Cumhuriyet Science Journal
CSJ

e-ISSN: 2587-246X
ISSN: 2587-2680

Cumhuriyet Sci. J., Vol.38-3 (2017) 525-534

Antikanser İlaç Olan Epirubicin'in DNA ile Etkileşiminin DNA Biyosensörleri ile Elektrokimyasal Tayini

Adil ELİK[1]*, Gültekin GÖKÇE[2], Ebru BOSTANCI[2], Derya KIZILOLUK[3]

[1]*Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, 58140 Sivas, TÜRKİYE*

[2]*Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 58140 Sivas, TÜRKİYE*

[3]*Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 58140 Sivas, TÜRKİYE*

Received: 21.04.2017; Accepted: 30.05.2017 *http://dx.doi.org/10.17776/csj.340503*

Özet: Anti kanser ilaçların DNA ile etkileşimlerinin biyosensörler ile tespit edilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Çalışmamızda antikanser ilaç olan Epirubicin'in DNA ile etkileşmesi elektrokimyasal yöntemlerle; kalem grafit elektrot (PGE) kullanılarak incelendi. Epirubicin'in Calph Thymus'dan (ct) izole edilmiş tek sarmal ct-DNA (ct-ssDNA) ve çift sarmal ct-DNA (ct-dsDNA) ile elektrot yüzeyinde veya çözelti ortamında etkileşimleri ct-DNA'larda bulunan guanin bazındaki yükseltgenme sinyalinde meydana gelen değişimler izlenerek incelendi. Çalışmamızda difarensiyel puls voltametri tekniği kullanıldı. Elektrotlara immobilize edilen ct-DNA'ların derişimleri, ct-DNA ile etkileşen ilaç derişimi ve etkileşim süresi gibi parametreler PGE ile optimize edildi, tayin sınırları belirlendi ve sonuçlar yorumlandı. Tayin sınırı (DL) ct-dsDNA ve ct-ssDNA etkileşimi için sırasıyla 0.556 µg/mL ve 0.059 µg/mL bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen sonuçların, üretimi yapılacak olan ilaçların tasarımına fayda sağlayacağına ve yeni sentezlenen ilaçların DNA ile olan etkileşim mekanizmalarının aydınlatılmasına imkan sağlayacağına inanılmaktadır., *Anaplasma Phagocytophilum,* Diferansiyel PulsVoltametrisi.

Anahtar Kelimeler: Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri, Epirubicin , Kalem Grafit Elektrot (PGE), Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

Development of Electrochemical DNA Sensor for The Determination of *Anaplasma Phagocytophilum*

Abstract: Studies that deal with the confirming the interaction of anticancer drugs with DNA have gained much more importance in recent years. In our study,the interaction of Epirubicin, an anticancer drug, with DNA was examined with electrochemical methods using pencil graphite electrode. Differential pulse voltammetry technique (DPV) was employed in our study. The parameters such as the concentrations of ct-DNA immobilized on electrodes Drug concentrations interacting with ct-DNA and its interaction periods of time were optimized using pencil graphite electrode and the limit of detection was determined and the result were explicated. To estimate the detection limit (DL) target sequences were found for ct-dsDNA and ct-ssDNA 0.556 µg/mL and 0.059 µg/mL , respectively. The study aims to contribute to the designing process of the drugs to be produced and to the illumination of the interaction mechanisms between the newly- synthesised drugs and DNA.

Keywords: DNA Biosensor, Epirubicin, Pencil Graphite Electrode (PGE), Differential Puls Voltammetry (DPV)

* Corresponding author. *Email address:* *elik@cumhuriyet.edu.tr*
http://dergipark.gov.tr/csj ©2016 Faculty of Science, Cumhuriyet University

1. GİRİŞ

Bir elektrokimyasal sensörün yapısına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit gibi biyolojik maddelerin katılmasıyla biyosensörler elde edilir[1,2]. DNA' nın, analizi yapılacak maddeyle etkileşerek onu tanıyan biyolojik materyal olarak kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörü denir[3,4]. DNA biyosensörleri, DNA hedefli bazı ilaçların ya da maddelerin DNA' ya olan etkilerinin aydınlatılmasında ve bu maddelerin etkileşim mekanizmalarının belirlenmesinde kullanılmaktadır[3-5]. Nükleik asitlerle ilaç etkileşimi, ilaçların tasarımlanmasında ve ilgili proseslerin geliştirilmesinde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir[6]. İlaç-DNA etkileşimini inceleyen farklı birçok teknik kullanılmakta olup bu tekniklerin bir takım avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Dolayısıyla ilaç tasarımı ve proses geliştirilmesine yönelik olarak ilaç-DNA etkileşimini esas alan yeni tekniklere olan talep giderek artmaktadır [1,5].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri elektrokimyasal transdusere immobilize edilmiş bir nükleik asit tanıma tabakasından oluşur[7,8]. Nükleik asit tanıma tabakası DNA ile bağlanma moleküllerinin etkileşimi esnasında DNA yapısında meydana gelen değişimleri veya DNA nın spesifik sekansını detekte eder. Etkileşim öncesi ve sonrası ölçülen sinyaller arasındaki farktan yararlanılarak DNA-ilaç etkileşim mekanizması açıklanabilmektedir[8]. Aynı zamanda bu etkileşim analiz edilen ilaçların miktarlarının belirlenmesinde veya yeni ilaç tasarımlarında kullanılmaktadır [7]. Yeni sentezlenen birçok maddenin, ilacın ve özellikle DNA hedefli kanserojen ilaçların tasarımı gerçekleştirilirken, bu maddelerin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve etkin bir şekilde aydınlatılması; bu çalışmaların amaçları doğrultusunda daha hızlı bir şekilde ilerlemesini sağlayacaktır. DNA biyosensörleri kullanılarak DNA–ilaç etkileşimleri başarılı bir şekilde algılanabilmektedir. Bu algılama DNA' ya ait elektroaktif bazlar olan guanin/adenin sinyali üzerinden ya da analizi yapılacak ilacın elektrokimyasal sinyali üzerinden sağlanabilir. Bu sinyallerdeki değişimlere göre DNA–ilaç etkileşimleri hakkında yorumlar yapılabilir [9]. Nukleik asit (DNA) tanıma yüzeyi içeren biyosensörler, bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddenin (kanserojen maddeler, ilaçlar vb.) etkileşim mekanizmasının aydınlatılması veya miktarının tayininde veya DNA'daki baz dizisi belli bölgelerdeki hibridizasyon olaylarının izlenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır[9]. Bazı ilaç molekülleriyle DNA' nın etkileşmesi (özellikle de antikanser özellik taşıyan ilaç molekülleri ile etkileşim) ve bu etkileşmenin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi; yeni ilaç tasarımları için çok önemlidir. Bir kimyasal maddenin veya metabolitin DNA ile etkileşimi sonrasında DNA'da oluşabilecek yan ürünlerin kısa zamanda tespiti kanser araştırmaları icin çok önemlidir[10]. DNA – ilaç etkileşimine dair literatürde pek çok yayın vardır. Bunlardan bir tanesinde; L. Wang ve arkadaşlarının antikanser bitkisel bir ilaç olan emodin ile diferansiyel puls voltametri tekniği ve dönüşümlü voltametri tekniği kullanarak yaptıkları çalışmada, emodinin DNA çift sarmal yapısının içine interkale olarak, DNA ile etkileştiği sonucunu bulmuşlardır[11]. Bir diğer çalışmada; H. Nawaz ve arkadaşlarının, kinolin türevi antibakteriyel etkiye sahip ciprofloxacin ile yaptıkları çalışmaya göre; ciprofloxacinin DNA' ya elektrostatik olarak ve interkalasyon yaparak bağlandığını göstermişlerdir [12].

Birçok antitümör ilaç etkisini DNA'ya bağlanarak göstermektedir[13]..Bu bilgi birçok bileşiğin antikanser ilaç olarak kullanılma potansiyelinin olup olmadığını inceleme fırsatı vermektedir.İlaç-DNA etkileşmesine dayalı benzer çalışmalarda elektrokimyasal çalışmalarda[14-18], DNA ile etkileşen ilaçların elektrokimyasal yanıtta bir azalma veya artışa neden olduğu gözlenmiştir. Örneğin, PGE ile hiç sinyal vermeyen veya çok az sinyal verebilen fenotiyazin grubu bazı ilaçların dsDNA modifiye edilmiş kalem grafit elektrot(PGE) ile nanomolar düzeyde tayinleri mümkündür [17].

DNA'daki elektroaktif bazlara ait sinyallerdeki değişiklikler ya da analizi yapılacak maddeye ait elektrokimyasal sinyaldeki değişiklikler, analit ile DNA arasındaki etkileşimleri güvenilir bir şekilde ortaya koymaktadır. Çalışmamızda antikanser ilaç olan epuribicinin DNA ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş tek kullanımlık PGE ile etkileşimleri ve elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. DNA–ilaç etkileşimleri çözelti fazında etkileşim ve elektrot yüzeyinde etkileşim (DNA modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde etkileşim, ilaç modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde etkileşim) olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Çalışmamızda, çözelti fazında ve DNA modifiye edilmiş elektrot yüzeyindeki etkileşimler incelenecektir. DNA' ya ait elektroaktif guanin bazının sinyalindeki azalmalar esas alınarak epuribicin miktarı ile ilgili hesaplamalar yapılacaktır. Ayrıca epirubicin konsantrasyonu değiştirildiğinde guanin sinyalinin yanıtı, etkileşimlere ait süre çalışması ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler incelenecektir. Literatürde, antikanser ilaçları ile ilgili yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen, epuribicin-DNA etkileşiminin PGE ile incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan bakıldığında, literatürdeki önemli bir eksikliği giderecektir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Kullanılan Cihazlar

Terazi (Precisa XB 220A), Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex), pH-metre (WTW series), Manyetik karıştırıcı (AGE velp), Vorteks (Velp scientifics), Potansiyostat (AUTOLAB 302, GPRES 4,9 yazılımı, Eco Chemie), Ag/AgCl referans elektrot, Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı)

2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Epirubicin (EPR) (Sigma), Asetik asit (%99-100) (Sigma-Aldrich), Hidroklorik asit (%37) (Sigma-Aldrich), Sodyum Hidroksit(Sigma), Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Sigma), Sodyum klorür (Sigma), EDTA disodyum tuzu (Sigma), Calf thymus ds-DNA (Sigma), Calf thymus ss-DNA (Sigma), Tüm çalışmalarda 18 mega – ohm'luk ultra saf su kullanıldı. Deneysel çalışmalar odasıcaklığında (25,0 ± 0,5 °C) gerçekleştirildi.

2.2.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

2.2.1.1 Tampon çözeltilerin hazırlanması:

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,4; PBS):

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36g (0,01 mol) KH_2PO_4, 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir.

0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,81; ABS):

0,5 M asetat tampon çözeltisi L başına yaklaşık 29 mL derişik asetik asit ve 1,168 g NaCl içermektedir. Tampon çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH çözeltisi ile 4,81'e ayarlanmıştır.

0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0;Tris-EDTA):

Kullanılan 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1,576 gTrizma HCl ve 0,372 g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8,0 değerineayarlanması, 0,1 N NaOH ve/veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerekgerçekleştirildi

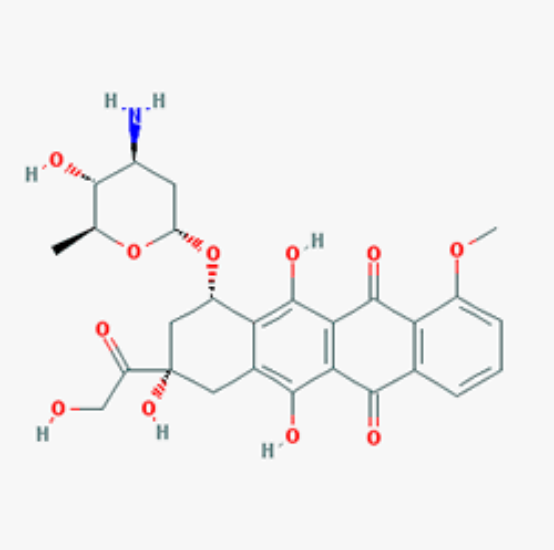
2.2.1.2 Epurubicin çözeltisinin hazırlanması:
Satın alınan % 100 saflıktaki Epirubici'nin ABS tamponu ile stok çözeltileri hazırlandı ve daha sonra kullanılmak üzere 50µL 'lik hacimlerde eppendorf tüplerine konarak 4°C de saklandı.

2.2.1.3 DNA çözeltilerinin hazırlanması:
Buzağı timus bezinden elde edilen DNA (= Calf Thymus DNA); çift sarmal DNA (ds-DNA) stok çözeltileri; 1000µg/mL, TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı [21]. Ct-ds-DNA seyreltik çözeltisi, 0,5M Asetat tamponu (pH 4,8) ile hazırlandı. Çözeltinin ışığa maruz kalma durumunu en aza indirebilmek için, ışık almayan

bir kutu içerisinde buzdolabında -20°C'de muhafaza edildi.

Tek sarmal DNA (ss-DNA) çözeltisi de yukarıda ct-ds-DNA için anlatıldığı gibi hazırlandı ve buzdolabında -20°C 'de muhafaza edildi.

2.2.2 Epirubicin (EPR) hakkında genel bilgi



Şekil 1. Epirubicin in açık formülü($C_{27}H_{29}NO_{11}$).

Farmakolojik Özellikleri: Epirubicin, antrasiklin sitotoksik bir ajandır. Antrasiklinlerin ökaryotik hücrelerde çeşitli biokimyasal ve biyolojik fonksiyonlarla etkileşebildiğinin bilinmesine rağmen, epirubisinin sitotoksik ve/veya antiproliferatif etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Epirubicin ayrıca sitotoksik serbest radikallerin oluşumuyla oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarında da işe karışmaktadır İn vitro çalışmalar, epirubisinin meme, karaciğer, akciğer, mide, kolorektal, skuamöz hücreli, servikal, mesane ve over karsinomları ile nöroblastoma ve lösemiden türemiş çeşitli hayvan ve insan tümör hücre serilerine karşı en az doksorubisine eşit bir sitotoksisiteye sahip olduğunu göstermiştir[8].

2.3 Kullanılan Yöntem

Kullanılan elektrotların aktivasyonu ve elektrot yüzeyine ct-dsDNA ve ct-ssDNA tutturulması, DNA materyalinin madde ile elektrot yüzeyinde incelenen madde ile etkileşmesine ilişkin basamaklarda, mevcut literatürlerde [4,19,20] rapor edilen yol izlenildi. Çalışmalarda her seferde elektrot tazelendi ve ard arda 5 kez tekrarlandı ve akım değerleri ölçüldü.

Deney düzeneği ve kullanılan elektrotların hazırlanması :

Diferansiyel puls voltametrisi tekniğinden yaralanılarak yapılan bu çalışmada, potansiyostat cihazı olarak μ-AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda) ve yazılım programı olarak GPES 4,9 kullanıldı. Üçlü elektrot sistemi olarak ise, kalem grafit elektrot çalışma elektrotu, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel de karşıt elektrot olarak kullanıldı. Her bir elektrot sisteme metal bağlantılarla bağlanmış ve bu üçlü elektrot sistemin daldırıldığı ölçüm çözeltisinin hacmi 6 mL olacak şekilde ayarlandı.

Tek kullanımlık kalem ucu grafit elektrot (PGE) hazırlanması: Çalışmada çalışma elektrotu olarak kullanılan, kalem grafit elektrotun (Rotring T 0,5 kalem, Tombo HB model 0.5mm uç) 6cm olan grafit uçları deneysel koşullara uygun olması bakımından 3cm boyunda kesildi [21,22]. Hazırlanan kalem elektrotlar yüzeydeki kirliliklerin giderilmesi ve yüzeyde aktif karboksil grupları oluşturulması için ABS içerisine daldırılarak, çözeltiye 60 saniye boyunca +1.4 V potansiyel uygulandı. Böylece kalem elektrot aktivasyonu gerçekleşmiş oldu.

2.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) Deneyleri

Her bir elektrot için DNA (ct ds-DNA ve ct ssDNA) immobilizasyon optimizasyonu ve DNA-EPR etkileşim optimizasyonu yapıldıktan sonra, EIS deneyleri için gerekli çözeltiler hazırlandı ve ölçümler alındı.

Ölçümün içinde yapılacağı ve değişik pH değerlerine sahip 164,5 mg $K_3Fe(CN)_6$(molekül kütlesi: 329,243g) ve 208,13 mg $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ (molekül kütlesi: 422,38g) redoks problarını içeren çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan ferro-ferri siyanür ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$) çözelti probuna iyonik şiddeti sabit tutmak için 1,49 g KCl eklendi (200mL için).

$K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ redoks çifti probu bütün deneylerde bu şekilde ayarlandı. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi deneylerinde, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel yardımcı elektrot olarak kullanıldı. Gamry Referans 600 potantiyostat /galvanostat/Frekans Analyzer (FRA) yazılımı kullanılarak, çözeltilerin elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği ile impedansı alındı.

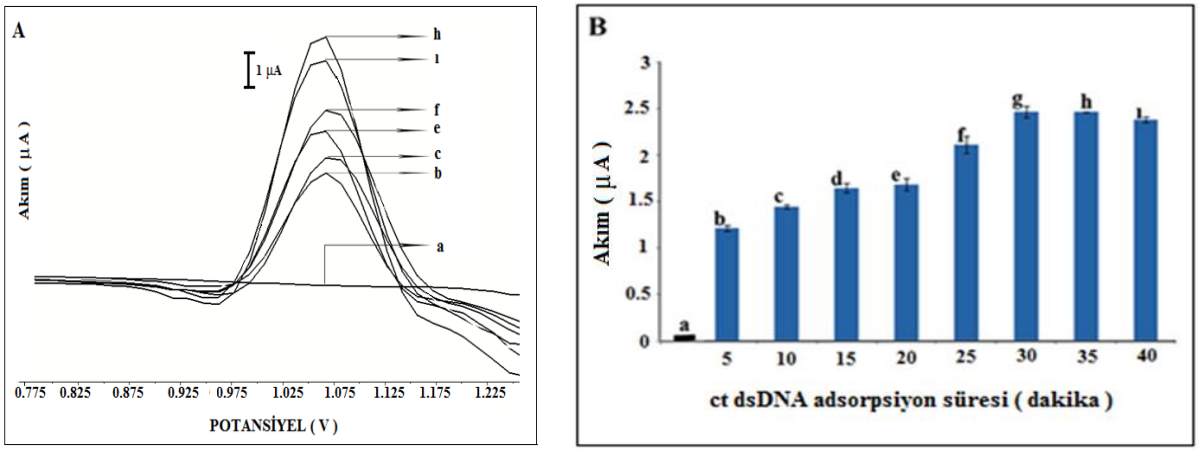
İmpedans ölçümleri, hazırlanan ferro-ferri siyanür çözeltisi içinde dalga yüksekliği 10 mV'ta sabitlendi ve böylelikle sistem özelliklerinin denge durumunda tutulması sağlandı. Nyquist eğrilerinin elde edilebilmesi için uygulanan frekans 0,1 Hz ile 100 kHz arasında ayarlandı.

Önceki tüm çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmalarda da elektrotların yüzeyi her seferinde tazelendi, ard arda 5 kez tekrarlandı ve elektrodun yüzey direnci ölçüldü.

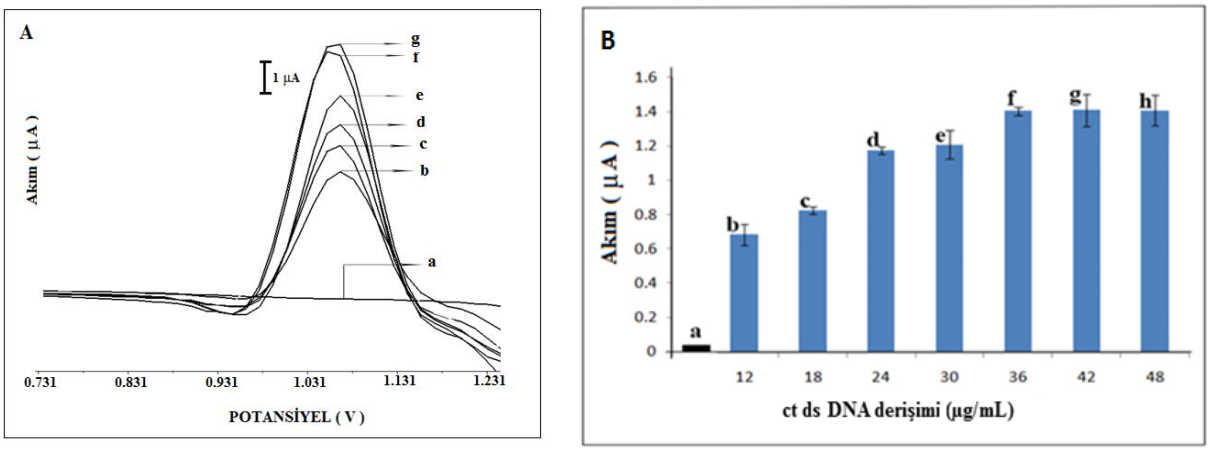
3. BULGULAR

3.1 Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon tekniği olarak PGE için pasif adsorbsiyon seçildi. Aktive edilen kalem uçlarıyla ct ds-DNA ve ct ss-DNA için ayrı deneyler yapıldı. Öncelikle immobilize edilecek DNA'ların derişimleri sabit tutularak immobilizasyonun gerçekleştiği en uygun süre (Şekil 2) ve daha sonra bu süre için en uygun DNA derişimi optimize edildi (Şekil 3). Gerek süre gerekse DNA derişiminin optimize edilmesinde DPV ölçümlerinden elde edilen guanin pik akım değerlerinden yararlanıldı. Bunun için üçlü elektrot sistemi elektrokimyasal hücre içine daldırıldı ve daha sonra voltametrik ölçüm gerçekleştirildi. Guaninin yükseltgenme sinyalleri, DPV (Differansiyel Pulse Voltametri) tekniği ile 0,2 V ile 1,4 V arasında, 50 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, ABS (pH 4,8) içersinde ölçüldü.



Şekil 2. PGE yüzeyine immobilize edilen ct ds-DNA'ların (a) ct ds-DNA yokken (b) 5, (c) 10, (d) 15, (e) 20, (f) 25, (g) 30, (h) 35, (ı) 40 dakika gibi farklı sürelerde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)

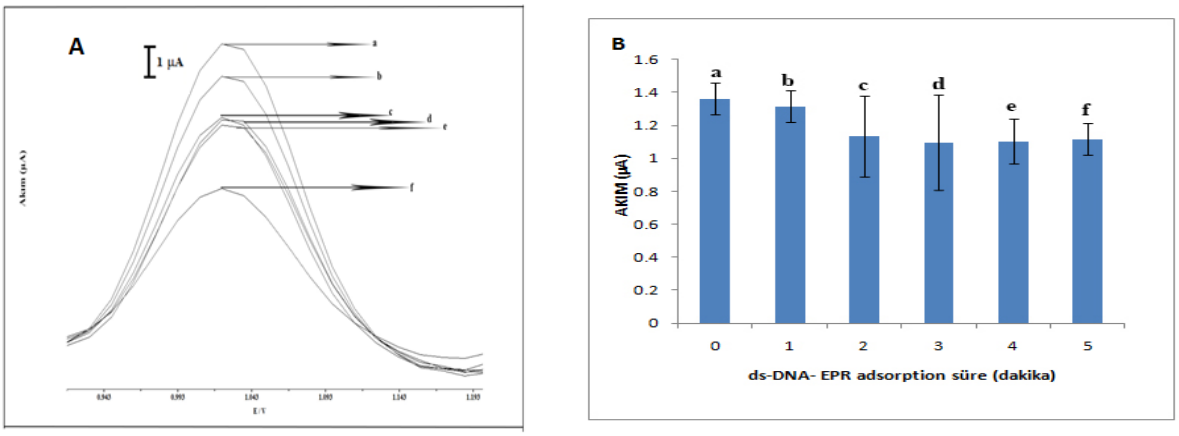


Şekil 3. PGE yüzeyine immobilize edilen (a) ct ds-DNA yokken, (b) 12, (c) 18, (d) 24, (e) 30, (f) 36, (g) 42, (h) 48 µg/mL gibi farklı derişimlerdeki ct ds-DNA'lara ait DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B).

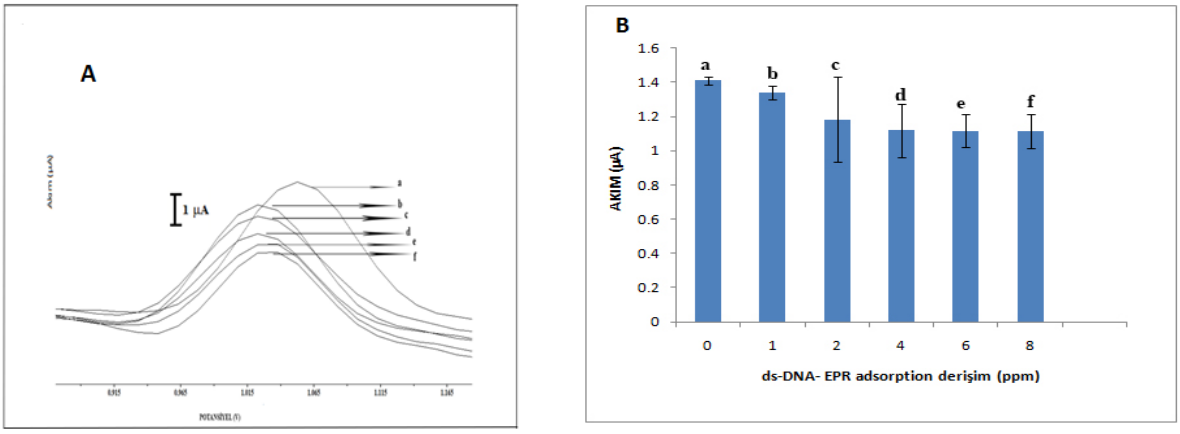
DNA immobilizasyonunda süre ve derişim optimizasyonu hem ct ds-DNA hem de ct ss-DNA için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Şekil 2 ve Şekil 3'de görüldüğü gibi ct ds-DNA için optimum etkileşme süresi tekrarlanabilirlik açısından en uygun 35 dakika ve ct ds-DNA derişimi olarak 36 µg/mL olarak bulunurken bu süre ct ss-DNA için 20 dakika ve ct ss-DNA derişimi 54 µg/mL olarak tayin edildi.

3.2 DNA İmmobilize Edilmiş PGE İle EPR(Epirubicin) –DNA (ctds-DNA ve ctssDNA) Etkileşiminin İncelenmesi

Ct ds-DNA ve ct ss-DNA immobilize edilmiş PGE'ler, belirli derişimde Epirubicin içeren 110 µL'lik çözeltilerde muhtelif sürelerde bekletilerek DNA-ilaç etkileşimindeki en uygun süre (Şekil 4) ve daha sonra bu süre için en uygun ilaç derişimi (Şekil 5) tayin edildi. Optimizasyon işlemlerinde DNA-ilaç etkileşiminden sonra guanin pik akımlarında meydana gelen azalmalardan yararlanıldı. Guaninin yükseltgenme sinyalleri, DPV tekniği ile 0,2 V ile 1,4 V arasında, 50 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, ABS (pH 4,8) içersinde ölçüldü



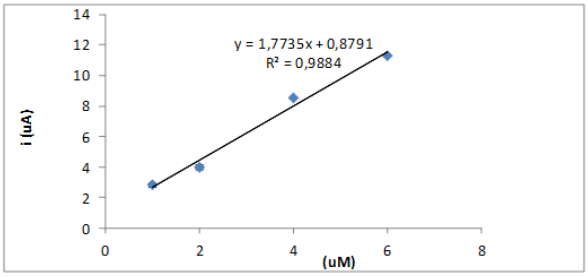
Şekil 4. EPR immobilizasyon süresinin yanıta olan etkisi: ct ds-DNA immobilize edilen PGE'lerEPR çözeltisinde (a) EPRile etkileştirilmede (yani sadece ct ds-DNA varken) (b) 1, (c) 2,(d) 3, (e) 4, (f) 5 dakika gibi farklı sürelerde bekletilerek DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram(B)



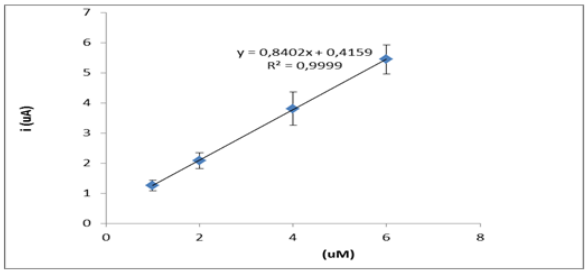
Şekil 5. EPR derişiminin yanıta olan etkisi: ct ds-DNA immobilize edilen PGE'ler ct ds-DNA yokken (a) EPR yok, ct ds-DNA varken (b) 1, (c) 2, (d) 4, (e) 6, (f) 8 µg/mL gibi değişik derişimlerdeki EPR çözeltileri içinde bekletilerek DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

DNA-EPR etkileşiminde süre ve derişim optimizasyonu hem ct ds-DNA hem de ct ss-DNA için ayrı ayrı gerçekleştirildi. Şekil 4 ve Şekil 5'te görüldüğü gibi ct ds-DNA için EPR ile optimum etkileşme süresi tekrarlanabilirlik açısından en uygun 4 dakika ve EPR derişimi 4 µg/mL olarak bulunurken bu süre ct ss-DNA-EPR etkileşimi için 4 dakika ve EPR derişimi 6 µg/mL olarak tayin edildi (gösterilmedi).

Elde edilen veriler kullanılarak hem ct ds-DNA-EPR hem de ct ssDNA-EPR etkileşimleri için kalibrasyon eğrileri Şekil 6 ve Şekil 7'da gösterilmiştir.



Şekil 6. PGE yüzeyine immobilize edilmiş ct ds-DNA ile EPR etkileşiminde EPR derişim değişiminin kalibrasyon eğrisi.



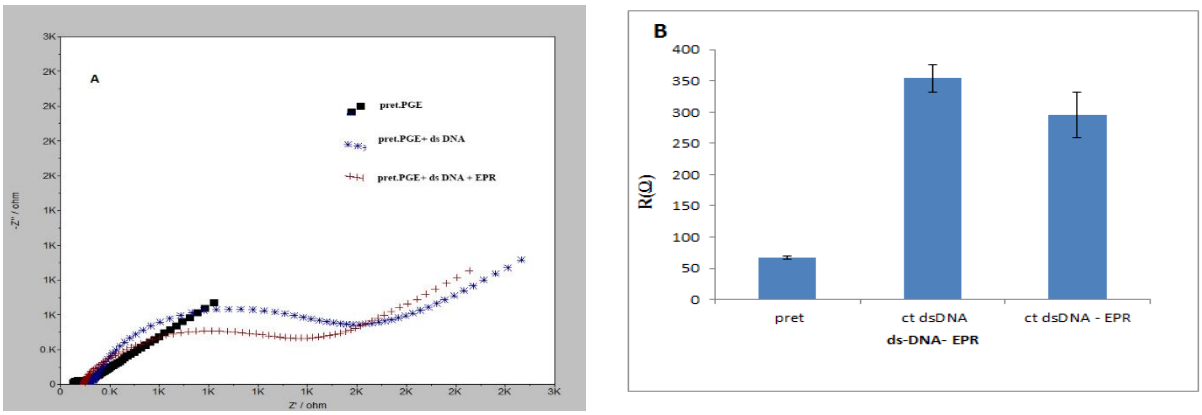
Şekil 7. PGE yüzeyine immobilize edilmiş ct ss-DNA ile EPR etkileşiminde EPR derişim değişiminin kalibrasyon eğrisi.

Tayin sınırları $DL = y_B + 3\ s_B$ bağıntısı (y_B: kör sinyal; s_B: kör standart sapma; n = 4) ile ct ds-DNA-EPR etkileşimi için çizilen kalibrasyon grafiğine ait regresyon denklemine (y=1.773x + 0.879) ve ct ss-DNA-EPR etkileşimi için çizilen kalibrasyon grafiğine ait regresyon denklemine (y=0.84x + 0.416) göre hesaplandı. ct ds-DNA-EPR etkileşimi için en düşük tayin sınırı 0,556 µg/mL, ct ss-DNA-EPR etkileşimi için en düşük tayin sınırı 0,059 µg/mL olarak hesaplandı.

3.2 Elektrokimyasal Empedans (EIS) Deneylerine İlişkin Bulgular

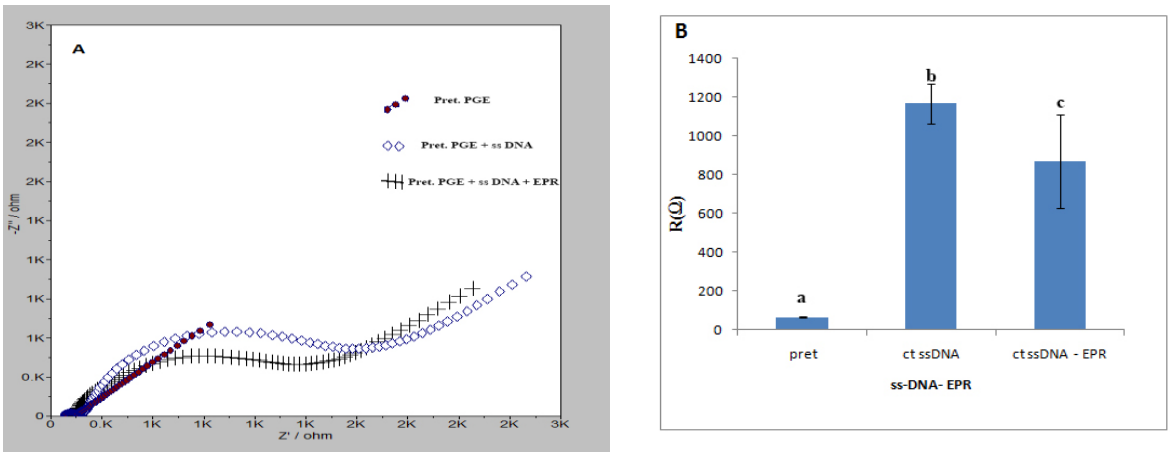
Bu yöntemde diğer çalışmalarda da uygulanan 1,4 V 60 saniye aktivasyon işlemi ile PGE 'ler aktive edilmiştir. Tek farklı basamak diferansiyel puls voltametrisi yerine Frekans Analyzer (FRA) yazılımı kullanılarak EIS deneyleri için ölçümlerin alındığı basamaktır. PGE yüzeyine optimum koşullarda (36 µg/mL, 35 dakika) ct ds-DNA

immobilizasyon edildikten sonra ferro ferri siyanür çözeltisi içinde EIS deneyleri yapıldı. Yüzeyine ct ds-DNA immobilize edilmiş PGE 'lerin EPRçözeltisine daldırılması sonrası PGE yüzeyinde gerçekleşen ct ds-DNA- EPR etkileşimi de yine ferro ferri siyanür çözeltisi içinde transfer edilen akıma karşı gösterdiği direnci ölçüldü ve ortalama değerlere yakın değerlerden oluşturulan Nyquist eğrisi ile birlikte Şekil 8'de gösterildi.



Şekil 8. (A) Nyquist eğrisi (B) PGE yüzeyinde gerçekleşen ct ds-DNA-EPR etkileşiminin transfer edilen akımyüküne karşı gösterdiği direnç; (a) aktivasyonu gerçekleştirilen PGE 'lerin direnci, (b) ct ds-DNA immobilize edilen PGE 'lerin direnci, (c) PGE yüzeyine immobilize edilen ct ds-DNA-EPR etkileşiminin direnci.

PGE yüzeyine optimum koşullarda (54 µg/mL, 20 dakika) ct ss-DNA immobilizasyon edildikten sonra ct ds-DNA'da yapılan tüm deneyeler ct ss-DNA için tekrarlandı. Ct ss-DNA-EPR etkileşiminin transfer edilen akıma karşı gösterdiği direnci ölçüldü ve ortalama değerlere yakın değerlerden oluşturulan Nyquist eğrisi ile birlikte Şekil 9'da gösterildi.



Şekil 9. (A) Nyquist eğrisi (B) PGE yüzeyinde gerçekleşen ct ssDNA-EPR etkileşiminin transfer edilen akım yüküne karşı gösterdiği direnç; (a) aktivasyonu gerçekleştirilen PGE 'lerin direnci, (b) ct ss-DNA immobilize edilen PGE 'lerin direnci, (c) PGE yüzeyine immobilize edilen ct ss-DNA-EPR etkileşiminin direnci

Elektrokimyasal empedans ölçümlerine göre en düşük yük aktarım direncine sahip olan aktive edilmiş PGE yüzeyidir. DNA immobilizasyonlarında veya DNA-EPR etkileşimlerinden sonra elektrot yüzeyi farklılaşmış ve yük aktarım dirençleri artmıştır.

3. SONUÇLAR

Sensör teknolojisine dayalı DNA analizlerine yönelik çalışmamızda, kalem grafit elektrotların (PGE) aktivasyonu, çift sarmal DNA (ct ds-DNA) ve tek sarmal DNA (ct ssDNA) analizlerine yönelik optimizasyonu ve elektrot yüzeyinde anti kanser ilaç olan epirubicin (EPR) ile etkileşiminin elektrokimyasal yöntemlerle incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Tek kullanımlık kalem grafit elektrotların çalışma elektrodu olarak kullanıldığı çalışmada elektrokimyasal davranışlar, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile araştırılmıştır. PGE yüzeyine immobilize edilmiş DNA'nın elektrokimyasal tayini, DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyalinin DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, EPR derişimi, DNA derişimindeki değişimin ve yüzey aktivasyon işleminin yanıta olan etkisi araştırılmış ve tekrarlanabilirlik ve duyarlık açısından çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Anti kanser ilaç olan EPR'nin DNA ile etkileşimi incelenmeden önce, ilacın çalışılan potansiyel aralığında elektrokimyasal davranışı incelenmiş ve bu aralıkta elektroaktif bir tür olmadığı gözlenmiştir. EPR'nin DNA ile etkileşmesinden sonra, DNA'nın elektroaktif bir grubu olan guanin bazının yükseltgenme sinyalinin, DNA-ilaç etkileşiminde artan ilaç derişimine bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Guanin sinyallerindeki bu azalma, literatür deki benzer çalışmaların sonuçlarına yakın olarak [5], EPR' nin çift sarmal DNA ile etkileşiminin bir sonucu olup, bu molekülün yapısındaki yükseltgenmeye uygun grupların etkileşim sonrasında, redoks reaksiyonu için kısmen mevcut olması şeklinde açıklanabilir.

Optimize deney sonuçları: PGE yüzeyine ct-dsDNA ve ct-ssDNA immobilizasyonu için, optimize etkileşim süresi ct-dsDNA için 35 dakika ve ct-ssDNA için 20 dakika, optimize etkileşim miktarı ct-dsDNA için 36 µg/mL ve ct-ssDNA için 54 µg/mL bulunmuştur. DNA immobilize edilmiş PGE'lerle EPR-DNA etkileşimi incelenmesinde, optimize etkileşim süresi ct-dsDNA ve ct-ssDNA için 4 dakika, optimize etkileşim miktarı ct-dsDNA için 4 µg/mL ve ct-ssDNA için 6 µg/mL bulunmuştur. PGE yüzeyinde gerçekleşen etkileşimlere pH etkisinin incelenmesinde ct-dsDNA ve ct-ssDNA için pH 4.8 ve ABS tamponun da guanin sinyali en yüksek bulunmuştur.

Aktive edilmiş PGE yüzeyine ct ds-DNA'nın immobilizasyonunda, optimum ct ds-DNA derişiminin 36 µg/mL ve optimum etkileşim süresinin 35 dakika olarak belirlenip, aktive edilen PGE yüzeyinde ct ds-DNA – EPR etkileşiminde de optimum EPR derişiminin 4 µg/mLve optimum etkileşim süresinin 4 dakika olarak belirlenmesinden sonra, aktive edilmiş PGE, ct ds-DNA immobilize edilmiş PGE ve ct ds-DNA–EPR etkileşiminden sonraki PGE için EIS ölçümleri alındı. ct ds-DNA immobilize edildikten sonraki PGE yüzeyinin bir önceki haline göre direncinde bir artma ve ct ds-DNA-EPR etkileşiminden sonra ise dirençte bir azalma olduğu gözlendi. Bilindiği gibi direnç ile iletkenlik ters orantılıdır yani, direnç artıkça iletkenlik azalır bu göz önünde bulundurularak histogram incelendiğinde; aktive edilmiş PGE iletkenliğinin, ct ds-DNA immobilize edilmiş PGE ve ct ds-DNA-EPR etkileşimi sonrasındaki PGE' ye göre daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Aktive edilmiş PGE yüzeyine ct ss-DNA'nın immobilizasyonunda, optimum ct-ssDNA derişiminin 54 µg/mL ve optimum etkileşim süresinin 20 dakika olarak belirlenip, aktive edilen PGE yüzeyinde ct ss-DNA-EPR etkileşiminde de optimum EPR derişiminin 4 µg/mL ve optimum etkileşim süresinin 4 dakika olarak belirlenmesinden sonra, aktive edilmiş PGE, ct ss-DNA immobilize edilmiş PGE ve ct ss-DNA-EPR etkileşiminden sonraki PGE için EIS ile ölçümler alındı. ct ss-DNA immobilize edildikten sonraki PGE yüzeyinin bir önceki haline göre direncinde bir artma ve ct ss-DNA-EPR etkileşiminden sonra ise dirençte bir azalma olduğu gözlendi. Aktive edilmiş PGE iletkenliğinin, ct ss-DNA immobilize edilmiş PGE ve ct ss-DNA-EPR etkileşimi sonrasındaki PGE'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Literatürde, antikanser ilaçları ile ilgili yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen, DNA biyosensörleri ve PGE kullanılarak yapılan

elektrokimyasal çalışma sayısı çok azdır. Çalışmamız bu açıdan bakıldığında, literatürdeki önemli bir eksikliği giderebilecektir. Sonuç olarak, tasarlanan DNA biyosensörleri kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal sensörlerin ilaç-DNA etkileşimlerinin tayininde daha duyarlı, güvenilir ve seçimli sonuçlar verebildiği görülmektedir. Yaygın olarak kullanılan antikanser Epirubicinin DNA ile bir etkileşiminin olup olmadığının incelenmesi ve bu tip ilaçların biyolojik numulerde tayinine yönelik ucuz ve kısa sürede sonuç alınabilen bir elektrokimyasal yöntemin geliştirilmesi bu bakımdan önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Kurulu (CÜBAP) tarafından, Proje No: F-392, desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

[1]. Erdem, A., in Comprehensive Analytical Chemistry (Ed: D.Barcelo), Electrochemical Sensor Analysis (Eds: S. Alegret, A. Merkoci) Elsevier, Amsterdam, 2007, 19, 403-411.
[2]. Wang J.,Anal. Chim.Acta.,2002, 469, 63.
[3]. Wang, J.,Anal. Chim.Acta,, 1997, 347, 1.
[4]. Erdem, A., Talanta,,2007,74, 318.
[5]. Wang, J.,Biosensors & Bioelectronics, 1998, 13, 757.
[6]. Erdem A., Ozsoz M.,Electroanalysis, 2002, 14, 965.
[7]. S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar, A.M. Khalid, J. Pharm. Biomed.Anal.,2005, 37, 205.
[8]. Erdem, A., Özsöz, M., Anal. Chim.Acta,, 2001, 437, 107.
[9]. Wang, J.; Rivas, G.; Fernandes, J. R.; Paz, J. L. L.; Jiang, M.; Waymire, R.,Anal. Chim.Acta, 1998, 375, 197.
[10].Mikkelsen, S. R. Electroanalysis, 1996, 1, 8.
[11].Wang, L., Lin, L., Ye, B., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 42, 625.
[12].Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K., Khalid, A. M., Analytical Biochemistry, 2006, 354, 28.
[13].Richardson, C. L., Springfield, G.E.S. et al., "Intercalation inhibition assay compounds that interact with DNA or RNA", Amerikan patent no; 4,257,774 / 24 March, 1981.
[14].Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E., Biophysical Chemistry,1998, 75, 87.
[15].0liveira Brett, A.M., Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P.,Biosensors and Bioelectronics, , 1998, 13, 861.
[16].Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D., Chemico-Biological Interactions, 1999, 117, 65.
[17].Wang, J., Rivas, G., Cai, X., , Shiraishi, H., Farias, A.M.P., Dontha, N., Luo, D., Anal. Chim. Acta,, 1996, 332, 139.
[18].Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., Anal. Chem., (1996), 68, 4365.
[19].Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M.,Ribiero, J.A., Electrochem.Commun., 2007, 9, 2167.
[20].Erdem, A., 2007, 74, 318.
[21].Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M., 2001, Analyst, 126, 2020.
[22].Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S. Ozyoruk, H. Yıldız, A., Electrochem. Commun., 2009, 11(6) 1242.