) olarak elde edilmiştir. dsDNA ile etkileşimine ait optimizasyon çalışmaları çözelti ortamında tamamlanmış TAM etken maddesinin bu

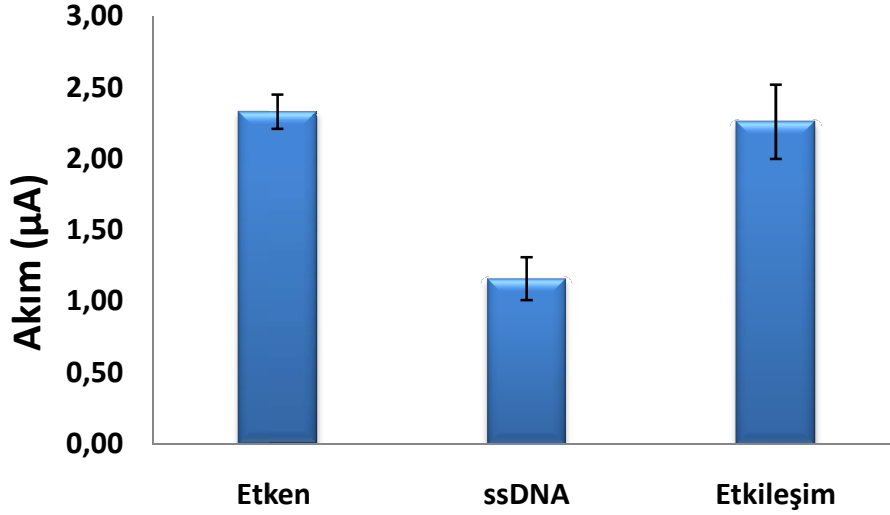
aşamadan sonra ssDNA ile etkileşim çalışmalarına geçilmiştir. Etkileşim sonunda guanin oksidasyon sinyalinde %65 oranında artış meydana gelmiştir.

ssDNA-TAM Etkileşim Çalışmaları:

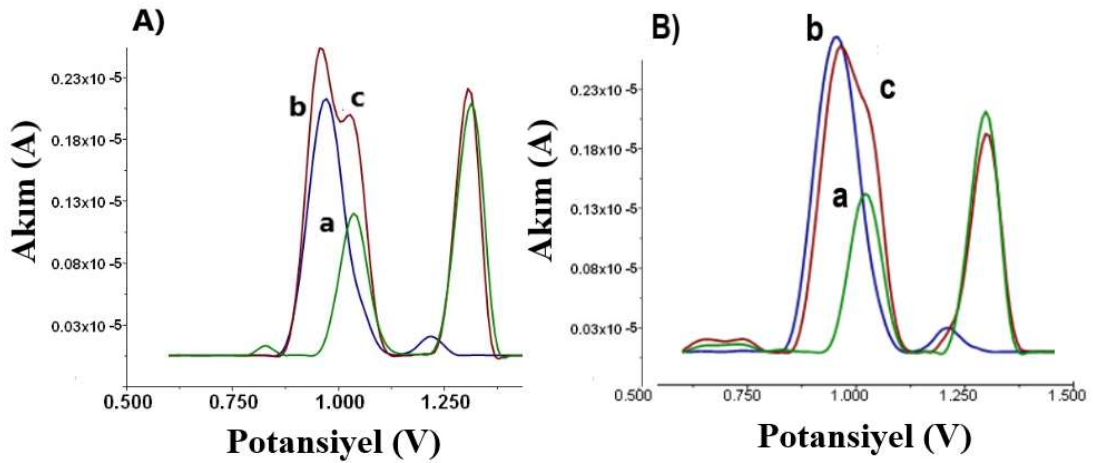


Şekil 26. Çözelti ortamında 10ppm ssDNA ile 5μM TAM etken maddesine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalinin voltamogram; (a)ssDNA, (b) Etkileşim sinyali, (c) 5μM TAM etken maddesi (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genişliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

Şekil 26.' de çözelti ortamında ssDNA için etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyalleri; a:ssDNA=1.16μA, b: Etkileşim = 2.26μA, c: TAM =2.33 μA (n=5) olarak elde edilmiştir. Voltamogramlarda gözlemlendiği üzere dsDNA'da olduğu gibi ssDNA'da da adenin bazının ilaçla etkileşmediği tespit edilmiştir. Ayrıca dsDNA ikili sarmaldan, ssDNA ise tek sarmaldan meydana geldiğinden baz sayıları farklıdır. Bu durum, TAM ile etkileşimin ardından çift sarmal DNA yapısında G-C arasındaki üçlü hidrojen bağlarının açılması veya bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır şeklinde yorumlanabilir. Bundan dolayı beklendiği gibi tek sarmaldaki baz sayısının ve dolayısıyla guanin bazının az olmasından dolayı guanin bazı oksidasyon sinyalinde dsDNA'ya göre azalma ve etkileşim sinyalinde dsDNA kadar artış gözlenmiştir (Şekil 26.) ve (Şekil 27.).



Şekil 27. Çözelti ortamında 10 ppm ssDNA ile 5μM TAM etken maddesine ait etkileşim öncesi ve sonrası guanin ve ilaç oksidasyon sinyalini gösteren histogram.



Şekil 28. A) 10ppm dsDNA ile 5μM TAM etken maddesine ait etkileşim voltamogramı; (a) 10ppm dsDNA, (b) 5μM TAM, (c) etkileşim voltamogramı. B) 10ppm ssDNA ile 5μM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim voltamogramı (a) 10ppm ssDNA, (b) 5μM Tamoksifen, (c) etkileşim voltamogramı (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genişliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

Etkileşimden sonra çözelti ortamında, dsDNA için %65 ve ssDNA için % 55'lik bir guanin oksidasyonu sonucu akım artışı gerçekleşmiştir (Şekil 28.). dsDNA ve ssDNA çözelti ortamında etken madde ile etkileşim çalışmaları tamamlanan TAM etken maddesinin bundan sonraki aşamada çeşitli sentetik oligonükleotid dizileri ile etkileşim türü araştırılmıştır. Bu noktaya kadar tek sarmal DNA ile kıyaslandığında, çift sarmal DNA ile daha yüksek etkileşim sinyali veren meme kanseri tedavisinde kullanılan TAM ilaç etken maddesinin farklı guanin bazına sahip sentetik oligonükleotidlerle nasıl etkileştiği ve

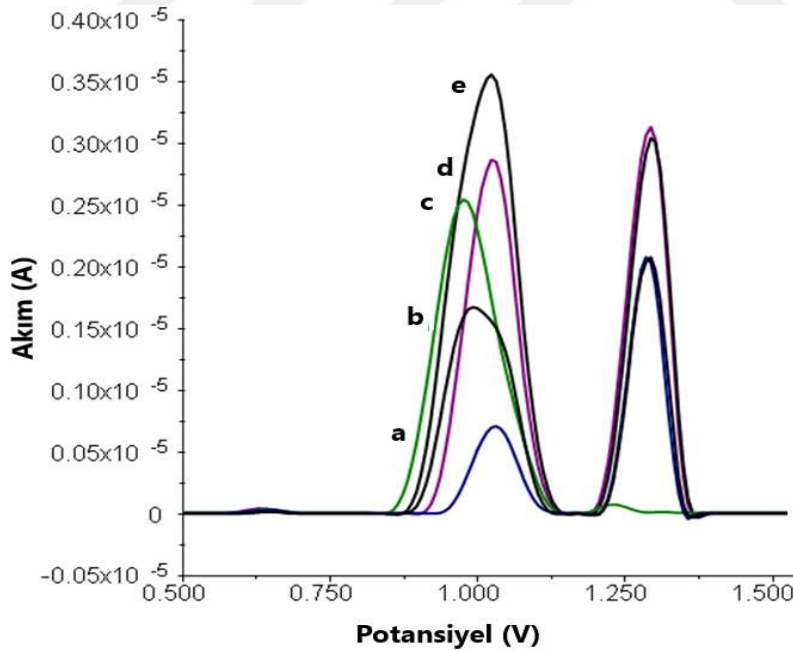
meme kanseri hastalık gen bölgesine ait BRCA-1 sentetik oligonükleotidlerle etkileşimi incelenmiştir.

Oligonükleotid Çözeltileriyle Gerçekleştirilen İlaç Etkileşim Sonuçları

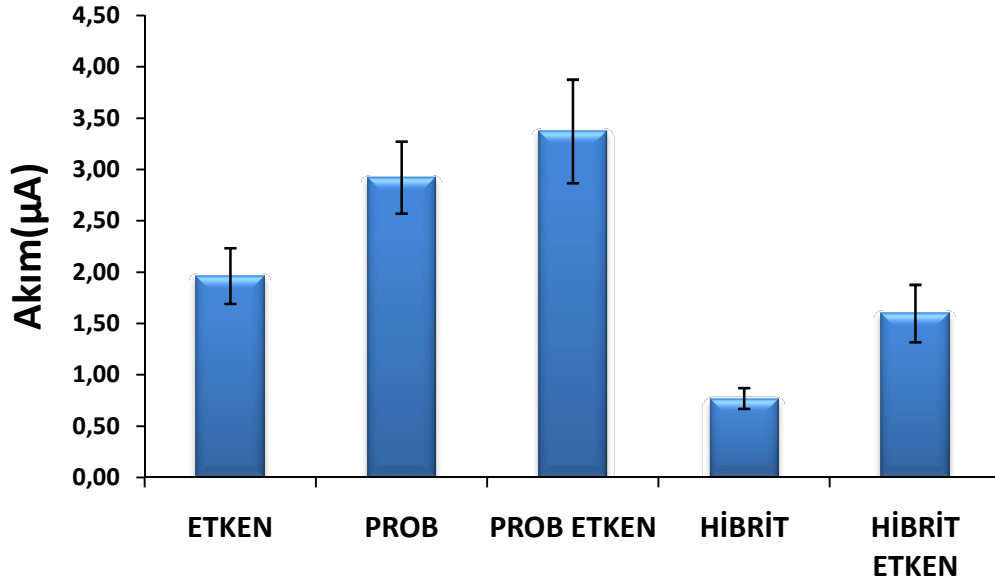
Çözelti ortamında gerçekleştirilen oligonükleotidlerle olan etkileşim çalışmalarında bölüm 3.6.2'de belirtildiği şekilde aynı şartlarda hazırlanan çözeltiler 1 saat etkileştirildikten sonra 20dk boyunca pasif adsorbsiyon yoluyla kalem grafit elektrot yüzeylerine immobilize edilmiştir. Sırasıyla COMT, INF-B ve BRCA-1 sentetik oligonükleotid dizilerine ait çözelti ortamındaki etkileşim sonuçları sırasıyla belirtilmiştir.

COMT Dizilerine Ait Çözelti Ortamında Gerçekleştirilen İlaç Etkileşim Çalışmaları:

Bölüm 3.6.2.'de belirtilmiş şartlarda COMT sentetik oligonükleotidleriyle (probe/hedef konsantrasyon 10/15ppm) muamele edilen TAM etken maddesi 20 dk boyunca pasif adsorbsiyon yoluyla aktive edilmiş PGE yüzeylerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri Şekil 29. ve elde edilen histogramı Şekil 30.'da belirtilmiştir.



Şekil 29. Çözelti ortamında COMT sentetik dizilerine ait etkileşim sonucu guanin ve ilaç oksidasyon sinyallerini gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (c) tek başına ilaç sinyali, (d) tek başına prob, (e) ilaçla etkileştirilmiş prob sinyali (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

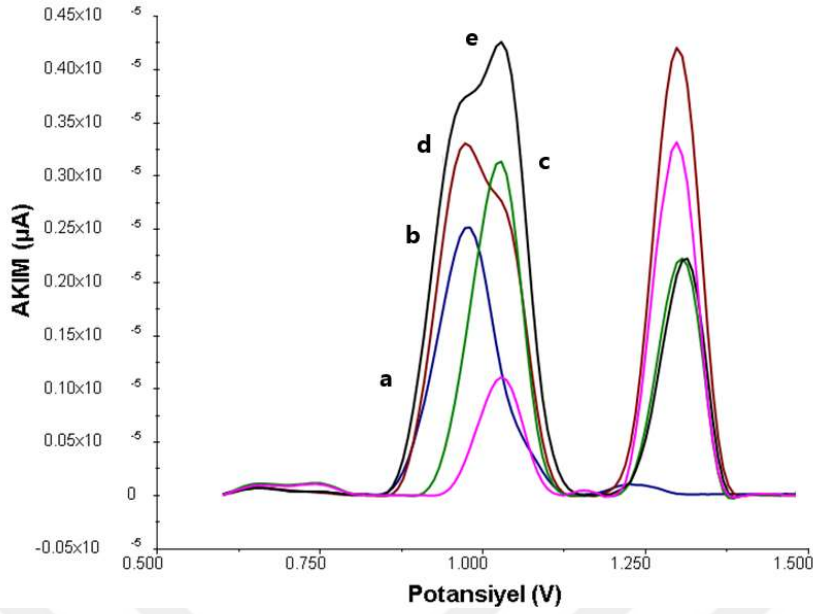


Şekil 30. Çözelti ortamında COMT sentetik dizilerine ait ilaçla etkileşim sonunda guanin oksidasyon ve ilaç oksidasyon ortalama sinyallerini belirten histogram

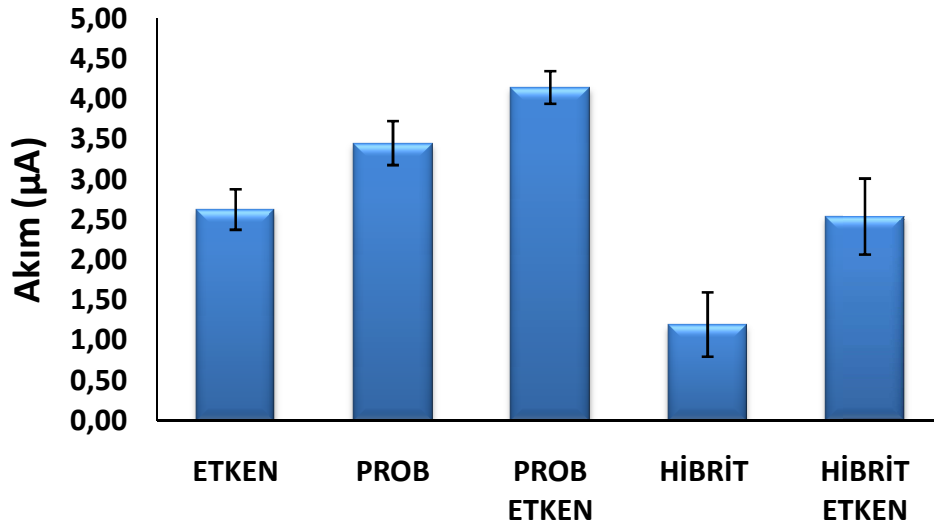
Şekil 29.'de belirtilmiş olan voltamogram sonuçları dsDNA ve ssDNA'nın gösterdiği sonuçlarla paralellik göstermektedir. Buna göre çözelti ortamında gerçekleştirilen analiz sonuçları için tek sarmal prob varlığında TAM etkileşimi sonrasında guanin oksidasyon sinyali %13 ve hibridizasyon sonucunda %52 olarak artmıştır. Bu sonuçlar tek sarmal olan COMT prob dizisi, ilaç etken maddesiyle etkileşim sinyalinin; COMT prob dizisine karşılık gelen hedef dizisiyle hibridizasyonu sonunda ilaç ile etkileşim sinyalinden daha düşük olduğu göstermiştir. Hibridizasyon sonucunda etkileşim sinyalinin hibridizasyon öncesi etkileşim sinyalinden yüksek olmasının sebebi çift sarmal oluklarını açılması veya etkileşim sonucu farklanma elde edilmesine sebep olması yönünde değerlendirilebilir. Guanin oksidasyon sinyallerini gösteren histogram Şekil 30.'da belirtilmiştir. Ayrıca dsDNA ve ssDNA da gözleendiği gibi adenin bazının ilaç etken maddesiyle etkileşmediği gözlenmiştir. Farklı dizilerde çözelti ortamında incelemelere devam edilmiştir.

INF-B Dizilerine Ait Çözelti Ortamında Gerçekleştirilen İlaç Etkileşim Çalışmaları:

Bölüm 3.6.2'de belirtildiği gibi aynı şartlarda hazırlanan çözeltiler 1 saat etkileştirildikten sonra 20dk boyunca pasif adsorbsiyon yoluyla PGE yüzeylerine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon sonucunda +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri Şekil 31. ve elde edilen histogramı Şekil 32.'de belirtilmiştir.



Şekil 31. Çözelti ortamında INF-B sentetik dizilerine ait ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b) tek başına ilaç sinyali, (c) tek başına prob, (d) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (e) ilaçla etkileştirilmiş prob sinyali (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).



Şekil 32. INF-B sentetik dizilerine ait etkileşim guanin oksidasyon sinyallerini gösteren histogram

Şekil 31. ve Şekil 32. da belirtildiği gibi çözelti ortamında INF-B dizileri, COMT dizileriyle benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuca göre prob varlığında TAM etkileşimi sonrasında guanin oksidasyon sinyali %14 ve hibridizasyon sonucunda guanin oksidasyon sinyali %65 olarak artmıştır. Bu sonuca göre benzer şekilde TAM çift sarmal oluklarına

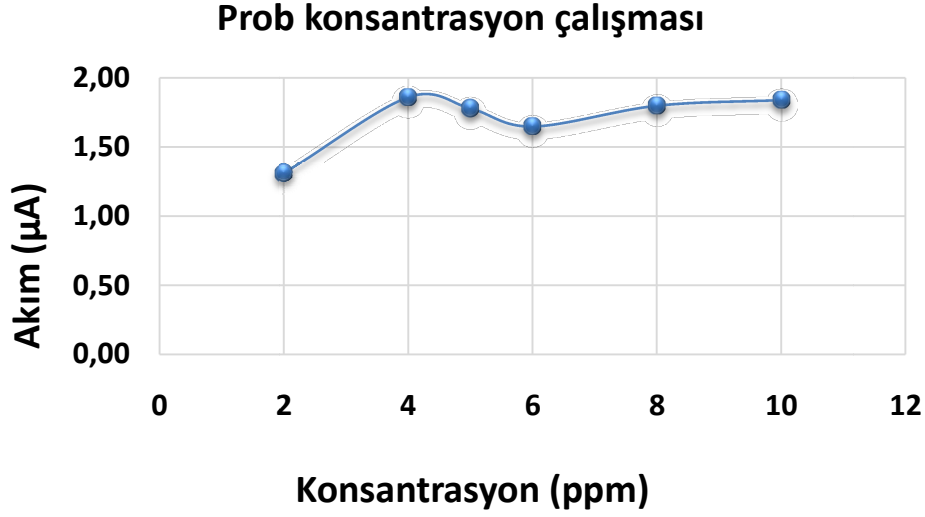
girerek ve/veya sarmal ile etkileşerek hibrit yapısını bozmuştur; ayrıca daha fazla guanin bazıyla etkileşime girmiş ve etkileşim sonucunda daha yüksek sinyal farklanmasına sebep olmuştur. Hibridizasyondan sonra guanin oksidasyon sinyalinde bir artış gözlenmektedir. Bu durum, TAM ile etkileşimin ardından çift sarmal DNA yapısında G-C arasındaki üçlü hidrojen bağlarının açılması veya bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır şeklinde yorumlanabilir. TAM'ın ayrıca prob DNA'daki guanin ile de etkileşime girdiği yine elde edilen bulgulardan görülmektedir. Hibridizasyondan sonra olan etkileşim, hibridizasyon öncesiyle kıyaslandığında daha fazladır. Bu nedenle, hibritleşen yapıdaki G-C kısımlarının, TAM ile hibrid DNA arasındaki etkileşimden sonra açılması veya bozulması muhtemeldir. Ayrıca TAM ve çift zincirli DNA arasındaki etkileşim, TAM'ın G-C üçlü bağlarına interkalasyonu olarak da değerlendirilebilir. Elde edilen bu bulgularla birlikte ayrıca hastalık tedavisinde kullanılan ilacın (TAM) bu hastalığın gen bölgesine ait sentetik oligonükleotidleriyle (BRCA-1) çalışılmıştır.

BRCA-1 Dizilerine Ait Çözelti Ortamında Gerçekleştirilen İlaç Etkileşim Çalışmaları:

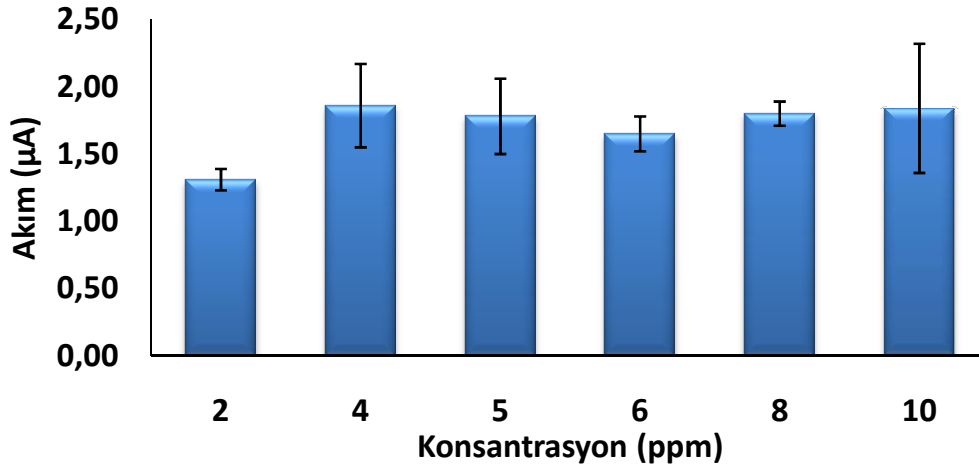
COMT ve INF-B sentetik oligonükleotid dizileri deneylerin gerçekleştirildiği laboratuvarı daha önceden optimize edilmiş çalışmalar olduğundan ve BRCA-1 sentetik dizisiyle ilk defa çalışılacak olduğundan, BRCA-1 sentetik dizilerinin öncelikle optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

BRCA-1 Sentetik Dizilerin Optimizasyonu:

BRCA-1 prob dizisi konsantrasyon çalışması: Çeşitli prob konsantrasyonlarında (2-10 ppm) PGE elektrot kullanılarak +1.00 V'da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerine ait çizgi grafiği ve elde edilen histogram Şekil 33. ve 34.'de belirtilmiştir. Buna göre DPV yöntemiyle; 0.5-1.60 V potansiyel arasında tarama yapılarak elde edilen guanin sinyallerinde; beklendiği gibi kademeli olarak artış sonrasında PGE yüzey doygunluğuna ulaştığından sinyal artışında çok büyük farklanma gözlenmemiştir. Bundan dolayı sentetik prob DNA derişim değeri elektrot yüzey doygunluğuna ulaşılan minimum değeri olan 4 ppm olarak belirlenmiştir.

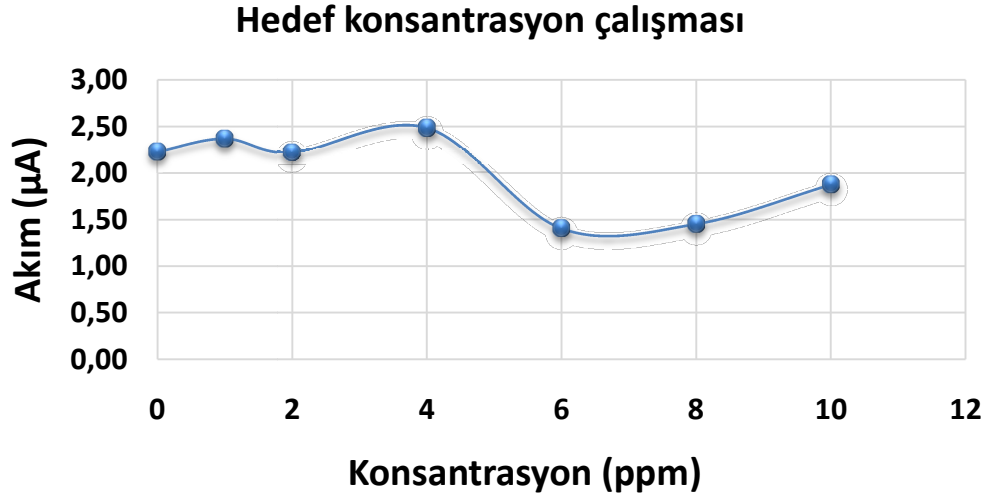


Şekil 33. BRCA-1 prob konsantrasyonu çalışmasını gösteren çizgi grafiği



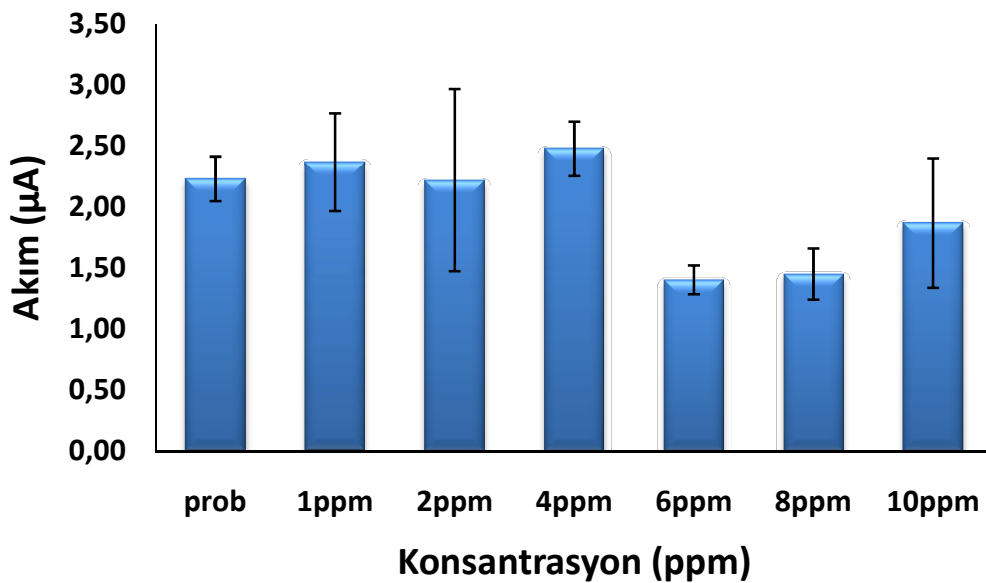
Şekil 34. BRCA-1 prob konsantrasyonu çalışmasını gösterir histogram

BRCA-1 prob dizisine karşı gelen hedef dizisine ait konsantrasyon çalışması:
 Optimum derişimi 4 ppm olarak belirlenmiş sentetik prob DNA dizisine karşılık gelen hibridizasyon için en uygun hedef konsantrasyonu araştırılmıştır. Bunun için Şekil 35.'deki çizgi grafiğinde belirtilen (2,4,6,8,10 ppm) konsantrasyonlarındaki hedef, 4 ppm prob konsantrasyonu ile sırasıyla hibritleştirilmiştir.



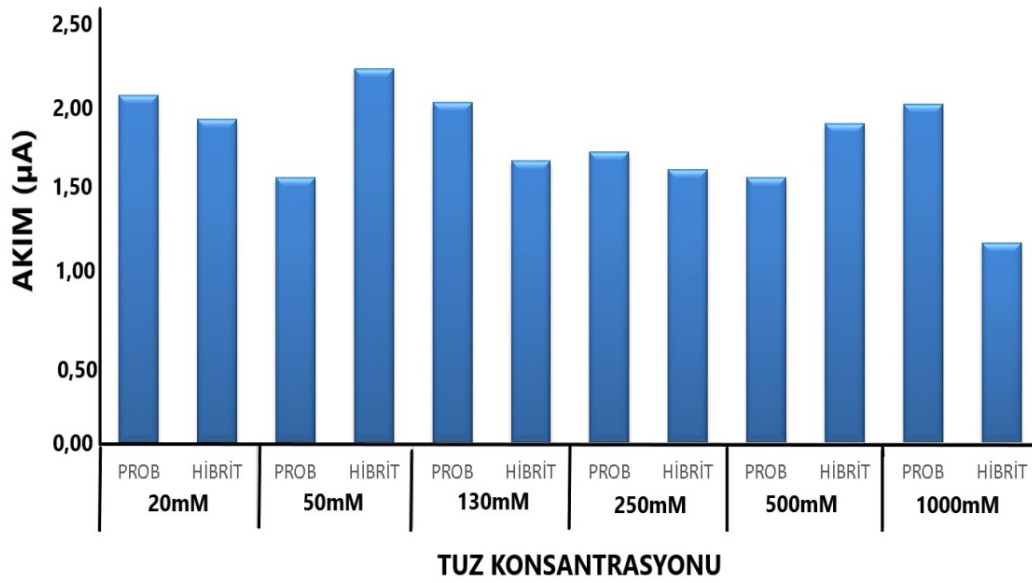
Şekil 35. BRCA-1 hedef konsantrasyonu çalışmasını gösterir çizgi grafiği

Şekil 35.' de çizgi grafiği belirtilmiş hedef dizisiyle prob dizisinin hibridizasyon sonucunda guanin oksidasyon sinyalinin akım değerleri belirtilmiştir. Bu grafiğe göre 0 ppm değeri tek başına prob dizisinin guanin oksidasyonu neticesinde elde edilen akım değerini göstermektedir. Çeşitli hedef konsantrasyonlarıyla (1,2,4,6,8,10 ppm) hedef dizilerinin grafiği incelendiğinde maksimum guanin oksidasyon sinyali akım değişiminin gözlemlendiği minimum hedef dizisi konsantrasyon değeri olan 6 ppm olarak seçilmiştir. Şekil 36.'de hibridizasyon sonrası guanin oksidasyon sinyalinin akım değerleri histogram halinde belirtilmiştir.



Şekil 36. BRCA-1 hedef konsantrasyonu çalışmasını gösterir histogram

BRCA-1 hibridizasyonu için tampon çözeltinin tuz konsantrasyonunu belirleme: Hibridizasyon için en uygun sıcaklık DNA dizisinin erime sıcaklığının 25°C altı olarak gösterilmektedir. İyonik kuvvet artışıyla hibridizasyon oranı doğru orantılıdır; bu nedenle her oligonükleotid dizisinin farklı baz konformasyonları olduğundan tuz konsantrasyonunun optimize edilmesi gerekmektedir. Tampon çözeltilerle sağlanan fizyolojik pH hibridizasyon için idealdir (Aydinlik, Ozkan-Ariksoysal, Kara, Sayiner ve Ozsoz, 2011; Bej, 1996; Hashimoto ve ark., 1994).



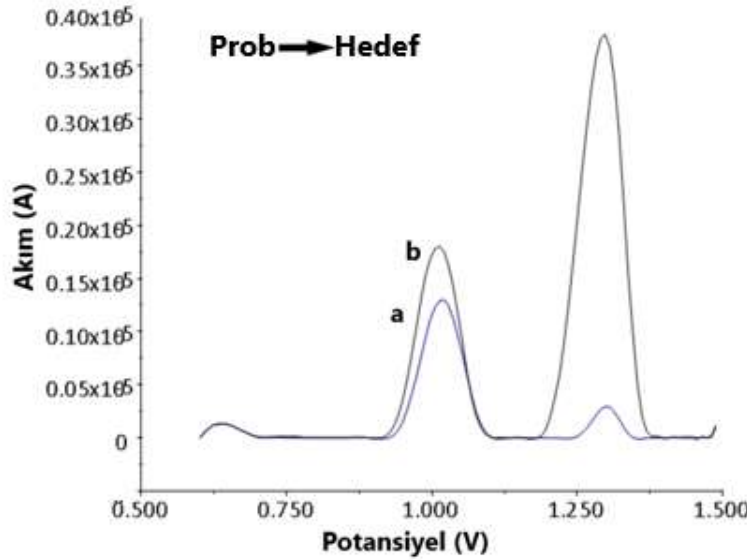
Şekil 37. BRCA-1 hibridizasyon tamponuna ait tuz konsantrasyonu çalışması

Tez kapsamında incelediğimiz meme kanseri tedavisinde kullanılan TAM etken maddesi, hastalık gen bölgesine ait BRCA-1 sentetik oligonükleotid dizisinin hibridizasyon tamponunun tuz konsantrasyonu, en fazla guanin oksidasyon sinyalinin akım değişiminin tespit edildiği 1000mM olarak belirlenmiştir (Şekil 37.).

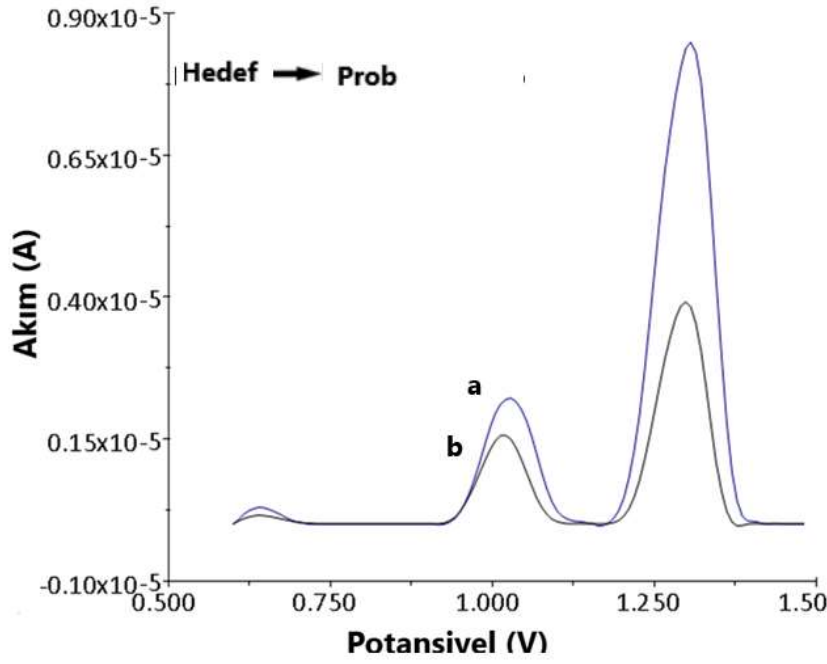
Hibridizasyon için uygun prob/hedef konsantrasyonu seçildikten ve hibridizasyon tamponunun tuz konsantrasyonu optimize edildikten sonra biyosensör sisteminin güvenilirliği araştırılmıştır. Bunun için prob dizi üzerine hedef dizisi ve hedef dizi üzerine prob dizisi hibritleştirilerek guanin oksidasyonuna ait akım değerlerindeki değişimi incelenmiştir. Target dizisinde 2 guanin bazı, prob dizisinde 1 guanin bazı olduğundan; target üzerine hibridizasyon gerçekleştirildiğinde hibridizasyon sonunda guanin oksidasyon sinyallerine ait akım değerlerinde bir düşüş beklenmiştir. Aynı şekilde prob dizisi üzerine target dizisi hibritleştirildiğinde guanin oksidasyon sinyallerine ait akım

değerlerinde prob sekansı 1 adenin bazına ve hedef sekans 12 adenin bazına sahip olduğundan yükselme beklenmiştir. Ayrıca hibridizasyonun doğrulanması adenin oksidasyon sinyalleri kullanılarak kontrol edildi çünkü 1 adenin bazı ihtiva eden sondadan elde edilen sinyal, beklediği gibi 12 adenin bazı ihtiva eden hedefin hibridizasyonundan sonra bir artış gösterdi. Örneğin, Şekil 38.'e göre, adenin cevabı arttığında, elektrotun yüzeyinde hibridizasyon meydana gelmiştir. Bu nedenle, hem probun hem de hibrit sinyallerin guanin oksidasyonu veya prob ve hibrit sinyallerin adenin oksidasyonu sonuçları arasındaki farklar BRCA-1 oligonükleotitlerin hibridizasyonunu kanıtlamaktadır.

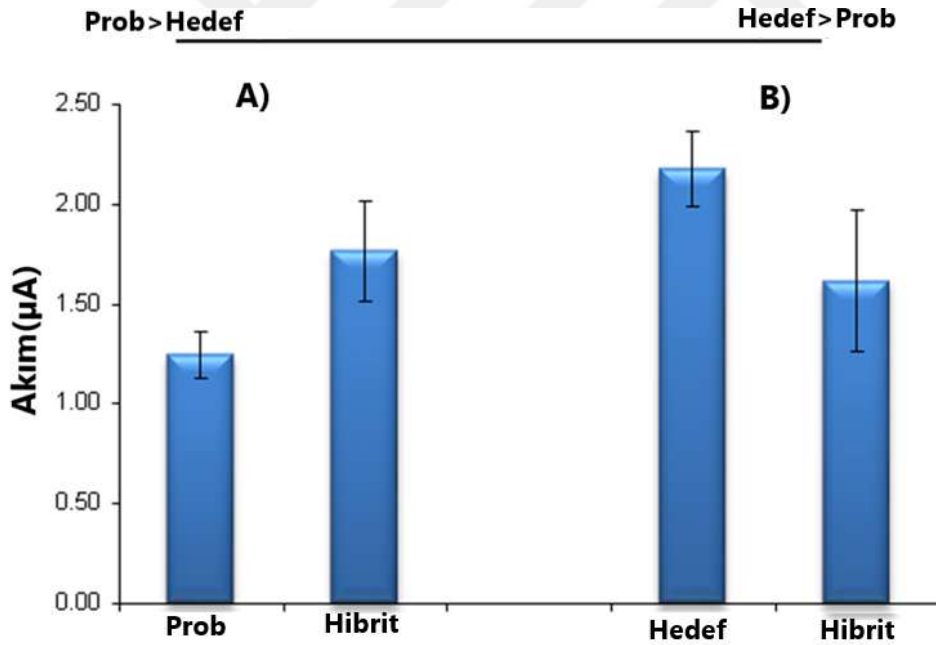
Sırasıyla Şekil 38.'deki voltamogramlarda beklediği gibi sinyal artışı ve Şekil 39.'deki hedef dizisinden prob dizisine olan hibridizasyon sonucu sinyal azalması meydana gelmiş Şekil 40. histogramda belirtilmiştir.



Şekil 38. Prob dizisi üzerine hedef diziyle gerçekleştirilen hibridizasyon sonucunu gösterir voltamogramlar; (a) tek başına prob sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.



Şekil 39. Hedef dizisi üzerine prob dizisiyle gerçekleştirilen hibridizasyon sonucunu gösterir voltamogramlar; (a) tek başına hedef sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.

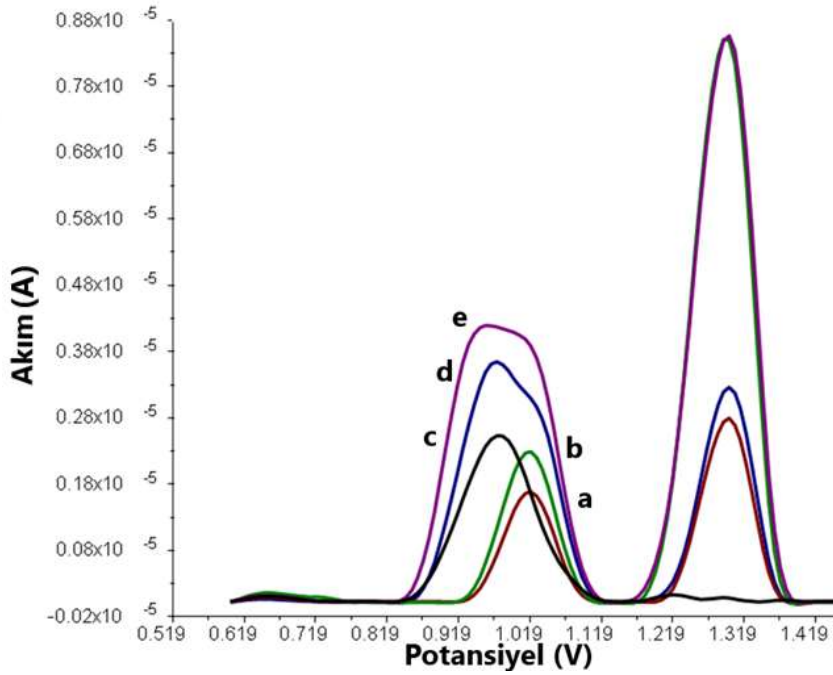


Şekil 40. Prob dizisi üzerine hedef dizisiyle gerçekleştirilen hibridizasyon ve hedef dizisi üzerine prob dizisiyle gerçekleştirilen hibridizasyon sinyallerini belirten histogram sonuçları; (a) tek başına prob sinyali, (b) hibridizasyon sinyali.

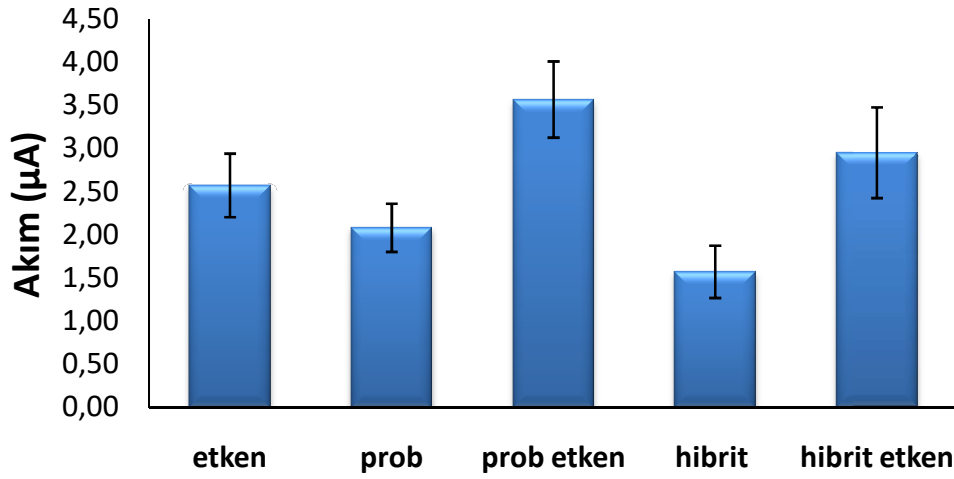
Uygun optimizasyon parametreleri belirlenen BRCA-1 sentetik oligonüklerinin ilaç etken maddesiyle etkileşimini araştırmak için hibridizasyon yöntemi, target üzerine prob olarak seçilmiştir. Bundan önceki oligonükleotidlerle yapılan çalışmalarda da hibridizasyon sonunda guanin oksidasyon sinyali azalması tercih edilmiştir. Sinyal

azalmasının olduğu hibridizasyon sonuçlarında ilaçla etkileşim sonunda hibridizasyon da engelleneceğinden sinyal artışı kolaylıkla gözlenmektedir. Hibridizasyon engellendiğinde ikili sarmal yapısı açılacağından guanin bazlarının oksidasyon sinyallerinde artış gerçekleşecektir.

Şekil 41. belirtilmiş olan voltamogramlarda gözleendiği üzere, beklendiği gibi hibritle etkileştirilmiş guanin sinyali artışı hedefle etkileştirilmiş guanin sinyali artışından fazladır. Şekil 42.'de etkileşim sinyallerini gösteren guanin oksidasyonuna ait ortalama değerlerle elde edilmiş histogramlar belirtilmiştir.



Şekil 41. Çözelti ortamında BRCA-1 sentetik dizilerine ait ait 5µM ilaç etken maddesiyle etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) hibrit, (b)tek başına hedef, (c)tek başına ilaç etken maddesi, (d) ilaçla etkileştirilmiş hibrit, (e) ilaçla etkileştirilmiş hedef sinyali.



Şekil 42. Çözelti ortamında BRCA-1 sentetik dizilerine ait 5µM ilaç etken maddesiyle etkileşim sonucunda guanin oksidasyon ve ilaç oksidasyon sinyallerinin ortalamalarını belirtir histogram.

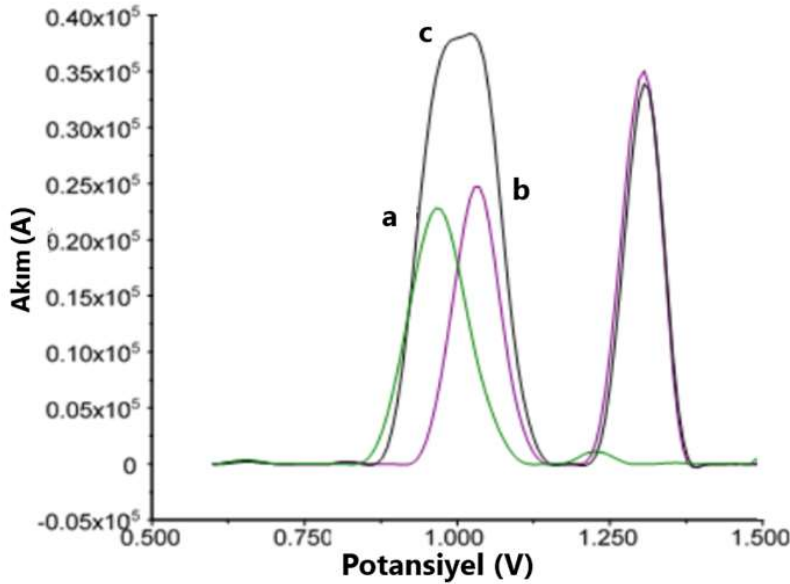
Şekil 42.'de açıkça gözlenen çözelti ortamında TAM ile etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyali BRCA-1 probu için yaklaşık (n=5)% 65 artmıştır. BRCA-1 hibridinin guanin oksidasyon sinyali ise yaklaşık olarak (n = 5)% 40 artmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda hibridizasyondan sonra guanin oksidasyon sinyalinde bir artış gözlenmektedir. Bu durum, TAM ile etkileşimin ardından çift sarmal DNA yapısında G-C arasındaki üçlü hidrojen bağlarının açılması veya bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır şeklinde yorumlanabilir. TAM'ın ayrıca prob DNA'daki guanin ile de etkileşime girdiği yine elde edilen bulgulardan görülmektedir. Başka bir deyişle, tüm deneylerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, TAM ve guanin bazının etkileşimi açıkça gözlenmektedir. Fakat hibridizasyondan sonra olan etkileşim, hibridizasyon öncesiyle kıyaslandığında daha fazladır. Bu nedenle, hibritleşen yapıdaki G-C kısımlarının, TAM ile hibrid DNA arasındaki etkileşimden sonra açılması veya bozulması muhtemeldir. Ayrıca TAM ve çift zincirli DNA arasındaki etkileşim, TAM'ın G-C üçlü bağlarına interkalasyonu olarak da değerlendirilebilir. Çözelti ortamında etkileşim araştırması yapılan TAM etken maddesi ile DNA materyallerinin etkileşim yolunu daha ayrıntılı araştırmak amacıyla elektrot yüzeyinde etkileşim ortamı araştırılmıştır. Böylece daha spesifik sonuçların elde edilmesi amaçlanmıştır.

4.2.2. Yüzey Ortamında İlaç-DNA Etkileşim Çalışmaları

Çözelti ortamında DNA materyalleriyle gerçekleştirilen çalışmalardan sonra yüzey ortamındaki çalışmalar bölüm 3.6.3.'de belirtildiği şekilde pasif adsorbsiyon yöntemiyle DNA materyallerinin ve ilaç etken maddesinin elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

dsDNA ve ssDNA ile yapılan çalışmalar: Sentetik oligonükleotidlerle olan çalışmalara geçilmeden önce dsDNA ve ssDNA ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.6.3'te belirtildiği şekilde aktive edilen elektrot yüzeyine ssDNA ve dsDNA pasif adsorbsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. DNA immobilize edilen elektrotlar 1 saat boyunca (çözelti ortamındaki etkileşim süresi kadar) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiştir.

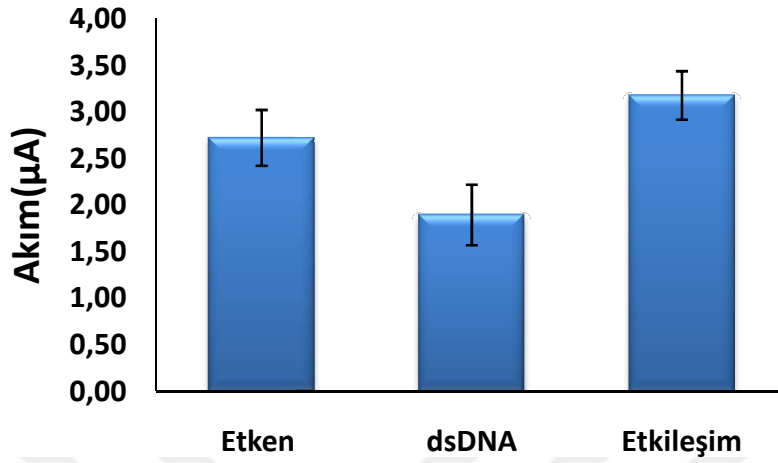
dsDNA ile yapılan çalışmalar: dsDNA ile yüzey ortamında yapılan çalışmalarda, çözelti ortamında olduğu gibi aynı miktarda 10ppm dsDNA ve 5µM ilaç etken maddesi kullanılmıştır. 20dk boyunca immobilize edilen dsDNA, 1 saat süreyle ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiştir. Bu etkileşim sonunda aşağıda dsDNA için aşağıda (Şekil 43. ve Şekil 44.) voltamogram ve histogram elde edilmiştir.(+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genişliğinde ve 16 mV/s tarama hızında)



Şekil 43. Elektrot yüzeyinde 10ppm dsDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sinyalini gösteren voltamogram; (a) 5µM Tamoksifen etken maddesi, (b) 10ppm dsDNA, (c) etkileşime ait voltamogram.

Şekil 43.'deki voltamograma göre dsDNA=1.90µA, TAM=2.72µA, Etkileşim=3.18 µA (n=5) olarak elde edilmiştir. Ayrıca yüzeyde etkileşim ortamında (çözelti ortamında olduğu gibi) adenin bazlarının TAM etken maddesiyle etkileşmediği gözlenmiştir. Bu

sebeple guanin oksidasyon sinyalleri üzerinden sonuçların yorumlanmasına devam edilmiştir.

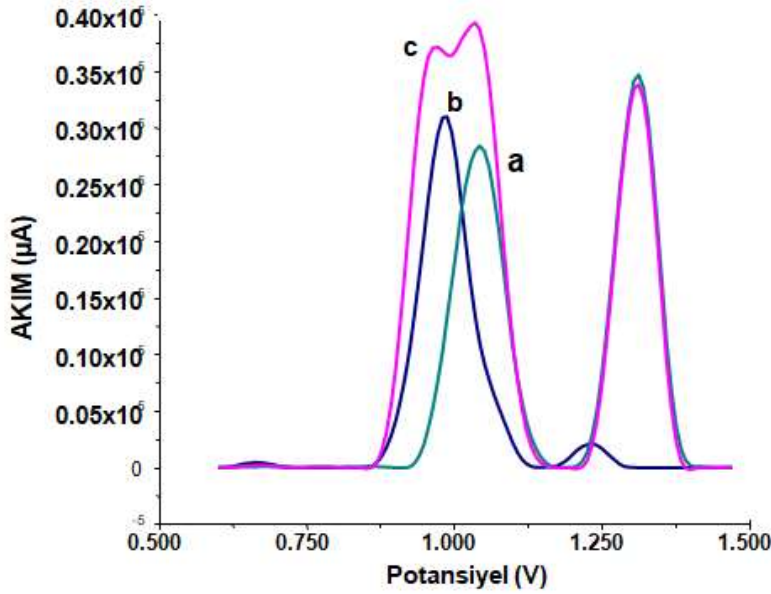


Şekil 44. Elektrot yüzeyinde 10 ppm dsDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyalini gösteren histogram.

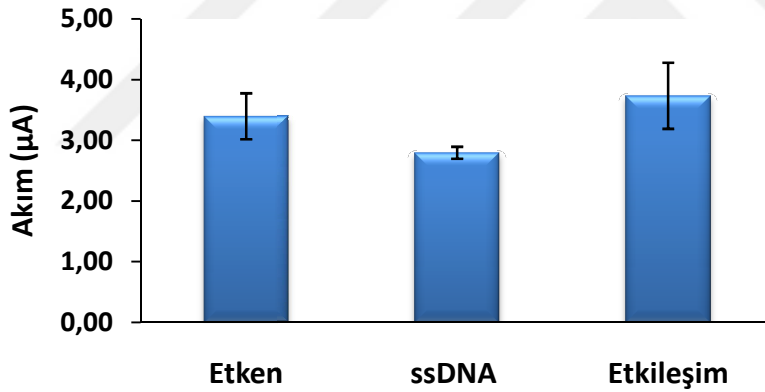
Şekil 44.'da ki histogramlar değerlendirildiğinde etkileşim sonrası dsDNA guanin oksidasyon akımının %60 oranında arttığı belirlenmiştir. Çözelti ortamında elde edilen verilere paralel olarak, TAM çift sarmal oluklarına girerek ve/veya sarmal ile etkileşerek hibrit yapısını bozmuştur; ayrıca daha fazla guanin bazıyla etkileşime girmiş ve etkileşim sonucunda daha yüksek sinyal farklanmasına sebep olmuştur.

ssDNA ile Yapılan Çalışmalar:

ssDNA ile yüzey ortamında yapılan çalışmalarda, çözelti ortamında olduğu gibi aynı miktarda 10ppm ssDNA ve 5µM ilaç etken maddesi kullanılmıştır. 20dk boyunca immobilize edilen dsDNA, 1 saat süreyle ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiştir. Bu etkileşim sonunda aşağıda dsDNA için aşağıda (Şekil 45. ve Şekil 46.) voltamogram ve histogram elde edilmiştir (+0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).



Şekil 45. Elektrot yüzeyinde 10ppm ssDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sinyalini gösteren voltamogram; (a) 10ppm ssDNA, (b) 5µM Tamoksifen etken maddesi, (c) etkileşime ait voltamogram.



Şekil 46. Elektrot yüzeyinde 10 ppm ssDNA ile 5µM Tamoksifen etken maddesine ait etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyalini gösteren histogram.

Şekil 45.'teki voltamograma göre yüzeyde etkileşim ortamında (çözelti ortamında olduğu gibi) adenin bazlarının TAM etken maddesiyle etkileşmediği gözlenmiştir. Şekil 46.'deki histogram değerlendirildiğinde; ssDNA=2.80µA, TAM=3.40µA, Etkileşim=3.74µA (n=5) olarak elde edilmiştir. Etkileşim sonucuna göre %74 oranında guanin oksidasyon sinyalinde artış meydana gelmiştir. Etkileşim sonuçları değerlendirildiğinde baz dizilimi açık halde bulunan ssDNA'nın kolaylıkla TAM ile etkileştii sonucuna varılmıştır. Etkileşim yolunu çözümlmek adına oligonükleotid dizileriyle incelemelere devam edilmiştir. Oligonükleotidler hibridizasyon öncesi tek sarmal yapısıyla ve hibridizasyon sonrasında çift sarmal yapı oluşturdıklarından ilaç ile

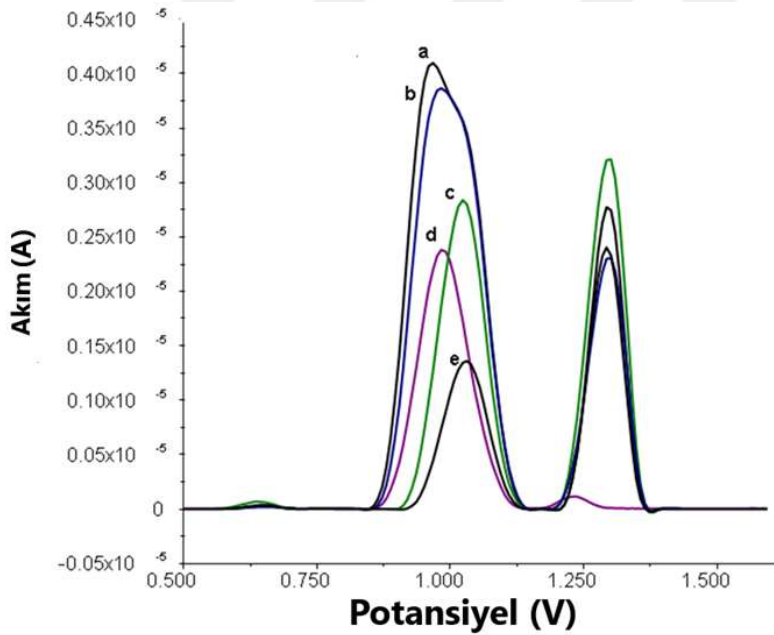
etkileşim sonucunda elde edilecek sinyal sonuçları TAM etkileşim yolu hakkında daha net bilgi elde edilecektir.

Oligonükleotid Çözeltileriyle Gerçekleştirilen İlaç Etkileşim Sonuçları:

Çözelti ortamında gerçekleştirilen oligonükleotidlerle olan etkileşim çalışmaların tamamlandıktan sonra yüzeyde etkileşim çalışmaları için bölüm 3.6.3’de belirtildiği şekilde aynı şartlarda hazırlanan çözeltilerle önce hedef immobilizasyonu, sonrasında elektrot yüzeyinde karşılık gelen prob ile hibridizasyonu sonucunda 1 saat ilaç etken maddesiyle muamele edilmiştir. Sırasıyla COMT, INF-B ve BRCA-1 sentetik oligonükleotid dizilerine ait elektrot yüzeyindeki etkileşim sonuçları sırasıyla belirtilmiştir.

COMT Sentetik Oligonükleotid Dizileriyle Elektrot Yüzeyinde İlaç Etkileşim Çalışmaları:

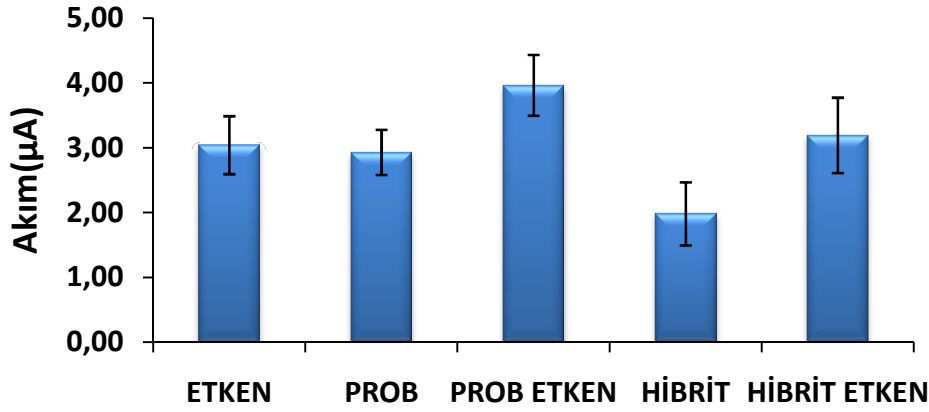
1 saat boyunca ilaç etken maddesiyle muamele edilmiş olan elektrotların, +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri değerlendirilmiştir. Ölçüm sonucu Şekil 47. voltamogram ve Şekil 48. histogramda belirtilmiştir.



Şekil 47. Elektrot yüzeyinde COMT sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) etkenle etkileştirilmiş hedef, (b) etkenle etkileştirilmiş hibrit, (c) tek başına hedef, (d) tek başına ilaç etken maddesi, (e) tek başına hibrit.

Şekil 47. voltamogram ve ortalama değerlerin belirtildiği Şekil 48. histogram sonuçlarına göre prob sinyali elektrot yüzeyinde etkileşim sonunda %26 oranında guanin

oksidasyon sinyalinde artış meydana gelmiştir. Ayrıca hibridizasyon sonrası TAM etkileşimi gerçekleştirildiğinde %38 oranında guanin oksidasyon sinyal artışı meydana gelmiştir.

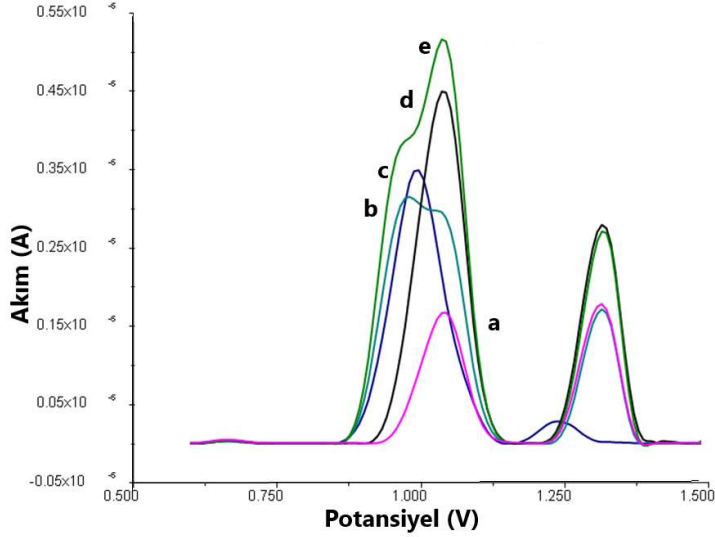


Şekil 48. Elektrot yüzeyinde COMT sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.

Bu sonuca göre benzer şekilde TAM çift sarmal oluklarına girerek ve/veya sarmal ile etkileşerek hibrit yapısını bozmuştur. TAM ile etkileşim sonucu elde edilen prob sinyali ve TAM ile etkiileşmişhibrit sinyali karşılaştırıldığında hibrit sinyalinin etkileşim sonunda daha yüksek sinyal farklanması gösterdiği elde edilmiştir. Bu durum, TAM ile etkileşimin ardından çift sarmal DNA yapısının açılması veya bozulmasıyla açıklanabilir. Hibridizasyondan sonra olan etkileşim, hibridizasyon öncesiyle kıyaslandığında daha fazladır. Bu nedenle, hibritleşen yapıdaki G-C kısımlarının, TAM ile hibrid DNA arasındaki etkileşimden sonra açılması veya bozulması muhtemeldir.

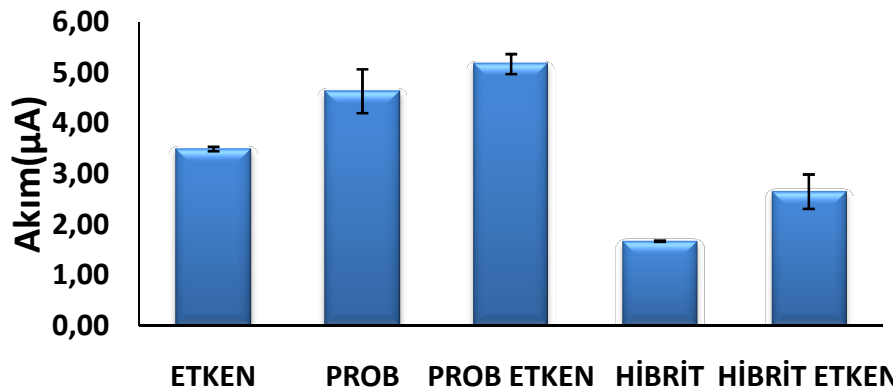
INF-B Sentetik Oligonükleotid Dizileriyle Elektrot Yüzeyinde Etkileşim Çalışmaları:

COMT sentetik oligonükleotidleriyle analiz tamamlandıktan sonra çözelti ortamında olduğu gibi sırasıyla INF-B ve COMT sentetik oligonükleotidlerle de çalışılmıştır. Buna göre muamele sonrasında INF-B oligonükleotidlerinin elektrotların +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 49. voltamogram ve Şekil 50. ortalama analiz değerleri histogramda belirtilmiştir.



Şekil 49. Elektrot yüzeyinde INF-B sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına hibrit, (b)etkenle etkileştirilmiş hibrit, (c)tek başına ilaç etken maddesi, (d)tek başına hedef, (e)etkenle etkileştirilmiş hedef.

Şekil 49. 'de belirtilmiş elde edilen voltamogram sonuçlarına göre prob guanin oksidasyon sinyalinde elektrot yüzeyinde etkileşim sonunda %25 oranında artış meydana gelmiştir. Ayrıca hibridizasyon sonrası TAM etkileşimi gerçekleştirildiğinde %43 oranında guanin oksidasyon sinyal artışı meydana gelmiştir. Şekil 50. ortalama değerlerin belirtilmiş olduğu histogramda da gözleneceği üzere elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçları öncesi çözelti ortamında ilaç-DNA etkileşim sonuçlarıyla yakın sonuçlar vermiştir.



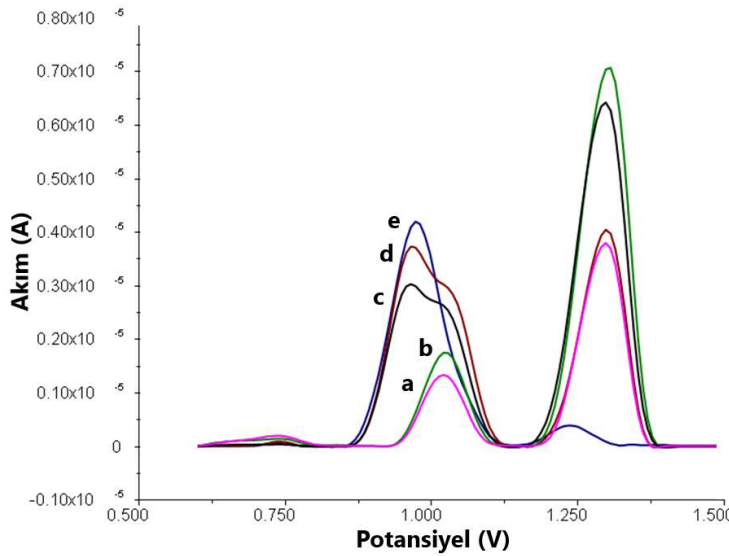
Şekil 50. Elektrot yüzeyinde INF-B sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonucunda elde edilen ortalama guanin ve ilaç oksidasyon sinyallerini belirtir histogram.

Elde edilen sonuçlar yorumlandığında tek sarmal durumda bulunan prob, etkileşim sonunda çift sarmal halde bulunan hibrit oligonükleotidlerle daha yüksek sinyal artışı meydana getirmiştir. Etkileşim sinyalindeki farklılığın sebebi, ilaçla etkileşim sonunda

hibridizasyon da engellediğinden sinyal artışı olduğu yönündedir. Hibridizasyon engellendiğinde ikili sarmal yapısı açık kalacağından guanin bazlarının oksidasyon sinyallerinde artış gerçekleşmiştir.

BRCA-1 Sentetik Oligonükleotid Dizileriyle Elektrot Yüzeyinde İlaç Etkileşim Çalışmaları:

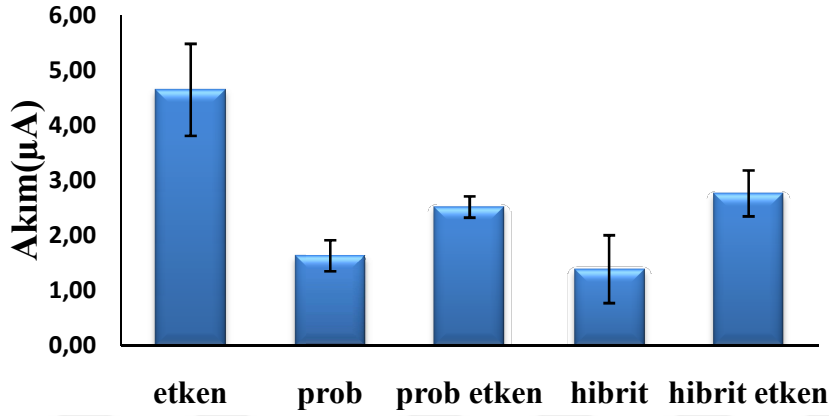
INF-B sentetik oligonükleotidleriyle analiz tamamlandıktan sonra çözelti ortamında olduğu gibi sırasıyla BRCA-1 sentetik oligonükleotidleriyle ilaç-DNA etkileşimi elektrot yüzeyinde incelenmiştir. BRCA-1 oligonükleotidlerinin +0.50 V/+1.6 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 51. voltamogram ve Şekil 52. histogramda belirtilmiştir. Ayrıca BRCA-1 oligonüklerinin prob ve hedef sentetik dizilerindeki guanin farkının azlığından dolayı adenin bazları ile de Şekil 52. histogram yardımıyla değerlendirilmiştir.



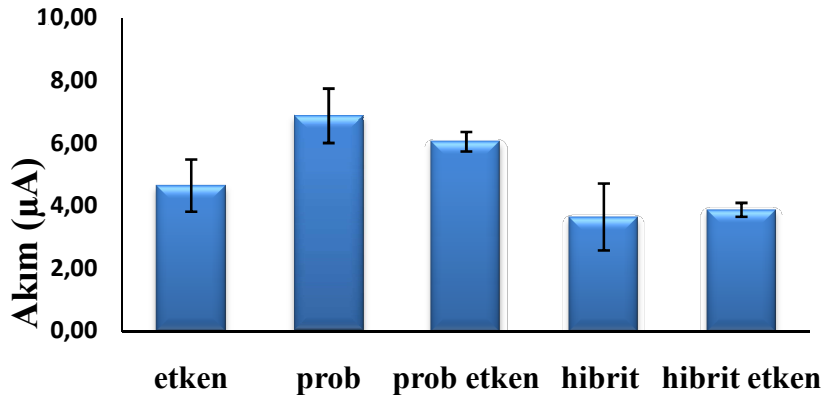
Şekil 51. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına hibrit, (b)tek başına hedef, (c)etkenle etkileştirilmiş hedef, (d)etkenle etkileştirilmiş hibrit, (e)tek başına ilaç etken maddesi.

Şekil 51. elde edilen voltamogramlar ve tekrarlı analizler sonucunda elde edilen ortalama değerler histogram olarak Şekil 52.'de belirtilmiştir. Buna göre prob guanin oksidasyon sinyalinde elektrot yüzeyinde etkileşim sonunda %30 oranında artış meydana gelmiştir. Ayrıca hibridizasyon sonrası TAM etkileşimi gerçekleştirildiğinde %37 oranında guanin oksidasyon sinyal artışı meydana gelmiştir. Prob ve hedef dizi guanin baz sayılarının yakın olmasından dolayı beklendiği gibi etkileşim sonrasında guanin

oksidasyon sinyalleri artışı arasında da önemli bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca hibridizasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla adenin bazı üzerinden değerlendirme yapılmıştır. (Şekil 53.).



Şekil 52. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren guanin oksidasyon sinyaline ait histogram.



Şekil 53. Elektrot yüzeyinde BRCA-1 sentetik dizilerine ait elektrot yüzeyinde etkileşim sonuçlarını gösteren adenin oksidasyon sinyaline ait histogram.

Şekil 53. Elektrot yüzeyinde etkileşim sonucunda elde edilen ortalama guanin oksidasyon sinyallerine ait histogramlar değerlendirildiğinde adenin bazlarının diğer oligonükleotidlerde olduğu gibi TAM ile etkileşmediği gözlenmiştir. Ayrıca BRCA-1 oligonükleotidlerinin prob ve hedef dizilerinin hibritleştiği gözlenmiştir.

Bu bağlamda, Şekil 51. voltamogramlar incelendiğinde, TAM ile etkileşmiş hibrit guanin oksidasyon sinyalindeki artış, beklendiği gibi TAM ile etkileşimli prob guanin oksidasyon sinyalindeki artıştan daha büyüktür. BRCA-1 ile elde edilen sonuçların, diğer sentetik oligonükleotidlerle elde edilen sonuçlarla tutarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, guanin bazlarının oksidasyon sinyallerinde artış gerçekleşmiştir.

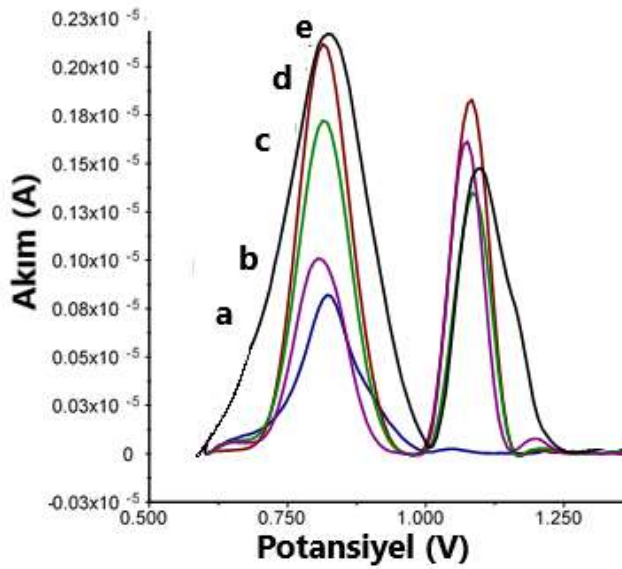
4.3. Perde Baskılı Elektrotlar (SPE) ile Yapılan Çalışmalar

Optimize edilmiş ve kalem grafit elektrotlarla analizleri tamamlanmış oligonükleotidler, deney aşamalarının pratik olması dolayısıyla çözelti ortamında gerçekleştirilen deneyler SPE ile tekrar edilmiştir. Ayrıca MWCNT/SPE ile sonuçlar kıyaslanmıştır. Aşağıda iki ayrı bölümde SPE (4.2.1.) ve MWCNT/SPE (4.2.2.) elektrotları ile elde edilmiş sonuçlar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

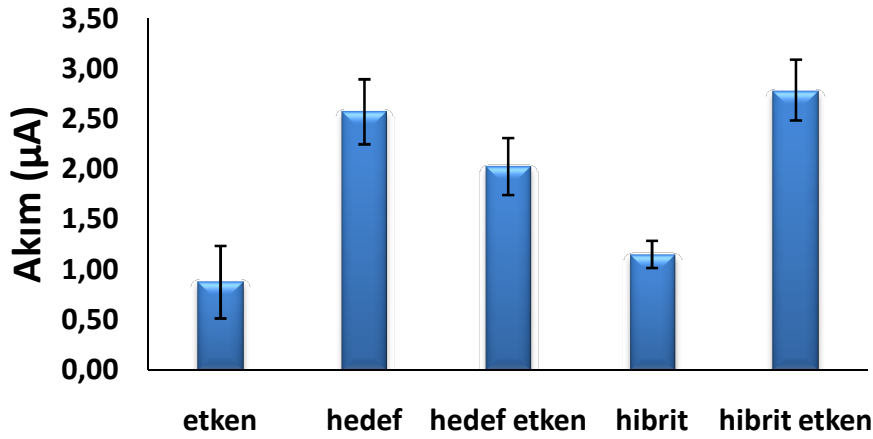
4.3.1. Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (SPE) ile Yapılan Çalışmalar

COMT Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

COMT oligonükleotidlerinin +0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 54. voltamogram ve Şekil 55. histogramda belirtilmiştir.



Şekil 54. COMT sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren DPV voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c) etkenle etkileştirilmiş hedef, (d) tek başına hedef, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali (+0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).

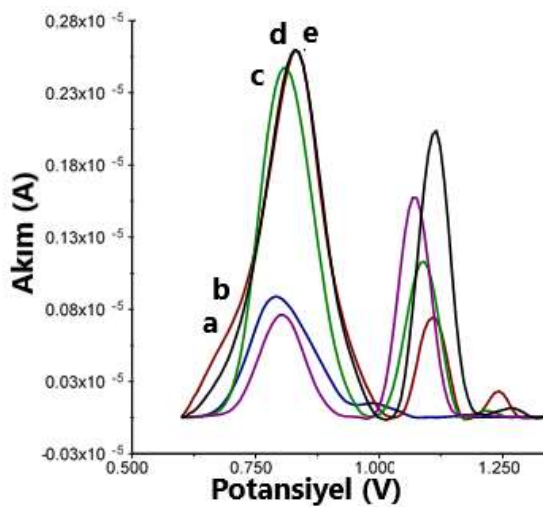


Şekil 55. COMT sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram

Şekil 55.'de belirtilmiş DPV voltamogram sinyallerinin ortalamalarından elde edilen histogram sonuçlarına göre tek başına etken madde için ortalama değer $0.88\mu A$, tek başına prob sinyali $2.57\mu A$, TAM ile etkileşmiş prob sinyali $2.03\mu A$, tek başına hibrit sinyali $1.15\mu A$ ve TAM ile etkileşmiş hibrit sinyali ise ortalama $2.43\mu A$ olarak elde edilmiştir. SPE'da PGE'da olduğu gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir.

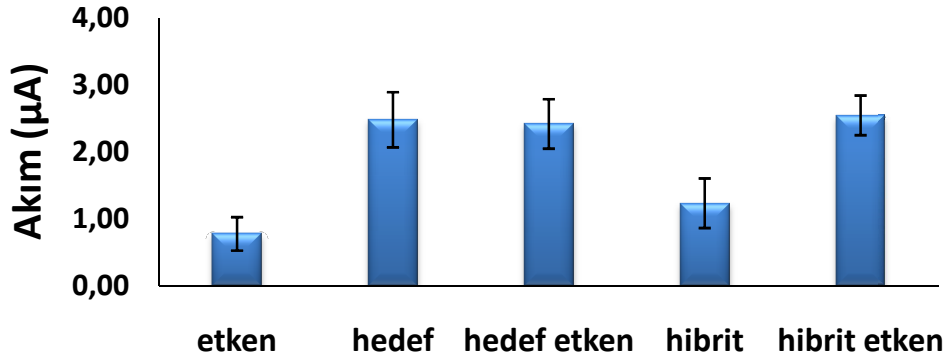
INF-B Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

INF-B oligonükleotidlerinin $+0.60 V/+1.5 V$ potansiyel aralığında, $50 mV$ puls genişliğinde ve $16 mV/s$ tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 56. voltamogram ve elde edilen sinyallerin ortalama analiz değerleri Şekil 57. histogramda belirtilmiştir.



Şekil 56. INF-B sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına hibrit, (b)tek başına etken madde, (c)etkenle etkileştirilmiş hedef, (d)tek başına hedef, (e)ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali.

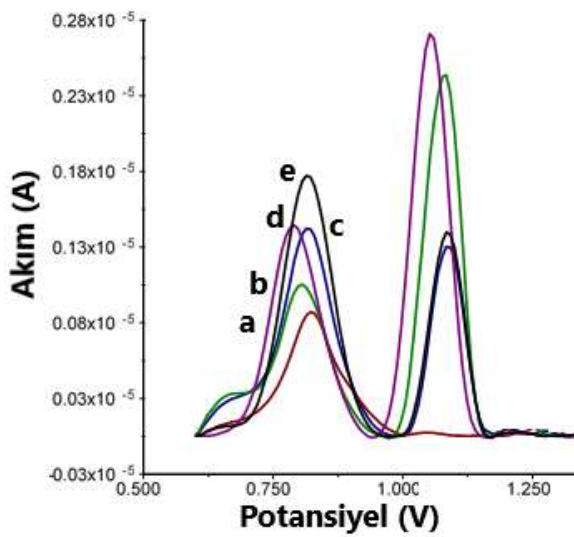
Şekil 57.'da belirtilmiş elde edilen histogram sonuçlarına göre tek başına etken madde için ortalama değer $0.78\mu A$, tek başına prob sinyali $2.48\mu A$, TAM ile etkileşmiş prob sinyali $2.42\mu A$, tek başına hibrit sinyali $1.23\mu A$ ve TAM ile etkileşmiş hibrit sinyali ise ortalama $2.55\mu A$ olarak elde edilmiştir. Voltamogramlar da gözlemlendiği üzere SPE'da PGE'lerde olduğu gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 57. INF-B sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.

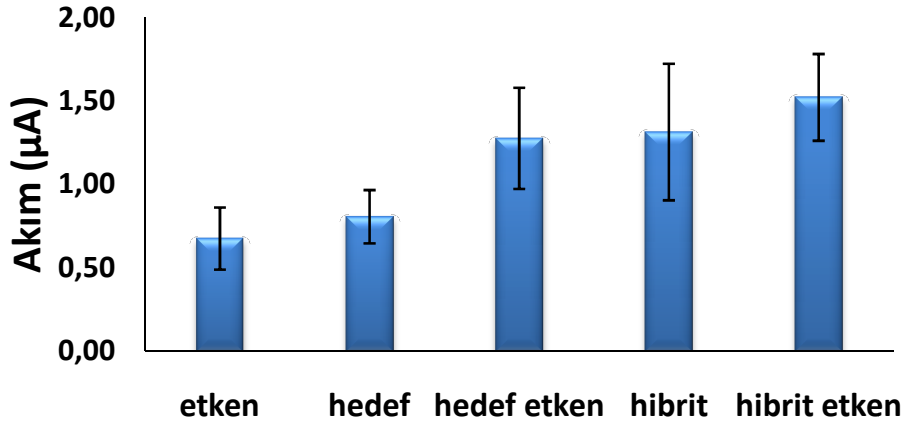
BRCA-1 Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

BRCA-1 oligonükleotidlerinin $+0.60 V/+1.5 V$ potansiyel aralığında, $50 mV$ puls genişliğinde ve $16 mV/s$ tarama hızında guanin oksidasyon sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 58. voltamogram ve ortalama değerler Şekil 59. histogramda belirtilmiştir.



Şekil 58. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a)tek başına etken madde, (b)tek başına hedef, (c)etken ile etkileştirilmiş hedef, (d)tek başına hibrit, (e)ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali.

Şekil 58. 'de belirtilmiş elde edilen voltamogram sonuçlarına göre tek başına etken madde için ortalama değer $0.68\mu\text{A}$, tek başına prob sinyali $0.81\mu\text{A}$, TAM ile etkileşmiş prob sinyali $1.28\mu\text{A}$, tek başına hibrit sinyali $1.31\mu\text{A}$ ve TAM ile etkileşmiş hibrit sinyali ise ortalama $1.52\mu\text{A}$ olarak elde edilmiştir. Şekil 59. DPV voltamogramlarından elde edilen akım sinyallerinin ortalama sonuçlarını belirten histogramlarda da gözlendiği gibi SPE'da, PGE'da olduğu gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir.



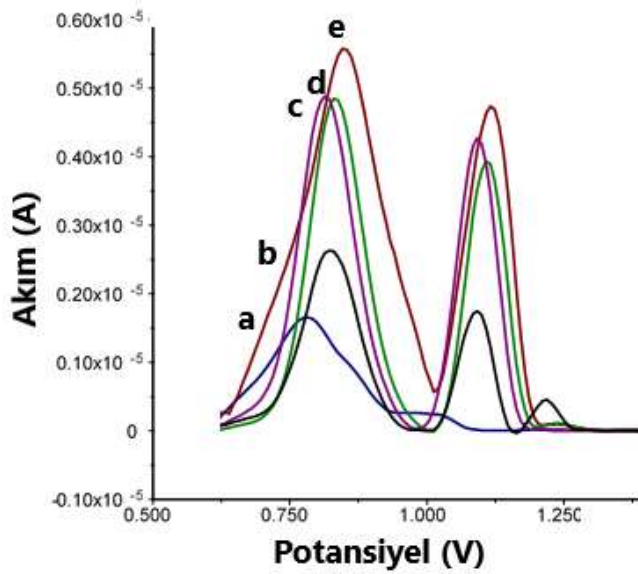
Şekil 59. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.

4.3.2. Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Perde Baskılı Elektrotlar (MWCNT/SPE) İle Yapılan Çalışmalar

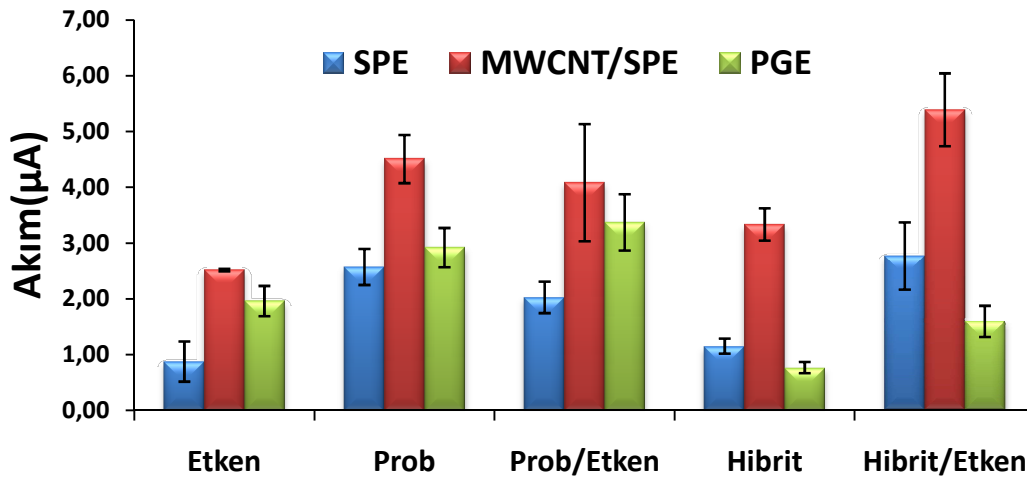
Hibridizasyon için uygun prob/hedef konsantrasyonu seçildikten ve hibridizasyon tamponunun tuz konsantrasyonunu optimize edildikten sonra, biyosensör sistemi bölüm 4.3.1' de SPE ile incelenmiştir. SPE ile elde edilen sonuçları aynı zamanda MWCNT/SPE 'ler ile de kıyaslamak amacıyla sentetik oligonükleotidler sırasıyla analizlenmiştir. Elde edilen sonuçların ortalamaları histogramlarda SPE ve PGE sonuçlarıyla beraber verilmiştir.

COMT Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

SPE ile incelemesinden sonra MWCNT/SPE ile sinyal farklanmasını araştırmak amacıyla aynı oligonükleotidler sırasıyla incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak COMT sentetik oligonükleotid sonuçları aşağıda belirtilmiştir. Şekil 60. COMT dizilerine ait $+0.60\text{ V}/+1.5\text{ V}$ potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında MWCNT/SPE ile elde edilen voltamogram belirtilmiştir.



Şekil 60. COMT sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren DPV voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c) etken ile etkileştirilmiş hedef, (d) tek başına hedef, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali (0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında).



Şekil 61. COMT sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE, SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram.

Şekil 61. SPE, MWCNT/SPE ve PGE ortalama değerlerin belirtildiği DPV ölçümüyle elde edilen voltamogram sinyallerinin histogram sonuçları değerlendirilmiştir. Buna göre MWCNT/SPE'lerin beklendiği gibi normal SPE'den (nanomalzeme içermeyen elektrot) daha fazla guanin oksidasyon akımı verdiği belirlenmiştir. Elde edilen sinyallerin ortalama değerleri (n=5) şöyledir; tek başına etken madde sinyali 2.51μA, tek başına prob

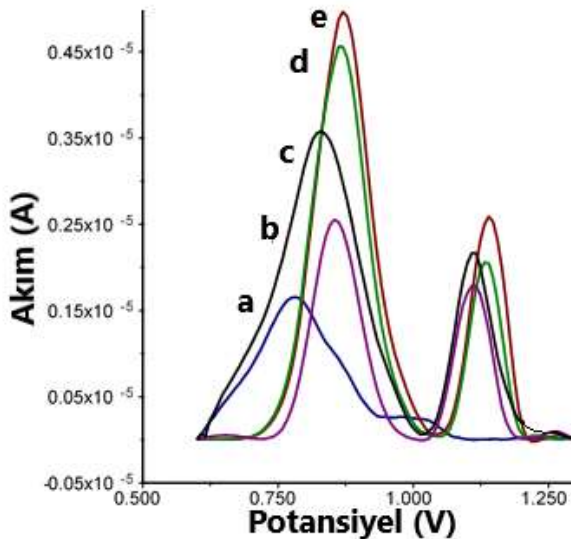
sinyali $4.51\mu\text{A}$, TAM ile etkileştirilmiş prob sinyali $4.08\mu\text{A}$, hibrit sinyali $3.33\mu\text{A}$ ve TAM ile etkileştirilmiş hibrit sinyali $5.39\mu\text{A}$ olara elde edilmiştir.

Şekil 61. elde edilen histogramda TAM ile etkileşim sonrasında elde edilen hibrit guanin oksidasyon sinyalinin, belirgin bir artış gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca hibrid DNA modifiye edilmiş SPE ve MWCNT/SPE'ler de elde edilen guanin oksidasyon sinyalleri incelendiğinde, her iki elektrot ile TAM ile etkileşimin bir sonucu olarak guanin sinyalinde artış meydana gelmiştir. Burada MWCNT/SPE'deki artış oranı ($n = 5$) %38 ve SPE'deki artış oranı ($n = 5$) % 53 olarak belirlenmiştir.

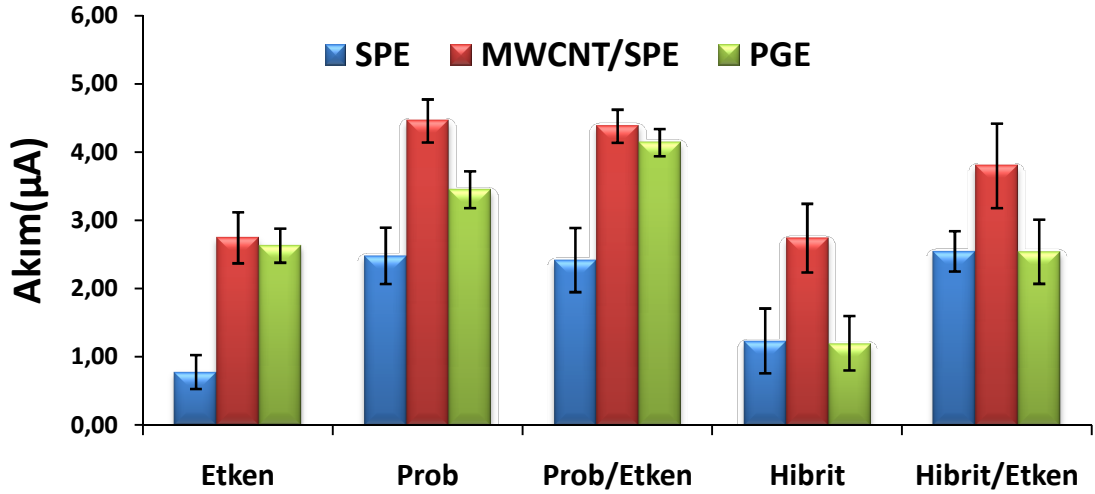
Sonuçlar PGE ile kıyaslandığında benzer şekilde çözelti ortamında gerçekleştirilen analiz sonuçları TAM ile etkileşim sonrasında elde edilen guanin oksidasyon sinyali hibridizasyon sonucunda ($n=5$) %52 olarak artmıştır. Ayrıca tüm elektrotlar incelendiğinde; PGE elektrotların sinyal yüksekliğinin normal SPE elektrotlardan daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer sentetik oligonükleotidler için analiz sonuçlarının incelenmesine devam edilmiştir.

INF-B Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

Şekil 62. COMT dizilerine ait $+0.60\text{ V}/+1.5\text{ V}$ potansiyel aralığında, 50 mV puls genişliğinde ve 16 mV/s tarama hızında MWCNT/SPE'ler ile çözelti fazında 1 saatlik etkileşim sonrasında elde edilen guanin oksidasyon sinyalini gösterir voltamogram belirtilmiştir.



Şekil 62. INF-B sentetik dizilerine ait MWCNT SPE ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına hibrit, (c) etken ile etkileştirilmiş hibrit, (d) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hedef sinyali, (e) tek başına hedef sinyali



Şekil 63. INF-B sentetik dizilerine ait SPE, MWCNT/SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram

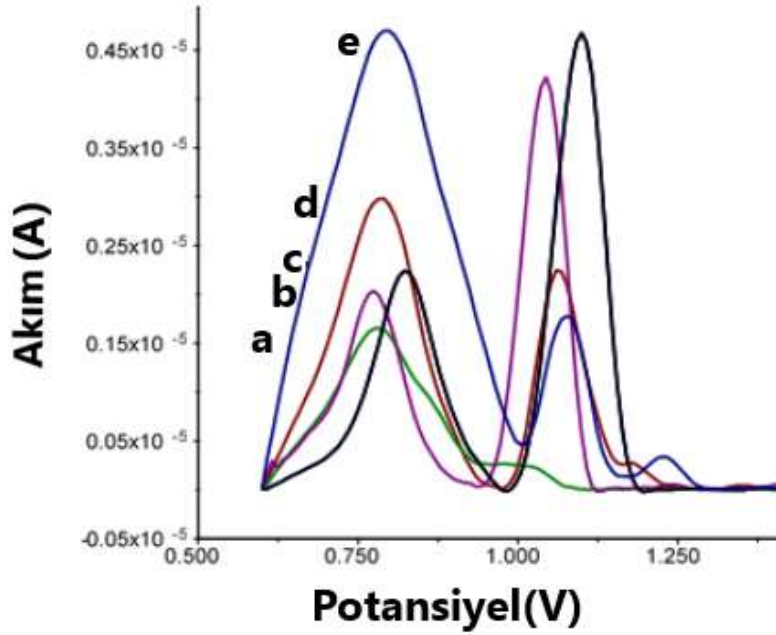
Şekil 62., ilaç etkileşiminin MWCNT/SPE elektrotlar ile ölçüm sonrasında guanin oksidasyon sinyalinde bir artış meydana getirdiğini göstermektedir. MWCNT/SPE'leri beklendiği gibi normal SPE'den daha yüksek guanin oksidasyon sinyali elde edilmiştir. INF-B prob/hibrit hibridizasyonundan önce ve sonra TAM ile etkileşim sonucu guanin akımları belirtilmiştir. Elde edilen pik akımları sırasıyla sadece TAM için 2.75uA, prob için 4.38uA, TAM ile etkileşmiş prob için 4.46µA hibrit için 2.74µA, TAM ile etkileşmiş hibrit için 3.80µA olarak elde edilmiştir.

Şekil 63. elde edilen histogramda TAM ile etkileşim sonrasında elde edilen hibrit guanin oksidasyon sinyalinin, hem SPE hemde MWCNT/SPE de belirgin bir artış gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca hibrit DNA modifiye edilmiş SPE ve MWCNT SPE'lerde elde edilen guanin oksidasyon sinyalleri incelendiğinde, her iki elektrot ile TAM ile etkileşimin bir sonucu olarak guanin sinyalinde artış meydana gelmiştir. Burada MWSPE'deki artış oranı %28 ve SPE'deki artış oranı (n = 5) %52 olarak belirlenmiştir. PGE için benzer şekilde prob varlığında TAM etkileşimi sonrasında guanin oksidasyon sinyali %14 ve hibridizasyon sonucunda %65 olarak artmıştır. Bu sonuca göre TAM çift sarmal oluklarına girerek ve/veya sarmal ile etkileşerek hibrit yapısını bozmuştur; ayrıca daha fazla guanin bazıyla etkileşime girmiş ve etkileşim sonucunda daha yüksek sinyal farklanmasına sebep olmuştur.

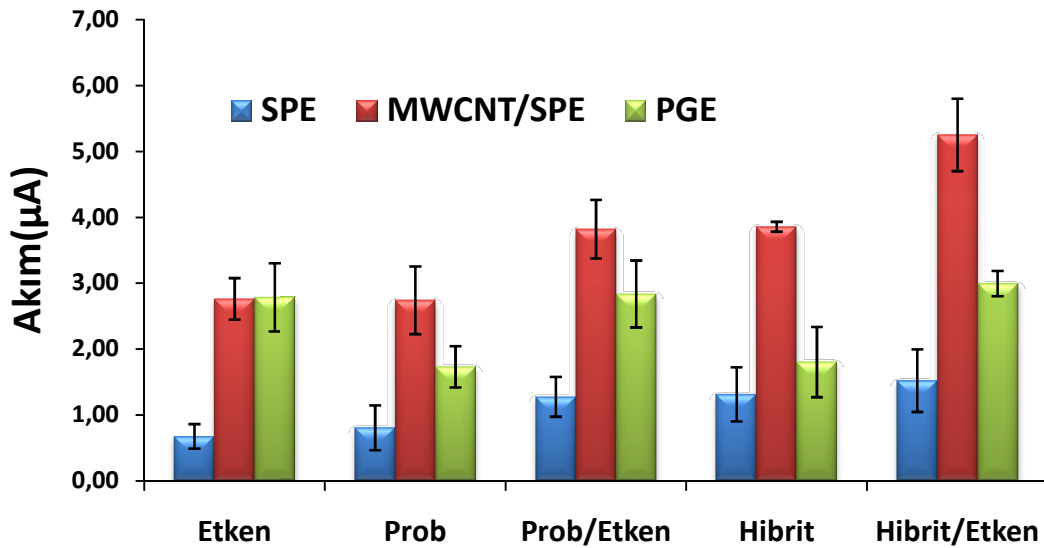
BRCA-1 Sentetik Dizileriyle Yapılan Çalışmalar:

Şekil 64. BRCA-1 sentetik dizilerine ait +0.60 V/+1.5 V potansiyel aralığında, 50 mV puls genliğinde ve 16 mV/s tarama hızında MWCNT/SPE'ler ile çözelti fazında 1

saatlik etkileşim sonrasında elde edilen guanin oksidasyon sinyalini gösterir voltamogram belirtilmiştir.



Şekil 64. BRCA-1 sentetik dizilerine ait MWCNT/SPE elektrot ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren voltamogram; (a) tek başına etken madde, (b) tek başına prob, (c) etken ile etkileştirilmiş prob, (d) tek başına hibrit sinyali, (e) ilaç etken maddesiyle etkileştirilmiş hibrit sinyali.



Şekil 65. BRCA-1 sentetik dizilerine ait SPE, MWCNT/SPE ve PGE elektrotlar ile çözelti ortamında hibridizasyon ve ilaçla etkileşim sonuçlarını gösteren histogram

Şekil 64., MWCNT SPE ile gerçekleşen TAM etkileşimin sonucunda guanin oksidasyon sinyalinde bir artış olduğunu göstermektedir. MWCNT SPE'lerden beklendiği gibi normal SPE'den daha yüksek guanin oksidasyon sinyali elde edilmiştir. BRCA-1 prob/hibrit hibridizasyonundan önce ve sonra TAM ile etkileşim sonucu guanin akımları belirtilmiştir. Elde edilen pik akımları sırasıyla sadece TAM için $2.76\mu\text{A}$, prob için $2.74\mu\text{A}$, TAM ile etkileşmiş prob için $3.82\mu\text{A}$ hibrit için $3.86\mu\text{A}$, TAM ile etkileşmiş hibrit için $5.25\mu\text{A}$ olarak elde edilmiştir.

Şekil 65.'te elde edilen histogramda TAM ile etkileşim sonrasında elde edilen hibrit guanin oksidasyon sinyalinin, hem SPE hemde MWCNT SPE de belirgin bir artış gösterdiği açıkça görülmektedir. Ayrıca hibrit DNA modifiye edilmiş SPE ve MWCNT SPE'lerde elde edilen guanin oksidasyon sinyalleri incelendiğinde, her iki elektrot ile TAM ile etkileşimin bir sonucu olarak guanin sinyalinde artış meydana gelmiştir. Bu artışlar BARE SPE ile BRCA-1 probu varlığında TAM ile etkileşimden sonra yaklaşık ($n = 5$) %37 artmıştır. MWCNT SPE'de guanin oksidasyon sinyali, TAM ile etkileşimden sonra BRCA-1 probu için yaklaşık %28 artmıştır. Ayrıca BRCA-1 hibridinin guanin oksidasyon sinyali, TAM ile etkileşimin ardından SPE için % 14 ve MWCNT SPE için % 27 ($n = 5$) artmıştır. PGE için ise çözelti ortamında TAM ile etkileşim sonrası guanin oksidasyon sinyali BRCA-1 probu için yaklaşık ($n=5$) % 65 artmıştır. BRCA-1 hibridinin guanin oksidasyon sinyali ise yaklaşık olarak ($n = 5$) % 40 artmıştır. SPE ve MWCNT SPE'nin sinyal yanıtı karşılaştırıldığında, BRCA-1 prob sinyali ve BRCA-1 hibrit sinyalinin TAM ile etkileşimi sırasıyla %30 ve %34 olarak belirlenmiştir.

Öte yandan, tüm deneyler sonucunda elde edilen bulgular incelendiğinde, hem hibrit yapıdaki adenin-timin bağına ilişkin adenin, hem de prob dizideki bağ yapmamış haldeki adenin sinyali, TAM ile etkileşimden önce ve sonra farklılık göstermediği görülmektedir. Özetle, TAM, ne prob dizideki ne de hibrit DNA'daki adenin bazları ile etkileşime girmemektedir.

Sonuç olarak, tüm elektrotlar ve farklı etkileşim koşulları değerlendirildiğinde, çeşitli özelliklerdeki oligonükleotidler, TAM ile benzer bir etkileşim özelliği göstermiştir. Bulgular doğrultusunda, TAM'ın çift sarmal hibrit yapıdaki oligonükleotitlerle etkileşime girdiğinde, hibrit yapıdaki guanin sinyalini, tek sarmal prob dizilerle etkileşiminden sonra elde edilen guanin sinyaline göre daha fazla oranda arttırdığı tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir antikanser ilaç olan TAM ile tez kapsamında yürütülen araştırmalarda voltametrik teknikler kullanılarak, bu ilacın miktar tayininde kullanılabilecek yeni ve duyarlı yöntemler geliştirilmiştir. Ayrıca, molekülün yükseltgenmesine ve dsDNA, ssDNA, çeşitli sentetik oligonükleotid dizileri ve tedavisinde kullanıldığı hastalık genine ait sentetik oligonükler ile etkileşme mekanizmasını aydınlatmak amacıyla dönüşümlü voltametri (CV) ve Adsorptif Sıyırma Diferansiyel Puls Voltametrisi (AdSDPV) teknikleri kullanılmıştır. Literatür araştırması sırasında ilacın elektrokimyasal davranışlarına ve DNA etkileşim mekanizmasına ait bu kapsamda detaylı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

TAM'ın elektrokimyasal tepkimeleri PGE kullanılarak incelenmiştir. PGE ile yapılmış çeşitli pH değerlerindeki ölçümler TAM'ın adsorbsiyon kontrollü yükseltgendiğini göstermektedir. TAM'a ait pik AdSDPV tekniğiyle PGE kullanılarak kaydedilmiştir. Akım türünün adsorbsiyon kontrollü özelliğini anlayabilmek için çeşitli tampon çözeltileri içerisinde denemeler yapılmış ve en uygun tampon çözeltisinin B-R pH=4.50 olarak tespit edilmiştir. B-R tamponu pH 4.50 ile gerçekleştirilen hız taraması deneylerin değerlendirilerek, $ip-v^{1/2}$, $ip-v$ ve $\log ip-\log v$ arasındaki denklemler incelenmiştir. pH=4.50 B-R'de 5ppm derişimde 10-60mV/s arasındaki tarama hızı değerleri incelenmiş ve TAM etken maddesinin yükseltgenmesinin adsorbsiyon kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır.

TAM etken maddesinin, AdsDPV tekniğiyle 0.75 V'da 60 s biriktirilerek 0.6-1.5 V potansiyel aralığında yükseltgenme sinyalleri elde edilmiştir. PGE'de 2.50-70µM konsantrasyon aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Elde edilen validasyon parametreleri Tablo 4.'de geri kazanım çalışmaları ise Tablo 5 .'de verilmiştir.

Voltametrik analizlerin saf TAM etken maddesiyle optimize edilmesinden sonra piyasa preparatı olan Tamoksifen® film kaplı tabletlere uygulanmıştır. Tabletler toz haline getirilip homojenize edilmiş ve etken maddeyle aynı şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Bilinen miktarda analiz edilen çözelti üzerine bilinen miktarda saf etken madde eklenerek geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak elde edilen % geri kazanım değeri, analitin tayininde ilaç katkı maddelerinin girişim etkisinde bulunmadığı ve analiz sonuçlarını anlamlı olarak etkilemediği sonucuna varılmıştır.

TAM etken maddesinin PGE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışı DPV yöntemiyle optimize edildikten sonra DNA materyalleriyle etkileşim çalışmalarına

geçilmiştir. Bu yöntemde Bölüm 4.'te belirtildiği gibi önce çözelti ortamında etkileşim daha sonra da elektrot yüzeyinde etkileşim yolu sırasıyla incelenmiştir.

Çözelti ortamında yapılan çalışmalarda bölüm 3.1.' de belirtildiği şekilde hazırlanan ABS çözeltisi içinde 10ppm dsDNA ve 10 ppm ssDNA ayrı ayrı eppendorf tüpleri içinde çözeltileri hazırlanmıştır. Bölüm 3.6.2.'de belirtildiği şekilde analizler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle Tamoksifen etken maddesiyle etkileşim süresi araştırılan DNA materyalleri ayrı ayrı incelenmiştir.

Hastalık gen bölgesine ait sentetik hedef oligonükleotid ile hibritleşecek en uygun prob sentetik oligonükleotid derişiminin belirlenmesi amacıyla en yüksek sinyalin belirlendiği elektrot yüzey doygunluğuna ulaşılan konsantrasyon seçilerek hedef modifiye PGE ile etkileştirilmek üzere artan derişimlerde prob çözeltileri ile hibridizasyon sağlanmıştır. Bu deneyde en yüksek guanin oksidasyon sinyalindeki farklanma amaçlanarak guanin oksidasyon sinyalleri değerlendirilmiştir

Etken madde ve DNA materyalleri arasındaki etkileşim guanin bazı oksidasyon sinyalleri üzerinden değerlendirilerek etkileşim yolu aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Yüzey fazındaki ilaç-DNA etkileşimi, hibridizasyondan önce ve sonra incelenmiştir. Etkileşim sonrası prosedür için, elektrot yüzeyinde hibridizasyonu gerçekleştirilmiş oligonükleotidler ilaç ile etkileştirilmiş ve ölçüm alınmıştır. Etkileşim öncesi prosedür için, prob oligonükleotid immobilize edilmiş elektrot yüzeyi ilaçla etkileşime sokulduktan sonra hedef oligonükleotid ile hibridizasyona tabi tutulmuştur. Etkileşim sonucunu incelemek amacıyla aynı şartlarda ölçümler alınmıştır.

Çözelti ortamındaki ilaç-DNA etkileşimi, hibridizasyondan önce ve sonra incelenmiştir. Etkileşim sonrası prosedür için, çözelti içerisinde hibridizasyonu gerçekleştirilmiş oligonükleotidler ilaç ile etkileştirilmiş ve ölçüm alınmıştır. Etkileşim öncesi prosedür için, prob ve hibrit oligonükleotidler çözelti içerisinde hibridize edilmiş etkileşim şartlarına aynı ortama tabi tutulmuştur. Etkileşim sonucunu incelemek amacıyla aynı şartlarda ölçümler alınmıştır.

Çözelti ortamında PGE ile elde edilen bulgular, SPE ve MWCNT/SPE elektrotlar ile kıyaslandığında PGE'den elde edilen akım değerlerinin SPE ile elde edilenlerden daha yüksek ve daha tekrarlanabilir olduğu görülmektedir. Ayrıca PGE, SPE'ye göre çok daha ucuz bir elektrottur. MWCNT/SPE ve PGE kıyaslandığında ise PGE'lerin karbon nanotüp içeren elektrotlara göre nispeten daha düşük sinyal verdiği, fakat daha yüksek tekrarlanabilirlik ve daha ucuz temin edilebilirliğe sahip olması nedeniyle tercih edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Guanin akımının gün içi ve günler arası tekrar edilebilirliği sırasıyla % 0.98 ve % 1.58 olarak belirlenmiştir.

Her iki yöntemle de (hem yüzey hemde çözelti ortamında) hibrit DNA'nın TAM ile her üç sekansla etkileşimi sonucu guanin oksidasyon sinyalde önemli bir artış gözlenmiştir.

Geliştirilen DNA (nano) biyosensöründe kalem grafit elektrotları ile tek kullanımlık bir biyosensör geliştirilmiştir ve her ölçüm için yeni biyosensör yüzeyi kullanılmıştır. Bu da daha fazla tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesine sebep olmuştur. Bu biyosensör, antikanser ilaçların neden olduğu DNA modifikasyonunun veya hasarının izlenmesinde önemli pratik uygulamalarda kullanılabilir ve bu nedenle yeni kanser tanı kitlerinin geliştirilmesinde rol oynayabilir. Ayrıca bu sistemin hastabaşı analizlerinde kullanılan sensör teknolojilerine de katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Andreu, T., Arbiol, J., Cabot, A., Cirera, A., Prades, J., Hernandez-Ramirez, F., Romano-Rodriguez, A., Morante, Jr. (2010). Nanosensors: Controlling Transduction Mechanisms at the Nanoscale Using Metal Oxides and Semiconductors. *In: Sensors Based on Nanostructured Materials*, (s. 79–130) içinde. doi: 10.1007/978-0-387-77753-5_5
- Apetoh, L., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., Zitvogel, L. (2008). A molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Research*, 68(11), 4026-4030. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0427
- Arancibia, V., Zuniga, M., Segura, R., Esteban, M. (2010). Optimization of experimental parameters in the determination of zinc in sea water by adsorptive stripping voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 255–261. doi: 10.1590/S0103-50532010000200010
- Arancibia, V., Zúñiga, M., Zúñiga, M. C.; Segura, R., Esteban, M. (2010). Optimization of experimental parameters in the determination of zinc in sea water by adsorptive stripping voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.* 21(2), 255-261. doi: 10.1590/S0103-50532010000200010
- Ardila, J., Oliveira, G., Medeiros, R., Fatibello-Filho, O. (2013). Determination of gem fibrozil in pharmaceutical and urine samples by square-wave adsorptive stripping voltammetry using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. *J. Electroanal. Chem.*, 690, 32–37. doi: 10.1016/j.jelechem.2012.11.038
- Ariksoysal, D. (2019). Electrochemical investigation of carbon nanotube modified surfaces based on ferricyanide and guanine signals for dna biosensor applications. *Cumhuriyet Sci. J.*, 40(1), 11-23. doi: 10.17776/csj.441382
- Ariksoysal, D., Doğan Topal, B., Topkaya, S.N. (2018). Nükleik asit temelli alternatif analiz yöntemleri “Biyoalgılayıcılar” (Biyosensörler). *T.C. Sağlık Bakanlığı, Türk Farmakope Dergisi*, 3(1), 63-84.
- Ariksoysal, O. D ., Kayran, Y.U., Yilmaz, F.F., Ciucu, A.A., David, I.G., David, V., Hosgor-Limoncu, M., Ozsoz, M. (2017). DNA-wrapped multi-walled carbon nanotube modified electrochemical biosensor for the detection of Escherichia coli from real samples. *Talanta*, 166, 27-35. doi: 10.1016/j.talanta.2017.01.005

- Ariksoysal, O. D., Topkaya, S. N. (2016). Prostate cancer biomarker detection with carbon nanotubes modified screen printed electrodes. *Electroanalysis*, 28, 1077–1084. doi: 10.1002/elan.201501003
- Ariksoysal, O. D., Tezcanli, B., Kosova, B., Ozsoz, M. (2008). Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal. *Anal Chem.*, 80(3):588-596. doi: 10.1021/ac071407q
- Ariksoysal, O. D. (2006). DNA’da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal dna biyosensörlerinin tasarımı (Doktora Tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 193843).
- Attar, T., Harek, Y., Dennouni-Medjati, N., Lahcen, L. (2012). Dosage of cadmium and lead in human blood by anodic stripping voltammetry. *Ann. Biol. Clin-Paris*, 70, 595–598. doi: 10.1684/abc.2012.0738
- Attar, T., Harek, Y., Larabi, L. (2013). Determination of ultra trace levels of copper in whole blood by adsorptive stripping voltammetry. *Journal of the Korean Chemical Society*, 57, 568–573. doi : 10.5012/jkcs.2013.57.5.568
- Aydınlık, S., Ozkan-Ariksoysal, D., Kara, P., Sayiner, A. A., Ozsoz, M. (2011). A nucleic acid-based electrochemical biosensor for the detection of influenza B virus from PCR samples using gold nanoparticle-adsorbed disposable graphite electrode and Meldola's blue as an intercalator. *Analytical Methods*, 3(7), 1607-1614. doi: 10.1039/C1AY05146F
- Aydoğdu, Tığ, G., Zeybek, B., Pekyardımcı, Ş. (2016). Electrochemical DNA biosensor based on poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode for the determination of anticancer drug gemcitabine. *Talanta*, 154, 312-321. doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.049
- Bagni, G., Mascinii, M. (2010). DNA biosensor for environmental risk assessment and drugs studies. in: sensors for chemical and biological applications. Ed.: Ram, M. K., Bhethanabotla, V.R., Boca Raton, FL: CRC Press. (s.249–276) içinde.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R. (2001). Electrochemical methods: fundamentals and applications. *John Wiley and Sons*. Inc. New York. doi: 10.1021/ed062p1018.1
- Bard, A. J., Inzelt, G., Scholz, F. (2008). Electrochemical Dictionary. *Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag*. Erişim adresi: <https://www.springer.com/gp/book/9783642094040>

- Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simonc, B., Marty, J.L. (2011). Enzyme-linked aptamer assays (elaas), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin a in wine. *Food Control* 22(5), 737–743 doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.005
- Bauer, L. A., Birenbaum, N. S., Meyer, G. J. (2004). Biological applications of high aspect ratio nanoparticles. *Journal Materials Chemistry*, 14, 517-526. doi: 10.1039/B312655B
- Bej, A. K. (1996). Nucleic acid hybridizations: principles and strategies. *Nucleic Acid Analysis: Principles and Bioapplications*, (s.1-29) içinde. *New York : Wiley-Liss*.
- Bogdan, M., Brugger, D., Rosenstiel, W., Speiser, B. (2014). Estimation of diffusion coefficients from voltammetric signals by support vector and gaussian process regression. *Journal of Cheminformatics* 6(1), 30. doi: 10.1186/1758-2946-6-30
- Bohunicky, B., Mousa, S. A. (2010). Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. *Nanotechnol Sci Appl.*, 4, 1-10. doi: 10.2147/NSA.S13465
- Can, G., (2005). Side effects of antineoplastic drugs and nursing approaches. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*, 2(2), 8-15. Erişim adresi: <http://www.kuhead.org/jvi.aspx?pdire=kuhead&plng=tur&un=KUHEAD-27928>
- Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M. (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme amplified sensing of nucleic acids, *Biosensors and Bioelectronics*. 20(2), 167-175. doi: 10.1016/j.bios.2004.02.021
- Chamot, E. M., Mason, C.W. (1958). Handbook of Chemical Microscopy, 3rd edition, Volume:1,258-269. *John Wiley&Sons, Inc., USA*,
- Chen, Y. C., Brazier, J. J., Yan, M. D., Bargo, P. R., Prahl, S. A. (2004). Fluorescence-based optical sensor design for molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102, 107-116. doi: 10.1016/j.snb.2004.02.044
- Chiorcea-Paquim, M. A., Corduneanu, O., Oliveira, S. C. B., Diclescu, V. C., Oliveira-Brett, A. M. (2009). Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds–DNA interaction. *Electrochimica Acta*, 54(7), 1978-1985. doi: 10.1016/j.electacta.2008.07.032
- Clark, L. C. Jr., Lyons, C. (1962). Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 102, 29–45. doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

- Conneely G., Aherne M., Lu H., Guilbault G. G. (2007). Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal. Chim. Acta*, 583 (2007), 153-160. doi: 10.1016/j.aca.2006.09.062
- Crew A. D., Lonsdale, N., Byrd, R. Pittson, J., Hart, P. (2011). A Reagentless, Screen-Printed Amperometric Biosensor for the Determination of Glutamate in Food and Clinical Applications. *Biosensors&Bioelectronics*, 26, 2847-2851. Erişim adresi: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6911-1_1
- Cummings, W. (2010). *Chemical Analysis: Introduction. In: Instrumentation*. Reference Book, Ed.: Boyes, W., 4th Ed. Burlington. (s.303–317) içinde. MA: Butterworth-Heinemann.
- Çubukçu, M., Anık, Ü.(2008). Examination of the electroanalytic performance of carbon nanotube (CNT) modified carbon paste electrodes as xanthine biosensor transducers. *Turk J Chem*, 32, 711–719. Erişim adresi: <http://journals.tubitak.gov.tr/chem/issues/kim-08-32-6/kim-32-6-7-0803-14.pdf>
- Demir, E, İnam, R., Özkan, S., Uslu, B. (2014). Electrochemical behavior of tadalafil on TiO₂ nanoparticles-MWCNT composite paste electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms and human serum samples using adsorptive stripping square wave voltammetry. *J Solid State Electrochem*, 18, 2709–2720. doi: 10.1007/s10008-014-2529-5
- Dilgin, Y., Kızılkaya B., Ertek B., Işık F., Dilgin, G. D. (2012). Electrocatalytic oxidation of sulphide using a pencil graphite electrode modified with hematoxylin, *Sensors and Actuators B*, 223– 229. doi: 10.1016/j.snb.2012.03.020
- Dittrich, P. S., Manz, A. (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.*, 5(3), 210-8. doi: 10.1038/nrd1985
- Dogan-Topal, B. ve Ozkan, S. A. (2011). Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode, *Electrochimica Acta*, 56, 4433–4438. doi: 10.1016/j.electacta.2011.01.066
- Eggenstein, C., Borchardt, M., Dumschat, C., Grundig, B., Cammann, K., Spener, F., Knoll, M. (1995). Potentiometric biosensor in double matrix membrane technology. *Biosensors and Bioelectronics* 10, 595–600. doi: 10.1016/0956-5663(95)96935-R
- Ensafi, A. A., Heydari-Bafrooei, E., Amini, M. (2012). DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode, *Biosensors and Bioelectronics*. 31(1), 376–381. doi: 10.1016/j.bios.2011.10.050

- Ensafi, A., Hajian, R. (2008). Simultaneous determination of captopril and thioguanine in pharmaceutical compounds and blood using cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(3), 405-412. doi: 10.1590/S0103-50532008000300006
- Erdem, A., Özsöz, M. (2001a). Interaction of anticancer drug, Epirubicin with DNA. *Analitica Chimica Acta*, 437, 107-114 Erişim adresi: <https://www.journals.elsevier.com/inorganica-chimica-acta>
- Erdem, A., Ozsoz, M. (2001b). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA. *Turkish Journal Chemistry*, 25, 469-475. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/279565356_Voltammetry_of_the_anticaner_drug_mitoxantrone_and_DNA
- Erdem, A., Özsöz, M. (2002). Review: Electrochemical DNA biosensors based on DNA-Drug interactions. *Electroanalysis*, 14, 965-974. doi: 10.1002/1521-4109(200208)14:14<965::AID-ELAN965>3.0.CO;2-U
- Erdem, A., Karadeniz, H., Mayer, G., Famulok, M., Caliskan, A. (2009). Electrochemical sensing of aptamer-protein interactions using a magnetic particle assay and single-use sensor technology. *Electroanalysis*, 21(11), 1278-1284. doi: 10.1002/elan.200804557
- Fabian, C. J. (2007). The what, why and how of aromatase inhibitors: hormonal agents for treatment and prevention of breast cancer. *International Journal of Clinical Practice*, 61(12), 2051–2063. doi: 10.1111/j.1742-1241.2007.01587.x
- Fang, H., Zhang, J., Zhou, S. (2015). Submonolayer deposition on glassy carbonelectrode for anodic stripping voltammetry: An ultra sensitive method for antimony intap water. *Sensor Actuat B–Chem*, 210, 113–119. doi: 10.1016/j.snb.2014.12.093
- Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardisana, P. J., Martín-Perní, A., Costa-García, A. (2008). Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta*, 53(10), 3635-3642. doi: 10.1016/j.electacta.2007.12.044
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project p-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*. 90, 1371-1388. doi: 10.1093/jnci/90.18.1371

- Gao, W., Song, J., Wu, N. (2005). Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 576, 1–7. doi: 10.1016/j.jelechem.2004.09.026
- Geçkil H. (2012). *Biyokimya I. İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü*, (s. 128–136) içinde. Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Gupta, V., Jain, R., Antonijevic, M., Khani, H., Siddiqui, Mn., Dwivedi, A., Mishra, R., Agarwal, S. (2011). Assay of nimodipine- an anti hypertensivedrug, in bulk form and pharmaceutical formulations by cathodic adsorptive stripping voltammetry. *Int J. Electrochem Sci.* 6, 37–51. Erişim adresi: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol6/6010037.pdf>
- Guo, X-X., Song, Z-J., Tian, X-J., Song, J-F. (2008). Single-sweep voltammetric determination of tamoxifen at carbon paste electrode. *Analytical Letters*, 41, 1225–1235. doi: 10.1080/00032710802052668
- Hall, E. A. H. (1990). *Biosensors*. Milton Keynes : Open university press. Erişim adresi: <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000266948>
- Hashem, F. M., Nasr, M., Khairy, A. (2014). In vitro cytotoxicity and bioavailability of solid lipid nanoparticles containing tamoxifen citrate. *Pharmaceutical development and technology*, 19(7), 824-832. doi: 10.3109/10837450.2013.836218
- Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y. (1994). Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Analytica Chimica Acta*, 286(2), 219-224. doi: 10.1016/0003-2670(94)80163-0
- Herne, T. M., Tarlov, M. J. (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of American Chemical Society*. 119, 8916-8920. doi: 10.1021/ja9719586
- Herne, T. M., Tarlov, M. J. (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 119, 8916-8920. doi: 10.1021/ja9719586
- How, C. W., Rasedee, A., Manickam, S., Rosli, R. (2013). Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: characterization, stability assessment and cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 393-399. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.009

- Izquierdo, A., Decastro, M., Valcarcel M. (1994). Simultaneous determination of copper, lead, cadmium, and zinc in previously lyophilized biological tissues using flow-injection analysis anodic-stripping voltammetry. *Electroanalysis*, 6, 894–902. doi: 10.1002/elan.1140061015
- Jayanthi, S. A., Das, A. B., Saxena, U. (2017). Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 95, 15-23. doi: 10.1016/j.bios.2016.12.014
- Jelen, F., Erdem, A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode. *Bioelectrochem.*, 55, 165-167. doi: 10.1016/s1567-5394(01)00143-8
- Jordan, V. C. (1988). The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur Walpole. *Breast Cancer Res Treat*, 11, 197- 209. doi: 10.1007/bf01807278
- Justino, C. I. L., Freitas, A. C., Pereira, R., Duarte, A.C., Santos, T. A. P. R. (2015). Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *Trac. Trends Anal. Chem.*, 68, 2-17. doi: 10.1016/j.trac.2015.03.006
- Justino, C. I., Rocha-Santos, T. A., Duarte, A. C. (2013). Determination of volatile organic compounds in human breath by optical fiber sensing. *Trends Anal. Chem.*, 45, 24-36. Erişim adresi:
<https://pdfs.semanticscholar.org/e581/ff34f1262429952c331e16843f12e1e48111.pdf>
- Kallichurn R. K. I. (2012). What will be the Future Development of Electrochemical Biosensors for the Detection and Quantification of Biomarkers?. *J. Bioengineering & Biomedical Science*, 2,4-10. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9538.1000e110>
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P. E., Ozsoz, M. (2002a). Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, 14(23), 1-6. doi: 10.1002/elan.200290011
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M. (2002b). Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. *Electrochemistry Communications*, 4, 705-709. doi: 10.1016/S1388-2481(02)00428-9

- Karacan, P., Okay, O. (2013). Ethidium bromide binding to dna cryogels. *Reactive & Functional Polymers*, 73, 442-450. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.11.014
- Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A. (2008). Electrochemical Monitoring of dna hybridization by multiwalled carbon nanotube based screen printed electrodes. *Electroanalysis*, 20(17), 1932-1938. doi: 10.1002/elan.200804270
- Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C. M., Pereira, E. M., Ribiero, J. A. (2007). Electrochemical sensing of silver tags labelled dna immobilized onto disposable graphite electrodes. *Electrochemistry Communications*, 9: 2167-2173. doi: 10.1016/j.elecom.2007.05.016
- Karakaya, S. (2019). *Metal nanoparçacık modifiye kalem grafit elektrot kullanılarak akışa enjeksiyon analizde sensör ve biyosensör uygulamaları* (Doktora Tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 539602).
- Karimi-Maleha, H., Bananezhad, A., Ganjali, M. R., Norouzi, P., Sadrnia, A. (2018). Surface amplification of pencil graphite electrode with polypyrrole and reduced graphene oxide for fabrication of a guanine/adenine DNA based electrochemical biosensors for determination of didanosine anticancer drug. *Applied Surface Science*, 441, 55-60. doi: 10.1016/j.apsusc.2018.01.237
- Khanna, V. K., (2011). *Nanosensors: Physical, Chemical and Biological*. Boca Raton, FL: CRC Press. doi: 10.1080/00107514.2012.689351
- Korotkaya, E. V. (2014). Biosensors: design, classification, and applications in the food industry. *Foods and Raw Materials*, 2, 161-171. doi: 10.12737/5476
- Kouchakzadeh, H., Shojaosadati, S. A., Shokri, F. (2014). Efficient loading and entrapment of tamoxifen in human serum albumin based nanoparticulate delivery system by a modified desolvation technique. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(9), 1681-1692. doi: 10.1016/j.cherd.2013.11.024
- Kumar, T. S. R., Mahesh, U. M. (2017). Binding interaction study of tamoxifen with herring sperm dna: spectroscopic and electrochemical studies. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(15), 607-617. doi: 10.20959/wjpr201715-10036
- Kuralay, F., Demirci, S., Kiristi, M., Oksuz, L., Uygun, Oksuz, A. (2014). Poly(3,4-ethylene dioxythiophene) coated chitosan modified disposable electrodes for DNA and DNA-drug interaction sensing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 825-830. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.10.021.

- Labuda, J., Brett, A. M. O., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J. (2010). Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 82(5), 1161-1187. doi: 10.1351/PAC-REP-09-08-16
- Labuda, J., Ovádek, R., Galandová, J. (2009). DNA-based biosensor for the detection of strong damage to dna by the quinazoline derivative as a potential anticancer agent. *Microchim Acta* 164(3/4), 371–377. doi:10.1007/s00604-008-0068-4
- LaGier, M. J., Scholin, C. A., Fell, J. W., Wang, J., Kelly, D. (2005). An electrochemical rna hybridization assay for detection of the fecal indicator bacterium *Escherichia coli*. *Mar Pollut Bull.*, 50(11), 1251–1261. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.04.034.
- Lazzeroni, M., Serrano, D., Dunn, B. K., Heckman-Stoddard, B. M., Lee, O., Khan, S., Decensi, A. (2012). Oral low dose and topical tamoxifen for breast cancer prevention: modern approaches for an old drug. *Breast Cancer Research*, 14(5), 214. doi: 10.1186/bcr3233
- Lorizio, W., Wu, A. H. B., Beattie, M. S., Rugo, H., Tchu, S., Kerlikowske, K., Ziv, E. (2012). Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*. 132(3), 1107-1118. doi: 10.1007/s10549-011-1893-4.
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melen, K., Julkunen, I., Taskinen, J. (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*, 34(13):4202-4210. doi: 10.1021/bi00013a008
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. (2002). Electrochemical dna biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and waste water samples. *Talanta*, 56, 949-957. doi: 10.1016/s0039-9140(01)00655-5
- Lumachi, F., Santeufemia, D. A., Basso, S. M. (2015). Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 231-239. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4549764/>
- Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M. (1999). Disposable dna electrochemical dna sensor for hybridisation detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 43-51. doi: 10.1016/S0956-5663(98)00102-X

- Martínez-Paredes, G, González-García, M. B., Costa-García, A. (2010). Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers. *Sensors Actuators B Chem*, 149, 329–335. doi:10.1016/j.snb.2010.06.064
- Maximov, P. Y., Lee, T. M., Jordan, V. C. (2013). The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Current Clinical Pharmacology*. 8(2), 135-155. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624793/>
- McCreery, R. L. (1991). *Carbon electrodes: structural effects on electron transfer kinetics*, in: A.J. Bard (Ed.), *Electroanalytical Chemistry*, vol. 18, Marcel Dekker, New York.
- Mehdinia, A., Kazemi, S. H., Bathaie, S. Z., Alizadeh, A., Shamsipur, M., Mousavi, M. F. (2008). Electrochemical studies of dna immobilization onto the azide-terminated monolayers and its interaction with taxol. *Analytical Biochemistry*, 375, 331–338. doi: 10.1016/j.ab.2008.01.006
- Mercan, H. (2010). *Triazin grubu pestisitlerin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ve tayinleri*. (Doktora Tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 269726).
- Mirmoghtadaie, L., Ensafi, A. A., Kadivar, M., Norouzi, P. (2013). Highly selective electrochemical biosensor for the determination of folic acid based on dna modified-pencil graphite electrode using response surface methodology. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1753–1758. doi: 10.1016/j.msec.2012.12.090
- Mirmomtaz, E., Zirakbash, A., Ensafi, A. A. (2016). An electrochemical dna sensor for determination of 6-thioguanine using adsorptive stripping voltammetry at hmde: an anticancer drug dna interaction study. *Russ J Electrochem*, 52, 320–329. doi: doi:10.1134/S1023193516040078
- Moghaddam, H. M., Beitollahi, H., Dehghannoudeh, G., (2017). A label-free electrochemical biosensor based on carbon paste electrode modified with graphene and ds-dna for the determination of the anti-cancer drug tamoxifen. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(7), 372-376. doi: 10.1149/2.0561707jes
- Moore, D. D. (2012). *A Conversation with Elwood Jensen*. *Annual Review of Physiology*, 74, 1–11. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153327
- Muti, M., Muti, M. (2018). Electrochemical monitoring of the interaction between anticancer drug and DNA in the presence of antioxidant. *Talanta*, 178, 1033-1039. doi: 10.1016/j.talanta.2017.08.089

- Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K., Khalid, A. M. (2006). Electrochemical dna biosensor for the study of ciprofloxacin–dna interaction. *Analytical Biochemistry*, 354, 28–34. doi: 10.1016/j.ab.2006.04.004
- O'Malley, B. W., Khan, S., Jensen, E. V. (2013). (1920-2012): Father of the nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(10), 3707-3708. doi: 10.1073/pnas.1301566110
- Ozkan, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Mascini, M., Ozsoz, M. (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(4), 905-912.
- Özcan, A., Şahin, Y. (2011). A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of N-acetyl-p-benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode. *Analytica Chimica Acta*, 685, 9–14. doi: 10.1016/j.aca.2010.11.004
- Özcan, B. (2015). *Bazı Hastalıkların Erken Teşhisi İçin Yeni Biyolojik Sistemlerinin Geliştirilmesi*. (Yüksek lisans tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 398680).
- Palcic, M., Milardovic, S., Kerekovic, I., Grabaric, Z. (2014). Application of nitrilotriacetic acid modified gold electrode for determination of lead in natural waters with differential pulse adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Int J. Electrochem. Sci*, 9, 3701–3714. Erişim adresi: <http://www.electrochemsci.org/papers/vol9/90703701.pdf>
- Palecek, E. (1960). Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. *Nature*, 188, 656–657. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/188656a0>
- Parkin, Max, D., Freddie, Bray, M. D., Ferlay, J., Paola, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, 55(2), 74-108. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078>
- Pickering, W. (2002). General strategies for speciation, in: chemical speciation in the environment, Ed.: Ure, A., Oxford: Blackwell Science Ltd. 9–29. doi: 10.1002/9780470988312.ch2
- Polat, E. (2016). İlaç DNA etkileşimlerinin elektrokimyasal sensörler ile incelenmesi ve geliştirilmesi. Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 414382).

- Radhika, K., Maha, Z.-F. (2008). Oxidative dna damage following photo excitation of daunomycin: direct role of oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 198, 200-204. doi: 10.1016/j.jphotochem.2008.03.009
- Rafique, B., Iqbal, M., Mehmood, T., Shaheen, M. (2019). Electrochemical dna biosensors: a review, *Sensor Review*, 39(1), 34-50. doi: 10.3390/s19224916
- Rajendiran, V., Palaniandavar, M., Periasamy, V., Akbarsha, M. (2012). New $[\text{Ru}(\text{5,6dmp}/3,4,7,8\text{-tmp})_2(\text{diimine})]^{2+}$ complexes: non-covalent dna and protein binding, anticancer activity and fluorescent probes for nuclear and protein components. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 116, 151-162. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.06.005
- Rauf, S., Gooding, J. J., Akhtar, K., Ghauri, M. A., Rahman, M., Anwar, M. A., Khalid, A. M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs–dna interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 205–217. doi: 10.1016/j.jpba.2004.10.037
- Reinert, T., Barrios, C. H. (2015). Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(6), 304–320. doi: 10.1177/1758834015608993
- Rezaei, B., Askarpour, N., Ensafi, A. (2013). Adsorptive stripping voltammetry determination of methyl dopa on the surface of a carboxylated multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode in biological and pharmaceutical samples. *Colloid Surface B*, 109, 235–258. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.04.004
- Schweiger, B., Zadow, I., Heckler, R., Timm, H., Pauli, G. (2000). Application of a fluorogenic pcr assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.*, 38(4): 1552–1558. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86487/>
- Shin, S. C., Choi, J. S. (2009). Effects of epigallocatechingallate on the oral bioavailability and pharmacokinetics of tamoxifen and its main metabolite, 4-hydroxytamoxifen, in rats. *Anti-Cancer Drugs*, 20(7), 584-588. doi: 10.1097/CAD.0b013e32832d6834
- Sirajuddin, M., Ali, S., Badshah, A. (2013). Drug–dna interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1-19. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (1998) *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, (Çeviri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.), (s. 563-670) içinde, Bilim Yayıncılık, 5. Baskı.

- Skoog, D. A., Leary, J. J. (1996). *Principles of Instrumental Analysis*. 4 th Ed. Saunders, (s. 538) içinde, College Publishing, New York.
- Subak, H., Ozkan-Ariksoysal, D. (2018). Label-free electrochemical biosensor for the detection of influenza genes and the solution of guanine-based displaying problem of dna hybridization. *Sens. Actuators B*, 263, 196-207. doi: 10.1016/j.snb.2018.02.089
- Subramanian, R., Crowley, K., Morrin, A., Killard, A. J. (2013). A sensor probe for the continuous in situ monitoring of ammonia leakage in secondary refrigerant systems. *Analytical Methods*. 5, 134-140. doi: 10.1039/C2AY25688F
- Şengiz, C. B. (2016). *Karbon nanotüp-kitosan modifiye grafit tabanlı sensörlerin tasarımı ve antikanser ilaç-dna etkileşiminin elektrokimyasal tayinine yönelik uygulamaları* (Yüksek lisans tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 420544).
- Teles, F. R. R., Fonseca, L. P. (2008). Trends in dna biosensor. *Talanta*, 77, 606– 623. doi: 10.1016/j.talanta.2008.07.024
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R., Wilson, G. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121 - 131. Erişim adresi: <https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-01084678/document>
- Thiel, A.J., Frutos, A. G., Jordan, C. E., Corn, A. M., Smith, L. M. (1997). In situ surface plasmon resonance imaging detection of dna hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. *Analytical Chemistry*, 69(24), 4948–4956. doi: 10.1021/ac9708001
- Tong, D., Stimpel, M., Reinthaller, A., Varva, N., Mullauer, S., Loedolter S., Zeillinger, R. (1999). BRCA1 gene mutations in sporadic ovarian carcinomas: detection by pcr and reverse allele-specific oligonucleotide hybridization. *Clin. Chem.*, 45(7), 976– 981. doi: 10.1093/clinchem/45.7.976
- Torne, S., Darandale, S., Vavia, P., Trotta, F., Cavalli, R. (2013). Cyclodextrin based nanosponges: effective nanocarrier for tamoxifen delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18 (3), 619-625. doi: 10.3109/10837450.2011.649855
- Topkaya, S. N. (2009). *Biyolojik ve kimyasal bazı maddelerin dna ile etkileşiminin elektrokimyasal biyosensörlerle algılanması*. (Yüksek Lisans Tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 260173).
- Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N., (2003). *Enstrümental Analiz 1 Elektroanalitik Yöntemler*. (s.132 –144) içinde, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir.
- Turner, A. P. F., Karube, I., Wilson, G. S., (1987). *Biosensors: fundamentals and applications*, (s.180-210) içinde, Oxford University Press, USA.

- Van der Linden, W. E. Dieker, J. W., (1980). Glassy carbon as electrode material in electro-analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 119, 1-24. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00025-8
- Vaughan, R. D., O'Sullivan, C. K., Guilbault, G. G. (2001). *Development of a quartz crystal microbalance (qcm) immunosensor for the detection of listeria monocytogenes*. enzyme and microbial technology, 29, 635-638. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00449-5
- Von Wandruszka, R. (1992). *Preconcentration by Electrochemical Means*. In: *Preconcentration Techniques for Trace Elements*, Ed.: Alfassi, Z. B., Wai, C. M., Boca Raton, (s.133–180) içinde FL: CRC Press.
- Wang, J, Dewald, H. (1983). Determination of trace elements in pharmaceutical tablets using anodic stripping voltammetry. *Anal. Lett. P. T. B.*, 16, 925–939. doi: 10.1080/00032718308065230
- Wang, J. (2002). Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 469(1), 63-71. Erişim adresi: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.1172&rep=rep1&type=pdf>
- Wang, J., Flechhsig, G., Erdem, A., Korbut, O., Gründler, P. (2004). Label-free dna hybridization based on coupling of a heated carbon paste electrode with magnetic separations. *Electroanalysis*, 16(11), 928-93. doi: 10.1002/elan.200302897
- Wang, J., Kawde, A. N., Erdem, A., Salazar, M. (2001a). Magnetic bead based label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Analyst*, 126, 2020-2024. doi: 10.1039/B106343J
- Wang, J. (2006). Bipolar electrochemical mechanism for the propulsion of catalytic nanomotors in hydrogen peroxide solutions. *Analytical electrochemistry: John Wiley ve Sons*, 22(25), 10451-10456. doi: 10.1021/la0615950
- Wang, J., Xu, D., Kawde, A.-N., Polsky, R. (2001b). Metal nanoparticle- based electrochemical stripping potentiometric detection of dna hybridization. *Analitica Chemistry*, 73, 5576-5581. doi: 10.1021/ac0107148
- Whitcomb, D. C., Lowe, M. E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.*, 52, 1-17. doi: 10.1007/s10620-006-9589-z
- Wu, Q., Batley, G., (1995). Determination of sub-nanomolar concentrations of lead in sea-water by adsorptive stripping voltammetry with xylenol orange. *Anal. Chim. Acta*, 309, 95–101. doi: 10.1016/0003-2670(95)00055-5

- Yanik, S., Ozkan-Ariksoysal, D., Yilmaz, S. (2020). Electrochemical biosensor for brcal gene and tamoxifen interaction. *Journal of Scientific Perspectives*, 4, 37-48. doi: 10.26900/jsp.4.004
- Yıldız, A., Genç, Ö. (1993). *Enstrümental Analiz*, (s. 352) içinde, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1.Baskı.
- Yılmaz, S., 2016. *Uygulama Örnekleriyle Elektroanalitik Kimya*, (s.138-151) içinde, Gazi Kitabevi, Ankara.
- Yumak, T., Kuralay, F., Muti, M. Sinag, A., Erdem, A., Abacı, S. (2011). Preparation and characterization of zinc oxide nanoparticles and their sensor applications for electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 397-403. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.030
- Yunus, G., Srivastava, S., Kuddus, M, Gupta, V. (2013). Drug dna interaction: A theoretical study on the binding of thionine with DNAs of varying base composition. *Current Applied Physics*, 13, 322-326. doi: 10.1016/j.cap.2012.05.020

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Suzan YANIK
Doğum Yeri : Rusçuk/Bulgaristan
Doğum Tarihi : 06.06.1986

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2012
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2014
Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İş Güvenliği Anabilim Dalı, 2018
Doktora Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2020.
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

1) SCI

Wiercińska A. N., Grochowski M., Wiśniewska M., Rotko K. T., Yilmaz S., Yagmur S., Saglikoglu, Yanik S., "Adsorption of Selected Amino Acids at the Mercury/Aqueous Solution Interface from the Chlorate (VII) and Its Dependence on the Supporting Electrolyte Concentration" Adsorption Science&Technology, Vol.33,pp.553-558, 2015.

2) Diğer

Yanik S., Ozkan-Ariksoysal D., Yilmaz S., 'Electrochemical Biosensor For BRCA1 Gene And Tamoxifen Interaction', Journal of Scientific Perspectives, Vol.4, pp.37-48, 2020.

Yanik S., Ozkan-Ariksoysal D., Yilmaz S., 'Voltammetric Analysis of Tamoxifen Recovery and Its Interaction with DNA', Journal of Scientific Perspectives, Vol.4, pp.13-24, 2020.

Yanik S., Yilmaz S., Saglikoglu G., Sadikoglu M., Yayintas O., "Voltammetric And Chromatographic Determination Of Naproxen in Drug Formulation", Journal of Scientific Perspectives, vol.3, pp.299-310, 2019.

b) Bildiriler

1) Uluslararası

S. Yanik, D. Ariksoysal, S. Yilmaz, " An electrochemical nanobiosensor for sensitive determination of drug effect on cancer related DNA" XX. Euroanalysis , İSTANBUL, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2019, 410, p2-092.

Yanik S., Öztürk Ö. F., " Dondurulmuş Gıda Üretimi Yapan Firmalarda İş Sağlığı ve Güvenliği" , 9. Uluslararası İş Sağlığı ve Güvenliği Kongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 6-9 Mayıs 2018, pp. 0-0, 612

Nosal-Wiercinska A., Yilmaz S., Yağmur S., Sağlıkoğlu G., Yanik S., Grochowski M., et al., "Electrochemical and Thermodynamic Study of the Electroreduction of Bi(III) Ions in the Presence of Cystine in Chlorate (VII) Solutions of Decreased Water Activity.", The 38th International Symposium on Enviromental Analytical Chemistry, Lausanne, ISVIÇRE, 17-20 Haziran 2014, pp.0-0

2) Ulusal

Yanik S. , Öztürk Ö. F. " Dondurulmuş Gıda Üretimi Yapan Firmalarda İş Güvenliği Ve Meslek Hastalıkları ", Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 15-16 Mayıs 2017, pp. P51

A. Nosal - Wiercińska, M. Wiśniewska, K. Tyszczyk – Rotko, S. Yilmaz, S. Yagmur, G. Sağlıkoğlu, S. Yanik, "The Effect of Ethionine Protonation on the Kinetics and the Mechanism of Bi(III) Ion Electroreduction" 10th Agean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, (29 Sept.-2 Okt. 2016) op-40.

Sadikoglu M., Cabuk A., Yanik S., Yilmaz S. " Quantitative Determination of Tenoxicam in Drug Dosage Forms and Modified Glassy Carbon Electrodes ", 10th Agean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, (29 Sept.-2 Okt. 2016) pp. P4-11.

Sadikoglu M., Soylu Ü. I., Yanik S., Yilmaz S. "Quantitative Determination of Moxifloxacin Hydrochloride in Drug Dosage Forms by Voltammetric Techniques Using Glassy Carbon and Modified Glassy Carbon Electrodes", 10th Agean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, (29 Sept.-2 Okt. 2016) pp. P4-10.

S. Yanik, D. Ariksoysal, D. Ulker Cakir, L. Koral, S. Yilmaz. "Electrochemical DNA Nanobiosensor for the Detection of Anticancer Drugs and DNA Interactions" 10th Agean Analytical Chemistry Days, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, (29 Sept. - 2 Okt. 2016) p4-23.

Yanik S., Yilmaz S., Yağmur S., Sağlıkoğlu G., "Naproxen'in Ultra Eser Grafit Elektrotta Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi Ve İlaç Dozaj Formlarından Miktarının Belirlenmesi.", 27. Ulusal Kimya Kongresi, ÇANAKKALE, TÜRKİYE, 23-28 Ağustos 2015, ss.0-0

Yilmaz S., Wiercińska A.N., Sağlıkoğlu G., Yagmur S., Yanik S., Growchoski M. , et al., "thermodynamic study of the electroreduction of Bi(III) ions in the presence of cystine in chlorate (VII) solutions of decreased water activity", 38th international symposium on environmental analytical chemistry, Lausanne, ISVIÇRE, 17-20 Haziran 2014, pp.PE42-PE42.

Yanik S., Yilmaz S., Sağlikoğlu G., "Naproksenin Voltametri ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Teknikleri ile İlaç Dozaj Formlarından Miktarının Belirlenmesi.", 14. Ulusal Kromatografi Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 12-15 Mayıs 2014, ss.0-0

c) Katıldığı Projeler

"Hidrojeller ile Sulu Ortamlardan Arsenik Uzaklaştırılmasının Voltametri Tekniği İle İncelenmesi", BAP Arastırma Projesi, 284, Araştırmacı, 2015.

"Kriyojel/İletken Polimer Kompozitlerin Hazırlanması ve Sensör Olarak Uygulanabilirliğinin İncelenmesi ", TÜBİTAK Projesi, 214M130, Araştırmacı, 2017.

"Nano/Mikroemlsiyonla Stabilize Edilmiş Esansiyel Yağların Aromatik, Antioksidan ve Antimikrobiyal zelliklerinin Belirlenmesi: Portakal Suyu Uygulaması", TÜBİTAK Projesi, 117O313, Araştırmacı, 2018.

"İlaç-DNA Etkileşimlerinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal Nanobiyosensrlerin Tasarımı Ve Uygulamaları", BAP Arastırma Projesi, 2459, Araştırmacı, Devam ediyor.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Kar-Bay Gıda Tarım Tic. ve San. A.Ş (Toplam Kalite Kontrol Sorumlusu), 2015-2016

Akuatek Su rnleri Tarım rnleri Gıda Turizm San. Tic. A.Ş., (Kalite Güvence Sorumlusu), 2017-2017

İLETİŞİM

E-posta Adresi : suzan.yanik@gmail.com

ORCID : 0000-0002-0532-4149