

Nano-elektrokimyasal Biyosensörler Kullanılarak DNA ile Doksorubisin Etkileşiminin Araştırılması

Yeşim Tuğçe YAMAN*1, 2 

¹Hacettepe Üniversitesi, İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06800, Ankara, Türkiye

²Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 06800, Ankara, Türkiye

(Alınış / Received: 20.12.2021, Kabul / Accepted: 16.03.2022, Online Yayınlanma / Published Online: 20.08.2022)

Anahtar Kelimeler

Biyosensör,
Voltametri,
Elektrokimya,
DNA-ilaç etkileşimi

Öz: Bu çalışmada, tek kullanımlık nano-elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak çift sarmallı deoksiribonükleik asit (dsDNA) ve doksorubisin (DOX) arasındaki etkileşim diferansiyel puls voltametri yöntemiyle araştırılmıştır. Biyosensör yüzeyi setil trimetilamonyum (sab) ve karbon nanotüp (knt) içeren çözeltiden elektrodepozisyon yöntemiyle poli(sab)-knt sentezi ile hazırlanmıştır. DNA-ilaç etkileşimi araştırmak için indikatör olarak dsDNA elektroaktif bazların voltametrik sinyalleri kullanılmıştır. İlaç-DNA etkileşimi sonrası hem guanin hem de adenin bazlarının oksidasyon pik akımlarının azaldığı gözlenmiştir. DOX için doğrusal çalışma aralığı $0,39-25 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında ve gözlenebilir sınıırı $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Ayrıca UV-vis spektroskopisi kullanılarak spektrokimyasal olarak ta ilaç-DNA etkileşimi ortaya konmuştur. Elektrokimyasal ve spektrokimyasal çalışmalar, DOX ve dsDNA arasındaki etkileşim mekanizmasının interkalasyon modu ile gerçekleştiğini göstermiştir.

Investigation of Doxorubisin Interactions with DNA by Using Nano-electrochemical Biosensors

Keywords

Biosensor,
Voltammetry,
Electrochemistry,
DNA-drug interaction

Abstract: In this study, the interaction between double-stranded deoxyribonucleic acid (dsDNA) and doxorubicin (DOX) was investigated using nano-electrochemical biosensors by differential pulse voltammetry. The biosensor surface was prepared from a solution containing cetyl trimethylammonium (cab) and carbon nanotubes (cnt) with the synthesis of poly(sab)-knt by electrodeposition method. Voltammetric signals of dsDNA electroactive bases were used as indicators to investigate DNA-drug interactions. It was observed that the oxidation peak currents of both guanine and adenine bases decreased after drug-DNA interaction. The linear range for DOX was found to be between $0.39-25 \mu\text{g mL}^{-1}$ and limit of detection was found as $0.26 \mu\text{g mL}^{-1}$. Besides, the drug-DNA interaction was demonstrated spectrochemically by UV-vis spectroscopy. Electrochemical and spectrochemical studies have shown that the interaction mechanism between DOX and dsDNA occurs with the intercalation mode.

1. Giriş

Nanoteknoloji ve biyosensör teknolojisinde DNA, kararlı, düşük maliyetli ve kolayca uyarlanabilir olduğundan yeni cihazların yapımı için mükemmel bir yapı taşı görevi görmektedir. DNA'nın elektroaktif bileşiklerle etkileşimi, farmasötik, çevresel izleme ve ilaç tespiti açısından önemlidir. Farmasötik ajanların etki tarzlarını ve bağlanmadaki reaksiyonların yapısal özgünlüğünü anlamak için DNA ile etkileşimlerine dayalı olarak incelenmelidir [1, 2]. İlaçların rasyonel tasarımında, DNA ve küçük moleküller arasındaki

etkileşim yoluyla yapısal bir kılavuz elde edilebilir. Bu da daha yüksek seçici aktiviteye, klinik etkinliğe ve daha düşük toksisiteye sahip yeni ilaçların gelişmiş sentezine katkıda bulunur. İlaçların DNA ile bağlanma etkileşimlerini araştırmak için UV-spektrofotometre [3], floresans spektroskopisi [4], dairesel dikroizm [5], rezonans raman spektroskopisi [6], Fourier dönüşümü kızılötesi infrared spektroskopisi [7] ve tek moleküllü kuvvet spektroskopisi [8] gibi farklı teknikler literatürde yerini almıştır. Elektrokimyasal teknikler ise, bu ölçümlere yönelik yüksek hassasiyet, düşük maliyet, basitlik, kolay kullanım, hızlilik,

mikrofabrikasyon teknolojisine uyumluluk ve hasta başı tespiti gibi önemli avantajlar sunar [9]. Burada, en çok uygulanan yaklaşım, tanıma için bir elektrokimyasal dönüştürücü üzerinde immobilize hale getirilecek bir nükleik asit elemanından oluşan elektrokimyasal DNA biyosensörlerini kullanmaktır. Bu element, spesifik bir DNA dizisini seçici olarak tespit etmeye veya ilaç molekülleriyle etkileşimi sırasında DNA yapısındaki değişiklikleri izlemeye yardımcı olur. DNA biyosensörleri duyarlılık, seçicilik, basitlik, hızlılık ve düşük maliyet gibi önemli özellikleri nedeniyle yoğun bir biçimde çalışılmaktadır [10].

Tek kullanımlık grafit elektrotlar diğer karbon temelli elektrotlara göre düşük maliyeti, yüzey parlatma gibi zaman alıcı işlemlere gerek duymayan, kullanım kolaylığı ve yüksek algılama hassasiyeti gibi avantajlara sahip olan bir elektrokimyasal elektrottur. Grafit elektrotlar çeşitli voltametrik tekniklerle çok çeşitli analitlerin belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [11]. Çünkü tek kullanımlık şekilde geliştirilen bu elektrotların elektrokimyasal modifikasyonu diğer modifikasyon işlemlerine göre daha basit ve az zaman alan strateji olarak görünmektedir. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde sinyal güçlendirilmesi için nanomalzemelerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Çalışma elektrotlarının nanomalzemelerle modifiye edilmesi elektroaktif yüzey alanını artırır ve bunun sonucunda kimyasal analiti karakterize etmek için artan bağlanma bölgesi sayısına bağlı olarak analitin tutunması (birikim) ve hassasiyet artırılabilir. Nano-karbon malzemeler, yüksek hassasiyette ve seçici DNA biyosensörlerinin geliştirilmesi için sıklıkla kullanılmıştır. Bu bağlamda, elektrokimyasal tespit için mükemmel kimyasal, mekanik, iletkenlik, geometrik ve yüzey özelliklerine sahip nanomalzemeler olarak karbon nanotüplerin (knt'ler) kullanılmasına önem verilmiştir [12, 13]. Ayrıca, yüzey aktif maddelerin kullanımı elektrokimyasal süreci olumlu yönde etkileyip elektrokimyasal cevabın artmasına neden olur. Katyonik yüzey aktif madde olan setil trimetilamonyum bromür (sab), bazı biyomoleküllerin elektroanalizi için uygulanmıştır [14, 15]. Elektrolit çözeltisindeki sab'ın varlığı, analitlerin elektrokimyasal cevabını büyük ölçüde artırır ve asidik ortamda elektrodepozit edilmiş sab iletken matris olarak görev yapabilir.

Doksorubisin (DOX); meme ve mesane kanseri, kaposi sarkoması, lenfoma ve akut lenfositik lösemi kemoterapisinde uygulanan sitostatik ilaçlar ailesine aittir [16, 17]. DOX, makromoleküler biosentezin birleştirilmesi ve inhibisyonu yoluyla DNA ile etkileşime girebilir. Sonuç olarak, DOX kullanıldıktan sonra, topoizomeras II enziminin fonksiyonu inhibe edilir, DNA çözülür ve kopyalanır [18]. Ayrıca, molekülün düzlemsel aromatik kromofor kısmı iki baz DNA çifti arasında birleşir. 1974 yılında tıbbi başvuru için onaylanmış olması nedeniyle DOX tek başına ve

çeşitli karışımlarda uygulanan en sık kullanılan preparatlardan biri olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, klinik aktivitesi akut kardiyotoksikite ile sınırlıdır. DOX'un neoplastik hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri nedeniyle vücutta uzun süreli gastrointestinal yaralar, karaciğer yetmezliği, böbrek yetmezliği, hipoalbuminemi ve pansitopeni nedeniyle kullanımı sınırlıdır [19]. Diğer ciddi yan etkiler anafilaksi, kalp hasarı, doku hasarı gibi alerjik reaksiyonlardır. Bu ilacın farmakolojik etkisi DNA'nın çift sarmalı ile etkileşime atfedilmiştir ve kanser hücrelerindeki antrasiklin kısmı DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu inhibe eder [18]. Bu nedenle, hastaların biyolojik sıvılarında analiz için hassas bir tekniğin geliştirilmesiyle DOX dozajının kontrol edilmesi klinik ve farmasötik uygulamalarda terapötik etkinliğin ve yan etkilerin değerlendirilmesi açısından oldukça önemli bir konudur. Son zamanlarda DNA'nın bir biyosensör yüzeyine immobilize edilmesi ile DOX tutuklayıcı olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir [12, 13, 20]. Ancak yapılan literatür taraması sonucunda poli(sab)-knt modifiye grafit elektrotlar ile elektrokimyasal DNA-DOX etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Önerilen çalışma kapsamında poli(sab)-knt modifiye tek kullanımlık grafit temelli DNA-nanobiyosensörü ile DOX arasındaki etkileşim ilk kez araştırılmıştır. Böylece bu çalışma ileride yeni antikanser ilaçların tasarımı, hastalık teşhisi, bakım-noktası-uygulamaları ve rutin klinik uygulamalar için sekans seçici DNA hibridizasyonu gibi genosensörler gibi ileri çalışmalar için temel oluşturmuştur.

2. Materyal ve Metot

2.1. Reaktifler ve cihazlar

Çift sarmal Deoksiribo nükleik asit (dsDNA) ve sülfürik asit (H₂SO₄) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. dsDNA stok çözeltisi ultra saf su içinde hazırlanmıştır. Destek elektrolit olarak 50 mM asetat tamponu (ABS), pH 4,8 çözeltisi 20 mM sodyum klorür (NaCl) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çözelti homojen hale gelinceye kadar 4 °C'de 12 sa bekletilmiştir. 0,1 M H₂SO₄ içinde 0,045 M olacak şekilde sab çözeltisi hazırlanmıştır. Knt'ler ise, 0,5 mg mL⁻¹ derişiminde sab çözeltisi içinde dağıtılmış ve 30 dk boyunca ultrasonik olarak karıştırılmıştır.

Elektrokimyasal ölçümlerin tümü Autolab PGSTAT302N model potansiyostat/galvanostat cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kalem grafit (PGE), referans elektrot olarak doymuş kalomel (SCE) ve karşıt elektrot olarak ise platin tel kullanılmıştır. Geliştirilen sensör yüzeyinin morfolojik olarak araştırılmasında taramalı elektron mikroskobu (SEM, Tescan-Czech Republic) kullanılmıştır. Modifiye elektrot yüzeylerinin kimyasal karakterizasyonu için

Azaltılmış toplam yansıma Fourier dönüşümlü kızılötesi Spektrometresi (FTIR-ATR, Thermo Fisher Scientific-USA) kullanılmıştır. Ayrıca ilaç-DNA etkileşimlerinin spektrofotometrik incelemesinde ise, Shimadzu 2600 model UV-vis absorpsiyon spektrofotometresinden faydalanılmıştır.

2.2. Nanobiyosensörlerin hazırlanması

Öncelikle elektrot yüzeyi elektrodepozisyon yöntemiyle poli(sab)-knt kullanılarak modifiye edilmiştir. Bu amaçla dönüşümlü voltametri yöntemiyle 10 döngü olacak şekilde 100 mVs^{-1} tarama hızında ve $-0,8 \text{ V}$ ile $+1,2 \text{ V}$ (SCE'ye karşı) potansiyel aralığında taramalar gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan elektrotlar poli(sab)-knt olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu elektrotlar $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde ve pH 4,8 AB çözelti ortamında hazırlanan dsDNA çözeltilerine 30 dk daldırılmıştır. Pasif adsorpsiyon yöntemi ile dsDNA molekülleri elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Elektrot yüzeyinden gevşek şekilde bağlanmış dsDNA'yı uzaklaştırmak için 5 sn boyunca pH 4,8 AB çözeltisi ile yıkanmıştır. Her deneysel ölçüm için yeni bir nanobiyosensör hazırlanmıştır.

2.3. DNA-DOX etkileşiminin araştırılması ve DOX tayini

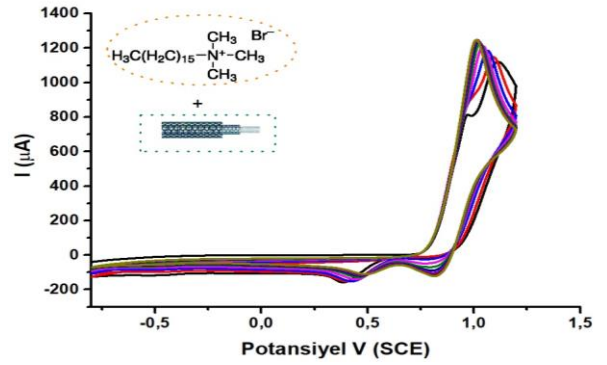
DOX'un dsDNA/poli(sab)-knt grafit ile biyo-etkileşiminde elektrotlar 30 dk süreyle 10 mM Tris-EDTA tampon çözeltisi (TBS), pH 8,0 içinde farklı derişimlerde hazırlanan DOX çözeltilerine daldırılmıştır. Daha sonra tampon ile yıkarak kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra elektrotlar pH 4,8'de yeni bir AB çözeltisine aktarılmış, ardından aşağıdaki koşullar altında DPV kaydedilmiştir: 50 mV darbe genliği, 2 mV adım potansiyeli, $0,07 \text{ s}$ modülasyon süresi, $0,4 \text{ s}$ aralık süresi.

3. Bulgular

3.1. Elektrokimyasal DNA-nanobiyosensörlerin hazırlanması ve karakterizasyonu

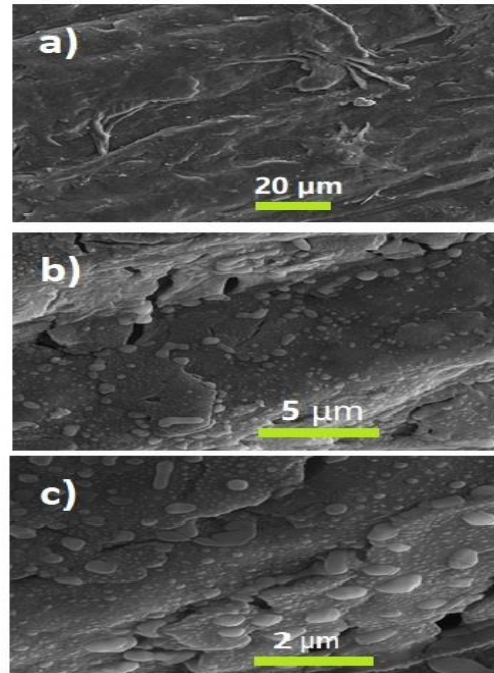
Etkileşim mekanizması, hedeflenen ilaçla etkileşimden önce ve sonra DNA elektrokimyasal sinyallerini gözlemleyerek kanıtlanabilir. En çok uygulanan yaklaşım, tanıma için bir elektrokimyasal dönüştürücü üzerinde immobilize edilecek bir nükleik asit elementinden oluşan elektrokimyasal DNA biyosensörlerini kullanmaktır [21]. Bu amaçla nanokompozit modifiye grafit yüzeyler dsDNA çözeltisine daldırılarak pasif adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edildi. DOX ile etkileşimi sırasında DNA yapısındaki değişiklikleri izlemek amacıyla dsDNA immobilize yüzeyler hazırlandı. Öncelikle daha hassas ve seçici DNA biyosensörlerinin geliştirilmesi amacıyla grafit yüzeyi nanotüp (knt) içeren polimerik yapıyla (poli(sab)) modifiye edildi. Tek aşamalı elektrodepozisyon işlemi, potansiyel $-0,8 \text{ V}$ ile $+1,2 \text{ V}$

(SCE'ye karşı) arasında taranarak 10 döngü sonunda elde edildi (Şekil 1). Şekil 1'de gösterilen voltamogramlardan ilk döngüde sab'a ait yaklaşık $+0,9 \text{ V}$ 'de (SCE'ye karşı) iyi tanımlanmış bir yükseltgenme piki ve ters yöndeki döngüde ise yaklaşık $+0,5 \text{ V}$ 'de (SCE'ye karşı) bir indirgeme piki gözlemlendi. Önceki çalışmalara göre elektrodepozisyon sırasında ortaya çıkan bu pikler poli(sab) oluşumunun bir göstergesi oldu [22-25]. Böylece polimerik kompozit yapı elektrot yüzeyinde başarıyla sentezlendi.



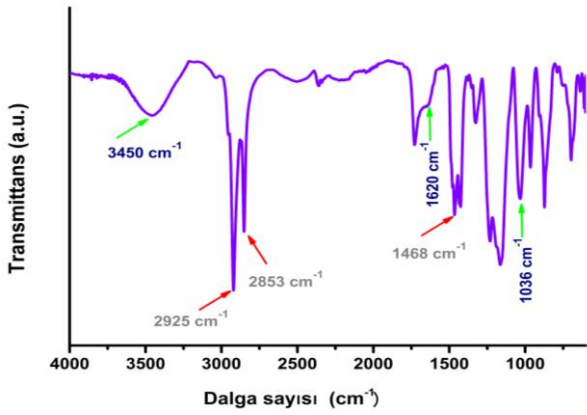
Şekil 1. Poli(sab)-knt'nin eş zamanlı elektrodepozisyonuna ait 10 döngü dönüşümlü voltamogramları. (E_i): $-0,8 \text{ V}$, (E_f): $1,2 \text{ V}$ (vs. SCE). Tarama hızı (SR): 100 mV s^{-1} .

Elde edilen yüzeyin özellikleri farklı karakterizasyon çalışmaları ile ortaya çıkarıldı. Grafit yüzeyler üzerine poli(sab-knt) birikimi sonucu elektrot yüzeyindeki değişimin mikroskopik olarak incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu kullanıldı ve ilgili sonuçlar Şekil 2'de verildi. Elektrodepozisyon sonrasında grafit tabakaların üstünü örtecek şekilde poroz bir yapıda film oluşumu gözlemlendi ve yüzey alanının arttığı da anlaşıldı.



Şekil 2. Farklı büyütme ölçeklerinde kaydedilen poli(sab)-knt modifiye grafit yüzeylere ait elektron mikroskobu görüntüleri a) $20 \mu\text{m}$, b) $5 \mu\text{m}$ ve c) $2 \mu\text{m}$.

Nanokompozit yapının Şekil 3'te verilen IR spektrumu incelendiğinde, sab'tan poli(sab) elde edilebildiğinin göstergesi olarak 2925 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1} 'de sab zincirindeki karakteristik pikler gözlemlendi. Bu iki bant, sırasıyla $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ asimetrik ve simetrik gerilmeden kaynaklanmaktadır. 1468 cm^{-1} 'deki keskin bant ise $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ bükülmesini gösterdi. Benzer spektrum elektrokimyasal olarak depozit edilmiş poli(sab)/grafen oksit kompozit film için de bildirilmiştir [25]. Ayrıca FTIR spektrumunda yer alan 3450 ve 1620 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla knt-COOH'nin yapısındaki karboksil gruplarındaki O-H gerilmesini ve C=O titreşimindeki gerilmeyi gösterdi. Ek olarak, 1036 cm^{-1} 'deki tepe noktası, C-O germe titreşimine atfedildi. Bu piklerin varlığı, knt'lerin yüzeyinde COOH gruplarının yer aldığını gösterdi ve G.D. Vukovic ve grubu tarafından da yayınlanan sonuçlarla uyumludur [26].



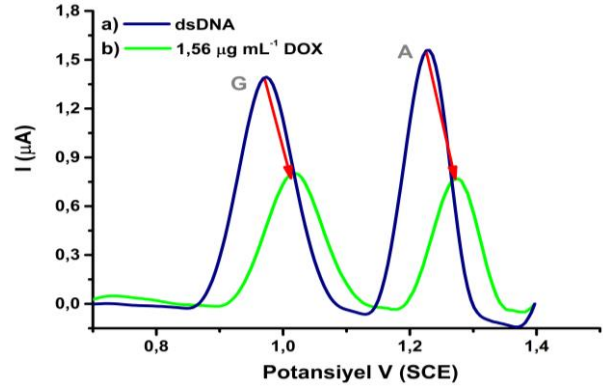
Şekil 3. poli(sab-knt) modifiye grafit yüzeye ait ATR-FTIR spektrumu.

Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda grafit yüzeylerin nanokompozit yapıyla modifikasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği belirlendi. Daha sonra, bu yüzeye dsDNA immobilizasyonu pasif adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Böylece dsDNA temelli nanobiyosensörler hazırlandı.

3.2. DNA-nanobiyosensörlerle DOX etkileşiminin araştırılması

Grafit yüzeye dsDNA immobilizasyonunun kanıtı için geliştirilen sensör yüzeylerin voltametrik davranışı incelendi. Şekil 4.a'da gösterildiği gibi öncelikle, AB pH 4,8 destek elektrolit içerisinde ds-DNA immobilize edilmiş grafit elektrodun diferansiyel puls voltametri (DPV) ile elektrokimyasal davranışı incelendi. Şekil 4.a'da dsDNA immobilizasyonundan sonra DNA yapısında bulunan guanin (G) ve adenin (A) nükleobazlarına ait sırasıyla yaklaşık $+0,95\text{ V}$ ve $+1,20\text{ V}$ (SCE'ye karşı) potansiyellerinde iki adet yükseltgenme sinyali elde edildi ve bu sonuç literatürde yayınlanan çalışmalarla uyum içerisinde [27-28]. DNA bazlarına ait gözlenen iki yükseltgenme pikinin varlığı grafit yüzeyine DNA'nın başarılı bir şekilde immobilize edilebildiğini kanıtladı. Şekil 4.b'de, 30 dk DOX etkileşiminden sonra ise G ve

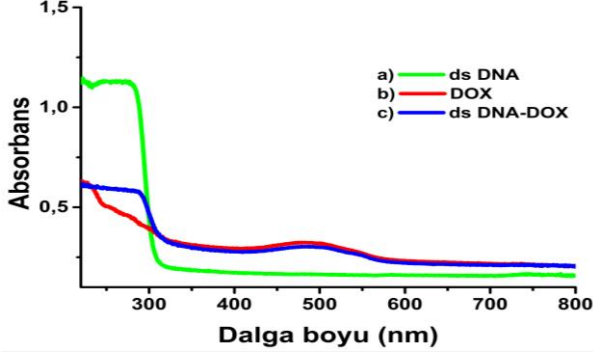
A'ya ait pik akımlarının azaldığı gözlemlendi. Ek olarak, G ve A'nın pik potansiyellerinin, etkileşim sonrası daha pozitif potansiyellere kaydığı belirlendi. G bazının pik potansiyelindeki kayma, DOX'un aromatik halka yapısının DNA sarmalına eklenmesiyle (interkalasyon) açıklanabilir. Klinik kullanımdaki birçok etkili antikanser ilacı DNA ile etkileşime girer ve bazıları bunu interkalasyon yoluyla yapar [29]. Bağlanma işlemi, genel istifleme düzenini bozmadan, bir DNA molekülünün bitişik baz çiftleri arasında yerleştirilen düzlemsel bir aromatik veya heteroaromatik sistemin kabiliyetini yansıtmaktadır.



Şekil 4. a) dsDNA/poli(sab-knt) modifiye grafit ve b) $1,56\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ DOX etkileşiminden sonra dsDNA/poli(sab-knt) grafit için AB (pH 4,8) içinde kaydedilen diferansiyel puls voltamogramları.

ilaç ve DNA arasındaki etkileşimin doğasını doğrulamak için etkileşim öncesi ve sonrasında UV-vis absorpsiyon spektrumları da araştırıldı. Şekil 5.a'da gözlenen serbest dsDNA'nın absorpsiyon spektrumu, pürin ve pirimidin bazlarının varlığı nedeniyle 260 nm 'de karakteristik bir absorpsiyon piki sergilediği gözlemlendi. Fakat $300\text{-}800\text{ nm}$ arasında herhangi bir pik gözlemlenmedi. DOX spektrumunda ise, moleküler yapısındaki kromoforların $\pi\text{-}\pi^*$ uyarılma geçişlerinden kaynaklanan ve DOX'a karakteristik olan görünür bölgede 483 nm 'de geniş bir absorpsiyon piki gözlemlendi (Şekil 5.b). DOX'un DNA ile etkileşiminden sonraki absorpsiyon spektrumuna bakıldığında ise (Şekil 5.c), 483 nm 'de bulunan maksimum DOX absorpsiyonunda hipokromik etki olduğu gözlemlendi. Bu sonuç ilaç molekülleri ve DNA bazları arasında $\pi\text{-}\pi$ istifleme etkileşimleri olduğunu gösterdi [30]. İnterkalasyon, bitişik baz çiftleri arasındaki ayrılmada bir artışı ve çift sarmalın kısmen çözülmesini içerir. Bu da büküm açısında değişikliklere ve şeker-fosfat omurgasında bozulmalara neden olur. İyi bilinmektedir ki, DOX moleküllerinin biyolojik aktivitesi DNA bağlama özellikleri ile ilişkilidir ve antitümör aktivitesinin esas olarak DNA'nın baz çiftlerindeki interkalasyondan kaynaklandığı literatürde bildirilmiştir. Buradan elde edilen sonuca göre DNA-DOX etkileşiminin bir çeşit interkalasyon modu olduğu belirlendi [31]. Bu nedenle DOX-DNA spektrumunda her iki yapıya ait karakteristik pikler gözlemlendi ancak yoğunluklarının daha düşük olduğu belirlendi. Bu

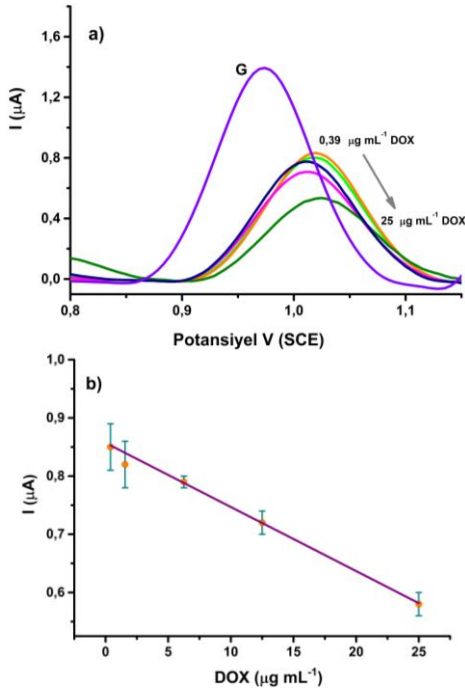
sonuç DOX'un π serbest orbitali ile DNA'daki bazların π orbitalinin birleşmesi, enerji seviyesinin düşmesine ve π - π geçişlerindeki enerji azalmasına neden olmasından ileri gelmektedir [32-34]. Elde edilen bulgular hem elektrokimyasal hem de spektrokimyasal olarak DOX-DNA etkileşiminin interkalasyon moduyla gerçekleştiğini gösterildi.



Şekil 5. a) dsDNA, b) DOX ve c) DOX-dsDNA çözeltisinin UV-vis spektrumları.

3.3. DOX'un elektrokimyasal tayini

DOX'un elektrokimyasal tayini için geliştirilen nanobiyosensörün elektrokimyasal performansı değerlendirildi. Şekil 6'dan görüldüğü gibi, DOX derişiminin G sinyalleri üzerindeki etkisi, dsDNA/poli(sab)-knt grafit üzerinde 30 dk bağlanma süresinde 0,39–25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DOX aralığında incelendi. Şekil 6.a'da kaydedilen voltamogramlar, DOX'un derişiminin 0,39'dan 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye artmasıyla guanin oksidasyon pik akımlarının doğrusal olarak azaldığını gösterdi.



Şekil 6. a) 0,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aralığında değişen DOX konsantrasyonları ile etkileşimden sonra G'ye ait diferansiyel puls voltamogramları ve b) doğrusal kalibrasyon eğrisi (n = 3).

Elde edilen doğrusal kalibrasyonun üst sınırı 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak tespit edildi. Bu sonuç 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'den yüksek DOX konsantrasyonları için, dsDNA çift sarmalındaki tüm aktif bölgelerin hâlihazırda DOX ile doldurulmuş olduğu anlamına gelmektedir. Buradan elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiği Şekil 6.b'de gösterildi. Buradan elde edilen kalibrasyon grafiğinin denklemi;

Akım (μA)= -0,0651 C DOX ($\mu\text{g mL}^{-1}$) + 1,459 $R^2 = 0,9995$ olarak elde edildi. Elde edilen doğrusal kalibrasyon grafiğinin eğiminden yararlanılarak düşük DOX seviyelerini tespit edebilen gözlenebilirme sınırı (LOD) değeri 0,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak hesaplandı.

Ayrıca geliştirilen nanobiyosensörün tekrar-üretilebilirlik sonuçlarının değerlendirilmesi için aynı yollarla hazırlanan 5 elektrodun ölçüm sonuçları kıyaslandı. 5 elektrot için kaydedilen G oksidasyon sinyallerinin bağıl standart sapma (RSD, %) değeri % 2,1 olarak hesaplandı. Bu değer, sunulan sensör sisteminin yüksek oranda tekrarlanabilir sonuçlara sahip olduğunu gösterdi.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, grafit yüzeyinin artan yüzey alanı ve DNA ile iyi etkileşmesi nedeniyle poli(sab)-knt üretiminde elektrodepozisyon modifikasyon stratejisi yürütüldü. Bu amaçla sab-knt çözeltisinden *in situ* elektrodepozisyon yöntemiyle nanokompozit yapısı başarıyla sentezlendi. Grafit yüzeyde sentezlenen nanoyapının elektrokimyasal, mikroskobik ve kimyasal karakterizasyonları gerçekleştirildi. Karakterizasyon çalışmalarının sonucunda nanokompozit yapının elektrot yüzeyinde başarılı bir şekilde oluşturulduğu belirlendi. Daha sonra ise, poli(sab)-knt modifiye grafit elektrotlar, antrasiklinler grubundan olan DOX'un dsDNA ile etkileşiminin araştırılması için tasarlandı. Grafit yüzeyler hazırlanan dsDNA çözeltileriyle fiziksel adsorpsiyon yöntemi esasına dayanılarak etkileştirildi ve DNA'nın sahip olduğu bazlardan olan Adenin (A) ve Guanin (G) bazlarına ait voltametrik pikler başarıyla kaydedildi. dsDNA bazlarının pik akım sinyallerindeki değişim temel alınarak dsDNA-DOX etkileşimi nitel ve nicel olarak DPV ile araştırıldı. DOX için doğrusal çalışma aralığı 0,39-25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişim aralığında ve LOD değeri ise 0,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulundu. Önerilen nanobiyosensörün tek kullanımlık olması, daha az dsDNA tüketimi sağlaması, kolay hazırlanması ve iyi hassasiyet göstermesi açısından öne çıkan özelliklere sahiptir.

Teşekkür

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (FBA-2019-18385) desteklenmiştir. Yazar ayrıca, faydalı yorumları için Prof. Dr. Serdar Abacı ve Dr. Gülçin Bolat'a teşekkür eder.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Erdem, A., Ozsoz, M. 2001. Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Analytica Chimica Acta*, 437(1), 107–114.
- [2] Yola, M. L., Özaltın, N. 2011. Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2), 56–60.
- [3] Marky, L. A., Snyder, J. G., Remeta, D. P., Breslauer, K. J. 1983. Thermodynamics of Drug-DNA Interactions, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1(2), 487–507.
- [4] Bi, S., Qiao, C., Song, D., Tian, Y., Gao, D., Sun, Y., Zhang, H. 2006. Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119(1), 199–208.
- [5] Garbett, N. C., Ragazzon, P. A., Chaires, J. O. B. 2007. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-dna interactions, *Nature Protocols*, 2, 3166–3172.
- [6] Manfait, M., Alix, A. J. P., Jeannesson, P., Jardillier, J. -C., Theophanides, T. 1982. Interaction of adriamycin with DNA as studied by resonance Raman spectroscopy, *Nucleic Acids Research*, 10(12), 3803–3816.
- [7] Agudelo, D., Bourassa, P., Bérubé, G., Tajmir-Riahi, H. A. 2016. Review on the binding of anticancer drug doxorubicin with DNA and tRNA: Structural models and antitumor activity, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 274–279.
- [8] Ros, R., Eckel, R., Bartels, F., Sischka, A., Baumgarth, B., Wilking, S. D., Pühler, A., Sewald, N., Becker, A., Anselmetti D. 2004. Single molecule force spectroscopy on ligand-DNA complexes: From molecular binding mechanisms to biosensor applications, *Journal of Biotechnology*, 112(1-2), 5–12.
- [9] Erdem, A., Ozsoz, M. 2002. Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions, *Electroanalysis*, 14(14), 965–974.
- [10] Congur, G., Eksin, E., Erdem, A. 2019. Chitosan modified graphite electrodes developed for electrochemical monitoring of interaction between daunorubicin and DNA, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 22, 100255.
- [11] Yaman, Y. T., Abacı, S. 2016. Sensitive Adsorptive Voltammetric Method for Determination of Bisphenol A by Gold Nanoparticle/Polyvinylpyrrolidone-Modified Pencil Graphite Electrode, *Sensors*, 16, 756.
- [12] Hajian, R., Tayebi, Z., Shams, N. 2017. Fabrication of an electrochemical sensor for determination of doxorubicin in human plasma and its interaction with DNA, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(1), 27–33.
- [13] Hassani, Moghadam, F., Taher, M. A., Karimi-Maleh, H. 2021. Doxorubicin anticancer drug monitoring by ds-dna-based electrochemical biosensor in clinical samples, *Micromachines*. 12(7), 808.
- [14] Kakaei, K., Hasanpour, K., 2014. Synthesis of graphene oxide nanosheets by electrochemical exfoliation of graphite in cetyltrimethylammonium bromide and its application for oxygen reduction, *Journal of Materials Chemistry A*, 2, 15428 -15436.
- [15] Toh, H. S., Compton, R. G. 2015. Electrochemical detection of single micelles through "nano-impacts," *Chemical Science*, 6, 5053–5058.
- [16] Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacological Review* 56(2), 185–229.
- [17] Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., Moreira, P. 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Current Medical Chemistry*, 16(25), 3267–3285.
- [18] Deepa, S., Swamy, B. E. K., Pai, K. V. 2020. A surfactant SDS modified carbon paste electrode as an enhanced and effective electrochemical sensor for the determination of doxorubicin and dacarbazine its applications: A voltammetric study, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 879, 114748.
- [19] Ghanbari, M. H., Norouzi, Z. 2020. A new nanostructure consisting of nitrogen-doped carbon nanooxions for an electrochemical sensor to the determination of doxorubicin, *Microchemical Journal*, 157, 105098.
- [20] Porfireva, A., Vorobev, V., Babkina, S., Evtugyn, G. 2019. Electrochemical Sensor Based on Poly(Azure B)-DNA Composite for Doxorubicin Determination, *Sensors*. 19(9), 2085.
- [21] Erdem, A., Congur, G. 2013. Impedimetric detection of in situ interaction between anticancer drug bleomycin and DNA, *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 295–301.
- [22] Yang, Y. J., Guo, L., W. Zhang, W. 2016. The electropolymerization of CTAB on glassy carbon

- electrode for simultaneous determination of dopamine, uric acid, tryptophan and theophylline, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 768, 102–109.
- [23] Bolat, G., Yaman, Y. T., Abaci, S. 2018. Highly sensitive electrochemical assay for Bisphenol A detection based on poly (CTAB)/MWCNTs modified pencil graphite electrodes, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 255(1), 140–148.
- [24] Hasanzadeh, M., Mohammadzadeh, A., Jafari, M., Habibi B. 2018. Ultrasensitive immunoassay of glycoprotein 125 (CA 125) in untreated human plasma samples using poly (CTAB-chitosan) doped with silver nanoparticles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 120(B), 2048–2064.
- [25] Abraham, P., Renjini, S., Nancy, T. E. M., Kumary, V. A. 2020. Electrochemical synthesis of thin-layered graphene oxide-poly(CTAB) composite for detection of morphine, *Journal of Applied Electrochemistry*, 50, 41–50.
- [26] Tehrani, M. S., Azar, P. A., Namin, P. E., Dehaghi, S. M. 2013. Removal of Lead Ions from Wastewater Using Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes with Tris(2-Aminoethyl)Amine, *Journal of Environmental Protection*, 4(6) 529–536.
- [27] Hasanzadeh, M., Shadjou, N. 2016. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction, *Materials Science and Engineering: C*, 61, 1002–1017.
- [28] Wang, J. 2002. Electrochemical nucleic acid biosensors, *Anal. Chim. Acta.* 469(1) 63–71.
- [29] Neidle, S. 1997. Crystallographic insights into DNA minor groove recognition by drugs, *Biopolymers*, 44(1) 105–121.
- [30] Chen, Z., Qian, S., Chen, X., Chen, J., Zhang, G., Zeng, G. 2012. Investigation on the interaction between anthracyclines and DNA in the presence of paclitaxel by resonance light scattering technique, *Microchimica Acta*, 177, 67–73.
- [31] Cai, C., Chen, X., Ge, F. 2010. Analysis of interaction between tamoxifen and ctDNA in vitro by multi-spectroscopic methods, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 76(2), 202–206.
- [32] Liao, L. B., Zhou, H. Y., Xiao, X. M. 2005. Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA, *Journal of Molecular Structure*, 749(1-3), 108–113.
- [33] Airoidi, M., Barone, G., Gennaro, G., Giuliani, A. M., Giustini, M. 2014. Interaction of doxorubicin with polynucleotides. a spectroscopic study, *Biochemistry*. 53(13), 2197–2207.
- [34] Hajian, R., Shams, N., Mohagheghian, M. 2009. Study on the interaction between doxorubicin and deoxyribonucleic acid with the use of methylene blue as a probe, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20(8) 1399–1405.