



Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi Dergisi
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/vyuumfd>



**Hypericum scabrum L.'nin Metanol Ekstresinin Tek Kullanımlık
Elektrokimyasal DNA Biosensörleri ile İncelenmesi**

Hasret Subak^{a,*}, Mert İlhan^b

^a Analitik Kimya ABD, Temel Eczacılık Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van,, Türkiye, ORCID: 0000-0003-0100-2529

^b Farmakognosi ABD, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, Türkiye, ORCID: 0000-0001-5042-3915

ÖZET

Bu çalışmada, halk arasında ülser, konstipasyon, hemoroit, romatizma ve menstrüel hastalıklar gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan, yüksek antioksidan aktiviteye sahip *Hypericum scabrum* L. bitkisine ait metanol ekstresinin nükleik asit molekülü "DNA" ile etkileşimlerinin tayini elektrokimyasal biosensörler ile yapılmıştır. Etkileşim tayinine yönelik, Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) ve Dönüşümlü Voltametri (CV) yöntemleri kullanılarak biosensör sistemleri tasarlanmıştır. Çalışmada; kalem grafit elektrot, yardımcı elektrot ve referans elektrottan oluşan 3'lü elektrot sistemi kullanılacaktır. Çalışmada ilk olarak bitki ekstresinin elektrokimyasal incelenmesi yapılarak elektroaktivite tayini sağlanmıştır. İkinci kısımda elektrot yüzeyine tutturulan tek zincirli (ssDNA) ve çift zincirli (dsDNA) DNA yapıları ile bitkiden hazırlanan metanol ekstresinin etkileşimi sağlanmıştır. Ekstrede yer alan biyoaktif maddelerin DNA yapılarına etkisinin tayini için, etkileşim öncesi ve sonrasında DNA'nın en aktif bazlarından biri olan ve yaklaşık +1,0 V'da yükseltgenen guanin bazı sinyallerindeki değişim dikkate alınmıştır. Sentetik DNA parçalarının analizleri tamamlandıktan sonra *H. scabrum* metanol ekstresinin DNA üzerine olan etkisi tasarlanan elektrokimyasal biosensör ile kısa sürede ve oldukça basit bir şekilde analizlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bitki içeriğinde yer alan biyoaktif maddelerin verdiği yanıtlar arasındaki farklılıklar ve guanin bazının yükseltgenme yanıtındaki farklılıklar DPV tekniği kullanılarak tayin edilmiştir. Tayinde ayrıca metanol ekstresinin yer aldığı düşünülen flavonoidlerin elektrokimyasal olarak yanıtlarının olup olmadığı (aktif olup olmadıkları) elektrokimyasal tayin yöntemlerinden dönüşümlü voltametri tekniği (CV) kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel parametrelerdeki farklılıkların (ortam ve pH, madde konsantrasyonu, DNA derişimi vb.) DPV tekniğiyle incelenmesi yapılmıştır. Bu incelemeler sonucunda, 2,5 µg/mL *Hypericum scabrum* L. metanolik ekstresi ile 20 µg/mL dsDNA ve ssDNA etkileşime sokulmuştur. Elde edilen verilere göre, bitki içeriğinde yer alan aktif maddelerin DNA'ya bağlanma yeteneği, oksidasyon sinyalleri (yaklaşık %70 oranında azalma) üzerinden ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Hypericum scabrum*, DNA, Biosensör, Elektrokimya.

**Investigation of the Methanol Extract obtained from *Hypericum scabrum* L.
with Disposable Electrochemical DNA Biosensors**

Hasret Subak^{a,*}, Mert İlhan^b

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Van Yüzüncü Yıl University, Van, Türkiye, ORCID: 0000-0003-0100-2529

^b Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Düzce University, Düzce, Türkiye, ORCID: 0000-0001-5042-3915

ABSTRACT

In this study, a voltammetric sensor was used to determine the interactions of the methanol extract of the plant *Hypericum scabrum* L., with the nucleic acid molecule "DNA". *Hypericum scabrum* L., which has high antioxidant activity is also used in the treatment of diseases such as ulcers, constipation, hemorrhoids, rheumatism, and menstrual diseases. Our biosensor system has been designed using differential pulse voltammetry (DPV) and cyclic voltammetry (CV) methods. In the study; A 3-electrode system consisting of a pencil graphite electrode, auxiliary electrode, and reference electrode will be used. In the study, firstly, an

electrochemical analysis of the plant extract was performed and electroactivity was determined. In the second part, the single-stranded (ssDNA) and double-stranded (dsDNA) DNA structures were attached to the electrode surface and then, the DNA-modified electrodes were interacted with the methanol extract obtained from *H. scabrum* solutions. To determine the effect of the bioactive substances contained in the extract on DNA structures, the change in guanine oxidation signal, which is one of the most active bases of DNA and is oxidized at approximately +1.0 V, was measured account before and after the interaction. After the analysis of synthetic DNA fragments was completed, the effect of the methanol extract obtained from *H. scabrum* on DNA was analyzed in a short time and in a very simple way with the designed electrochemical biosensor. As a result of the studies, the differences between the responses of the bioactive substances contained in the plant and the differences in the oxidation response of the guanine base were determined using the DPV technique. In the determination, whether the flavonoids, which are thought to be included in the methanol extract, have an electrochemical response (whether they are active or not) was investigated using the cyclic voltammetry technique (CV), one of the electrochemical determination methods. Differences in experimental parameters (environment and pH, substance concentration, DNA concentration, etc.) were examined with the DPV technique. As a result of these investigations, 20 µg/mL dsDNA and ssDNA interacted with 2.5 µg/mL *Hypericum scabrum* L. methanolic extract. According to the obtained data, the DNA binding ability of the active substances contained in the plant was revealed through oxidation signals (approximately 70% reduction).

Keywords: *Hypericum scabrum*, DNA, Biosensor, Electrochemistry

1. Giriş

Başta bitkiler olmak üzere doğal ürünlerin tıbbi amaçla kullanımı Sümerliler zamanında başlamış ve Hipokrat tarafından tedavi amacıyla yaklaşık 400 farklı bitki kullanılmıştır. Günümüzde doğanın kaynağına yönelme ve bitkilerle tedavi popülaritesi giderek artan tamamlayıcı tıp yöntemleri arasında yer almaktadır. Oldukça etkili olan birçok modern ilaç doğal kaynaklardan esinlenerek ortaya çıkmıştır. Son yıllarda en çok satılan ilaçların doğal ürünlerden elde edildiği tespit edilmiştir [1–3]. Örneğin kanser tedavisinde kullanılan taksol *Taxus brevifolia* Nutt. bitkisinden, vinkristin *Catharanthus roseus* (L.) G. Don bitkisinden, morfin *Papaver somniferum* L. bitkisinden elde edilmiştir [4]. Yapılan bir çalışmada 1983 ve 1994 yılları arasında onay almış 520 ilacın %39'unun doğal ürünler veya bunların türevleri olduğu ayrıca antibakteriyel ve antikanser ilaçların %60-80'inin de doğal orjinli olduğu tespit edilmiştir [5]. 2001 yılında en çok satılan 30 ilaçtan 8'inin doğal ürünler veya türevleri olduğu belirlenmiştir.

Sentetik yollardan elde edilen ilaçların her geçen gün ortaya çıkan yeni yan etkileri nedeniyle bitkisel ürünlere yönelim artmıştır. Dolayısıyla daha etkili ve en düşük yan etkiye sahip, kolay tolere edilebilir ilaç moleküllerinin elde edilebilmesi önemli beklentiler arasında yer almaktadır. Bu beklentiler doğrultusunda araştırmalarımız, halk arasında hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerin, halk ilacı olarak hazırlanma ve uygulanma yöntemlerinin saptanmasına ve söz konusu etkilerinin bilimsel olarak kanıtlanması ile etkiden sorumlu bileşiklerin tespitine yönelik yapılan çalışmaları kapsamaktadır. Küçük moleküllerin biyoaktivite derecelerinin test edilmesi amacıyla pek çok çalışma mevcuttur (*in vitro/in vivo*) [6-8]. DNA biyosensörleri, başta ilaç molekülleri olmak üzere pek çok aktif maddenin hem DNA üzerine etkisinin araştırılmasına hem de kantitatif analiz sağlayarak etkin madde miktarlarının tespitine olanak sağlamaktadır. Biyosensörler, sahip olduğu biyolojik tanıma yüzeyi ile nano boyut düzeyinde etkileşimin tayin edildiği, kantitatif ve *in vitro* analiz sağlayan küçük cihazlardır [9, 10].

İncelenen Hypericaceae familyasına ait olan *Hypericum scabrum* L. bitkisinden daha önceki çalışmalarda tanenler, floroglusinoller, fenilpropanlar, flavonoidler ve proantosiyaniinler gibi çeşitli bileşikler izole edilmiş ve tanımlanmıştır [11]. Geleneksel tedavide *H. scabrum* peptik ülser, gastrit, hemoroit, romatizma, kabızlık ve sarılık tedavisinde kullanılmaktadır [12, 13]. İlhan ve ark tarafından yapılan çalışmada *H. scabrum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin yapılan LC-MS/MS çalışmaları sonucunda flavonoidler bakımından zengin olduğu tespit edilmiştir [14]. Özellikle flavonoidler olmak üzere bitkinin içerdiği maddelerin, literatür taramalarında elektrokimyasal olarak incelenmeye uygun olduğu tespit edilmiştir [12, 15]. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda *H. scabrum* bitkisine ait yapılmış bir biyosensör çalışması bulunmamaktadır. Bu da bitkiden hazırlanan

ekstre ile DNA etkileşiminin ilk defa analizinin yapıldığını göstermektedir. Bu çalışmada, halk arasında hastalıkların tedavisinde kullanılan bir bitki türünün, mikromolar düzeyde analizi gerçekleştirilmiştir. Amaç, bitkide yer alan biyoaktif maddelerin saflaştırma başmağına gerek kalmaksızın aktivitelerinin tayinini sağlamaktır. Böylelikle, tedavi edici özellikleri kanıtlandıktan sonra saflaştırma prosedürü uygulanabilir. Bu yönde çalışma ilkler arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, benzer çalışmalarına sıklıkla rastlanmayan; geleneksel tedavide kullanımı olan *H. scabrum* bitkisinden hazırlanan metanol ekstresi hazırlandıktan sonra, bu ekstreten hazırlanan sulu çözeltilerin nükleik asit molekülü “DNA” ile olan etkileşimleri “elektrokimyasal biyosensör teknolojileri” kullanılarak incelenmiştir. Tasarımı yapılan elektrokimyasal biyosensörde, tek kullanımlık (kullan-at) özellikteki kalem grafit elektrot (PGE) çevirici olarak kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine tutturulan guanin bazlarını içeren sentetik DNA’lar ile oksidasyon sinyali incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kullanılan Cihazlar

Voltametik çalışmalar, elektrokimyasal analiz cihazı Autolab tip III (GPES 4.9 yazılım paketi (EcoChemie, Hollanda)) ile gerçekleştirildi. Elde edilen yalın voltamogramlara, ‘Savitzky ve Golay’ yazılım programı kullanılarak zemin düzeltilmesi yapılmıştır. Referans elektrot olarak MF 2012, BAS kodlu Ag/AgCl, yardımcı elektrot olarak MW 1032, BAS kodlu platin tel elektrot kullanılmıştır. 4 mililitrelik elektrokimyasal cam deney hücreleri (üç elektrot girişli) kullanılmıştır. Düzeneğin alt kısmına manyetik karıştırıcı yerleştirilmiştir. WTW, inolab pH 720 ile çözeltilerin pH ölçümleri yapılmıştır.

2.2. Kimyasal materyal

Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar, di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum di-hidrojen fosfat di-hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), dietanolamin ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_2$, DEA), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich'ten elde edildi. pH 2-10 arasındaki 0,1 M Britton-Robinson (BR) tamponu destek elektroliti olarak kullanıldı. Tüm tampon, stok ve destek tampon çözeltilerinin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı VAN (ReagentPlus®, %99). Çift sarmallı balık sperm DNA'sı Serva'dan (Almanya) alındı. Sonrasında, dsDNA stok solüsyonları yüksek konsantrasyonda (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gibi) hazırlanarak -200C'de saklandı.

2.3. Bitkinin Toplanması ve Metanol Ekstresinin hazırlanışı

H. scabrum bitkisi Van Başkale ilçesi Güzeldere mevkiinden toplanmış, Doç. Dr. Hüseyin Eroğlu tarafından teşhis edilmiş ve herbaryum örneği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryumu'nda muhafaza edilmektedir (VANF165216). *H. scabrum* bitkisinden metanol ekstresi, İlhan ve ark tarafından kullanılan yöntem kullanılarak hazırlanmıştır [14].

2.4. Ekstre karakterizasyonu

İlk olarak bitkiden hazırlanan metanol ekstresinde elektroaktif madde tayini için dönüşümlü voltametri (CV) yöntemiyle tarama yapılır.

2.5. CV yöntemi

Dönüşümlü voltametri (CV) de belirli potansiyel aralığında potansiyel taraması yapılarak oluşan akım ölçülür ve analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davranış gösterdiği hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda maddenin en iyi yanıtı verdiği bölge (potansiyel) bulunur.

Ölçüm: Çalışmada kullanılan kalem grafit elektrot: asetat tamponu içerisinde 1.4V'ta 1 dk tutularak aktive edilmiştir. Bitkiden hazırlanan metanol ekstresi aktive elektrota adsorbsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Dönüşümlü voltametri ile (-0,05)-(+1,15)-(-0,05) V aralığında 120 mV/s, hızda 8 mV adım gerilimi ile elektrokimyasal ölçüm sağlanmıştır.

2.6. pH Tarama

H. scabrum metanol ekstresinden 25 µg/mL derişiminde çözelti hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyine 50 µl hacminde 45 dk adsorbsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Ölçüm esnasında destek çözeltisi olarak BR tamponuna ait pH 2-9 aralığında çözeltiler kullanılmıştır. Ölçüm: DPV ile +0,0V dan +1,40 V'a kadar, 15 mV/sn tarama hızında, 50 mV amplitüt ve 8 mV adım potansiyeli uygulanarak ölçüm sağlanmıştır.

2.7. Konsantrasyon Çalışması

Artan derişimlere sahip (1-2,5-5-7,5-10 µg/mL) metanol ekstresine ait çözeltiler hazırlanmıştır. Elektrot yüzeyine 50 µl hacminde 45 dk adsorbsiyon yoluyla immobilize edilmiştir. Ölçüm: DPV ile +0,0V dan +1,40 V'a kadar, 15 mV/sn tarama hızında, 50 mV amplitüt ve 8 mV adım potansiyeli uygulanarak ölçüm sağlanmıştır.

2.8. Biyomoleküler Etkileşim

Sunulan çalışmada hazırlanan *H. scabrum* metanol ekstresinin dsDNA ve ssDNA ile etkileşimleri elektrot yüzeyinde tayin edilmiştir. Yöntemlere ait işlem şeması aşağıda verilmiştir. Çalışma iki basamakta gerçekleştirilmiştir:

i. DNA İmmobilizasyonu: 100'er µL olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan 5 µg/mL konsantrasyonunda PBS'de hazırlanmış ssDNA/dsDNA çözeltilerine, aktive edilmiş elektrotlar 20 dk süreyle daldırılarak, adsorbsiyon yoluyla DNA tutturulması sağlanmıştır. Bağlanmadan sonra, yüzey 1 kez boş PBS çözeltisinde yıkanarak elektrot yüzeyine bağlanmayan DNA dizileri uzaklaştırılmıştır.

ii. Bitkiden hazırlanan metanol ekstresi ile etkileşim: DNA immobilize elektrotlar 100'er µL olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan 10 µg/mL konsantrasyonunda bitki ekstresiyle belirli sürelerde etkileştirilir. Bu işlemden sonra, yüzey 1 kez boş PBS çözeltisinde yıkanır.

Ölçüm: DPV yöntemiyle, bitki ekstresi-DNA etkileşimi tayini: DPV ile +0,0V dan +1,40 V'a kadar, 15 mV/sn tarama hızında, 50 mV amplitüt ve 8 mV adım potansiyeli uygulanarak etkileşim öncesi ve sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri ölçülmüştür. Elde edilen ham eğriler, potansiyostattaki GPES yazılım sistemi ile tanımlanabilir pikler haline dönüştürülerek pik yükseklikleri değerlendirilmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışma

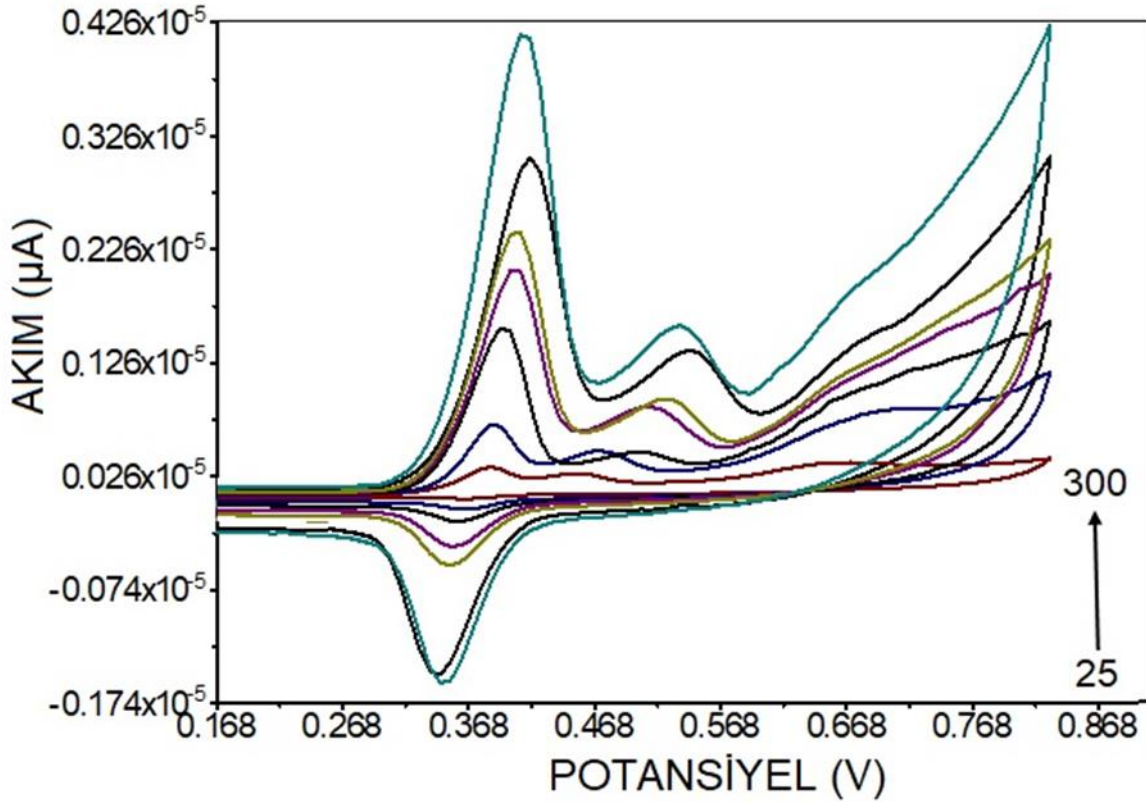
3.1. *H. scabrum* Metanol Ekstresinin CV ile Tayini

Deneyde 25 µg/mL konsantrasyonunda metanol ekstresi içeren çözeltiler hazırlanmış ve KGE yüzeyine uygulanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde, biosensörle hazırlık aşamasına geçmeden önce

metanol ekstresinin optimum elektrokimyasal ölçüm şartları araştırılmıştır. İlk olarak metanol ekstresinde elektroaktivite tespiti amacıyla CV tarama çalışması yapılmıştır. Burada anodik ve katodik (yükseltgenme ve indirgenme) bölgelerinde ayrı taramalar yapılmıştır. Ekstre içeriğinin elektroaktif olması çalışmada çok önemlidir. Çünkü DNA ile etkileşimde kendine ait elektroaktif sinyalin değişimi, çalışmanın yorumlanmasında temel analiz noktalarından olmuştur.

3.2. *H. scabrum* Bitki Ekstrelerinin CV Tarama Hızı Çalışmaları

H. scabrum metanol ekstresinden hazırlanan su bazlı çözeltinin (25 µg/mL) elektrokimyasal analizi sırasında KGE elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonu aydınlatmak amacıyla tarama hızı çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla pH 5 BR tamponu içerisinde 25 µg/mL *H. scabrum* metanol ekstresinin 0,1-0,8 V potansiyel aralığında 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ve 300 mV/s tarama hızlarında dönüşümlü voltamogramları kaydedilmiştir (Şekil 2). Her tarama hızında üç ölçüm alınmış ve ortalama değerler kullanılmıştır. Elde edilen voltamogramlar 0,41 V ve 0,55 V civarı elde edilen ekstreye ait iki elektroaktif nokta üzerinden değerlendirilmiştir.

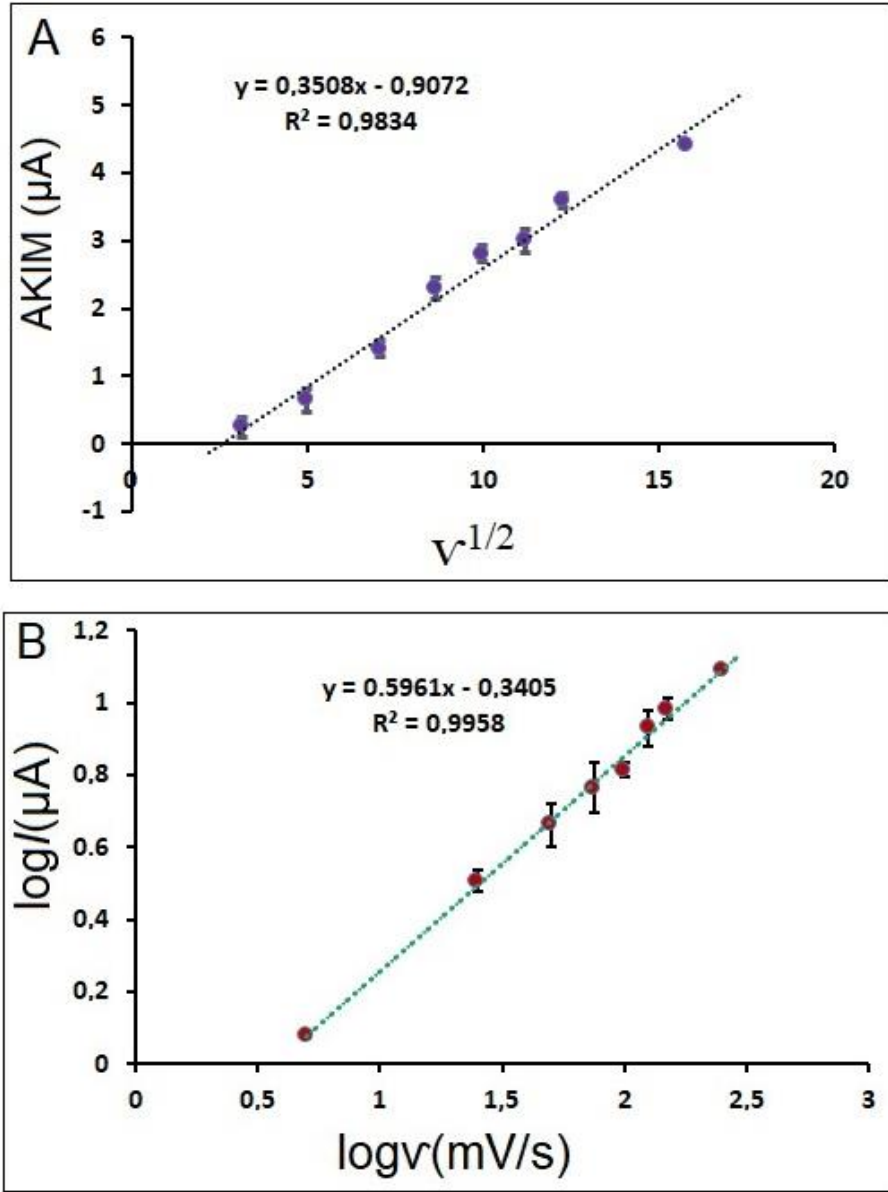


Şekil 1. 25 µg/mL *H. scabrum* metanol ekstresinin 0.1 M BR tamponu (pH=5,0) içerisinde KG elektrot ile farklı hızlarda alınan dönüşümlü voltamogramları (1: 25, 2: 50, 3: 75, 4: 100, 5: 150, 6: 200, 7: 300 mV/s).

H. scabrum metanol ekstresinden hazırlanan 25 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisi, aktive edilmiş elektrotlara 100 µL hacminde vialerde 20 dk immobilize edildikten sonra CV tekniği ile 0.1 M BR tamponu (pH=5,0) içerisinde 1 dakika tutulduktan sonra yapıldı. Ekstre elektroaktif olarak belirgin olarak iki farklı noktada (anodik) sinyal vermektedir (Şekil 1).

H. scabrum metanol ekstresine ait 25- 300 mV/s arasında alınan dönüşümlü voltamogramlar incelendiğinde, tarama hızlarının artmasıyla pik potansiyellerinde ve pik akımlarında doğrusal bir artış gözlenmiştir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon mekanizmasının daha anlaşılabilir olması

amacıyla, tarama hızı ve tarama hızının kareköküne karşılık pik akımları grafiksel olarak ifade edildiğinde tarama hızının karekökü ile pik akımları arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir ve elde edilen grafik Şekil 2 A/B’de verilmiştir.



Şekil 2. 25 µg/mL *H. scabrum* metanol ekstresinin 0.1 M BR tamponu (pH=5.0) ortamında 0.41 V civarı elde edilen oksidasyon pikine ait tarama hızı sonuçları (25 – 300 mV/s tarama hızında CV ile alınan voltamogramlar, A) tarama hızı kareköküne karşı, pik akımı değişimini gösteren grafik, B) tarama hızlarının logaritmasına karşı, pik akımları logaritması grafiği).

Elde edilen grafikler ile, bitki içeriğinde yer alan elektroaktif flavonoit olduğu düşünülen maddelerin elektrot yüzeyine taşınma mekanizması aydınlatılabilir. Bunun için Şekil 3 A ve B’de elde edilen eşitlikler ve eğim değerleri kullanılmaktadır [16, 17]. Elektrot yüzeyine madde taşınımı, adsorbsiyon veya difüzyon kontrollü yapılmaktadır. KGE elektrot yüzeyinde adsorpsiyon kontrolünden söz edebilmek için grafiğinin doğrusal ve eğiminin 0,5 değerinden daha büyük bir değerde olması gerekir. Ancak 0,5’ten daha küçük bir eğim değeri olması durumunda reaksiyon difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği bilinmektedir [18, 19]. Tarama hızının kareköküne karşı pik akımları grafiğinde

(Şekil 3 A) ve tarama hızlarının logaritmasına karşı, pik akımları logaritması grafiklerinde (Şekil 3 B) elde edilen eşitlikler aşağıda verilmiştir:

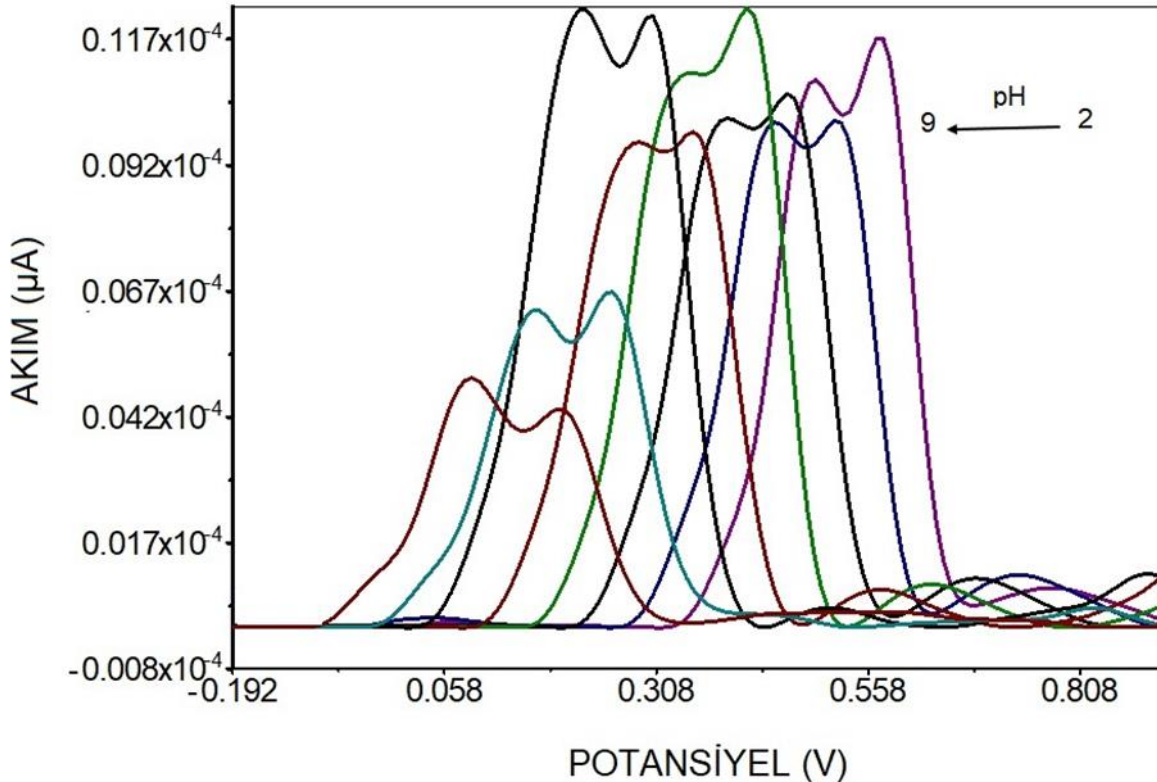
$$i_p(\mu A)=0,3508v^{1/2}(mv/s)-0,9072 \quad (n=3, R=0,9916) \quad (0,41 \text{ V}, \text{ Şekil 3A})$$

$$\log i_p(\mu A)= 0,5961 \log v (mv/s)-0,3405 \quad (n=3, R=0,9979) \quad (0,41 \text{ V}, \text{ Şekil 3B})$$

Teorik olarak elektrot yüzeyine kütle taşınımında; elde edilen eğim 0,5'ten küçük veya eşitse difüzyon kontrollü, 0,5'ten büyük ise adsorbsiyon kontrollü bir yük taşınımı gerçekleştirilir [18, 20, 22]. Elde edilen R^2 değerlerinin 1,0'e yakın bir değer olması ve eğim değerlerinin 0,5 değerine yakın olması nedeniyle KGE, yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal reaksiyonun difüzyon kontrollü bir reaksiyon olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, artan tarama hızı değerleriyle bir $\log v$ - $\log I$ grafiği oluşturulmuş ve bu denklemden doğrusal bir grafik elde edilmiştir (Şekil 3B). Bu denkleme karşılık gelen eğim değerlerinin teorik değer olan 0,5'e yakın olması, elektrokimyasal reaksiyonun difüzyon kontrollü bir işlemle gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Bu sebeple DNA modifiye sensör yüzeyindeki ekstraktlara ait etkileşim çalışmaları difüzyon yoluyla gerçekleştirilmiştir.

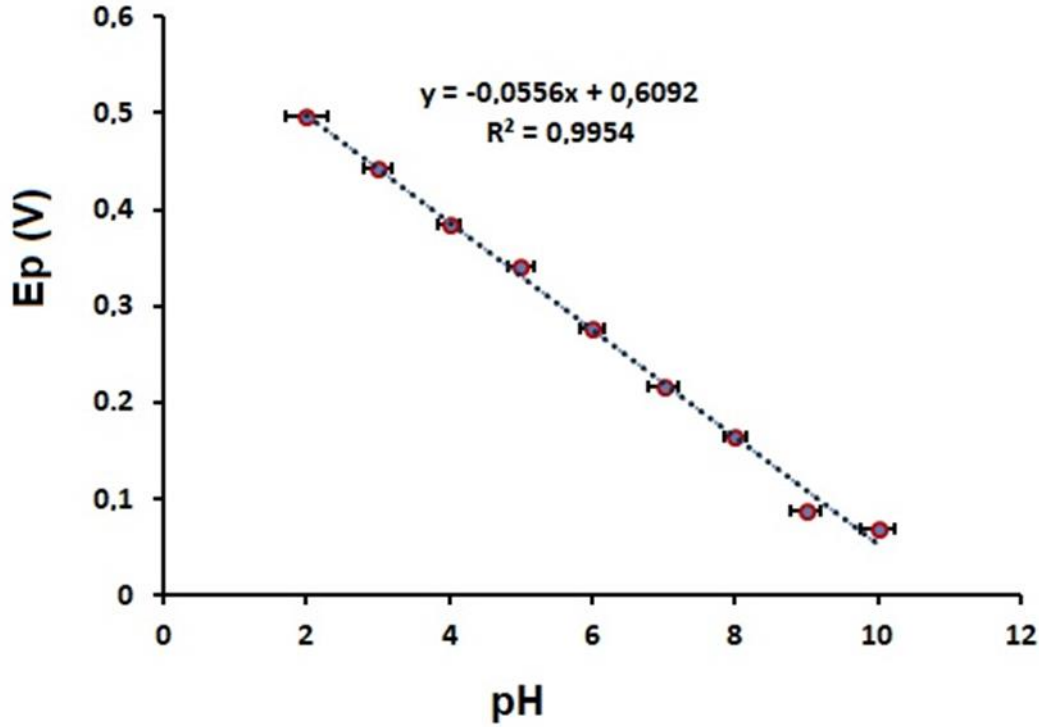
3.3. *H. scabrum* Metanol Ekstresinden Elde Edilen Su Bazlı Çözeltilere pH Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada BR tamponu kullanılmıştır. *H. scabrum* metanol ekstresi 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda su ile çözelti hazırlanarak pH 3-10 arasında ölçüm sağlanmıştır (Şekil 4).



Şekil 3. BR tamponunda (pH:2-9) 25 $\mu\text{g/mL}$ *H. scabrum* metanol ekstresinin DPV voltammogramları. (Ölçüm parametreleri: tarama aralığı (-0,20 V dan +0,82 V'a), 15 mV/sn tarama hızında, 50 mV amplütüt ve 8 mV adım potansiyeli)

Değişen pH değerlerine bitki ekstresinin verdiği cevaplar şekil 4’de görülmektedir. Sinyaller pH değişimine göre değişim ve kayma göstermiştir. Buna göre asidik ortamda sinyaller yüksek iken pH 7’den sonra sinyallerin belirgin bir farklılık (düşük sinyal) gösterdiği görülmektedir. En yüksek elektrokimyasal sinyali veren ekstresi pH değeri 5 olarak bulunmuştur (Şekil 4). Elde edilen verilere göre, *H. scabrum* metanol ekstresinde bulunan maddelerin oksidasyonu pH bağımlıdır. Ayrıca çözelti pH’ının yükseltilmesi ekstreye ait pikin, tepe potansiyelinde negatif yönde bir kayma sağlamıştır. pH değişimi ile tepe potansiyelleri arasındaki ilişki aşağıdaki doğrusal regresyon denklemiyle ifade edilir.



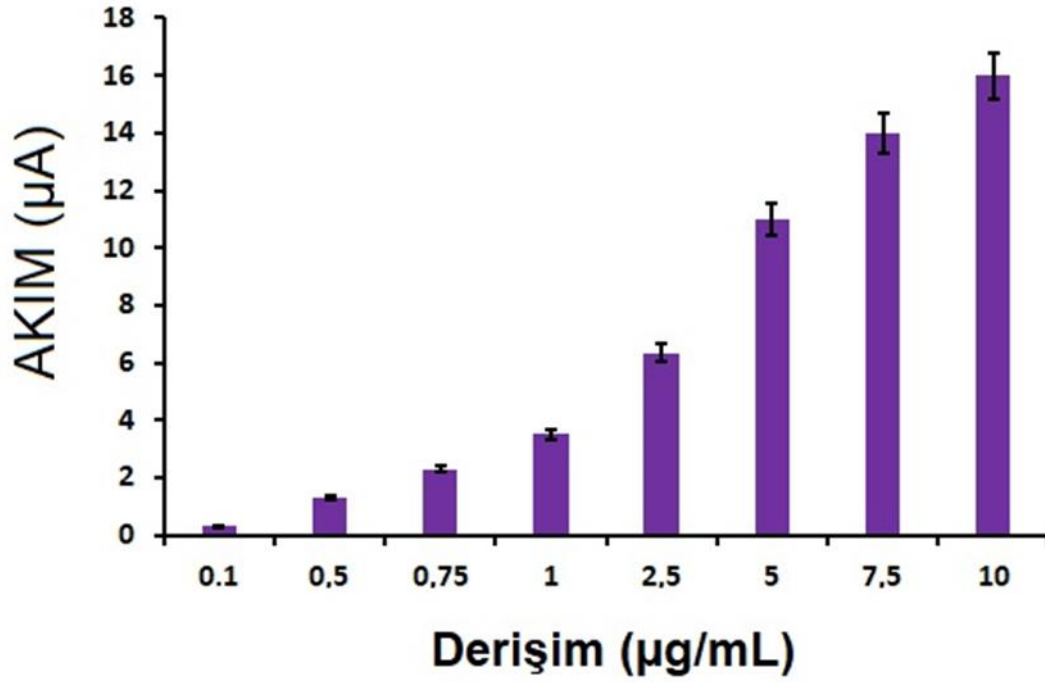
Şekil 4. *H. scabrum* metanol ekstresi (25 µg/mL) BR tamponu ile pH 2-9 arasında tarama ile analizine ait histogram.

$$E_p (V) = -0,0556 \text{ pH} + 0,6092, R^2 = 0,9954.$$

Şekil 5’de çözeltinin değişen pH’ı ve *H. scabrum* metanol ekstresinden elde edilen pik potansiyel noktaları arasındaki bağlantı değerlendirildi. Bu denklemde grafikteki eğim değeri kullanılmıştır. Grafikten eğim, - 55,6 mV/pH birimi olarak bulunmuş olup, bu değer -59 mV’lik teorik değere (Nernst denkleminde verilen değer) yakındır, bu da elektrot reaksiyonunda yani oksidasyon sırasında alınan ve verilen elektron ve proton sayısının birbirine eşit olduğunu göstermektedir [22]. Öte yandan *H. scabrum* metanol ekstresinin flavonoit yapısındaki bileşikleri içerdiği ve elde edilen eğim değerinin aslında flavonoitlerin davranışına benzer olduğu bilinmektedir [23, 24]. Başka bir deyişle bu değer ekstrede en az bir flavonoit bileşiğinin varlığını kanıtlamaktadır.

3.4. *H. scabrum* Metanol Ekstresine Ait En Uygun Ekstre Derişiminin Bulunması

DNA ile etkileşimden önce en uygun ekstre derişiminin tayini için, 01-0,5-0,75-1-2,5-5-7,5-10 µg/mL derişiminde çözeltiler BR (pH: 5,00) tamponunda hazırlanarak 100 µL viallerde 30 dakika KGE yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra yıkanan elektrotlar metot kısmında verilen ölçüm parametrelerine uygun olarak DPV yöntemiyle ölçülmüştür.



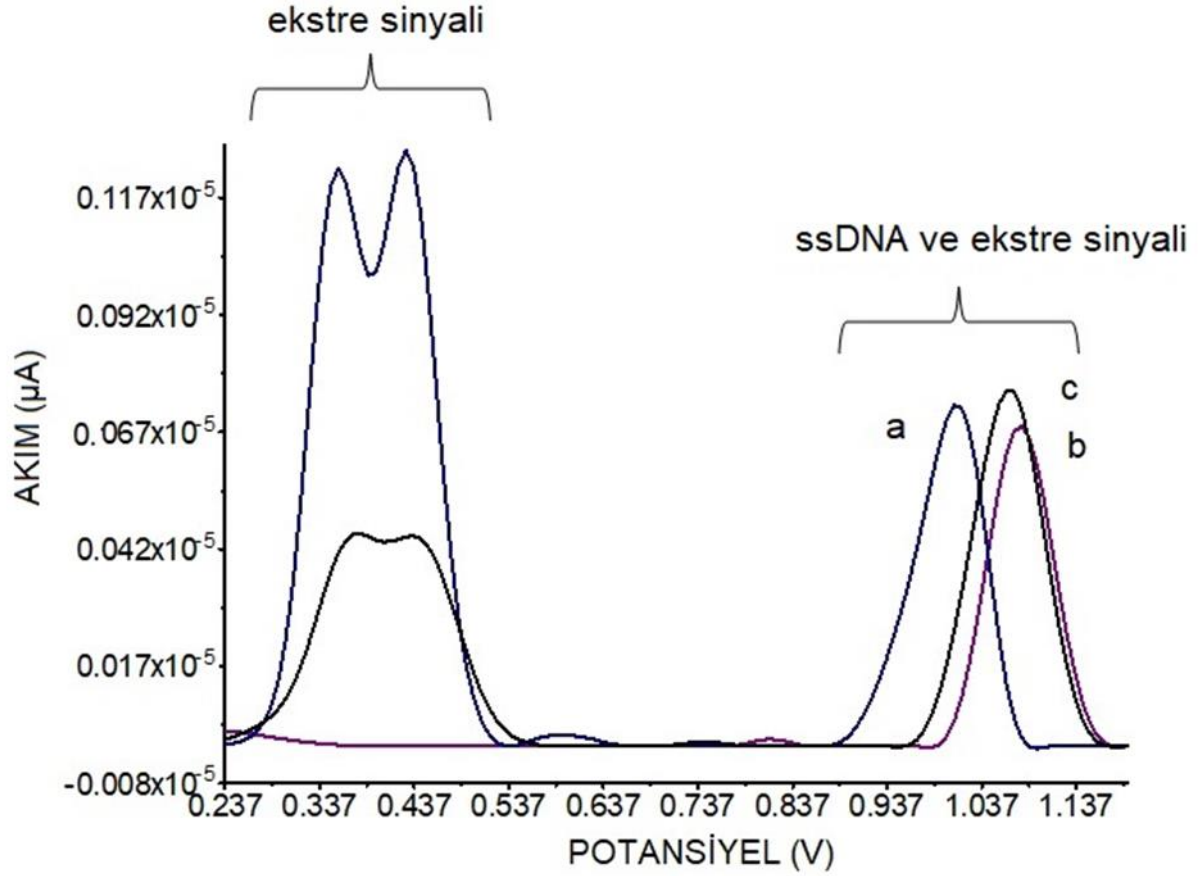
Şekil 5. *H. scabrum* metanol ekstresine ait derişim çalışması sonrası ölçülen 0,41 V'ta yer alan oksidasyon sinyallerine ait değişimleri içeren histogram.

Şekil 5'de *H. scabrum* metanol ekstresine ait artan derişimlerde çözeltiler kullanılarak en uygun derişimin saptanması amaçlanmıştır. Elde edilen verilerde, derişim çalışmasından, artan derişime bağlı olarak oksidasyon sinyallerinde de lineer bir artış olduğu gözlenmektedir. DNA ile etkileşim çalışmasında kullanılacak en uygun konsantrasyon 2,5 µg/mL olarak belirlenmiştir.

3.5. *H. scabrum* Metanol Ekstresinin Biyomoleküler Etkileşimi

Derişim çalışması sonrası belirlenen optimum konsantrasyon (2,5µg/mL) ile ssDNA/dsDNA (20 µg/mL) biyomoleküler etkileşim sağlanmıştır.

3.5.1. *H. scabrum* metanol ekstresinin ssDNA ile biyomoleküler etkileşimi

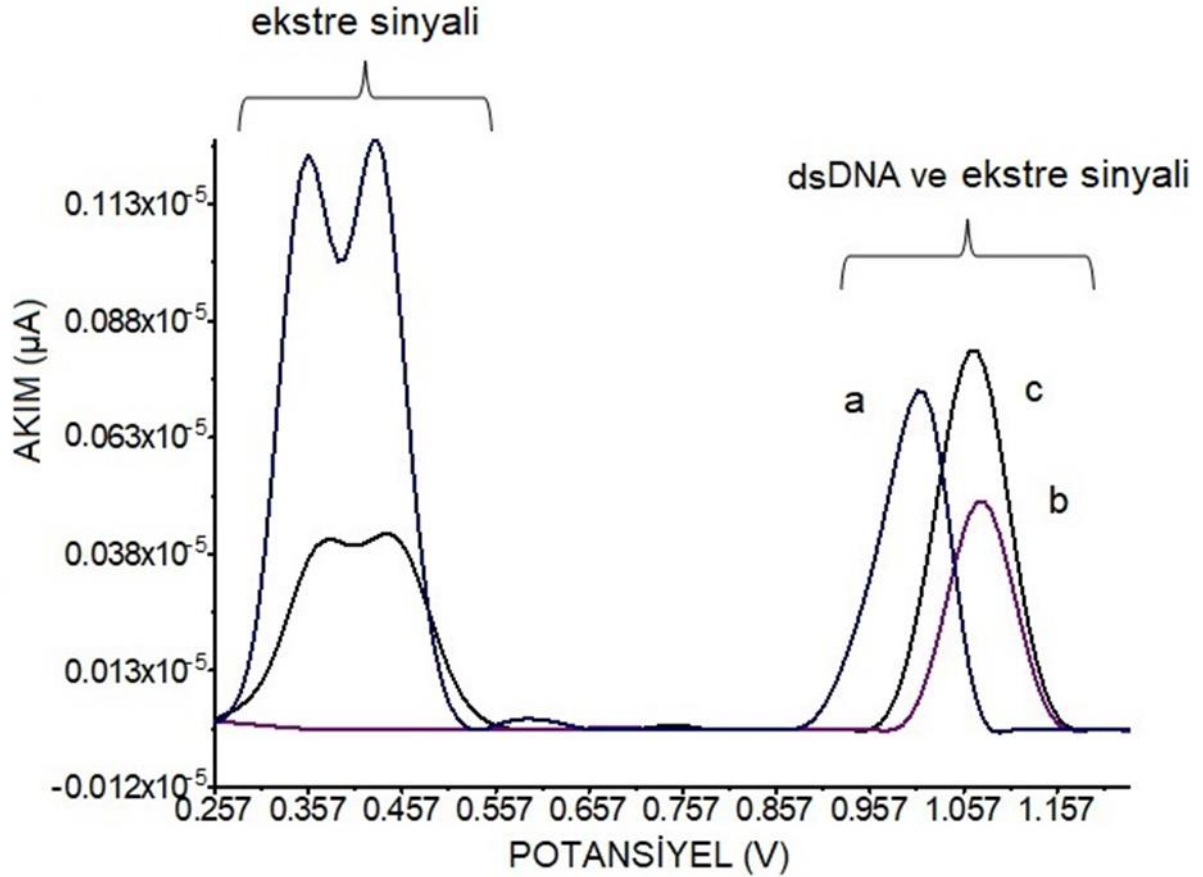


Şekil 6. *H. scabrum* metanol ekstresinden elde edilen belli konsantrasyondaki (ssDNA: 20 µg/mL, *H. scabrum* metanol ekstresi: 2,5 µg/mL) çözeltilerin DNA üzerine etkisinin elektrokimyasal ölçümüne ait voltamogramı. a: *H. scabrum* metanol ekstresi (yalın), b: DNA (yalın), c: DNA+ *H. scabrum* metanol ekstresi.

Elektroaktif içeriğe sahip olduğu daha önceki çalışmalarla belirlenen *H. scabrum* metanol ekstresinin, DNA üzerine etkisi bu bölümde incelendi. Kullanılan ssDNA biyolojik materyali, yaklaşık olarak 1V'ta guanin oksidasyonundan kaynaklı oluşan anodik sinyal vermektedir. *H. scabrum* metanol ekstresi ile etkileşim öncesi ve sonrası, guanin oksidasyon sinyali ölçülmüştür. Diğer yandan, ekstre içeriğinden kaynaklı oksidasyon sonucu 0,4 V ve yaklaşık olarak 1V'ta meydana gelen iki anodik pik incelenmiştir. Şekil 7'de yer alan voltamogramda ekstre ve DNA kaynaklı oksidasyon pikleri, metanol ekstresi ile etkileşimden önce ve sonra elde edilen değişimlere yer verilmiştir. Yapılan deneyde DNA'ya ait guanin bazında meydana gelen oksidasyon sonucu 1V civarı oluşan sinyal incelenmiştir. Buna göre ekstrede yer alan aktif maddelerin etkisi guanin oksidasyon sinyalinde meydana gelen değişimler ölçülerek değerlendirilmiştir (b). Çünkü deneyde aynı şartlar altında ekstre etkisi (c) incelenmiştir. DNA üzerinde etkisi olan tek değişken ekstre olduğu için bu değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmede 0,4 V ve 1 V civarı elde edilen ekstreyle ait ki elektroaktif noktanın DNA ile etkileşiminde nasıl tepki verdiği ile ilgilidir. Şekil 7 de yer alan voltamogramda 1 V civarı tek başına metanol ekstresi (a), DNA (b) ve DNA-metanol ekstresi (c) sinyalinde oluşan değişimler tek tek değerlendirilmiştir. Ekstreyle ait olduğu düşünülen 0,4 V'ta yer alan oksidasyon sinyali etkileşim öncesi yaklaşık 1,15 µA (RSD: 0,5, n:3) olarak ölçülürken, DNA ile etkileşimden sonra 0,45 µA (RSD: 0,25, n:3) olarak ölçülmüştür. Öte yandan, ekstre nin bir diğer oksidasyon sinyali (1V'ta yer alan) etkileşim öncesi yaklaşık 0,675 µA (RSD: 0,5, n:3) olarak ölçülürken, DNA ile etkileşimden sonra guanin sinyali ile birleşerek yaklaşık 0,1 V kayma

göstererek guanin oksidasyon bölgesinde $0,72 \mu\text{A}$ (RSD: 0,33, n:3) olarak ölçülmüştür. Ekstre ile etkileşim öncesi ssDNA sinyali $1,1 \text{ V}$ 'ta $0,52 \mu\text{A}$ (RSD: 0,33, n:3) olarak ölçüldü. Ekstre ile etkileşim sonrası, ssDNA sinyali potansiyel noktası değişmeden bir miktar sinyal artışı ile $0,72 \mu\text{A}$ (RSD: 0,33, n:3) olarak ölçüldü. Sonuçlar göz önüne alındığında; metanol ekstresine ait sinyalin ssDNA ile etkileşim sonrası değişime uğradığı net bir şekilde görülmektedir. Diğer bir yandan DNA sinyalinin bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

3.5.2. *H. scabrum* metanol ekstresinin dsDNA ile biyomoleküler etkileşimi



Şekil 7. *H. scabrum* metanol ekstresinden elde edilen belli konsantrasyondaki (dsDNA: $20 \mu\text{g/mL}$, *H. scabrum* metanol ekstresi: $2,5 \mu\text{g/mL}$) çözeltilerin DNA üzerine etkisinin elektrokimyasal ölçümüne ait voltamogramı. a: *H. scabrum* metanol ekstresi (yalın), b: DNA (yalın), c: DNA+ *H. scabrum* metanol ekstresi.

Ekstre içeriğinde yer alan biyoaktif bileşenlerin DNA ile etkileşim sonuçları bu bölümde dsDNA kullanılarak incelenmiştir. Bir önceki çalışmaya benzer şekilde ekstre ve dsDNA oksidasyon sinyalleri, etkileşim öncesi ve sonrası tek tek incelenmiştir. Metanol ekstresi iki farklı ($0,4, 1\text{V}$) noktada oksidasyon sinyaline sahiptir. Biyomoleküler etkileşimden sonra, $0,4 \text{ V}$ 'ta yer alan oksidasyon sinyali yaklaşık %70 azalma göstererek $0,35 \mu\text{A}$ (RSD: 0,33, n:3) olarak ölçülmüştür. Ekstre oksidasyon sinyali dsDNA ile etkileşimden sonra 1V 'ta yer alan bölgede $0,1 \text{ V}$ kayma göstererek guanin bölgesinde $0,85 \mu\text{A}$ (RSD: 0,30, n:3) olarak ölçülmüştür. Diğer yandan, dsDNA metanol ekstresi ile etkileşim sonrası yaklaşık %50 artış göstererek $0,85 \mu\text{A}$ (RSD: 0,30, n:3) olarak ölçülmüştür.

DNA ile biyomoleküler etkileşim incelendiğinde metanol ekstresinin, ssDNA ve dsDNA'yı oksidasyon sinyalleri değişimleri göz önüne alınarak etkilediği tespit edilmiştir. Bir karşılaştırma yapılırsa, dsDNA ile etkileşim ve sinyal değişim oranlarının, ssDNA ile olan etkileşime oranla farklı olduğu belirgin olarak fark edilmektedir. Buna göre DNA'ya bağlanma şekillerine göre sınıflandırılan (interkalatörler, kimyasal bağlanan materyaller vs.) gibi yapılarına göre içerik yorumlaması yapılabilir. Ekstre içeriğindeki biyoaktif içeriklerin dsDNA çift zincir yapısına afinitesi olduğu Şekil 8'de yer alan oksidasyon sinyal değişimleri ile ilişkili olarak yorumlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, ssDNA ile etkileşiminin olduğu verilen voltamogramlar ile desteklenmektedir. Bu sonuçlara dayanarak, ekstre içeriğinin DNA omurgasına bağlanabildiği düşünülmektedir.

4. Sonuç

Bu çalışmada, *H. scabrum* metanol ekstresi ve DNA etkileşiminin tespiti için tek kullanımlık kalem grafit elektrot bazlı, etiketsiz, basit, doğrudan ve hassas bir elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlanmıştır. Kullanılan yöntem, olası ekstre bileşenleri (flavonoidler) ile ssDNA/dsDNA arasındaki etkileşimi, indikatör kullanımı veya etiketleme, nanomateryal modifikasyonu veya kendi kendine bir araya getirilmiş bir yapı oluşturma gibi herhangi bir ekstra deneysel protokol olmadan 45 dakikalık bir etkileşim süresinde analiz edilmesini sağladı. Literatür taramasında *H. scabrum* metanol ekstresinin DNA ile etkileşiminin tespiti için şu ana kadar kullanılan bu kadar basit ve doğrudan bir voltametrik teknik bulunmamaktadır. Yaklaşık 2,5 µg/mL ekstre ve 20 µg/mL ssDNA/dsDNA kullanılarak elde edilen 50 µL reaksiyon hacmindeki 26 ng'lik saptama sınırı, DNA-*H. scabrum* metanol ekstresi etkileşiminin tespiti için yeterince düşük ve tatmin edicidir. Önerdiğimiz biyosensörün kolay kullanımlı, ekonomik, tek kullanımlık ve taşınabilir olması gibi avantajları da bulunmaktadır. Tüm bu özellikler biyosensör tasarım teknolojileri açısından önem taşımaktadır. *H. scabrum* metanol ekstresinin DNA ile biyomoleküler etkileşiminin belirlenmesi için tasarlanan bu çok basit elektrokimyasal tekniğin, diğer ekstreler-DNA etkileşimlerinin analizi için de uygun olacağını öngörüyoruz. Deneyimlerimiz doğrultusunda metodoloji, sahada (bitki yetiştirilen tarla vb.) veya herhangi bir laboratuvar ortamında hızlı teşhis test sistemlerinde de kolaylıkla uyarlanıp kullanılabilir.

Kaynaklar

- [1] I.A. Schepetkin, A.G. Ramstead, L.N. Kirpotina, (2016). Therapeutic potential of polyphenols from *Epilobium angustifolium* (Fireweed). *Phyther Research*, 30, 1287–1297.
- [2] F.T. Gurağaç Dereli, M. Ilhan, E. Sobarzo-Sánchez, E. Akkol, (2020). The investigation of the potential antidepressant-like activity of *Xanthium orientale* subsp. *italicum* (Moretti) Greuter in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 258, 112914.
- [3] C.T. Standing, (2020). Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: *Molecules*, 25, 1–12.
- [4] S. Tajik, M.A. Taher, H. Beitollahi, M. Torkzadeh-Mahani, (2015). Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor. *Talanta*, 134, 60–64.
- [5] K.P. Devi, D.S. Malar, S.F. Nabavi, (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Research*, 99, 1–10.
- [6] N.K. Janjua, A. Siddiq, A. Yaqub, (2009). Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA binding interactions at physiological conditions. *Spectrochim Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74, 1135–1137.
- [7] R.A. Dar, P.K. Brahman, N. Khurana, (2017). Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin, and kaempferol by chemical, biochemical, and electrochemical assays. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1119–S1128.
- [8] F. Lyu, M. Pan, S. Patil, (2018). Phenotyping antibiotic resistance with single-cell resolution for the detection of heteroresistance. *Sensors Actuators, B Chemical*, 270, 396–404.

- [9] G. Selvolini, H. Subak, B. Taneri, (2021). Chapter 6 - Electrochemiluminescent and photoelectrochemical aptasensors based on quantum dots for mycotoxins and pesticides analysis. In *Electroanalytical Applications of Quantum Dot-Based Biosensor*, Elsevier, 185-208
- [10] A. Sanati, M. Jalali, K. Raeissi, (2019). A review on recent advancements in electrochemical biosensing using carbonaceous nanomaterials. *Microchimica Acta*, 186: 1-22.
- [11] G. Kizil, M. Kizil, B. Çeken, (2011). Protective ability of ethanol extracts of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum retusum* Aucher against protein oxidation and DNA damage. *International Journal of Food Properties*, 14, 926–940.
- [12] B. Eslami, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, (2011). Pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 32–37.
- [13] N. Faraji, A. Ganji, N. Heshami, (2021). Hypolipidemic effects of *Hypericum scabrum* extract on the serum lipid profile and obesity in high-fat diet-fed rats. *Human Antibodies*, 29, 55–61.
- [14] M. İlhan, A. Battal, B. Kaptaner, ve diğerleri. (2023). Exploring the ameliorative effects of *Hypericum scabrum* L. on a surgically-induced endometriosis rat model and its phytochemical profiling by LC-MS/MS. *Farmacia*, 71, 710–721.
- [15] L. Jiang, S. Numonov, K. Bobakulov, (2015). Phytochemical profiling and evaluation of pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *Molecules*, 20, 11257–11271.
- [16] B. Baykal, G. Kadikoylu, H. Senturk, (2021). Preparation and characterization of gallic acid-titanium dioxide nanocomposites for biosensing application on voltammetric detection of DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 892, 1–7.
- [17] H.E.S. Kara, (2014). Redox mechanism of anticancer drug idarubicin and in-situ evaluation of interaction with DNA using an electrochemical biosensor. *Bioelectrochemistry*, 99, 17–23.
- [18] Y. Yardım, (2011). Sensitive Detection of Capsaicin by Adsorptive Stripping Voltammetry at a Boron-Doped Diamond Electrode, *Electroanalysis* 23.102491–2497.
- [19] A. Yigit, P.T. Pınar, Y. Akinay, (2021). Nanotube-Boramidic Acid Derivative for Dopamine Sensing. *ChemistrySelect*, 6, 6302–6313.
- [20] S. Allahverdiyeva, E. Keskin, P.T. Pınar, (2020). Electroanalytical investigation and determination of hepatitis C antiviral drug ledipasvir at a non-modified boron-doped diamond electrode. *Diamond and Related Materials*, 108, 107962.
- [21] Y. Yardım, M. Gulcan, Z. Şentürk. (2013). Determination of vanillin in commercial food products by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode. *Food Chemistry*, 141, 1821–1827.
- [22] S. Allahverdiyeva, O. Yunusoğlu, Y. Yardım, Z. Şentürk. (2021). First electrochemical evaluation of favipiravir used as an antiviral option in the treatment of COVID-19: A study of its enhanced voltammetric determination in cationic surfactant media using a boron-doped diamond electrode. *Analytica Chimica Acta*, 1159, 338418.
- [23] A.M.O. Brett, M.E. Ghica. (2003). Electrochemical Oxidation of Quercetin. *Electroanalysis*, 15, 1745–1750.
- [24] D. Zielińska, L. Nagels, M.K. Piskula. (2008). Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods. *Analytica Chimica Acta*, 617, 22–31.