

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**JELATİN-KARBOKSİMETİLSELÜLOZ-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

ÖZGE KOCABAY

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA

2011

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÖZGE KOCABAY

JELATİN-KARBOKSİMETİLSELÜLOZ-SÜPEROKSİT DİSMUTAZ BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emel EMREGÜL

Süperoksit dismutazın (SOD) doğrudan elektron transferine dayanan biyosensörü, süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) tayini için geliştirildi. Biyosensör platin elektrot yüzeyine SOD'un jelatin-karboksimetilselüloz (J-KMS) içine immobilizasyonu ile yapıldı. Sensör ksantin-ksantin oksidaz (Ks-KsOD) sisteminin ürettiği $O_2^{\cdot-}$ lerin elektrokimyasal tayininde çalışıldı. J-KMS-SOD biyosensörünün tepkisi $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonu ile orantılıdır. Biyosensör performansını etkileyen parametreler incelendi. İmmobilize SOD biyosensörü, $O_2^{\cdot-}$ 'ne yüksek katalitik aktivite gösterdi. SOD'un J-KMS'ye immobilizasyonu, enzim çevresinde biyouyumlu mikroçevre sağlamış ve enzimin aktivitesini verimli bir şekilde kararlı hale getirmiştir. Geliştirilen biyosensör $O_2^{\cdot-}$ tayini için yüksek seçicilik, düşük tayin sınırı, uzun süreli kararlılık gibi önemli analitik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. J-KMS-SOD biyosensörü, $O_2^{\cdot-}$ 'nin oluşmasıyla 2s içinde hızlı bir şekilde $O_2^{\cdot-}$ 'ye cevap vermiştir. Biyosensör tekrar kullanılabilir ve uygun saklama koşullarında kararlı kalmıştır. SOD biyosensörü, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların serbest radikalleri uzaklaştırması özelliklerinin ve sağlıklı, kanserli insan dokularının antiradikal aktivitelerinin tayininde kullanılmıştır. Biyosensör aynı zamanda kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkilerinde süperoksit tayini için test edilmiştir.

Ağustos 2011, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Jelatin, Karboksimetilselüloz, Süperoksit radikali, Süperoksit dismutaz, Biyosensör.

ABSTRACT

Master Thesis

ÖZGE KOCABAY

DEVELOPMENT OF GELATIN-CARBOXYMETHYLCELLULOSE-SUPEROXIDE DISMUTASE BIOSENSOR

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emel EMREGÜL

A novel biosensor based on direct electron transfer of superoxide dismutase (SOD) was fabricated for the determination of superoxide radicals ($O_2^{\bullet-}$). The biosensor was constructed by immobilization of SOD, in gelatin-carboxymethylcellulose (G-CMC) on a platinum electrode. The sensor worked by electrochemically detecting the $O_2^{\bullet-}$ generated by a xanthine-xanthine oxidase system. The response of the G-CMC-SOD biosensor was proportional to $O_2^{\bullet-}$ concentration. Parameters affecting the performance of the biosensor were also investigated. The immobilized SOD exhibited high catalytical activity towards $O_2^{\bullet-}$. Immobilization of SOD on G-CMC provides a biocompatible microenvironment around the enzyme, and stabilizes the activity of enzyme efficiently. The developed biosensors were demonstrated to possess striking analytical properties for $O_2^{\bullet-}$ determination, such as high sensitivity, low detection limit and long term stability. The G-CMC-SOD biosensor responded immediately to $O_2^{\bullet-}$ within 2s during the generation of $O_2^{\bullet-}$. The biosensor is reusable and remains stable under adequate storage conditions. The biosensor was used to determine the free radicals removal properties of acetylsalicylic acid-based drugs, antiradical activities of the healthy and cancerous human tissues. The biosensor was also tested to investigate the $O_2^{\bullet-}$ in tomato plants which exposed to drought, salt, cold, heavy metal stress.

August 2011, 91 pages

Key Words: Gelatin, Carboxymethylcellulose, Superoxide radical, Superoxide dismutase, Biosensor.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü esirgemeyen, sabırla hep destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü),

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi, Kimya Bölümü),

Her daim yanımda olduklarına inandığım, başta bu yolda ilerlememde örnek aldığım canım babam, annem ve kardeşlerime,

Her konuda desteklerini hissettiğim sevgili dostlarım Zeynep AKTAŞ, Arş. Gör. Ceren KAÇAR, Eylem Funda KÜREKÇİ, Eda ÖZGÜVEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmalarına katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali ERGÜL (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), Doç. Dr. Sümer ARAS (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve ekibine teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TUBİTAK 108T131 nolu “Süperoksit Radikallerinin Tayini İçin Jelatin-Karboksimetilselüloz-Süperoksit Dismutaz Biyosensörünün Geliştirilmesi” konulu proje tarafından desteklenmiştir.

ÖZGE KOCABAY

Ankara, Ağustos 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Serbest Radikaller	4
2.2 İmmobilizasyon Metodları	14
2.2.1 Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri	17
2.2.1.1 Bağlama yöntemi	17
2.2.1.2 Tutuklama yöntemi	20
2.2.2 Çözünen formda immobilizasyon yöntemi	22
2.3 Biyosensörler	23
2.3.1 Biyoreseptörler	28
2.3.2 Dönüştürücü çeşitleri ve özellikleri	29
2.3.2.1 Geleneksel dönüştürücüler	29
2.3.2.2 Piezoelektrik dönüştürücüler	29
2.3.2.3 İletken dönüştürücüler	30
2.3.2.4 Elektrik kapasitans dönüştürücüler	30
2.3.2.5 Termometrik dönüştürücüler	30
2.3.2.6 FET tipi dönüştürücüler	30
2.4 Enzim Sensörleri	30
2.5 Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat, Taşıyıcı ve Çapraz Bağlayıcı Özellikleri	34
2.5.1 Enzim	34
2.5.2 Substrat	38
2.5.3 Taşıyıcı	40
2.5.3.1 Jelatin	40

2.5.3.2 Karboksimetilselüloz	41
2.5.3.3 Taşıyıcı sistemin oluşması	43
2.5.4 Çapraz bağlayıcı	44
2.6 Kaynak Araştırması	45
3. ÇALIŞMANIN AMACI	50
4. MATERYAL VE YÖNTEM	52
4.1 Materyaller	52
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	52
4.1.2 Kullanılan cihazlar	52
4.1.3 Kullanılan elektrotlar	52
4.1.4 Kullanılan çözeltiler	53
4.1.5 Platin elektrotun temizlenmesi	53
4.2 Yöntem	54
4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması	54
4.2.2 J-KMS-SOD elektrotlarının ve mikrotabakanın hazırlanması	54
4.2.3 Bağlanmayan enzimin uzaklaştırılması	55
4.2.4 Enzim aktivitesi tayini	55
4.2.4.1 Elektrokimyasal yöntem	55
4.2.4.2 Kimyasal yöntem	56
4.2.5 Bitki yetiştirilmesi	56
4.2.6 Optimizasyon çalışmaları	58
4.2.6.1 Jelatin-karboksimetilselüloz oranı	58
4.2.6.2 Glutaraldehit konsantrasyonu	58
4.2.6.3 Enzim konsantrasyonu	58
4.2.6.4 Ksantin konsantrasyonu	59
4.2.6.5 J-KMS-SOD elektrodunun ömrü	59
4.2.7 Biyosensör uygulamaları	59
4.2.7.1 Radikal kovucu moleküller üzerine testler	59
4.2.7.2 Sağlıklı ve kanserli dokular üzerine testler	59
4.2.7.3 Strese maruz bırakılmış domates bitkilerinde süperoksit tayini	60
5. BULGULAR	61

5.1 İmmobilize Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Kimyasal Metod	
ile Optimizasyonu	61
5.1.1 SOD aktivitesi üzerine J-KMS oranlarının etkisi	61
5.1.2 SOD aktivitesi üzerine glutraldehit konsantrasyonunun etkisi	62
5.1.3 Ksantin konsantrasyonu	63
5.2 İmmobilize Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Elektrokimyasal Metod	
ile Optimizasyonu	64
5.2.1 SOD aktivitesi üzerine J-KMS oranlarının etkisi	64
5.2.2 SOD aktivitesi üzerine glutraldehit konsantrasyonunun etkisi	65
5.2.3 Enzim konsantrasyonu	66
5.2.4 Ksantin konsantrasyonu	67
5.3 J-KMS-SOD Elektrotunun Ömrü	68
5.4 Radikal Kovucu Moleküller Üzerine Testler	70
5.5 Sağlıklı ve Kanserli Dokular Üzerine Testler	72
5.6 Strese Maruz Kalmış Domates Bitkilerinde Süperoksit Tayini	73
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	77
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μA	Mikroamper
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
A	Amper
ANP	Altın Nanoparçacıkları
Au	Altın
Au-NP	Altın nanopiramidal
Au-NR	Altın nanoçubuk
Au-NS	Altın nanospiral
Cu	Bakır
cm^{-2}	Santimetre kare
DTS	Düşük tayin sınırı
Fe	Demir
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
İTO	İndiyum Kalay Oksit
J	Jelatin
KMS	Karboksimetilselüloz
Ks	Ksantin
KsOD	Ksantin Oksidaz
L	Litre
mmol	Milimol
mmol L^{-1}	Milimolar
MPA	Merkaptopropiyonik Asit

Na	Sodyum
NO [•]	Nitrik Oksit Radikali
O ₂	Moleküler Oksijen
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit Radikali
PEG	Polietilen Glikol
Pt	Platin
ROP	Reaktif Oksijen Partikülleri
s	Saniye
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka
SOD	Süperoksit Dismutaz
U	Ünite
w/w	Ağırlık oranı
Zn	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumu	6
Şekil 2.2	ROP ve doku hasarı arasındaki ilişki (Stohs ve Bagchi 1995)	10
Şekil 2.3	Antioksidanların ROP' ları tutarak etkisiz hale getirmesi	12
Şekil 2.4	Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1997)	16
Şekil 2.5	Çapraz bağlama ile immobilizasyon	17
Şekil 2.6	Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması	18
Şekil 2.7	Reaktif aminoasit kalıntıları: (+) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılır; (-) enzim immobilizasyonunda kullanılmaz; (±) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılmaz; (++) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılır	19
Şekil 2.8	Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır	19
Şekil 2.9	Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu	20
Şekil 2.10	Enzimin polimerler arasında tutuklanması	20
Şekil 2.11	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu	21
Şekil 2.12	Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül	21
Şekil 2.13	Çözünür formda immobilizasyon	22
Şekil 2.14	Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması (Velasco-Garcia ve Mottram 2003)	23
Şekil 2.15	Farklı metal merkezli SOD çeşitleri	35
Şekil 2.16	SOD enziminin yapısı	36
Şekil 2.17	SOD enziminin uygulamaları (Bafana vd. 2011)	38
Şekil 2.18	Ksantin kimyasal yapısı	39
Şekil 2.19	Karboksimetilselülozun yapısı	42
Şekil 2.20	Polielektrolit kompleks	43
Şekil 2.21	Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi	44

Şekil 2.22	Bifonksiyonel glutaraldehitin bağlanması	45
Şekil 4.1	Elektrot yüzeyindeki reaksiyon şeması (Emregül 2005)	56
Şekil 5.1	Değişik J-KMS oranlarının %SOD inhibisyonu üzerine etkisi	62
Şekil 5.2	Değişik glutaraldehit konsantrasyonlarının %SOD inhibisyonu üzerine etkisi	63
Şekil 5.3	Ks konsantrasyonuna bağlı olarak %SOD inhibisyonundaki değişim	64
Şekil 5.4	J-KMS oranlarına bağlı olarak akım yoğunluğundaki değişim	65
Şekil 5.5	Değişik glutaraldehit konsantrasyonlarına bağlı olarak duyarlılıktaki değişim	66
Şekil 5.6	J-KMS-SOD elektrotlarında değişik enzim konsantrasyonlarının amperometrik cevaba etkisi	67
Şekil 5.7	J-KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği	68
Şekil 5.8	SOD biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği	69
Şekil 5.9	J-KMS-SOD biyosensörü kullanılarak asetilsalisilik asit bazlı ilaçların anti- oksidan özelliklerinin invitro belirlenmesi. Asetilsalisilik asit bazlı ilaçların varlığında ($12,5 \text{ gL}^{-1}$) ve yokluğunda J-KMS-SOD biyosensörünün süperok-sit radikallerine duyarlılığı	71
Şekil 5.10	J-KMS-SOD biyosensör sinyalinin homojenize sağlıklı ve kanserli doku ilavesi ile değişimi	72
Şekil 5.11	Kuraklık stresinin $\text{O}_2^{\bullet-}$ üzerine etkisi	74
Şekil 5.12	Ağır metal stresinin $\text{O}_2^{\bullet-}$ üzerine etkisi	74
Şekil 5.13	Soğuk stresinin $\text{O}_2^{\bullet-}$ üzerine etkisi	75
Şekil 5.14	Tuz konsantrasyonunun $\text{O}_2^{\bullet-}$ üzerine etkisi	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Reaktif oksijen partikülleri	5
Çizelge 2.2	Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları	8
Çizelge 5.1	Sensör için çalışma koşulları ve analitik veriler	70

1. GİRİŞ

Çağımızın hastalıkları arasında sayılan kanser, diabetes mellitus, ateroskleroz, AIDS gibi pek çok metabolik hastalığın kaynağının organizmada oluşan serbest radikaller olduğu düşünülmektedir. Serbest radikaller, yapılarında bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron taşıyan atom ya da moleküllerdir. Biyolojik yaşamları için oksijene gereksinim duyan organizmalarda bulunan serbest radikaller arasında en önemlileri oksijen serbest radikalleridir. Bunlardan başka, nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve NO ile süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit anyonu (ONOO^-) da organizma için toksik etki yaratır (Feldman vd. 1993, Marletta 1993, 1994, Aruoma 1994, Halliwell 1997).

Aerobik canlılarda reaktif oksijen partiküllerinin (ROP) toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında antioksidan savunma sistemleri görev almaktadır. Biyolojik sistemlerde en çok oluşan radikallerden biri süperoksit radikalidir ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Bu radikal, biyolojik sistemlerde daha reaktif çeşitlerine dönüştürüldüğünden, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'lerin çok toksik olduğu düşünülmektedir. Süperoksit radikallerinin artışıyla, doğrudan ya da dolaylı yollardan hücre büyümesi, mutagenez, hücre ölümünün yavaşlaması gibi sonuçlar oluşur. Bu yüzden, $\text{O}_2^{\cdot-}$ konsantrasyonunun kantitatif tayini ve antioksidan bileşiklerin yararlı etkileri çok ilgilidir. Normal koşullarda canlı organizmada, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri dengede tutulmaktadır. Her iki sistemin birbirleriyle etkileşimleri, gerek normal hücre fonksiyonlarının devamında gerekse patolojik olayların gelişmesinde veya önlenmesinde ya da patolojinin mekanizmasının anlaşılmasında son derece önemlidir. Klinik açıdan son derece önemli olan serbest radikallerin hızlı ve doğru bir şekilde tayin edilmesi gerekmektedir.

Süperoksit radikallerinin tayininde genel olarak, ESR (Carey vd. 1984), kemilüminesans (Prasad vd. 1989) veya semikantitatif kolorimetrik testler (Fridovich 1970, Halliwell 1981) kullanılır. Protein kimyasında elektrokimyasal temelli sistemlerde ve biyolojik sistemlerde çalışmalarda örneklerle en küçük karşılıklı, eş zamanlı ölçüm yöntemleri tercih edilmektedir. Son yıllarda temeli elektrokimyasal sensörler (Tammeveski vd. 1998) ve biyosensörlere (Naughton vd. 1993, Sang vd.

1995, Lvovich ve Scheeline 1997) dayanan bazı elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Süperoksit radikali veya nitrik oksit gibi reaktif taneciklerin tayini için doğrudan protein elektrokimyasının kullanımı oldukça ilgi çekmektedir. Bu radikallerin biyolojik sistemlerde önemi büyüktür. Süperoksit analizi için süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hazırlanan enzim elektrotları kullanılmaktadır (Ohsaka vd. 2002, Ge vd. 2003).

Elektrokimyasal temelli, polimelerle hazırlanan enzim membranlı biyosensörlerle oluşturulan enzim elektrotları yapımında, enzimin oluşturulan polimerleştirilmiş film içine hapsedilmesi güçlü ve çok yönlü bir immobilizasyon tekniğidir (Malitesta vd. 1990). Bu basit teknik, monomer ve enzim içeren çözeltiye elektrotun daldırılması ve elektrot yüzeyinde elektrosentezlenmiş filmin oluşturulmasından ibarettir. Bu teknik tek basamaklı ve oldukça hızlıdır. Filmden enzim sızıntısı ise metodun dezavantajıdır. Polimer yüzeyine enzimin kovalent bağlanması, tekrar kullanılabilir enzim elektrotları oluşturmada kolaylık sağlamaktadır. Bu amaçla değişik çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. En sık kullanılanları epiklorhidrin, glutaraldehit ve 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimittir (Curulli vd. 2001). Bu yöntemde biyosensörün cevap zamanı hızlanmaktadır.

Bu çalışmada, $O_2^{\bullet-}$ tayininde spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek SOD biyosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla, jelatin-karboksimetilselüloz (J-KMS) enzim immobilizasyonunda taşıyıcı materyal olarak kullanılmış ve SOD enzimi çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılarak platin (Pt) elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Immobilizasyon koşullarının optimize edilmesi için enzim konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, J-KMS oranları gibi değişik parametreler kimyasal ve elektrokimyasal olarak çalışılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Immobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra SOD elektrotu geliştirilmiştir. Ksantin (Ks) ve ksantin oksidaz (KsOD) enzimi kullanılarak $O_2^{\bullet-}$ invitro oluşturulmuştur. Süperoksit radikali “Gamry Instruments Framework Chronoamperometry” kullanılarak amperometrik olarak tayin edilmiştir.

Tekrar kullanılabilirlik, cevap zamanı ve saklama koşulları gibi analitik parametreler çalışılmıştır. Geliştirilen SOD biyosensörü asetilsalisilik asit bazlı ilaçların serbest radikalleri uzaklaştırması özelliklerinin tayininde ve sağlıklı, kanserli insan dokularının antiradikal aktivitelerinin tayininde kullanılarak biyosensörün çalışılrlığı ispat edilmiştir. Geliştirilen biyosensör kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkilerinde süperoksit tayini için kullanılmış, biyosensörün yanıtı test edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Serbest Radikaller

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgelerde çiftler halinde bulunur. Atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş bir veya daha fazla elektron taşıyan, dış yörüngelerinde kısa bir süre de olsa bir ya da daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da moleküller serbest radikaller veya reaktif türler olarak tanımlanır (Salvemini ve Botting 1993). Ancak, birden fazla ortaklanmamış elektron içermesine rağmen geçiş metalleri ve lantanit iyon kompleksleri bu tanım içine girmez. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Serbest radikaller genelde son derece reaktiftir ve diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girme eğilimleri vardır, bunun yanı sıra dayanıksızdırlar ve yarı ömürleri kısadır. “Radikal” ve “serbest radikal” terimleri genelde eş anlamlı kullanılmakla beraber, bir radikal bir çözelti kafesi içinde hapsolmuş veya başka bir moleküle bağlanmış durumda olabilir. Radikaller, yanma, atmosfer kimyası, polimerleşme kimyası, biyokimya ve pek çok başka kimyasal süreçte önemli rol oynar. 1900 yılında Michigan Üniversitesi’nden Moses Gomberg tarafından betimlenen trifenilmetil radikali, ilk tespit edilmiş organik serbest radikal olmuştur.

Molekülün yapısına bağlı olarak serbest radikaller, oksijen merkezli (süperoksit; $O_2^{\bullet-}$, hidroksil; $OH^{\bullet}$, peroksil; $ROO^{\bullet}$), karbon merkezli (triklorometil; $CCl_3^{\bullet}$) ve kükürt merkezli (tiyol; $RS^{\bullet}$) olarak adlandırılırlar (Halliwell ve Chirico 1993; Aust vd. 1993). Bunun yanı sıra nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$) ve azot dioksit radikali ($NO_2^{\bullet}$) de tek sayıda elektron taşıdıklarından serbest radikaller arasında yer alırlar (Darley-Usmar 1996).

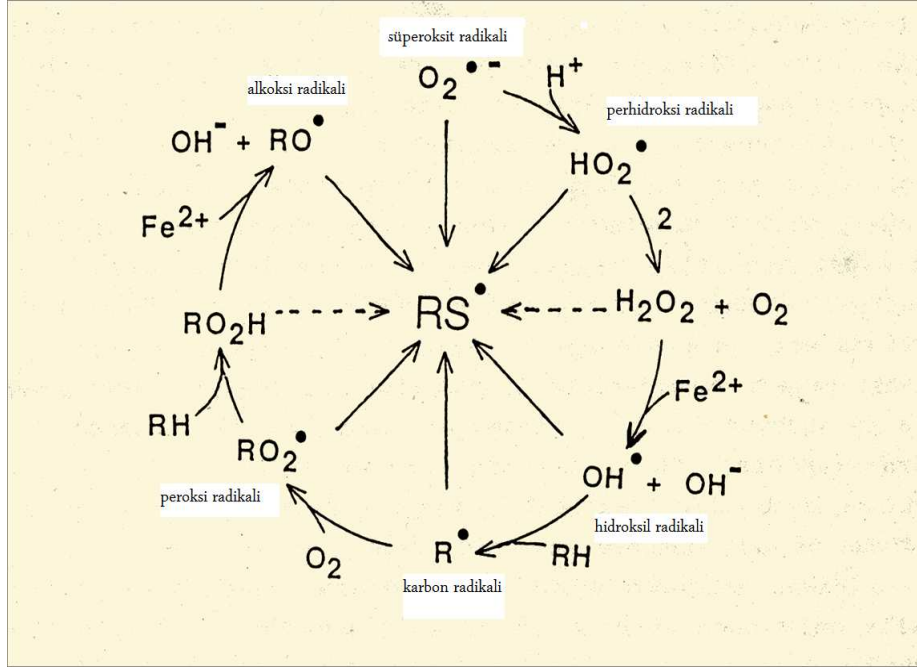
Serbest radikaller bazı biyolojik süreçlerde önemli rol oynar, bunların bazıları yaşam için gereklidir. Biyolojik sistemde en çok oksijen serbest radikalleri bulunmaktadır. Aerobik ortamın vazgeçilmez parçası olan oksijen, ortaklanmamış elektronları

nedeniyle indirgenme eğilimindedir ve bu yüzden toksik özellik gösterir. Hücre içi gerekli oksidasyon reaksiyonları ile oksijen suya kadar indirgenir. Ancak, reaksiyonlar sırasında oksijenin indirgenemediği durumlar da ortaya çıkar ve serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin hücrede yaratacağı etkiler, radikalın yapısına ve olduğu bölgeye bağlıdır. Biyolojik sistemde, başka moleküllerle çok kolay elektron alışverişine giren bu moleküllere “oksidan” veya “reaktif oksijen partikülü (ROP)” de denir (Halliwell 1991a).

Reaktif oksijen partikülleri oksijenin normal metabolizmasının bir yan ürünü olarak oluşurlar ve hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynarlar. Reaktif oksijen partiküllerini 3 grupta inceleyecek olursak çizelge 2.1’deki gibi bir sınıflandırma yapılır.

Çizelge 2.1 Reaktif oksijen partikülleri

Radikaller	Süperoksit radikal ($O_2^{\bullet-}$) Hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$) Alkoksil radikal ($RO^{\bullet}$) Peroksil radikal ($ROO^{\bullet}$)
Radikal Olmayanlar	Hidrojen peroksit (H_2O_2) Lipid hidroperoksit ($ROOH$) Hipoklorik asit ($HOCl$)
Singlet Oksijen	Oksijenin biradikal doğasından kaynaklanan radikal özeliği taşımaktadır.



Şekil 2.1 Reaktif oksijen partiküllerinin oluşumu

Moleküler oksijenin (O₂) suya indirgenmesi sırasında ortaya çıkan ROP' lar hücrelerin sitokrom komplekslerinde meydana gelirler (Onar 1990). Reaktif oksijen partikülleri, çeşitli serbest radikallerin oluşturduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve,

- karbon merkezli organik radikaller (R•),
- peroksit radikalleri (ROO•),
- alkoksi radikalleri (RO•),
- tiyil radikalleri (RS•),
- sülfenil radikalleri (RSO•),
- tiyil peroksit radikalleri (RSO₂•)

gibi serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Şekil 2.1).

Serbest radikaller, diğer moleküllerle değişik şekillerde reaksiyona girebilir. Böylece, reaksiyona giren serbest radikallerin ortaklanmamış elektronları, ortak bir elektron çifti oluşturmak üzere (kovalent bağ) birleşir. Bir radikal bir elektron verdiğinde ya da aldığı anda veya radikal olmayan başka bir moleküle birleştiğinde, radikal olmayan molekül radikal özellik kazanır. Bu nedenle, ROP'ların radikal olmayanlarla reaksiyona

girmesi, biyolojik sistemlerde genellikle zincir reaksiyonuna yol açmaktadır (Aruoma 1994).

Reaktif oksijen partüküllerinin oluşumu, ekzojen kaynaklı olabildiği gibi endojen kaynaklı da olabilir. Endojen kaynaklı oluşumda başta mitokondriyel elektron transport sistemi olmak üzere, mikrozomal ve çekirdek membranı elektron transport sistemi, endojen ve ekzojen substratları okside eden pek çok sitozolik enzim (ksantin oksidaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz gibi) ve bu substratların oksidasyonu, aktive edilmiş fagositik hücreler ve demir, bakır gibi geçiş metalleri sorumlu tutulmaktadır.

Organizmada serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları, mitokondriyal elektron transportu, heksoz monofosfat yolu, ksenobiyotiklerin metabolizması, doğal uyaranla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentetik ve biyokimyasal yıkım olaylarıdır. Normal metabolizmanın yanısıra, hiperoksi, inflamasyon ve radyasyon serbest radikal oluşumunu hızlandırırlar (Kalyanaraman vd. 1980). Klinikte kullanılan bazı neoplastik ajanlar O_2 radikallerini ortaya çıkarırlar. Çizelge 2.2’de in vivo ortamda ROP’ ların kaynakları gösterilmiştir (Carroll 1987).

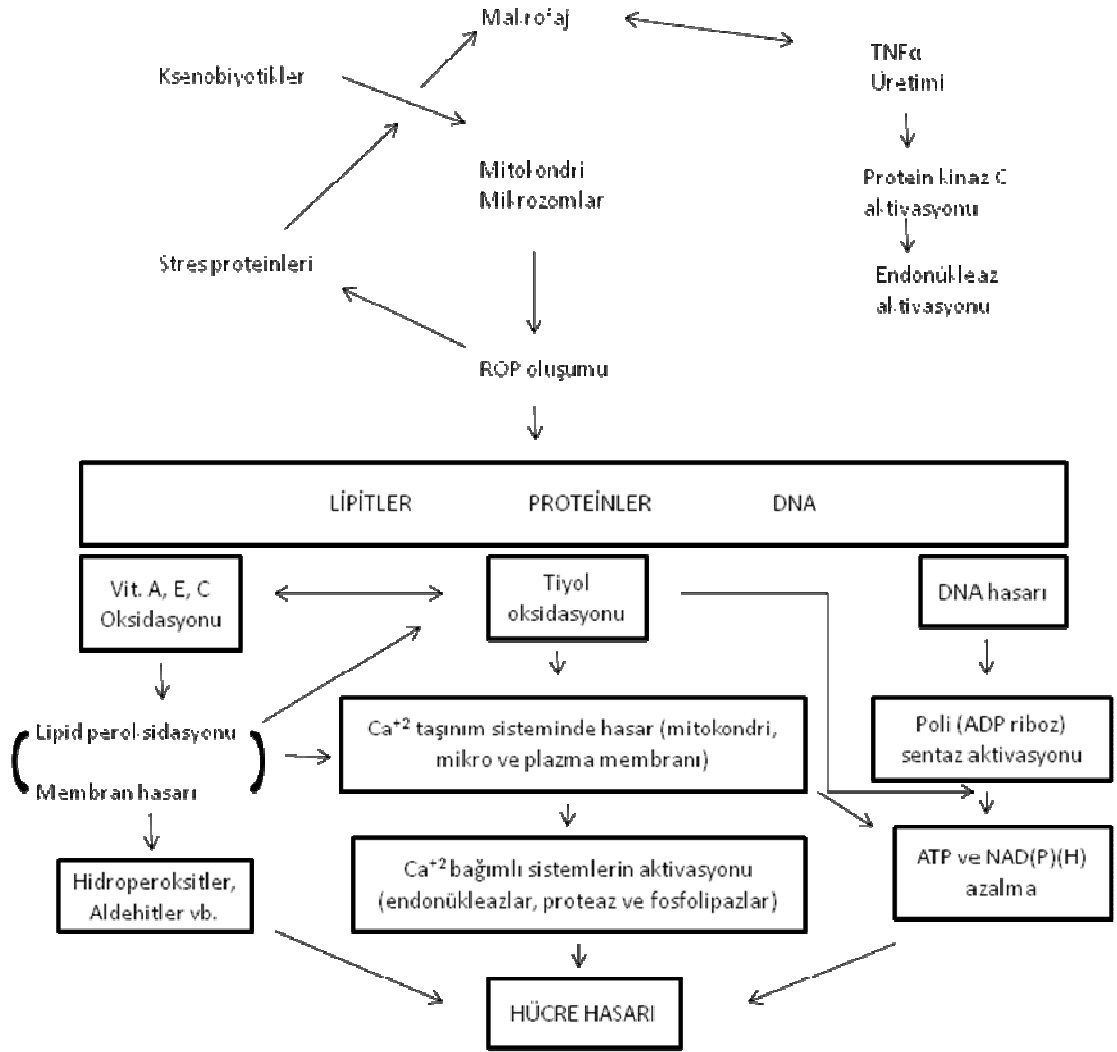
Çizelge 2.2 Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları

I. Normal biyolojik işlemler	1. Oksijenli solunum 2. Katabolik ve anabolik işlemler
II. Oksidatif stres yapıcı durumlar	1. İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksikasyon 2. Ksenobiyotik maddelerin etkisi a) İn hale edilenler b) Alışkanlık yapan maddeler c) İlaçlar 3. Oksidan enzimler a) Ksantin oksidaz b) İndolin dioksijenaz c) Triptofan dioksijenaz d) Galaktoz oksidaz e) Siklooksijenaz f) Lipooksijenaz, g) Monoamino oksidaz 4. Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 5. Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelial hücreler) 6. Uzun süreli metabolik hastalıklar 7. Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
III. Yaşlanma süreci	Yaş ilerledikçe, vücudun ROP üretimi artar.

Reaktif oksijen partiküllerinin başlıcaları; $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet-}$ ve H_2O_2 ' tir. Bunlardan organizma için en aktif, dolayısıyla en toksik olanı $OH^{\bullet-}$ 'dir. Gerçekte bir radikal olmayan, ancak metal iyonlarıyla $OH^{\bullet-}$ oluşumuna neden olan H_2O_2 'de radikal olarak nitelendirilir (Feldman vd. 1993, Marletta 1993, 1994, Auroma 1994, Halliwell 1997). Reaktif oksijen partiküllerinin organizma için yararlı görevlerinin olmasının yanı sıra, doku

harabiyetine yol açar. İskemi-perfüzyon hasarı, kanser, yaşlanma, eritrosit hasarları, solunum yetmezliği, astım, böbrek hasarları (nefrotik sendrom), karaciğer hasarı, romatizma, kardiyovasküler sistem bozuklukları (parkinson, ateroskleroz vb.) ve göz hasarlarına neden olabilir (Aruoma 1994).

Biyolojik sistemlerde ROP'ların oluşumu, başta nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofillerde savunma mekanizması için yararlı olduğu gibi, bazı biyokimyasal işlevlerin yerine getirilmesinde de enzimatik sistemlerin etki mekanizmaları ve denetiminde görev alırlar. Ancak proteinler, nükleik asitler ve DNA, karbohidratlar ve lipidler üzerine atak yapmaları nedeniyle bir çok hastalığın patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadırlar. Gerçekte bu bozuklukların pek çoğunun nedeni olmakla beraber, ROP'lar hasarlı dokuda hastalığın seyrinin ağırlaşmasında rol oynamaktadır (Şekil 2.2, Stohs ve Bagchi 1995).



Şekil 2.2 ROP ve doku hasarı arasındaki ilişki (Stohs ve Bagchi 1995)

Organizmada en sık oluşan ROP'lar lipid yapılarındadır. Doymamış yağ asitlerinin allil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve ROOH'lar oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır (Kour ve Perkins 1991). Lipid radikalleri yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir.

Son derece reaktif oksijen içerikli, normal aerobik solunum sırasında üretilen ROP hasarlarına karşı organizmada savunma sistemi gelişmiştir. Antioksidan savunma

sistemi olarak adlandırılan bu sistem, enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere ikiye ayrılır. Enzimatik sistemde, SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler, non-enzimatik sistemde A, E, C gibi vitaminler, metal bağlayan proteinler ile şelatörler, glutatyon gibi tiyol içeren bileşikler bulunmaktadır.

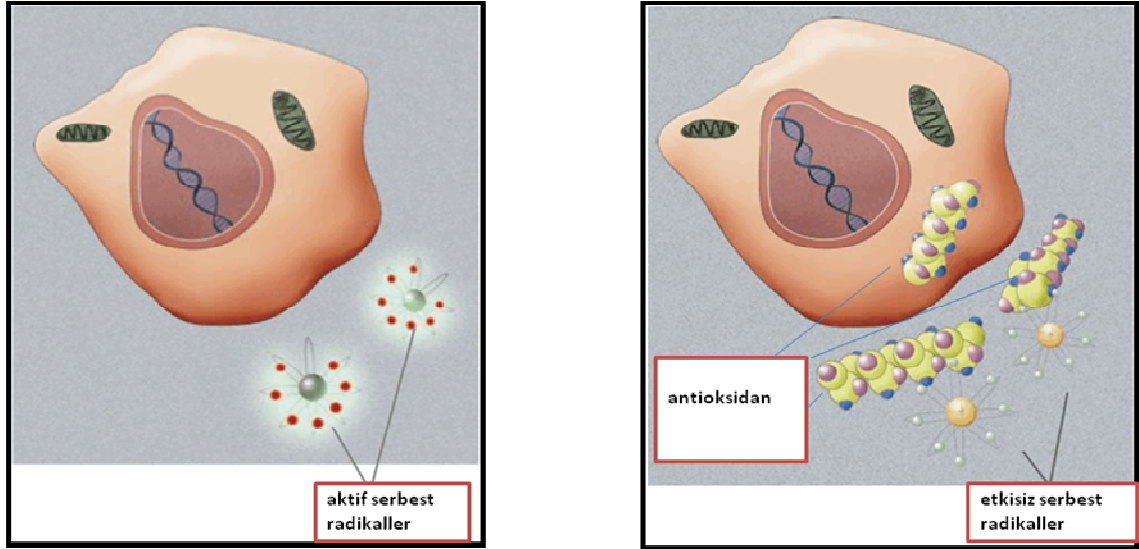
Belirli düzeyi aşmış ROP'lara doğrudan olarak etki edip onları inaktif hale getiren antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; glutatyon peroksidazda ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre dışı ortamda ise antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobulin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, P-karoten ve α -l antitripsin sorumludur (Halliwell 1991b).

Organizmada ROP düzeyi antioksidan sistemi ile kontrol altında tutulur (Şekil 2.3). Ancak, çevresel ve alışkanlıklardan kaynaklanan stresler (kirlilik, güneş ışığına maruz kalma, sigara içmek, alkol gibi) ya da antioksidan üretimindeki basit bir arıza serbest radikallerin artmasına neden olur, bu da oksidatif strese neden olur. Biyolojik sistemlerde, başta O_2 merkezli radikaller olmak üzere, ROP üretiminin kontrolünü yapan antioksidan dengesinin ROP lehine bozulması, oksidatif stres olarak tanımlanan durumun ortaya çıkmasına neden olur (Kehrer 1993).

Oksidanlar, belirli bir düzeyin üzerinde oluşması ya da antioksidanların yetersiz kaldığı oksidatif stres durumunda ve ROP'lar organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapısını bozarak, zararlı etkilere yol açarlar (Halliwell 1991b). Artmış ROP'ların zararları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, galaktoz oksidaz gibi enzimleri aktive ederler,

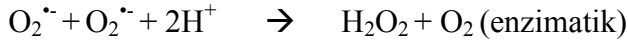
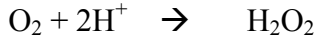
- Hücrenin potasyum kaybını artırır,
- Trombosit agregasyonunu artırır,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırır,
- Hücre dışındaki kollojen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.



Şekil 2.3 Antioksidanların ROP'ları tutarak etkisiz hale getirmesi

Antioksidan savunma sisteminin önemli bir üyesi McCord ve Fridovich (1969) tarafından rapor edilmiş ve $O_2^{\cdot-}$ dismutasyonunun SOD adını verdikleri bir enzimle gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Süperoksit radikali, moleküler O_2 'in π^* yörüngelerinden birine bir elektron girişi ile oluşur. Mitokondri membranındaki elektron taşıma sistemi, $O_2^{\cdot-}$ oluşturan en temel kaynaktır. Mitokondriyal SOD, mitokondride oluşan $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'e indirgenmesini katalize eder. Bunun yanında, mitokondriden sitoplazmaya bir miktar $O_2^{\cdot-}$ geçmektedir. Sitoplazmadaki $O_2^{\cdot-}$ ise, sitoplazmik SOD' un katalitik etkisiyle dismutasyona uğratılarak H_2O_2 'e çevrilmektedir. Mitokondri dışında O_2 kullanımı ve buna bağlı olarak $O_2^{\cdot-}$ oluşumu, oksidaz ve oksijenazlar tarafından katalize edilen bazı reaksiyonlar sonucunda meydana gelmektedir.

Hidrojen peroksit, iki elektron ile O₂'nin indirgenmesi sonucunda oluşan, biyolojik sistemlerde sıklıkla O₂^{••}'nin bulunduğu ortamlarda kendiliğinden ve yavaş olarak ya da SOD etkisiyle hızlı bir şekilde oluşur.



D-amino asit oksidaz, glukoz oksidaz, ürat oksidaz gibi bir çok enzim de O₂'e iki elektron vererek H₂O₂ oluşturabilir. Ortaklanmamış elektronu olmayan H₂O₂ hem zayıf bir yükseltgen hem de zayıf bir indirgendir. Ortamda geçiş metalleri yoksa oldukça karardır ve diğer ROP'lardan farklı olarak membranlardan kolaylıkla geçebilir. Ancak geçiş metalleri varlığında, kararlı olmasına rağmen kolaylıkla yıkılarak dokularda hızlı bir şekilde radikal hasarına yol açan OH[•] oluşturması nedeniyle H₂O₂, potansiyel bir ROP'tur. Aerobik hücrelerde H₂O₂ katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer peroksidazlar gibi antioksidan enzimlerle parçalanır (Halliwell 1997).

Son yıllarda oksijen radikalleri çalışmaları onların biyolojik moleküllerle zararlı etkileşimleri ve sinyal yollarında ilişkilerinden dolayı büyük ilgi çekmektedir. Süperoksit radikali insan vücudunda proteinler, DNA ve lipid yapılarına büyük hasar oluşturur. Bu radikal enzimatik reaksiyonların yan ürünü olarak sürekli üretilir (Fridovich 1978, Branda vd. 2004) ve oksidatif parçacıkların çoğalmasına yol açar. Kalp hastalıkları, kanser, nöronal bozulmalar gibi bazı önemli patolajilerde rol oynar (Leonard 2001, Liang ve Patel 2004).

Süperoksit radikali, biyolojik sistemlerde en fazla üretilen radikallerden biridir. Mitokondride, antioksidanın belirli bir türünün (askorbik asit, a-tokoferol, katekolaminler vb.) ya da antioksidan enzim (nitrik oksit sentaz ve NAD(P)H peroksidaz gibi) varlığında moleküler O₂'nin bir indirgenme ürünüdür. Süperoksit radikali genelde toksik olarak kabul edilir, çünkü biyolojik sistemler O₂^{••}'ni, RO[•], HO[•] ve ONOO[•] gibi diğer daha reaktif türler haline dönüştürebilir. Süperoksit radikal artışı

ile doğrudan ya da dolaylı hücre büyümesi, mutagenез ve hücre ölümünün bir inhibisyonu sonucu oluşur (Halliwell ve Gutteridge 1984, Kehrer 2000, Auché ve Rusnak 2002, Cepinskas vd. 2002, Afonso vd. 2007, Seifried vd. 2007).

Süperoksit radikali, hücresel stres yanıtlarını izlemek için kritik bir biyolojik belirteçtir (Xiaojun vd. 2008). Biyolojik modellerde $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonunun kantitatif tespiti, kısacık varlığı ve düşük konsantrasyon nedeniyle çok zordur. Süperoksit radikalının tayini için spektroskopik yöntemlerin tespiti için teknikler spektrofotometrik ölçüm (Haseloff vd. 1991), kemilüminesans metodu (Reichl vd. 2001) ve elektron spin rezonans spektroskopisi (Harbour ve Hair 1978) gibi dolaylı spektroskopik metodlar (Fridovich 1997) kullanılır. Ancak, bu teknikler kötü seçicilik veya duyarlılıkları ile eski tekniklerdir.

Radikal analizlerinin önemli bir sorunu, $O_2^{\bullet-}$ 'lerin O_2 ve H_2O_2 anlık dismutasyonları nedeniyle çok kısa yarı ömürlerinin olmasıdır (Fridowich 1972). Biyomoleküllerin radikal yüzünden zarar görmesi gibi dolaylı yaklaşımlarla beraber, kromatografi, EPR spin yakalaması, çeşitli boyamalar gibi teknikler radikallerin miktar belirtilmesinde kullanılmıştır (Chen vd. 2004).

2.2 İmmobilizasyon Metodları

Enzimlerin, teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlaması ile bilim adamları, enzimlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirilme olanaklarını araştırmaya yönelmişlerdir. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, hareketi sınırlandırmak demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin hareketleri sınırlandırılmıştır. “İmmobilize” terimi yerine “tutuklanmış”, “çözünmez hale getirilmiş”, “bağlanmış” gibi terimleri kullanmaktadır. İmmobilize enzim, genel bir isim olup, diğerleri yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedir.

Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanarak immobilize edilirler (Telefoncu 1997).

Enzimin üründen ayrılması daha kolaydır, multienzimli reaksiyon sistemleri geliştirilmiştir, dış etkilere karşı dayanıklıdır (Kim S-W). Bunların yanında immobilize enzimin serbest enzime göre üstünlüklerini daha açık bir şekilde şu şekilde sıralayabiliriz;

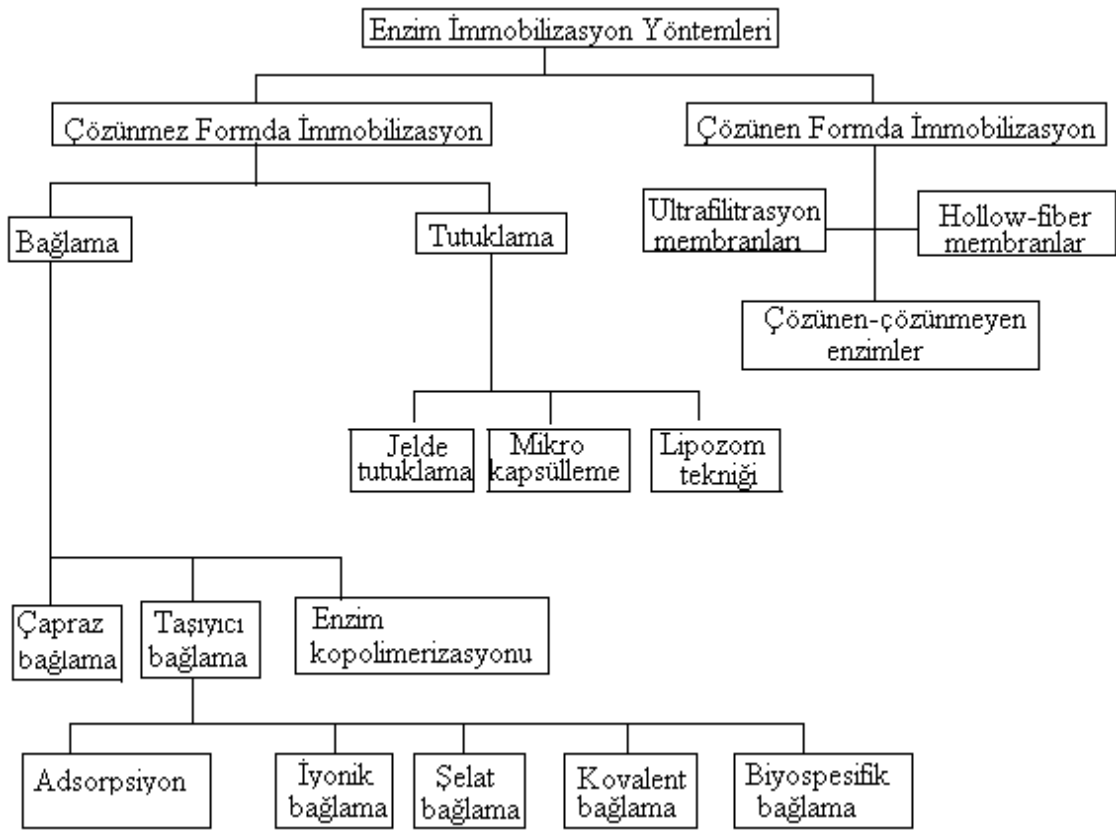
- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemler uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha karardır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcıda aranan özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Broun vd. 1978);

- Hidrofilik karakter,
- Gözenekli yapı,
- Suda çözünmeme,
- Mekanik kararlılık ve yeterli gözenek büyüklüğü,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,

- Rejenere olabilme,
- Ucuzluk,
- Zehirsizlik,
- Kovalent bağlamada kullanılacak olan taşıyıcılar uygun koşullarda reaksiyon verebilen, fonksiyonel gruplar taşımalıdır.

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber şekil 2.4’de verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 2.4 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1997)

Enzim immobilizasyon yöntemleri; çözünmez formda immobilizasyon ve çözünen formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

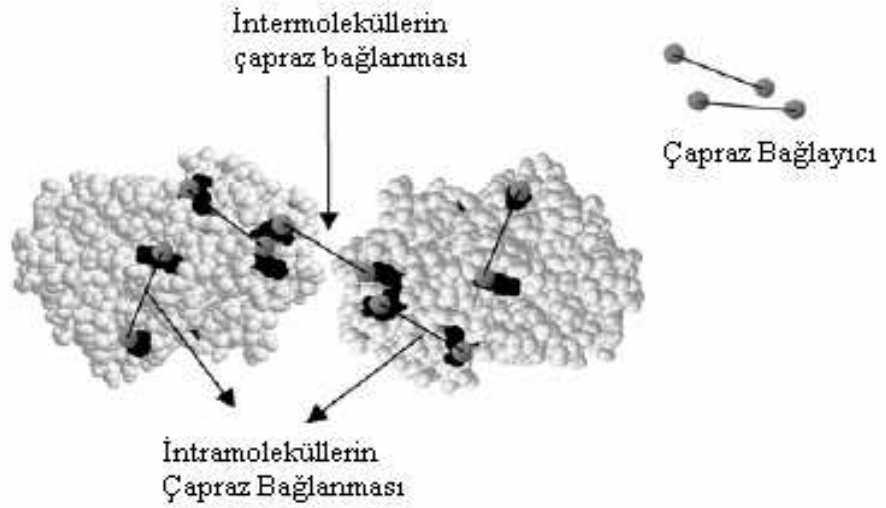
2.2.1 Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri, bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.2.1.1 Bağlama yöntemi

Çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Çapraz bağlamada küçük molekülü iki veya daha çok fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağ yapmaktadırlar (Chibata 1978), (Şekil 2.5).

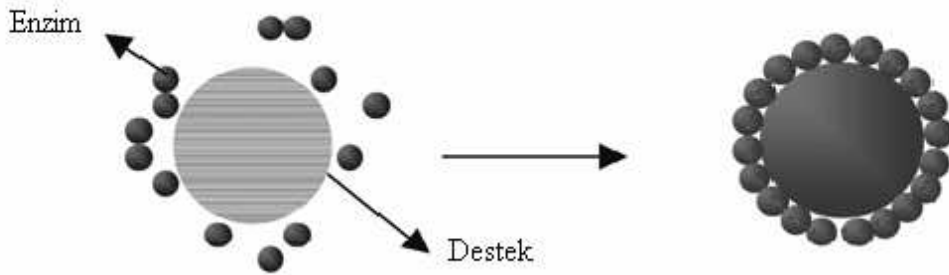


Şekil 2.5 Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Enzim kopolimerizasyonunda enzimler, bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır.

Taşıyıcıya bağlama ise kendi içinde adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır.

Adsorpsiyon, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak ortamdan uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.6).

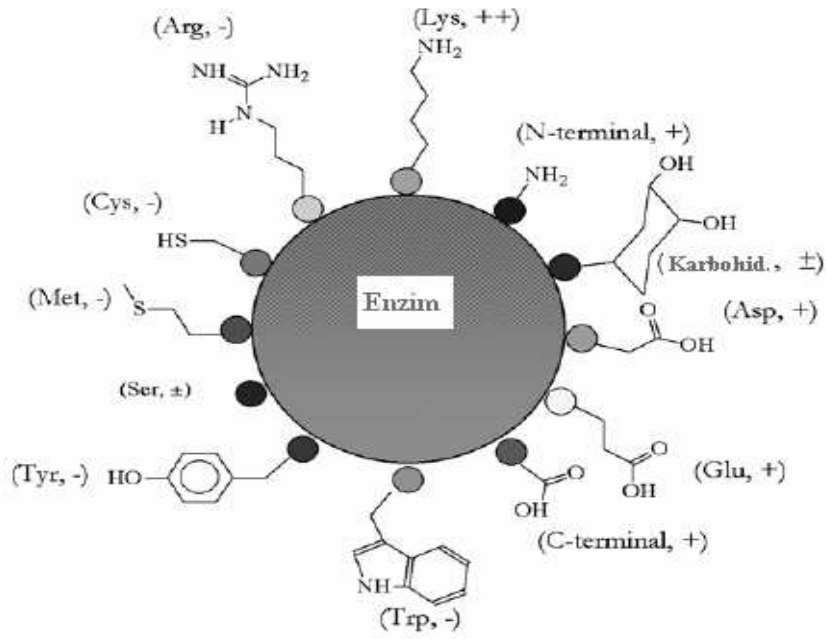


Şekil 2.6 Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması

İyonik bağlama, iyon değişirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanmasıdır (Wang 1993).

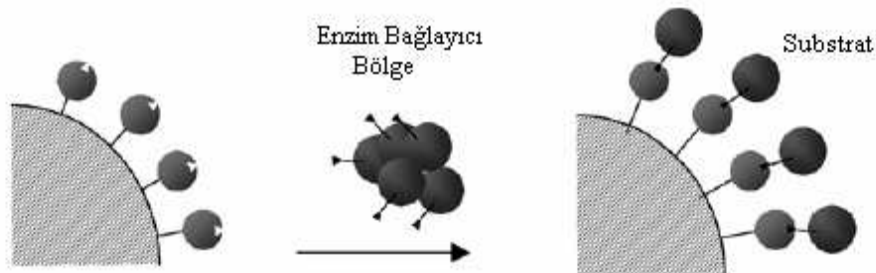
Şelat bağlama, bazı geçiş metallerinin (Titan (III), Titan (IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Kennedy vd. 1983).

Kovalent bağlamada enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması, enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Reaktif aminoasit kalıntıları: (+) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılır; (-) enzim immobilizasyonunda kullanılmaz; (±) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılmaz; (++) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılır.

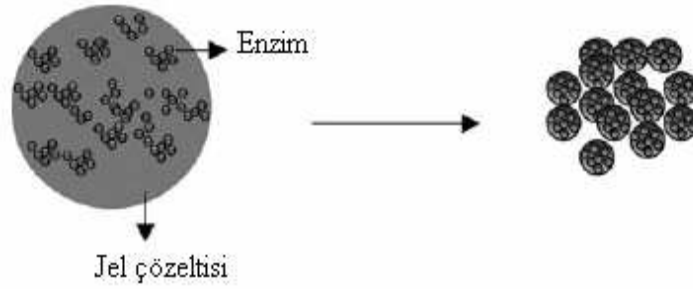
Biyospesifik bağlama yönteminde, enzimlerin antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden ile immobilizasyon yapılmaktadır (Telefoncu 1997), (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır.

2.2.1.2 Tutuklama yöntemi

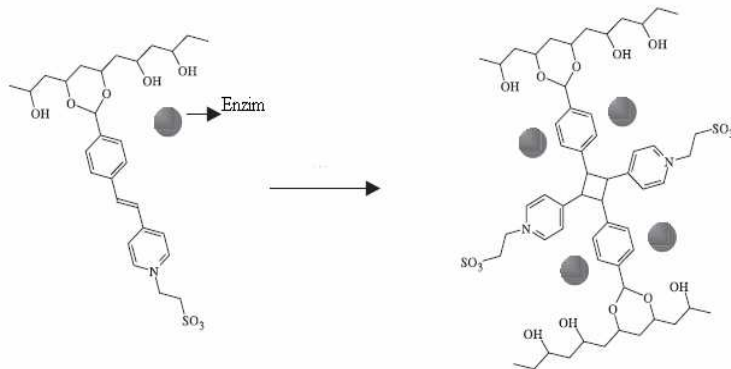
Enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde yapıldığı gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve misellerle de yapılabilir (Telefoncu 1997), (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

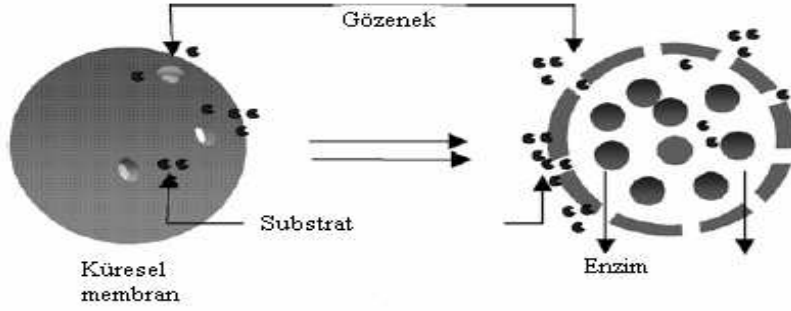
Tutuklama yöntemi polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir.

Polimer matrikse tutuklama, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan yapıda enzimin tutulmasıdır (Şekil 2.10).



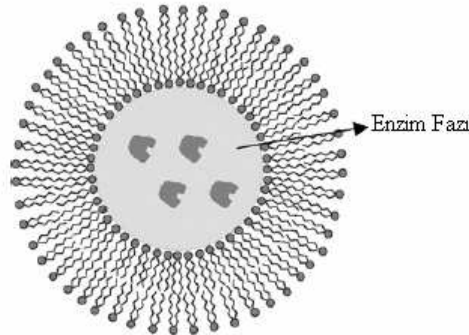
Şekil 2.10 Enzimin polimerler arasında tutuklanması

Mikrokapsülleme enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasıdır (Şekil 2.11). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına izin verecek büyüklükte olmalıdır (Chang 1976).



Şekil 2.11 Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

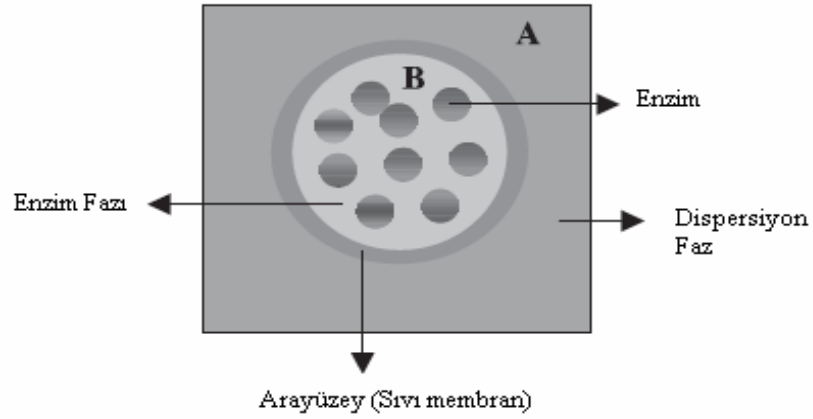
Lipozom tekniği sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir (Şekil 2.12). Oldukça büyük bir temas yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak verir. Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim sızıntısı olasılığı bulunmaktadır (Luisi ve Magid 1986).



Şekil 2.12 Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül

2.2.2 Çözünen formda immobilizasyon yöntemi

Enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok, yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı yöntemdir (Şekil 2.13). Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmemektedir. Ancak, substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalara rastlanmaktadır. Bu nedenle küçük molekülü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir (Wichmann vd. 1981).



Şekil 2.13 Çözünür formda immobilizasyon

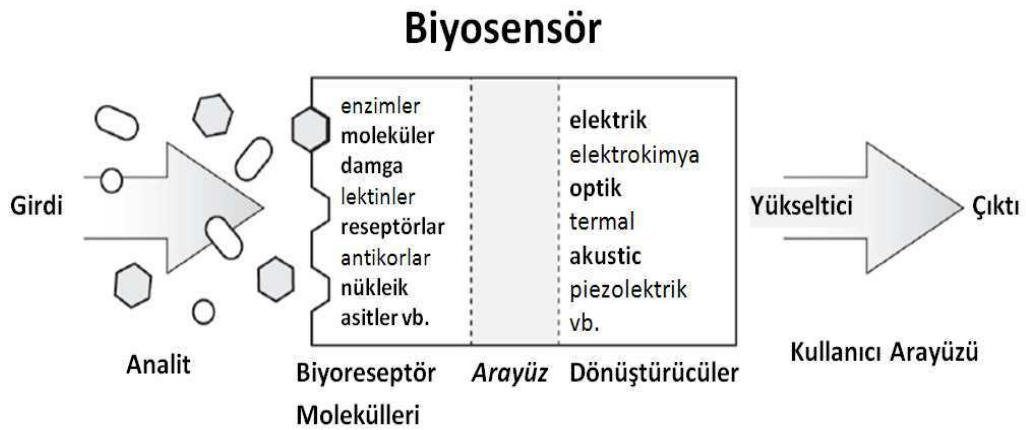
Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır:

- Yüksek kararlılık,
- Tekrar kullanılabilirlik,
- Sürekli üretime olanak vermesi,
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi,
- Yüksek saflık,
- Yüksek ürün yüzdesi,
- Ekonomik olması.

2.3 Biyosensörler

Bir cihaz veya sistem olarak tanımlanan biyosensör, sinyal oluşturan bir aygıt veya sistemdir. Biyosensör terimini ilk defa Clark ve Lyons (1962) ifade etmişlerdir. Enzim-elektrot kompleksini imal eden ikili, bu kompleksi glikoz sensörü olarak kullanmışlardır. Sensör, oksido-reduktaz enzim olan glikoz oksidazın Pt elektroduna immobilize olmasından ibarettir. Platin elektrot enzim tarafından üretilen H_2O_2 tarafından +0.6 V'da polarize olur. Basitçe bu prensibe göre çalışan tarihin ilk biyosensörü 1974 yılında piyasada Yellow Springs Instrument (YSI) olarak görülmüştür.

Biyosensörlerde immobilize edilmiş biyolojik/biyokimyasal bileşenler ölçümü yapılacak analitle etkileşir, uygun bir dönüştürücü aracılığıyla, analit miktarı veya analit aktivitesi ile orantılı sinyal oluşturur (Şekil 2.14). Algılama etkileşimleri; antikorlar, DNA problemleri veya doğal hücre reseptörleriyle bağlanmayla veya enzimler, organeller, tam hücreler, dokular veya tam organ aracılığıyla oluşturulan reaksiyonlarla gerçekleştirilebilir (Ziegler ve Gopel 1998, Hill ve Davis 1999).



Şekil 2.14 Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması (Velasco-Garcia ve Mottram 2003)

Biyosensörler; bakteri, safra asitleri, kan gazları, kolesterol, kolin, kreatinin, DNA, etanol, in vivo glukoz, heparin, homosistein, laktat, üre ve toksik metaller ölçümü gibi birçok klinik uygulamada yararlıdır (Pandey ve Weetall 1994, Wang 1995, Morgan vd. 1996, Ramanathan vd. 1997, Billard ve DuBow 1998, Durst ve Siggaard-Anderson 1999).

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler aşağıdaki şekilde inceleyebiliriz (Hall 1990).

- Seçicilik; ideal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. İdeal bir biyosensörün sadece hedef reaktifin konsantrasyon değişimlerine cevap vermesi, diğer kimyasal taneciklerden etkilenmemesi gerekmektedir. Girişim veren taneciklerin konsantrasyonundan kaynaklanan sinyaller ile hatalı reaktif ölçümleri elde edilebilmektedir. Girişimin olduğu durumlarda numune baska kimyasal ileticilerle ölçülmeli ve biyosensör sinyali düzeltilmelidir.
- Kullanım ömrü; biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir. Biyokomponentlerin kararlılıkları oldukça düşüktür. Normal çalışma ortamında bir biyosensörün duyarlılığını koruması en önemli özelliğidir. Bir biyosensörün ömrü, yapılan ölçümlerin sayısı veya ölçülen reaktifin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Yüksek konsantrasyonlar, duyarlılıkta daha çabuk düşüşe neden olmaktadır. Saklama koşulları son derece önemlidir. Belirli sıcaklıklarda saklanması gerekmektedir.
- Kalibrasyon gereksinmesi; ideal bir biyosensörün en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler. İdeal bir biyosensör, hedef reaktifin bilinen değişik konsantrasyonlarını içeren standart

çözeltiler ile kolaylıkla kalibre edilebilmelidir. Beklenen değerin dışarıda olmasını önlemek için kalibrasyon aralığının belirlenmesi gerekmektedir.

- Tekrarlanabilirlik; ideal bir biyosensör için, elektrotun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamaları da o kadar iyi olur.
- Kararlılık; elektrot kararlılığının yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Isı, pH, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.
- Duyarlılık; biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindendir. Biyosensörlerin duyarlılığı, elektrot yüzeyinde oksit oluşumu, protein veya bazı kimyasal maddelerin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu gibi faktörlerden dolayı azalabilir. Spesifik kimyasal taneciklerin konsantrasyonundaki değışime bağlı olarak biyosensörün sinyalinin yükselişindeki kararlı hal değışimi olarak tanımlanır. İdeal biyosensör duyarlılığının, kullanım süresi boyunca sabit kalması ve ileticinin sinyalinin elektronik aletler tarafından kolay algılanabilmesi için yeteri kadar yüksek olması gerekmektedir.
- Doğrusallık; ideal bir biyosensörün, sıfırdan maksimum substrat konsantrasyonuna kadar olan aralıkta sabit bir duyarlılığı olmalıdır. Pratikte, doğrusal bölge dar bir substrat konsantrasyonu ile sınırlıdır. İki nokta kalibrasyonu, ölçümlerin güvenilir ve tam doğru olarak substrat konsantrasyonlarına çevrilebilmesini sağlayacak şekilde doğrusal aralığın herhangi bir yerinde yapılabilir.

- Tayin sınırı; tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir. Bir biyosensör, çok düşük substrat konsantrasyonlarına cevap vermelidir. Pratikte kullanılan elektrokimyasal ileticilerin diğer iyonlardan ve yüzey reaksiyonlarından etkilenmesinden dolayı düşük olması gereken tayin sınırı yükselmektedir. Biyosensörün kullanılabilir olması için, belirlenen reaktif konsantrasyon aralığında tayin edilebilir olmalıdır.
- Taban sinyali; biyosensörlerde genellikle bir taban sinyali bulunmaktadır. Taban sinyali, biyosensörlerde düşük tayin sınırının doğru olarak tespit edilmesini güçleştirmektedir. Akım sızıntısı, elektronik cihazdaki küçük bir potansiyel değişimi, biyosensörün telindeki metal-metal etkileşimi ve elektrokimyasal faktörler taban sinyalinden sorumlu olabilmektedir.

$$\text{Sinyal} = \text{Sinyal}_{\text{ölçülen}} - \text{Sinyal}_{\text{taban}}$$

- Ölçüm aralığı; biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığıdır.
- Cevap zamanı; bir biyosensör elektrotunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin, elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun, tersi durumda ise cevap zamanı kısadır.
- Histerisis; ölçümler sırasında lokal kimyasal çevrenin değişmesi veya enerji adsorplanması, sonraki ölçümleri etkileyebilmektedir. Yüksek reaktif konsantrasyonunda yapılan ölçümler, sensörün elektroliz çözeltisinin pH'ının değişmesine neden olabilmektedir. Çözelti tamponlanmadığı takdirde, düşük analit konsantrasyonunda yapılacak bir sonraki çalışma etkilenecektir. Enzim aktivitesi pH dan etkilendiğinden özellikle enzim bazlı biyosensörlerde bu problem olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerde reaktifin biyosensöre difüzyon

olasılığı bulunmaktadır. İkinci ölçüm düşük konsantrasyonda yapıldığında biyosensörde birikmiş reaktif, numune ile dengeye gelinceye kadar difüze olacaktır. Numunenin hacmi küçük ise son yatışkan hal üzerinde büyük etkisi olmaktadır. İdeal bir biyosensör önceki ölçümlerden etkilenmemeli ve sıfır histerisise sahip olmalıdır.

- Geriye dönme zamanı; çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. İlk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlemleniyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.
- Sıcaklık; difüzyon katsayıları, sıvıların kimyasal çözünürlüğü gibi fiziksel özellikler ve biyosensörün yapımında kullanılan materyaller sıcaklık ile değişmektedir. Enzim katalizli reaksiyonların hızları sıcaklığa çok duyarlıdır ve bazı kimyasal reaksiyonların sonucunda oluşan ısı, biyosensörün sıcaklığını değiştirmektedir.
- Basitlik ve ucuzluk; tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir.
- Biyoyumluluk; tıbbi uygulamalarda kullanılacak biyosensörler için son derece önemlidir. Hastalık tedavisinde ve insan vücuduna biyosensör implantasyonlarında önem kazanmaktadır. Kan akımına doğrudan daldırılan biyosensörlerin kanın pıhtılaşmasına neden olmaması gerekir. Biyoyumlu materyallerin sterilizasyonu ileticinin duyarlılığını etkilemeden ve biyokomponentin biyolojik aktivitesini bozmadan yapılabilmesi gerekmektedir.
- Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik; elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

2.3.1 Biyoreseptörler

Biyoreseptör bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır. Temel olarak biyoreseptörler 3 grup (biyokatalitik, biyoafinite ve hibrit reseptörleri) altında toplanırlar (Mehrvar vd. 2000).

Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen şekilde belirlenebilir şekle çevirerek dönüştürücülerle kaydedilebilir ve belirlenebilir hale getirir. Biyokatalitik tanıma elementleri; enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşur (Mello ve Kubota 2002). Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir.

Antikorlar, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoafinite reseptörlerine örnektir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler, tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer bir çok protein gibi maddelerin belirlenmesi ve ölçümü, immunolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlarda bile başarılabilmektedir (Mehrvar vd. 2000). Afinite bazlı biyosensörler belirli bir ligantı termodinamik olarak kararlı kompleks şekline dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar (Mello ve Kubota 2002).

Hibrit reseptörlerde biyosensör uygulamalarında, nükleik asit kullanımı rapor edilmiştir. Bazı parça karakteristiklerinden dolayı nükleik asitler seçici bir şekilde çalışmaktadırlar. Bu sensörlerin kullanım alanları DNA’da oluşan zararları kimyasal olarak belirleme ve DNA’ nın türe özgü diziliminin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir (Mehrvar vd. 2000).

DNA biyosensörler, DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. İşlemin ilk basamağında, hedef diziye karşılık gelen kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik oligomerin (tek

sarmal DNA, prob) elektrot yüzeyine bağlanmasıdır. Daha sonra biyosensör, hedef çözeltiye daldırılır ve elektrot yüzeyinde hibrit oluşumu sağlanır. Hibridizasyon, elektrokimyasal veya optik bir dönüştürücü sinyali ile gözlemlenir (Özsöz 2005).

2.3.2 Dönüştürücü çeşitleri ve özellikleri

Dönüştürme işlemlerinde, elektrokimyasal ölçüm teknikleri yanında optik, kütle ve ısı ölçümleri gibi dönüştürme mekanizmaları kullanılır.

2.3.2.1 Geleneksel dönüştürücüler

Geleneksel dönüştürücüler 3 çeşittir. Bunlar; H_2O_2 veya O_2 ölçümlerine odaklanan amperometre, pH veya iyon ölçümleri yapan potansiyometre ve fiber optik kablo kullanan fotometrelerden oluşur. Biyotanıma reaksiyonları genelde kimyasal ürünler üretir ve elektrokimyasal metotlarla kolayca tayin edilebilirler. H_2O_2 (veya reaktif O_2) bir çift elektrot ile ölçülebilir. Referans elektrotun (Ag/AgCl veya kalomel) karşısında olan elektrota uygun bir voltaj uygulanarak hedef moleküller olan H_2O_2 veya O_2 elektrotta yükseltgenir, bir akım oluşur ve oluşan bu akım amperometre ile algılanır. Potansiyometre ise bir membranın iki tarafındaki H^+ farkına bakarak çalışır. Fotometre, oluşan ışığı sinyal olarak algılar. Fiber optik kablolar oluşan bu ışığı yönlendirmede kullanılırlar (Gooding 2006).

2.3.2.2 Piezoelektrik dönüştürücüler

Piezoelektrik materyalleri ve yüzey akustik dalga cihazları kütle değişimine karşı hassas bir ortam sunar. Bu tip dönüştürücüler, biyoreseptörde tanıma reaksiyonu sonrasında kütle artışı olduğu durumlarda kullanılır. Piezoelektrik silikon kristalleri pikogramlık kütle değişimlerini hissedebilmektedirler. Kuartz kristal mikrobalslara sabitlenen antikorların antijenleriyle karşılaşmalarıyla oluşacak kütle değişimi algılanıp dijitalize edilir.

2.3.2.3 İletken dönüştürücüler

Çözelti iletkenliğindeki değişimler bir reaksiyonun hızını belirlemede kullanılabilir. Oluşan iyonların yaptığı hareket sonucu iletkenlikteki değişimlere dayanan bu teknik bir çok enzim reaksiyon hızlarının ölçülmesinde kullanılmaktadır.

2.3.2.4 Elektrik kapasitans dönüştürücüleri

Kapasitans ölçüm metodunu kullanan bir dönüştürücüdür. İki farklı elektrotlu levha üzerine antikorlar immobilize edildiğinde bir antijen-antikor reaksiyonu oluşacak ve sonuçta iki levha arasındaki ortamın dielektrik sabitinde meydana gelen değişim tayin edilir.

2.3.2.5 Termometrik dönüştürücüler

Bazı biyotanımlama reaksiyonları sırasında ortam sıcaklığı değişir. Bu değişim sayesinde reaksiyon dolayısıyla analit varlığı hakkında yorum yapılabilir. ATP'nin hidrolizlenmesinde veya antijen-antikor kompleksi oluşumları sırasında ortam sıcaklığı değişir.

2.3.2.6 FET tipi dönüştürücüler

İyon konsantrasyonlarındaki değişimi algılayabilen FET'ler oldukça kullanışlıdır (ing: field effect transistors: alan etkili transistörler) (Gooding 2006).

2.4 Enzim Sensörleri

Son yıllarda enzim temelli biyosensörlerin önemi yüksek seçicilik, hızlı yanıt ve düşük maliyetinden dolayı artmıştır (Choi 2004). Enzimatik biyosensörlerin yapısı basit tek

enzimden multienzim sistemlerine değişir. Genellikle, enzimatik reaksiyonda elde edilen ürünler doğrudan bir dönüştürücü ile tayin edilemez ya da ürünü tanımak için geliştirilen dönüştürücü ile seçiliği ve duyarlılığı tayin edilemez. Bundan dolayı, bir enzim türünden fazla kullanım önemli ölçüde çok sayıda biyolojik substratın tayini için biyosensörün uygulanabilir aralığını genişletir, ama temel yapılandırılmalarına göre bu cihazların üretimi daha karmaşıktır (Wollenberger vd. 1993).

Aynı sol-jel matriks içine multienzimatik hapsedme, ardışık reaksiyonların oluşmasına izin verir, araçların ve analitlerin enzimlerin aktif bölgelerine yakınlığı nedeniyle yüksek dönüşüm verimine neden olur (Jin ve Brennan 2002). Enzim biyosensörlerinin çeşitli tipleri iki enzim sol-jel immobilizasyonuna dayalı olarak geliştirilmiştir (Martinez-Perez vd. 2003, Pastor vd. 2004, Cui vd. 2007, Singh vd. 2007).

Biyosensörlerde elektrokimyasal temelli metodlar, özellikle $O_2^{\bullet-}$ radikalinin eş zamanlı hassas tayini için uygundur. Bu yöntemler klasik olarak ya SOD ya da sitokrom c (sit-c)'ye dayanmaktadır. İlki, elektrot yüzeyinde H_2O_2 'in elektrooksidasyonunun tespitininin ardından, H_2O_2 oluşturmak için SOD tarafından $O_2^{\bullet-}$ 'nin spesifik dismutasyonuna dayanmaktadır. İkinci grup, altın elektrot üzerine immobilize edilmiş sit-c'nin $O_2^{\bullet-}$ tarafından azaltılmasına ve ardından elektrot yüzeyinde proteinin reoksidasyonuna dayanmaktadır. Çoğunlukla, $O_2^{\bullet-}$ çözeltide KsOD/hipoksantin (HKs) sistemi kullanılarak enzimatik olarak üretilir. Böylece, elde edilen oksidasyon eğimi $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olur. Altın elektrotları yapılandırmak için çoğunlukla kullanılan kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (Self Assembly Monolayers, SAM) kullanılarak uzun zincirli alkanetiyoller elektrot ile sit-c arasındaki etkinliği arttırmıştır (Cortina-Puig vd. 2009).

Serbest radikaller ve antioksidanların tayini, yiyecek teknolojisi ve insan sağlığı alanında geniş olarak incelenmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler, hızlı, maliyeti düşük ve basit operasyon protokolüne dayalı umut verici materyallerdir. Tıp alanında temel amacı serbest radikalleri kovucu bazı bileşiklerin ölçümü, gıda sanayisinde ise bu bileşikleri tayin etmek ve miktarını belirlemektir. Bu anlamda antioksidan etkisinde iki

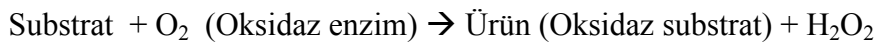
farklı biyosensör çeşidi sunulmuştur. Birincisi, mono ve polifenol (yiyeceklerdeki antioksidan bileşiklerini ifade eden bileşikler) tayini için tirozinaz, lakkaz ya da peroksidaz gibi enzim temelli değişik amperometrik biyosensörler geliştirilmiştir (Mello ve Kubota 2002). İkincisi, antioksidan kapasitesini değerlendirmek için biyosensörler serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırma temellidir. Bu amaç için geliştirilen bütün biyosensörler elektrokimyasal olup yapılarında ROP kullanırlar.

Radikallerin üretildiği bir örnekteki antioksidan maddelerin varlığı onların bozulmasını gerektirir. Onun için, farklı bileşiklerin antioksidan kapasitesinin ölçümü reaksiyon ortamındaki ROP konsantrasyonunun değişimi dikkate alınarak saptanabilir.

Antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinde, $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ölçümüne dayalı, sit-c ve SOD içeren iki çeşit biyosensör geliştirilmiştir. Sit-c temelli biyosensörler seçicilikte yeterli değildir. Bu proteinin $O_2^{\bullet-}$ için seçici olmaması ve biyolojik sistemde endojen olarak eşlik eden H_2O_2 'yu azaltan doğal peroksidaz özelliği ile gerçek örneklerdeki $O_2^{\bullet-}$ 'nin tayini için uygulamaları büyük ölçüde sınırlanır. SOD temelli biyosensörler ise çok daha duyarlı ve spesifiktir.

Amperometrik enzim biyosensöründe montaj için genellikle oksidaz enzimler kullanır ve H_2O_2 oluşur. Oksijen tüketimi (Clark ve Lyons 1962) ve H_2O_2 üretiminin (Updike ve Hicks 1967, Harrison vd. 1988) ölçülmesi enzimin substratının başlangıç konsantrasyonu ile orantılıdır.

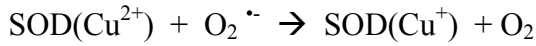
Son yıllarda O_2 azalması yerine, büyük ölçüde H_2O_2 ölçümüne dayalı yöntemler tercih edilmiştir. Hidrojen peroksit, oksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon yan ürünüdür.



H_2O_2 ' in doğrudan amperometrik tayini sadece 0.6 V'da Ag/AgCl'e karşı mümkündür. Bu potansiyelde, askorbat, bilirubin, üre gibi kolayca okside olan bileşiklerin varlığı,

H₂O₂ ile beraber okside olarak girişim vermektedir (Scheller vd. 1987). Başlangıçta, girişimleri ortadan kaldırmak için yeterli bir cut-off membrandan yapılmış koruyucu bir tabaka kullanılmıştır. Ancak bu uzun hazırlanma ve difüzyon bariyeri gibi sorunlara neden olmuştur. Bu sorunu aşmak için, ya enzimin aktif bölgesine tekrar oksidasyonu mümkün ya da ürünlerden birinin oksidasyonunu sağlayan bir aracı kullanılması önerilmiştir. Duyarlı, kararlı, tekrarlanabilir ve girişimsiz H₂O₂ aracısının optimizasyonu, biyosensör geliştirilmesinde bir sorun oluşturmaktadır. Böyle bir tabakanın geliştirilmesi, ilginin analite spesifik bir oksidaz enziminin immobilizasyonu için iyi bir zemin sağlayacaktır.

Süperoksit dismutaz biyosensörleri, antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için, sit-c biyosensörlerine alternatif umut verici olarak gösterilmiştir. SOD enzimi, ROP'lardan oksidatif zararlara karşı hücre koruma mekanizmasında bulunurlar. Spesifik olarak yükseltgenme/indirgenme elektron transfer mekanizması döngüsü üzerinden O₂ ve H₂O₂ üreterek O₂^{•-}'nin dismutasyonunu katalizler.



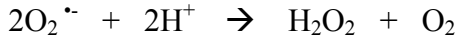
Süperoksit radikalının yüksek reaktivliği, doğrudan tayinini sınırlaması enzimatik olarak üretilen, O₂ ya da H₂O₂'nin amperometrik dönüştürücüler ile kolayca tayin edilebilen yapıların daha hassas ölçümü öne sürmektedir. Seçiciliği geliştirmek için, H₂O₂'yi geçirmeyen teflon membran ya da O₂^{•-}'nin eş zamanlı tayini ve iki kanal sensörlü H₂O₂ gibi farklı yaklaşımlar tasarlanmıştır (Lvovich ve Scheeline 1997).

2.5 Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat, Taşıyıcı ve Çapraz Bağlayıcı Özellikleri

2.5.1 Enzim

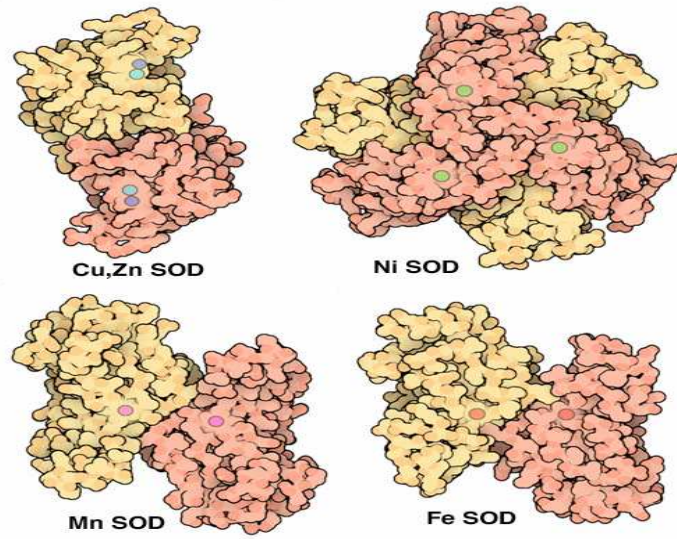
Reaktif oksijen partikülleri, normal oksijenli solunum sırasında üretilir. Lipidler, proteinler ve DNA gibi hücre içi yapılarla reaksiyona girerek, onlara zarar verip oksidatif strese neden olurlar. Bu yüzden, ROP düzeyi vücut antioksidan savunma sistemi ile kontrol altında tutulurlar. Bu savunma sisteminin önemli bir üyesi McCord ve Fridovich (1969) tarafından rapor edilmiştir, $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonunun SOD adını verdikleri bir enzimle gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

Süperoksit dismutazlar, $10^9 M^{-1} s^{-1}$ değerlerine varan yüksek hız sabitleri ve $O_2^{\bullet-}$ 'ne olağanüstü seçicilikleriyle tanınırlar (Bertini vd. 1998). Diğer moleküllerle hiçbir yan etki bugüne kadar rapor edilmemiştir. Süperoksit dismutaz, $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 'e ve O_2 'e dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Hidrojen peroksit, katalaz ve peroksidaz gibi diğer enzimler tarafından daha zararsız bir ürüne dönüştürülür.



Yüksek reaksiyon oranı ve özgülüğünden dolayı SOD enzimi, elektrokimyasal biyosensörlerde $O_2^{\bullet-}$ 'nin hassas miktarı için çok yüksek potansiyele sahiptir. Protein SOD, oksijen radikallerine karşı biyolojik savunma mekanizmasının bir parçasıdır (McCord ve Fridowich 1969, Fridowich 1972) ve oksijenle bağlantılı bütün organizmalar için hayati olduğu kanıtlanmıştır. SOD'lar metaloenzimlerdir, katalitik metal iyonlarının birbirini izleyen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonları sayesinde, $O_2^{\bullet-}$ 'in O_2 ve H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizlerler (katalaz ve peroksidazla da ortadan kaldırılan) (Fridowich 1972).

Süperoksit dismutaz yaşamın her biçiminde vardır. Cu-ZnSOD, NiSOD, MnSOD ve FeSOD olmak üzere 4 farklı metal merkezli çeşidi tayin edilmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Farklı metal merkezli SOD çeşitleri

Bakteri ve mantarlarda oksijenli gelişim ve sabit durumun devamında Cu-ZnSOD çok önemli rol oynamaktadır (Alina vd. 2010). Bitkilerin, diğer organizmalardan farklı olarak Cu-ZnSOD'un birden fazla şekline sahip olduğu bulunmuştur. Bunlar kloroplastik ve sitozolik SOD olmak üzere 2 ana alt gruba ayrılmıştır (Fink ve Scandalios 2002).

MnSOD prokaryotlarda ve ökaryotlarda, mitokondride meydana gelirken FeSOD genellikle prokaryotlarda ve kloroplastlarda bulunur. Mitokondriyal konumu nedeniyle MnSOD yaşam için vazgeçilmezdir. Çünkü, mitokondriyal solunum sırasında hemen yok edilmesi gereken, önemli miktarda $O_2^{\cdot -}$ oluşumuna neden olmaktadır (Paul vd. 2007).

NiSOD şimdiye kadar sadece siyanobakteri ve straptomislerde karakterize edilmiştir ve bu yüzden pek bir bilgi mevcut değildir (Palenik vd. 2003).

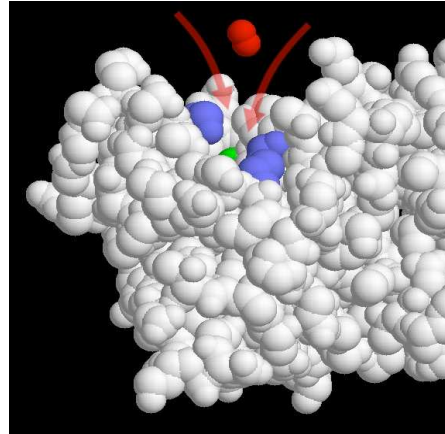
Cu-ZnSOD genellikle homodimeriktir ve farklı organizmalarda, farklı yerlerde bulunurlar. Bakterilerin periplazmalarında, bitkilerin sitoplazma ve kloroplastlarında, hayvanların çekirdek, lizozom, peroksizom, sitozol, ve hücre dışı ortam gibi çeşitli

bölgelerinde bulunur. Çeşitli yerlerde SOD varlığı, $O_2^{\bullet-}$ 'nin membrandan geçemeyeceğini ve nerede üretildiye orada detoksifiye edilmesi gerektiğini gösterir (Bafana vd. 2011).

İnsanda SOD'un 2 izomeri vardır. Bunlar; sitozolde bulunan Cu-ZnSOD ve mitokondrial MnSOD'dur.

Çok etkin bir enzim olan Cu-ZnSOD enziminin yapısına baktığımızda, aktif bölgenin enzim yüzeyinin sadece küçük bir bölümünü kapsamasına rağmen araştırmacılar, süperoksit ve enzim arasındaki her 10 çarpışmadan birinin bir reaksiyona yol açacağını belirlemişlerdir.

Aktif bölgenin şekli ve özellikleri, bu etkinlik için bazı ipuçları vermiştir (Şekil 2.16). Aktif bölge tabanında Cu ve Zn (yeşil renk) ile huni şeklindedir. Metal iyonlarının güçlü pozitif yükü, yakınında iki pozitif yüklü aminoasit (mavi renk) ile beraber negatif yüklü $O_2^{\bullet-}$ 'ni (kırmızı renkte) huni içine çekmek için görev yapar. Aktif bölgedeki Cu iyonu, katalitik reaksiyondan sorumluyken, Zn iyonu proteinin doğru katlanması ve kararlılığı için önemli olduğu gösterilmiştir (Banci vd. 2002).

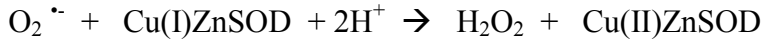
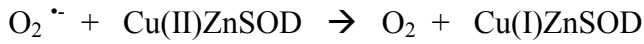


Şekil 2.16 SOD enziminin yapısı

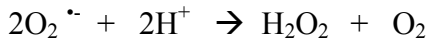
Enzim, oksijeni metabolize eden hücreleri, $O_2^{\bullet-}$ 'nin lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerinden koruma görevini üstlenir. Ayrıca SOD, immün sistemde fagosit edilmiş zararlı bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD enziminin ekstraselüler aktivitesi düşüktür.

Cu-ZnSOD'un doğrudan elektrokimyası, promotor-modifiye elektrotlar ve biyosensör yapımı için Cu-ZnSOD'un kullanımını ön plana çıkarmıştır (Tian vd. 2002, Ohsaka vd. 2002, Ge vd. 2003, Tian vd. 2004).

Cu-ZnSOD'un $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu iki basamaklı reaksiyon üzerinden devam eder. Bakır iyonu iki oksidasyon hali, Cu(I) ve Cu(II), arasında değişmektedir.

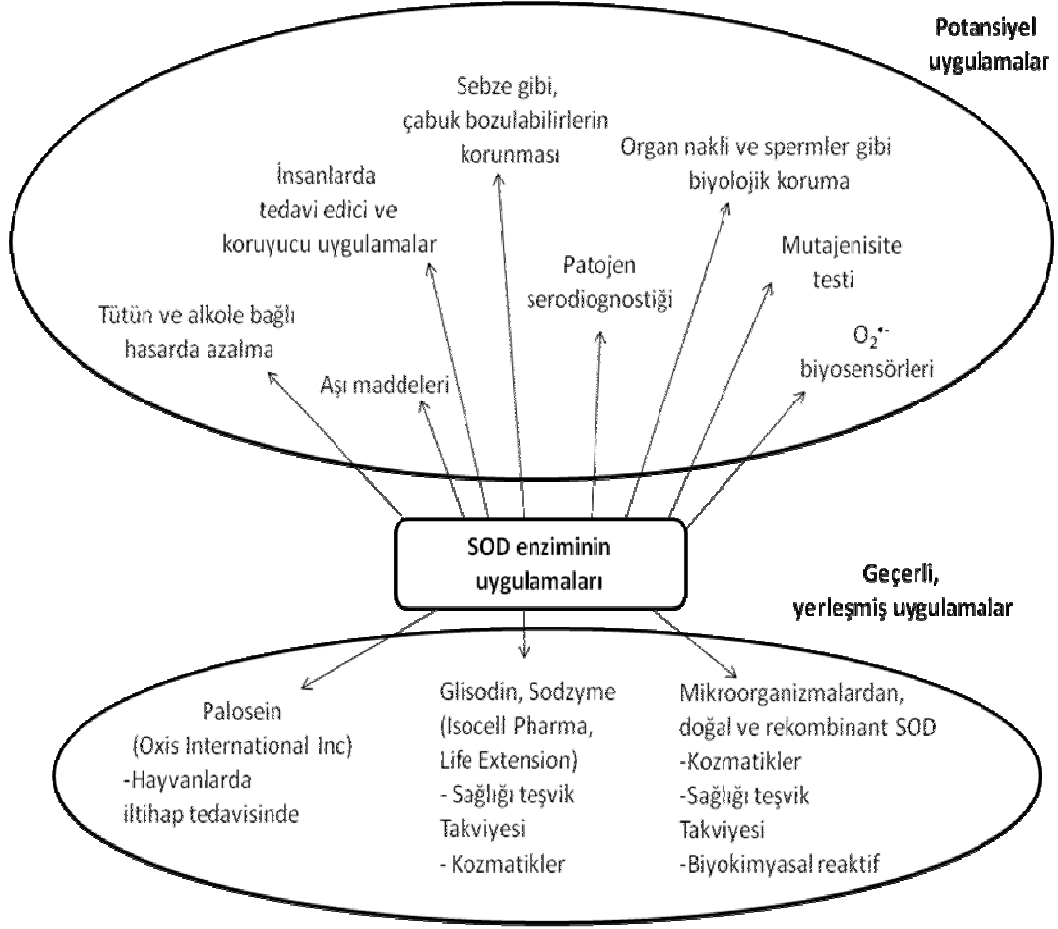


Genel bir reaksiyon stokimetrisiyle,



Süperoksit dismutaz olağanüstü biyokimyasal özelliklerinden dolayı ilgi çekmiştir. İlk olarak, substrat ve enzimin aktif bölgesi arasındaki elektron transferi mekanizması tespit edilmiştir (Perry vd. 2010). İkinci olarak, bazı kaynaklarda enzim, üre, donma-çözünme döngüsü, yüksek sıcaklık ve uzayan soğutma için alışılmadık kararlılık göstermiştir.

Süperoksit dismutazın kullanım alanlarına bakıldığında çok geniş bir çerçeve karşımıza çıkar (Şekil 2.17).

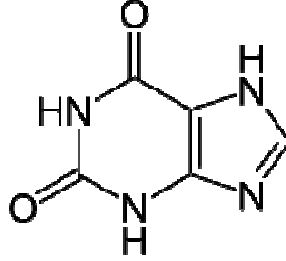


Şekil 2.17 SOD enziminin uygulamaları (Bafana vd. 2011)

2.5.2 Substrat

Ksantin, DNA ve RNA da bulunan pürin nükleotidinin kimyasal yıkımı sırasında elde edilen bir üründür (Şekil 2.18). Hücre membranında bulunur ve hücre dışı sıvıda birikir. Biyolojik örneklerde ksantin kantitatif tayini, perinatal boğulma, erişkin solunum yetmezliği sendromu, beyinsel iskemi, tümör hipertermi ve eklampsi başlangıcı gibi çeşitli patoloji tanılarında büyük ilgi görmektedir (Jimenez vd. 2007). Bu analit, plazma ve idrar örneklerinde rutin olarak HPLC, kemiluminesans ya da UV spektroskopisi gibi analitik teknilerle ölçülür, bunun dezavantajı, örnek hazırlaması zahmetli olan işlemlerdir (Horozova vd. 2008). Ks tespiti reaksiyon zincirlerine dayalıdır. Ks, KsOD ile $O_2^{\cdot-}$ oluşturur. Oluşan radikal SOD ile H_2O_2 oluşturur, yani Ks' nin ürik asit ve $O_2^{\cdot-}$ ne katalitik oksidasyonu ve radikallerin sonraki dismutasyonu, çok yüksek resorufin

(pembe kimyasal floresan boya) floresanı üretmek için, floresan olmayan Amplex Kırmızısı ile stokiyometrik reaksiyon veren H₂O₂ oluşumuna neden olur.



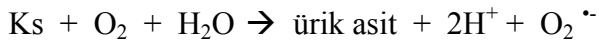
Şekil 2.18 Ksantin kimyasal yapısı

DNA temelli biyosensörler Fenton reaksiyonunu kullanırlarken, sit-c ve SOD temelli biyosensörler radikal üretici olarak genellikle KsOD içeriklidir.

Fenton reaksiyonlarında, Fe(II), Cu(II) ya da Cr(II) gibi indirgenmiş geçiş metal iyonları, tek elektron redoks tepkimesinde OH⁻ ve OH[•] üreterek H₂O₂ ile reaksiyona girerler.



İndirgen bir ajan eklenmesi radikal üretimi oranını artırır. Alternatif olarak, geçiş metali uygun bir elektrot potansiyelinin uygulanmasıyla indirgenebilir. KsOD, O₂'nin H₂O₂'ye dönüşüm reaksiyonuna eşlik ederek, Ks'nin ya da hipoksantin (HKs) oksidasyonunu katalizler, O₂^{•-} bu reaksiyonla oluşur.



2.5.3 Taşıyıcı

2.5.3.1 Jelatin

Jelatin, hayvan kemik, bağ dokuları, bağırsak ve organlarındaki kolajenlerin kısmi hidrolize edilmesi ile üretilir. Farklı zincir uzunlukları içeren polipeptit bir yapıdır, suda ve organik çözücülerde çözünmez, ancak su çeker. Bu özelliğinden dolayı kıvam artırıcı, jelleştirici, film oluşturunca bir maddedir.

Jelatin, 3000 ile 20000 arasında değişen molekül ağırlığına sahip, kolejen hidroliz ürünlerinin heterojen bir karışımıdır. Polipeptit bağında sıralı şekilde lisin-prolin-prolin ve glisin-prolin-hidroksiprolin amino asitlerinin tekrarı ile oluşan lineer bir polimerdir.

Jelatin %26,4-30,5 glisin, %14,8-18 prolin, %13,3-14,5 hidroksiprolin, % 11,1-11,7 glutamik asit, % 8,6-11,3 alanin ve azalan miktarlarda arjinin, aspartik asit, lizin, serin, lözin, valin, fenilalanin, izolözin, hidroksilisin, histidin, metiyonin ve tirozin içerir.

Jelatinin en belirgin özelliği, sıcaklığa bağlı geri dönüşümü olan jel oluşturma özelliğine sahiptir. Çözeltiden jelle, jelden çözeltiye dönüşme işlemi, çok kısa bir sıcaklık aralığında gerçekleşir ve bu işlem tekrarlanabilir bir dönüşüm işlemidir. Bu özelliği, jelatinin sayısız uygulamada kullanılmasına olanak verir.

Jelatin, en temel sınıflandırma jel gücü ya da jel sıkılığı tanımlayan ve Bloom adı verilen sınıflandırmadır. Diğer sınıflandırmalar ise, jelleşme noktası ve erime noktasına göre yapılan sınıflandırmalardır. Jelatinlerin jel gücü, genelde 50-300 Bloom arasında değişmektedir. Jel gücü 120 ve daha altı düşük bloom; jel gücü 120 ile 220 arası orta bloom; jel gücü 220 ve üstü yüksek bloom olarak sınıflandırılır.

Jelatinin bir diğer önemli özelliği de köpük oluşturma ve oluşan bu köpüğü uzun süre muhafaza etme özelliğidir. Böylece ürünlerin hacimlerinin de artmasını sağlar.

Kolloidal yapıyı koruma gücü yüksek olan jelatin, emülsiyonların ve süspansiyonların oluşumunu kolaylaştırır ve örneğin dondurmada ve dondurulmuş tatlılarda buz kristallerinin oluşumunu engeller. Protein molekül zincirleri iki farklı fazın arayüzeyine doğru hareket eder ve parçacıkların etrafında mono-moleküler bir film oluşturur. Buna ek olarak, protein molekül zincirleri sıvı fazın viskozitesini artırır ve böylece emülsiyonların ve süspansiyonların oluşmasını ve bu yapının muhafazasını sağlar.

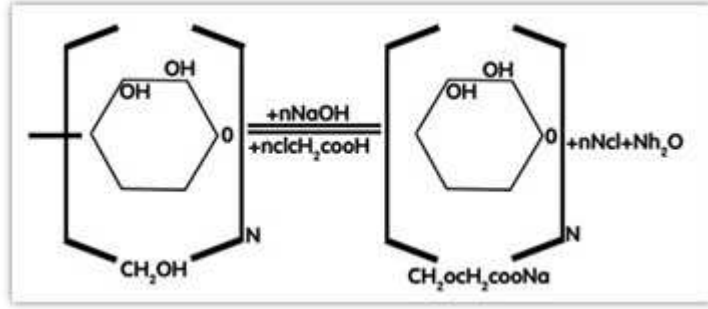
Jelatin yapısındaki aminoasit molekülleri, sulu ortamda kutuplu iyonlar gibi davranırlar. Karboksil (-COOH), hidroksil (-OH) ve amin (-NH₂) fonksiyonel gruplarına sahiptir. Jelatin, izoelektrik nokta altında pozitif (+) özelliktedir.

Ticari jelatin temiz, şeffaf, ince bir tabaka halindedir, hemen hem renksiz ancak kuru formda çok açık sarı renge sahiptir. Jelatin, yemeklerde, fotoğraf filmlerinde, ilaçlarda kapsülleme materyali olarak kullanılır. Jelatinler, agarlar, aljinatlar, karagenanlar ve pektinler gibi diğer kıvam arttırıcılar ile, mısır nişastası, dekstroz ve glikoz gibi mısır şurupları ile, yenilebilir asitlerle ve aromalar ile birlikte uyum içerisinde kullanılabilir. Bu noktada önemli olan, ürüne ve prosese en uygun oranın bulunmasıdır. Jelatinin, gıda sektöründe birçok uygulama alanı bulunmaktadır. Şekerlemeler, jöleler, süt ürünleri (yoğurt çeşitleri, fermente sütler, sütlü tatlılar, dondurmalar), et ürünleri gibi sektörlerde birçok işlevi ile kullanılmasının yanı sıra, şarap ve meyve suyu sektörlerinde de kullanılır.

Jelatinin yapısı 100°C gibi yüksek sıcaklıklarda bozulur. Bunun sonucunda da jelatin, kıvam arttırıcı ve jelleştirici gibi özelliklerini kaybeder.

2.5.3.2 Karboksimetilselüloz

Karboksimetilselüloz, veya CMC, selüloz zincirini oluşturan glukopiranoz monomerlerinin hidroksil gruplarına, karboksimetil gruplarının (-CH₂-COOH) bağlanması ile oluşan bir selüloz türevidir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Karboksimetilselüloz yapısı

Karboksimetilselüloz molekülleri düşük konsantrasyonlarda, düz bir yapıya sahiptir. Fakat konsantrasyon arttıkça moleküller üst üste binerek sarmal bir yapı formunu alır ve sıcaklığa bağlı olarak geri dönüşümlü jel haline gelir. İyon gücünün yükseltilmesi ve pH'ın düşürülmesi viskoziteyi düşürerek, polimerin daha sarmal bir yapı haline gelmesini sağlar.

Karboksimetilselüloz pH 5,0-10,0 aralığında oldukça kararlıdır; fakat KMS'nin özel bir asit-stabil çeşidi haricinde, pH 5,0'ın altındaki asitlendirme viskoziteyi ve kararlılığı düşürür.

Selülozdan elde edilen karboksimetilselülozun genelde sodyum (Na) tuzu formu kullanılmaktadır. Karboksilik asitin Na tuzu olan Na-KMS polielektrolittir (Chawdhury ve Neale 1963).

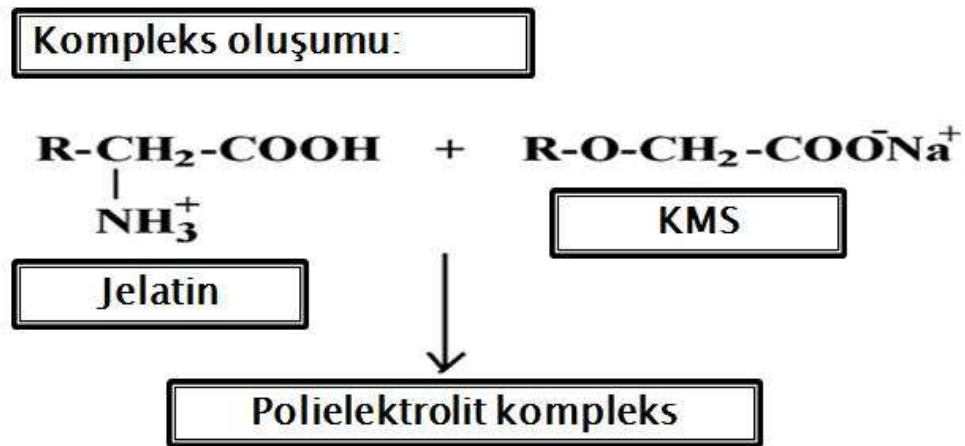
Karboksimetilselüloz krem rengi, tozudur. Suda kolayca çözünür. Organik sıvılarda çözünmez. Ağır metal tuzları ile reaksiyona girdiğinde suda çözünmeyen, şeffaf, dayanıklı ve organik maddelerden etkilenmeyen bir film oluşturur. Yarı sentetik, suda çözünebilir polimerdir. Yüksek viskoz özelliğine sahiptir. Isı, radyasyon, oksit ajanlar ile bozulabilen KMS, biyolojik olarak parçalanabilir özelliğe sahiptir. Karboksimetilselüloz izoelektrik nokta altında negatif (-) özelliktedir.

Gümüş, bakır, kurşun gibi metal iyonlu KMS, suda çözünmez ve metalin suda çözünen bir formu eklenerek KMS çözeltisi elde edilir.

Karboksimetilselüloz gıda, ilaç ve kozmetik uygulamalarında kıvam verici, bağlayıcı, emülsifiyer, koloidal süspanse edici ajan ve stabilizör olarak kullanılmaktadır. Şekerin kristalizasyonunu önleme özelliği de vardır. KMS sabunlarda yüzey aktifliği artırır, liflerdeki kirleri taşır ve absorplar. KMS'nin teknik kalitesi tutkal üretiminde kullanılır. Mükemmel film oluşturuucu özellikleriyle, suda eriyebilen polimerdir. Selülozik yapısı nedeniyle, kağıt gibi diğer selüloz maddeler için çok iyi bir yapıştırıcı olma özelliğine sahiptir.

2.5.3.3 Taşıyıcı sistemin oluşması

Jelatin ve KMS elektrostatik çekim, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları ile birbirine bağlanarak “interpenarating network (IPN)” adı verilen bir ağ yapısı oluştururlar (Sudha vd. 2010). Kontrollü şartlar altında oluşan bu ağ yapısına “polielektrolit kompleks” denir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20 Polielektrolit kompleks

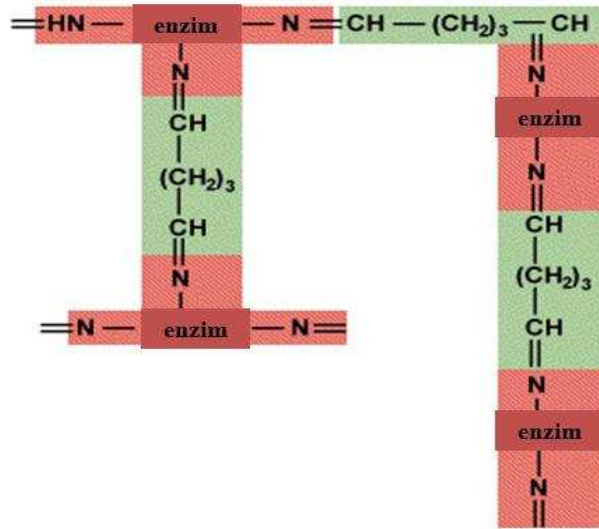
Jelatinin enzimatik olarak parçalanması ve KMS'nin biyolojik olarak parçalanması özelliklerinden dolayı J-KMS, son derece biyoyouumlu bir yapı oluşturur. Bu yüzden J-

KMS sistemi, çalışmalarımızda enzim immobilizasyonunda taşıyıcı materyal olarak kullanılmıştır.

2.5.4 Çapraz bağlayıcı

Çalışmamızda kullanılan çapraz bağlayıcı glutaraldehittir. Glutaraldehit biyokimyasal çalışmalarda sık sık kullanılan keskin kokulu, renksiz bir sıvıdır. Biyokimyasal uygulamalarda amin-reaktif bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılır. Proteinlerin oligomerik yapıları bu uygulamalarla incelenir.

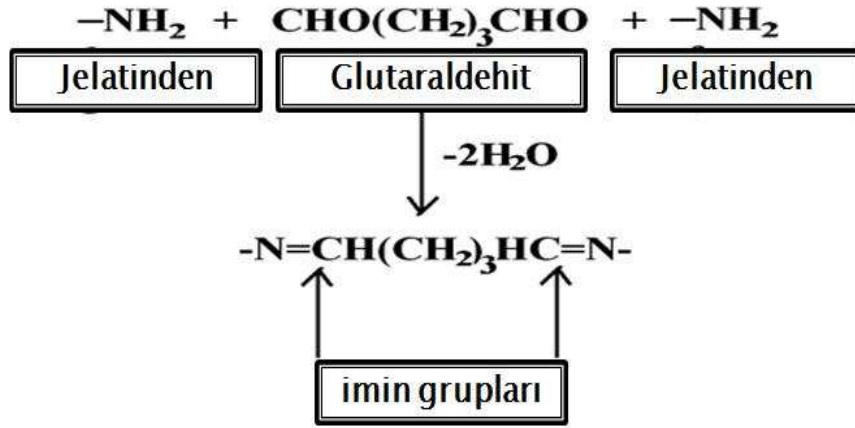
Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi, serbest enzim molekülleri ile glutaraldehit homo çapraz bağlayıcı reaktifi kullanılarak çapraz bağlı enzim agregasyonları oluşturulur (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi

Glutaraldehitin her iki ucu da reaktiftir. Böylece bir çok enzim molekülünün bir arada bulunmasıyla çözünür yapı, çözünmez özellik kazanarak enzim molekülleri güçlü bir şekilde bağlanır (Şekil 2.22). Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon

immobilizasyonu, çapraz bağlı immobilizasyon çeşidinin bir alt kümesi olarak düşünülebilir. Ayrıca zaman tasarrufu ve düşük maliyet imkanı sağlamaktadır.



Şekil 2.22 Bifonksiyonel glutaraldehitin bağlanması

2.6 Kaynak Araştırması

Campenalla ve arkadaşları (2000), kapa-karagenan membranına SOD'u immobilize ederek, SOD biyosensörü geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri biyosensör ile radikal kovucu moleküllerin antioksidan özelliklerini ile sağlıklı ve hastalıklı insan böbrek dokularında antiradikal aktivitelerini tespit etmişlerdir. Geliştirilen biyosensörün minimum tayin sınırı 0,001 mM olup, cevap zamanı yaklaşık 100 s'dir. Biyosensörün kullanım ömrü 7 gündür.

Campenalla ve arkadaşları (2001), 2000 yılında geliştirdikleri SOD biyosensörünü kullanarak, birçok meyvanın ve bitkinin (domates, biber, havuç, turp, limon, portakal, greyfurt, kivi) radikal kovucu özelliklerini tayin etmişlerdir.

Ge ve arkadaşları (2001), sığır eritrositlerinden Cu-ZnSOD ve Escherichia coli' den FeSOD' u, ayrı ayrı 3-Merkaptopropiyonik asit-altın elektrotlar üzerine immobilize etmişler ve SOD elektrotlarının karakterizasyonunu, Cu-ZnSOD ve FeSOD adsorbe

yüzey için sırasıyla 47 ± 4 mV ve 154 ± 5 mV geçerli potansiyelle (Ag/AgCl, 1 M KCl) yarı tersinir, elektrokimyasal redoks davranışı gösterdiğini görmüşlerdir. SOD elektrot ile $O_2^{\cdot-}$ etkileşimini ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin amperometrik tespitini çalışmışlardır.

Tian ve arkadaşları (2002), modifiye sistein-SAM elektrotunda SOD' un redoks pikinin tayinini, doğal SOD (Cu_2Zn_2SOD) ve onun Cu- ve Zn- içermeyen türevleri (E_2Zn_2SOD ve Cu_2E_2SOD , E boş alanı gösteriyor) ve tekrar sırasıyla Zn- ve Cu- yapıya sokulmuş (E_2Zn_2SOD ve Cu_2E_2SOD 'u kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Cu kompleks kısmını, $O_2^{\cdot-}$ enzimatik dismutasyonu için aktif kısım, yani SOD un elektroaktif kısmı olduğunu tespit etmişlerdir.

Campanella ve arkadaşları (2004), esas bileşen olarak asetilsalisilik asit içeren çeşitli ilaçları, SOD enzimine dayanan enzimatik elektrotlar kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçları, geleneksel spektrofotometrik metod ve sırasıyla dönüşümlü ve pulse (darbeli) voltametri ile karşılaştırılmıştır.

Di ve arkadaşları (2004) $O_2^{\cdot-}$ tayini için 3. jenerasyon biyosensör altın elektrot yüzeyinde ince silika/polivinilalkol/sol-jel filmine SOD immobilizasyonu yapılmıştır. Sensörün minimum tayin sınırı $0,1 \mu M$ 'dır. Doğrusal aralığı $0,2-1,6 \mu M$ 'dır. Sensör 20 gün süreyle kullanılmıştır.

Tian ve arkadaşları (2004), SOD (Cu/Zn-, Fe-, Mn-) / 3-merkaptopropiyonik asit modifiye altın elektrotları kullanılarak bu üç değişik SOD'un elektrokimyasal özellikleri ve elektrokatalitik aktivitelerini araştırmışlardır. Geliştirilen biyosensör 10 gün boyunca aktivitesini korumuştur.

Emregül (2005) $O_2^{\cdot-}$ 'nin kararlılığı için, platin elektrot yüzeyine J içinde SOD enzimi immobilize ederek bir SOD biyosensörü geliştirmiştir. J-SOD biyosensörünün cevabı $O_2^{\cdot-}$ konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğunu tespit etmiştir. Minimum tayin sınırını $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ olarak tespit etmiştir. Biyosensör duyarlılığını 3-4 hafta sonunda,

sırasıyla %89 ve %60 korumuştur. SOD'un J üzerine immobilizasyonu, enzim etrafında bir mikroçevre yaratarak, enzimin kararlılığını sağlamıştır.

Zhou ve arkadaşları (2006), yoğun çözeltilerdeki sığır sütü KsOD ve sığır eritrosit $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ etkileşimlerini incelemek için floresans spektroskopisi ve rezonans ayna biyosensörleri uygulamalarını rapor etmişler. Birlikte ele alındığında, yoğun makromolekülerin SOD'un, KsOD'a bağlanmasını artırdığını ve SOD'un işlevine uygun olduğunu göstermişlerdir.

Prieto-Sim'on ve arkadaşları (2008), bazı bileşiklerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için elektrokimyasal biyosensörleri incelemişlerdir. Sit-c, SOD ve DNA temelli üç farklı algılayıcı için yaklaşımları açıklamışlardır. Basit, hızlı, güvenilir analiz imkanı sayesinde, antioksidan özelliklerin değerlendirilmesi için, biyosensörlerin umut verici biyomateryaller olduğunu öne sürmüşlerdir.

Chen ve arkadaşları (2008) kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SEM) üzerine sit-c immobilizasyonu gerçekleştirilerek O_2^- biyosensörü geliştirilmiştir. Bu amaçla MUA:MU/Sit-c, MPA/Sit-c, MPA:MP/Sit-c elektrotlarını geliştirmişlerdir (MUA: 11-merkaptoun-dekonoik asit, MU: 11-merkaptoundekonol, MPA: 3-merkaptopropiyonik asit, MP: 3-merkaptometanol). Geliştirilen MUA:MU/Sit-c, MPA/Sit-c, MPA:MP/Sit-c elektrotlarının düşük tayin sınırı sırasıyla, 0,24; 0,68; 0,0065 μM 'dır. Bu elektrotlar yüksek duyarlılık göstermesine rağmen, düşük tayin sınırlarına sahiptirler.

Liu ve arkadaşları (2008) $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 'un hiçbir aracı olmadan, doğrudan elektron transferi nanospiral altın (Au-NS), nanoçubuk altın (Au-NR) ve nanopiramidal altın (Au-NP) yapılarda ilk uygulamasını yaparak Au-NS/SOD, Au-NR/SOD, Au-NP/SOD elektrotlarını geliştirmişlerdir. SOD'un morfoloji bağımlı elektrokimyasından yola çıkarak, elektrobirikimli altın nanoyapıların morfolojisi ile elektron transferinin termodinamik ve kinetik parametreleri değiştiğini tespit etmişlerdir. Deneysel sonuçlar, SOD' un altın nanoyapılar üzerine çok güçlü hapsoldüğünü ve altın yapıların 3 türü üzerine adsorbe olduktan sonraki kendine özgü enzimatik aktivite sürecini ve SOD'un

doğrudan elektron transferini kendisinin sağladığını göstermişlerdir. Geliştirilen elektrotların doğrusal aralığı; Au-NS/SOD 0,2-220 μM ; Au-NR/SOD 0,35-168 μM ; Au-NP/SOD 0,26-207 μM 'dir. Cevap zamanları; Au-NS/SOD' un 4,1 s; Au-NR/SOD' un 4,9 s; Au-NP/SOD' un 4,5 s'dir. Nano yapıda geliştirilen bu sensörler düşük tayin sınırına sahiptir.

Xiaojun ve arkadaşları (2008) duyarlılık, seçicilik, $\text{O}_2^{\cdot-}$ tespiti için düşük tayin sınırı (DTS) arasındaki dengeleri göz önüne alarak, süksinimit propiyonat üzerine sit-c immobilize biyoelektrotu en uygun sistem olarak görmüşlerdir. Fosfat tamponunda, süksinimit propiyonat/sit-c elektrot 410 nA $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ duyarlılığa sahiptir ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ için DTS 73 nM'dir. Sonuçları, $\text{O}_2^{\cdot-}$ tespiti için serumlu ve serumsuz karmaşık bir doku kültür ortamında sunmuşlardır, ve serum yokluğunda doku kültür ortamında süksinimit propiyonat/sit-c nin duyarlılığı 640 nA $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$ 'ye yükselmiştir. Bir süksinimit propiyonat/sit-c elektrot ile $\text{O}_2^{\cdot-}$ ölçülmesiyle, SOD enziminin bolus ilavesinin öncesinde ve sonrasında, SOD enzim özgülüğü sit-c sisteminin duyarlılığı ile tamamlanmıştır.

Wang ve arkadaşları (2009) $\text{O}_2^{\cdot-}$ tayini için, SOD'un doğrudan elektron transferine dayanan tek kullanımlık biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensör indiyum kalay oksit (ITO) elektrot üzerine altın nanoparçacıklarının elektrobiriktirmesi sonrası elektrot yüzeyinde sistein varlığında, silika sol-jel (SJ) içine SOD' un immobilizasyonuna dayanmaktadır. İmmobilize SOD, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ye karşı yüksek katalitik aktivite sergilemiştir. Süperoksit radikal biyosensörünün saklama-muhafaza kararlılığını 90 günlük bir süre olarak test etmişler, biyosensör buzdolabında 4°C'da muhafaza edildiğinde, bu süre içinde aralıklı olarak kullanıldığında, başlangıçtaki akım yanıtını % 85 koruduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma bir substrat olarak ITO üzerinde ANP'lerin elektrokimyasal biriktirilmesine dayalı strateji ve sonra sistein varlığında ve SOD'un silis örgüsü içine hapsedilmesi, tek kullanımlık $\text{O}_2^{\cdot-}$ biyosensör üretimi için etkili bir yol olduğunu göstermiştir. Bu matriksin, enzim aktivitesinin tespiti ve enzim sızıntısının önlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Salinas-Castillo ve arkadaşları (2008) kantitatif Ks tespiti için çok hassas bir floresan multienzim biyosensörünün gelişimini açıklamışlardır. Ksantin tayini için, bir tek sol-jel matriks içinde, amplex kırmızısı probu ile birleştirilmiş KsOD, SOD ve peroksidazın (HRP) immobilizasyonuna dayalı floresan üçlü enzim biyosensörünü geliştirmişlerdir. Sol-jel kimyası gözenekli, doğal yapıyı ve 3'lü ko-immobilize edilmiş proteinlerin aktivitesini koruyan, optik şeffaf matriks sağlamıştır. Immobilize edilmiş üç enzimin aktivitesi analiz etmişler ve karşılaştırmışlardır. Ks, KsOD ile oluşan radikal $O_2^{\bullet-}$, SOD ile H_2O_2 oluşturur. Oluşan H_2O_2 , HRP ile su açığa çıkarırken bu sırada fluorasan olmayan amplex kırmızısının, yüksek fluorasan özelliği olan resorufine dönüşüm reaksiyonuna dayanan çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Uyarı ve emisyon dalga boyu 530-590 nm'de çalışılmış, floresan ve UV spektroskopisi kullanılarak ölçümler alınmıştır. Geliştirilen biyosensörün tekrar kullanılabilir ve uygun koşullarda saklandığında 2 hafta kararlılığını koruduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonunda en dayanıksız enzimin KsOD olduğunu göstermişlerdir.

Cortina-Puig ve arkadaşları (2009) Sit-c ve KsOD un altın elektrot modifiyeli kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM, self assembled monolayer) üzerine immobilizasyonuna dayanan bir $O_2^{\bullet-}$ biyosensörünün, elektrokimyasal karakterizasyonunu belirlemiş ve geliştirdikleri sensörü saf maddeler ve doğal örneklerin antioksidan kapasitesini tespit etmekte kullanmışlardır. Çeşitli uzun zincirli tiyol kombinasyonlarını kullanarak, sit-c ve KsOD enzimini elektrot üzerine immobilize etmişlerdir. Dönüşümlü voltametri çalışmasında, potansiyel -0,15 ve 0,25 V'da, tarama hızı 100 mVs^{-1} 'de ölçümler alınmış, veriler her 15 s de 150 mV uygulanarak elde etmişlerdir. Sonuç olarak, geliştirdikleri biyosensörü, sarımsak bulbından ekstrakte edilen saf allin ve iki bileşiğin kararlılığın tayininde kullanmışlardır.

3. ÇALIŞMANIN AMACI

Çağımızın hastalıkları arasında sayılan kanser, diabetes mellitus, ateroskleroz, AIDS gibi pek çok metabolik hastalığın kaynağının organizmada oluşan serbest radikaller olduğu düşünülmektedir. Aerobik canlılarda reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinin ortadan kaldırılmasında antioksidan savunma sistemleri görev almaktadır. Biyolojik sistemlerde en çok oluşan radikallerden biri süperoksit radikalidir. Bu radikal, biyolojik sistemlerde daha reaktif çeşitlerine dönüştürüldüğünden, $O_2^{\bullet-}$ lerin çok toksik olduğu düşünülmektedir. Süperoksit radikallerinin artışıyla, doğrudan ya da dolaylı yollardan hücre büyümesi, mutagenез, hücre ölümünün yavaşlaması gibi sonuçlar oluşur. Bu yüzden, $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonunun kantitatif ve kalitatif tayini oldukça önem taşımaktadır. Süperoksit radikallerinin tayininde genel olarak, ESR, kemilüminesans veya semikantitatif kolorimetrik testler kullanılır. Protein kimyasında, elektron aktarımına dayanan elektrokimyasal temelli biyolojik sistemler, spesifik, duyarlı, hızlı, kolay ve eş zamanlı sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Son yıllarda temeli elektrokimyasal sensörler ve biyosensörlere dayanan bazı elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Tezde, SOD'un doğrudan elektron transferi temeline dayanan J- KMS-SOD biyosensörü, $O_2^{\bullet-}$ 'nin tayini için geliştirilmiştir. Biyosensör, platin elektrot yüzeyine SOD'un J- KMS içine immobilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör ksantin- ksantinoksidaz sisteminin oluşturduğu $O_2^{\bullet-}$ 'nin kimyasal ve elektrokimyasal tayininde kullanılmıştır.

Tez üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda platin elektrot yüzeyine SOD'un J- KMS içine immobilizasyonunun optimizasyonu kimyasal metod ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla glutaraldehit konsantrasyonu, J- KMS oranı gibi parametrelerin incelenmiş ve J- KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

İkinci kısımda platin elektrot yüzeyine SOD'un J- KMS içine immobilizasyonunun optimizasyonu elektrokimyasal metod ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzim

konsantrasyonu, glutaraldehit konsantrasyonu, J-KMS oranı, gibi parametrelerin değişimleri incelenmiş ve geliştirilen J- KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen kimyasal ve elektrokimyasal sonuçlar karşılaştırılmıştır. İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra J-KMS-SOD biyosensörü geliştirilmiştir.

Üçüncü kısımda J-KMS-SOD biyosensörü, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların serbest radikalleri uzaklaştırması özelliklerinin ve sağlıklı, kanserli insan dokularının antiradikal aktivitelerinin tayininde kullanılabilirliği test edilmiştir. Ayrıca J-KMS-SOD biyosensörü kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresi gibi çevresel streslere maruz bırakılmış domates ve kontrol bitkilerinde süperoksit radikal tayini için kullanılmıştır.

4. MATERİYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan Ksantin (%99), SOD (E.C.1.15.1.1), KsOD (E.C.1.1.3.22), glutaraldehit (%25), jelatin, H₂SO₄ (%98), asetil salisilik asit (%99) ve Süperoxide Anion Assay Kit Sigma'dan; NaOH, NaH₂PO₄.2H₂O ve Na₂HPO₄.12H₂O Merck'den temin edilmiştir. Bayer firmasına ait Asprin (Tablet) (500 mg Asetilsalisilik asit), Asprin Plus C (Tablet) (400 mg Asetilsalisilik asit+240 mg Askorbik asit) ve Abdi İbrahim firmasına ait Sedergine / Vit. C (Tablet) (330 mg Asetilsalisilik asit+200 mg Askorbik asit) çalışmalarda kullanılmıştır.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

Çalışmalarda elektrokimyasal ölçümde “Gamry Instrument Chronoamperometry” kullanılmıştır. Mikrotabaka yönteminde “Biotek Synergy HT Multi-Mode” mikrotabaka okuyucu ile 550 nm dalga boyunda ölçüm alınmıştır.

4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal hücre sisteminde karşıt, çalışma ve referans elektrotları tüm deneylerde kullanıldı. Karşıt ve çalışma elektrotları yüzey alanı 0,5 cm² olan platindir. Referans elektrot Luggin kapiler içinde Ag/AgCl elektrotudur.

4.1.4 Kullanılan çözeltiler

0,1 M sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 0,1 M disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak 0,05 M ve pH'ı 7,4 olan Fosfat tamponu ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) hazırlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan diğer çözeltiler fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır.

Substrat olarak, Ks stok çözeltisi (25 mmol L^{-1}) kullanılmıştır. Ksantin çözeltisi hazırlanırken Ks'in fosfat tamponunda çözünmesi için ortamda $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ olacak şekilde NaOH eklenmiştir.

Çapraz bağlayıcı glutaraldehit çözeltisi fosfat tamponu kullanılarak $0,125 \text{ mol L}^{-1}$ olarak hazırlanmıştır. Liyofilize haldeki SOD, fosfat tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. Platin elektrotların temizliğinde $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ çözeltisi kullanılmıştır.

Asprin ve Asprin Plus C stok çözeltileri, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ olacak şekilde fosfat tamponu içinde hazırlanmıştır.

Kanserli doku çalışması için temin edilen doku, 0,5 gr tartılarak 3 ml fosfat içinde çözülerek hazırlanmıştır.

4.1.5 Platin elektrotun temizlenmesi

Çıplak Pt elektrotlar önce $0,05 \mu \text{ mol L}^{-1}$ alümina ile cilalanmıştır. Daha sonra kimyasal temizliği için H_2SO_4 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) çözeltisinde 5 dakika süreyle 100 mVs^{-1} tarama hızında, -0,3 ile +1,2 V arası dönüşümlü voltametrileri çalışılmıştır. Sonra, elektrotlar pH'ı 7,4 olan fosfat tamponu ile 100 mVs^{-1} tarama hızında, -0,5 ile +0,5 V arası çalışılmıştır (ortama KsOD, Ks ve SOD ilave edilmeden). Kullanılan tüm Pt elektrotların temizliği bu şekilde yapılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 İmmobilizasyon jelinin hazırlanması

Jelatin (%7,5) fosfat tamponu içinde yarım saat bekletilerek şişmesi sağlanmıştır. Daha sonra J'nin çözünmesi için, fosfat tamponu içeren J, sıcaklığı 50°C olan sıcak su banyosuna daldırılmıştır. Ardından değişik oranlarda KMS ilavesi yapılarak vorteks ile karıştırılmıştır. Homojen J-KMS polimerinin elde edilmesinden sonra, sıcaklık 32°C'a düşürülmüştür.

Fosfat tamponunda hazırlanmış SOD enzimi değişik ünitelerde ilave edilmiş ve tekrar homojen olması için vortekslenmiştir. En son olarak, çapraz bağlayıcı glutaraldehit ortama ilave edildikten sonra, immobilizasyon jeli hazırlanmıştır.

4.2.2 J-KMS-SOD elektrotlarının ve mikrotabanın hazırlanması

İmmobilizasyon jeli hazırlandıktan sonra, Pt elektrotun her iki yüzeyine immobilizasyon jeli (25 µL) damlatılarak, bir Pt elektrotta toplam 50 µL jel olacak şekilde immobilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Mikrotabakaya yapılacak immobilizasyon için, mikrotabanın her bir kuyucuğuna 25 µL immobilizasyon jeli damlatılmıştır.

İmmobilize Pt elektrot ve mikrotabaka hazırlandıktan sonra, 24 saat kurumaya bırakılmış, J-KMS-SOD immobilize haldeki elektrotlar ve mikrotabaka kuruduktan sonra ölçüm için hazır hale gelmiştir.

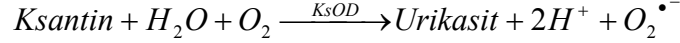
4.2.3 Bağlanmayan enzimin uzaklaştırılması

İmmobilizasyon işlemi bitip, Pt elektrot üzerindeki jel kısım, en az 24 saat kurumaya bırakıldıktan sonra, fosfat tamponu (pH 7,4) içinde 10'ar dakika 3 farklı tüpte bekletilerek bağlanmayan enzimin uzaklaşması sağlanmıştır.

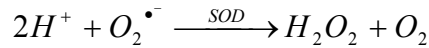
4.2.4 Enzim aktivitesi tayini

4.2.4.1 Elektrokimyasal yöntem

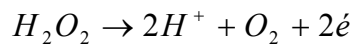
Platin yüzeyindeki immobilize SOD'un performansı elektrokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Immobilize enzim performansının değerlendirilmesinde $O_2^{\bullet-}$, Ks ve KsOD kullanılarak in vitro oluşturulmuştur. Bu amaçla elektrokimyasal hücre içerisinde Ks, KsOD kullanılarak $O_2^{\bullet-}$ ve ürik asite dönüştürülmüştür.



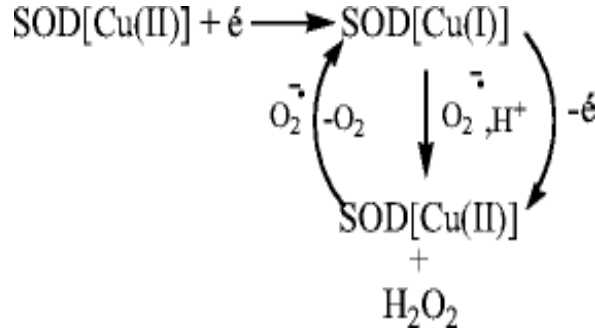
SOD enzim reaksiyonu sonucunda oluşan H_2O_2 elektrot yüzeyinde Ag/AgCl'e karşı +650 mV potansiyel uygulanarak yükseltgenmiştir. Süperoksit radikali doğrudan çözeltide oluşturulmuştur. SOD enzimi aşağıdaki reaksiyona göre $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyon reaksiyonunu katalizlemektedir.



Elektrot yüzeyinde oluşan aşağıdaki reaksiyonla tayin edilmektedir.



Oluşan H_2O_2 , Pt elektrot yüzeyinde +650 mV'da yükseltgenerek, oluşan akım tayin edilmiştir. Oluşan akım çözeltideki $O_2^{\cdot -}$ konsantrasyonu ile orantılıdır. Süperoksit radikali amperometrik olarak tayin edilmiştir. Elektrot yüzeyindeki reaksiyon şeması aşağıdaki gibidir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Elektrot yüzeyindeki reaksiyon şeması (Emregül 2005)

4.2.4.2 Kimyasal yöntem

Mikrotabaka yüzeyine SOD immobilize edilmiştir. SOD enziminin immobilizasyonu için J-KMS taşıyıcı materyal olarak seçilmiştir. SOD enzimi, değişik J-KMS taşıyıcı sistemine çapraz bağlayıcı glutaraldehit ve SOD kullanılarak immobilize edilmiştir. Mikrotabakanın her bir kuyucuğunun yüzeyi, immobilizasyon jeli ile kaplanarak immobilize SOD mikrotabaka elde edilmiştir. Çalışmada Süperoksit Anyon Assay Kit (Sigma) kullanılmıştır. Süperoksit Anyon Assay Kit, $O_2^{\cdot -}$ tarafından luminolün oksidasyonu sonucunda kemilüminesans ışık oluşumuna dayanmaktadır. Kit, pozitif kontrol olarak $O_2^{\cdot -}$ oluşturunucu sistem (Ks/KsOD) ve negatif kontrol, baskılayıcı sistem olarak SOD enzimi içermektedir. SOD varlığında Ks/KsOD sistemi ile oluşan $O_2^{\cdot -}$ hemen H_2O_2 'ye dönüştürülmüş ve böylece luminesans yoğunluğundaki değişime göre ölçümler gerçekleştirilmiştir.

4.2.5 Bitki yetiştirilmesi

Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş. Ankara'dan temin edilen Falcon çeşidi domates tohumları yüzey sterilizasyonunun ardından kurutma kağıtları üzerinde çimlendirildikten sonra

ortama yalnızca su tutma kabiliyeti olan herhangi bir mineral madde içermeyen perlit ortamına alınmış ve burada toplu halde geliştirilen fideler gelişimin ileri aşamalarında her bir fide tek bir ortamda olacak şekilde şaşırtılarak geliştirilmiştir.

Tüm bu geliştirme işlemleri sıcaklık, nem ve ışık ayarları yapılabilen bir gelişmiş bir iklim odasında gerçekleştirilmiştir.

Geliştirme odasında belirli büyüklüğe gelen fideler stres uygulamaları için Hogland besi ortamına aktarılmıştır.

25 günlük iki kotiledon ve iki gerçek yapraklı bitki haline gelinceye dek Hogland besi ortamında geliştirilen bitkilere aşağıdaki koşullar ile NaCl (0- 100-150mM), soğuk (0 ile 10°C arasında 10 gün süreyle uygulama), ağır metal (0, 80, 160, 320, 640,1280 uM CdCl₂.H₂O, Cu(NO₃)₂.3H₂O, Pb(NO₃)₂ uygulamış ve NaCl (0- 100-150mM) stresine göre Polietilen Glikol (PEG) aracılığı ile kuraklık stresi dengelenmiştir.

Buna göre; NaCl 0-100-150 mmolL⁻¹ stresi 48 saat süre ile uygulanmış ve herbir farklı moleritedeki tuz stresi denemesinden 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. saatlerde örneklerin alımı gerçekleştirilmiştir.

Kuraklık stresi için hazırlanan PEG 6000 çözeltileri benzer şekilde 25 günlük bitkilere 48 saat süre ile uygulanmış ve tuz stresi ile eş zamanlı olarak örneklerin alımı yapılmıştır.

Ağır metal stresi uygulaması 0, 80, 160, 320, 640, 1280 µmolL⁻¹ CdCl₂.H₂O, Cu(NO₃)₂.3H₂O, Pb(NO₃)₂ solüsyonları hogland besi ortamı ile dilüe edilerek hazırlanmış ve bitkiler bu stres ortamında 24 saat süre ile tutulmuş ve ardından örneklerin alımı gerçekleştirilmiştir.

Soğuk uygulaması +4°C'lik soğuk odada 10 gün süre ile gerçekleştirilmiş ve 0., 2., 4., 6., 8., 10. günlerde örneklerin alımı gerçekleştirilmiştir.

Alınan tüm bitki örnekleri, -80°C'lik sıvı azota batırılmış ve ani bir şekilde dondurularak, stabil kalması sağlanmış ve -80°C'lik soğuk dolapta muhafaza edilmiştir. Bitkilerin geliştirilmesi, strese maruz bırakılması, A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı Bitki Biyoteknolojisi Birimi, Prof. Dr. Ali ERGÜL gözetimi dahilinde gerçekleştirilmiştir..

4.2.6 Optimizasyon çalışmaları

4.2.6.1 Jelatin-karboksimetilselüloz oranı

İmmobilizasyon şartlarının optimize edilmesinde ilk olarak değişik J-KMS oranları denenmiştir. İmmobilizasyon jelinde 4 farklı J-KMS oranı kullanılmıştır. SOD enzimi, 0,05; 0,1; 0,175; 0,25 oranında J-KMS ve glutaraldehit 0,005 mmolL⁻¹ içeren immobilizasyon jeli ile immobilize SOD elektrotu ve mikrotabaka elde edilmiştir. Bu çalışmada SOD ve glutaraldehit konsantrasyonları sabit tutulmuştur.

4.2.6.2 Glutaraldehit konsantrasyonu

SOD' un J-KMS taşıyıcı sistemine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0,0025; 0,0050; 0,0075 ve 0,01 mmolL⁻¹ konsantrasyonlarında glutaraldehit kullanarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır.

4.2.6.3 Enzim konsantrasyonu

Enzim elektrotları, 2366 U, 4733 U, 7212 U ve 9466 U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında hazırlanmış, değişik enzim konsantrasyonları içeren enzim elektrotlarının amperometrik cevabı tespit edilmiştir.

4.2.6.4 Ksantin konsantrasyonu

Jelatin-karboksimetilseluloz oranı 0,100 w/w ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olan immobilize SOD ile değişik ksantin konsantrasyonları denenmiştir. Ksantin konsantrasyonu 0,00125-2 mmolL⁻¹ aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

4.2.6.5 J-KMS-SOD elektrodunun ömrü

İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra SOD elektrodu geliştirilmiştir ve elektrotun tekrar kullanılabilirliği tespit edilmiştir. Hazırlanan elektrotlar birer gün arayla kullanılarak, kararlılıklarının takibi için 80 gün süreyle çalışılmıştır. Her kullanımdan sonra elektrotlar fosfat tamponu (0,05 mmolL⁻¹, pH 7,4) ile yıkanmış ve bir sonraki kullanıma kadar 4°C’de aynı tampon içinde saklanmıştır.

4.2.7 Biyosensör uygulamaları

4.2.7.1 Radikal kovucu moleküller üzerine testler

Biyosensörün yanıtı O₂^{•-} yokluğunda ve radikal kovucu moleküllerin varlığında tespit edilmiştir. Aspirin ve C vitamini içeren Aspirin, serbest radikalleri kovucu kapasitesini göstermek için kullanılmıştır. Radikal kovucu olarak kabul edilen moleküllerin antioksidan özellikleri, radikal kovucu molekülün varlığı ve yokluğunda kalibrasyon eğrisinin yüzde eğim değerlerine göre değerlendirilmiştir.

4.2.7.2 Sağlıklı ve kanserli dokular üzerine testler

Sağlıklı ve kanserli meingioma (grade I, who 2,000, A.Ü. Beyin ve Sinir Cerrahisi, Doç. Dr Ayhan Attar’ dan alınmıştır.) beyin dokusu üzerinde biyosensör yanıtı test edilmiştir. Bu amaçla 0,5 g doku 3 ml fosfat tamponu içinde homojenize edilmiştir.

Fosfat tamponu ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,5) içeren hücrede J-KMS-SOD biyosensörü kararlı hale getirildikten sonra, 500 μl homojenize sağlıklı ve kanserli doku içeren çözeltilerden ilave edilmiş ve sinyaldeki değişim tespit edilmiştir. Sağlıklı veya kanserli dokudaki $\text{O}_2^{\bullet-}$ konsantrasyonuna bağlı olarak akım yoğunluğundaki değişim incelenmiştir.

4.2.7.3 Strese maruz bırakılmış domates bitkilerinde süperoksit tayini

Kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkileri üzerine biyosensör yanıtı test edilmiştir. Bu amaçla 0,5 g strese maruz kalmış bitki 3 ml PB tamponunda homojenize edilmiştir. Fosfat tamponu ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,4) içeren hücrede J-KMS-SOD biyosensörü kararlı hale getirildikten sonra, 500 μl homojenize strese maruz kalmış bitki içeren çözeltilerden ilave edilmiş ve sinyaldeki değişim tespit edilmiştir.

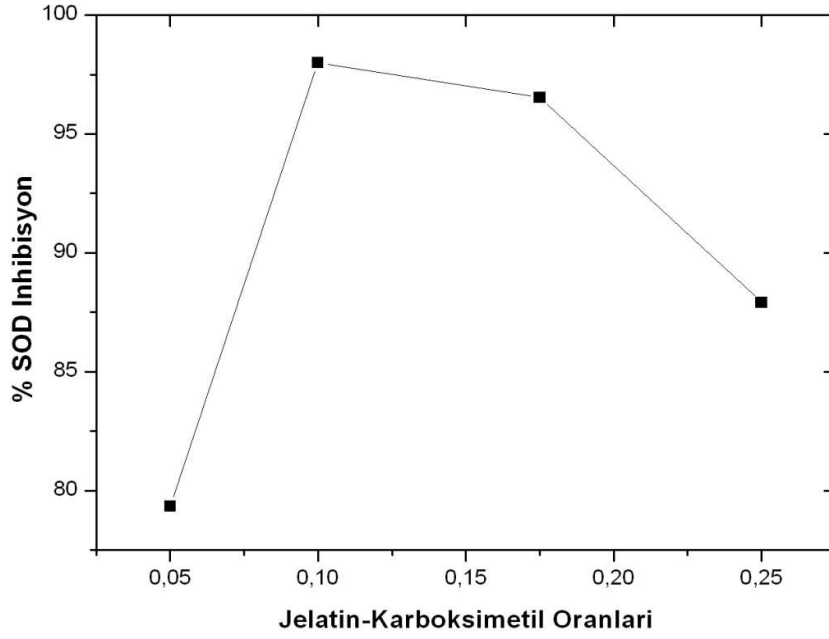
5. BULGULAR

5.1 İmmobilize Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Kimyasal Metod ile Optimizasyonu

Çalışmada Süperoksit Anyon Assay Kit (Sigma) kullanılmıştır. Süperoksit Anyon Assay Kit, $O_2^{\cdot-}$ tarafından luminolün oksidasyonu sonucunda, kemilüminesans ışık oluşumuna dayanmaktadır. Kit, pozitif kontrol olarak $O_2^{\cdot-}$ oluşturunucu sistem (Ks/KsOD) ve baskılayıcı sistem negatif kontrol olarak SOD içermektedir. SOD varlığında Ks/KsOD sistemi ile oluşan $O_2^{\cdot-}$ hemen H_2O_2 'ye dönüştürülmüş ve böylece luminesans yoğunluğunda bir artış görülmemiştir.

5.1.1 SOD aktivitesi üzerine J-KMS oranlarının etkisi

Mikrotabaka yüzeyine J-KMS taşıyıcı sistemi kullanılarak SOD immobilize edilmiştir. Değişik J-KMS oranları (0,05-0,250 w/w) kullanılarak immobilizasyonda en uygun taşıyıcı oranını araştırılmıştır. Değişik J-KMS oranlarının SOD inhibisyonu üzerindeki etkisi grafikteki gibi bulunmuştur (Şekil 5.1).



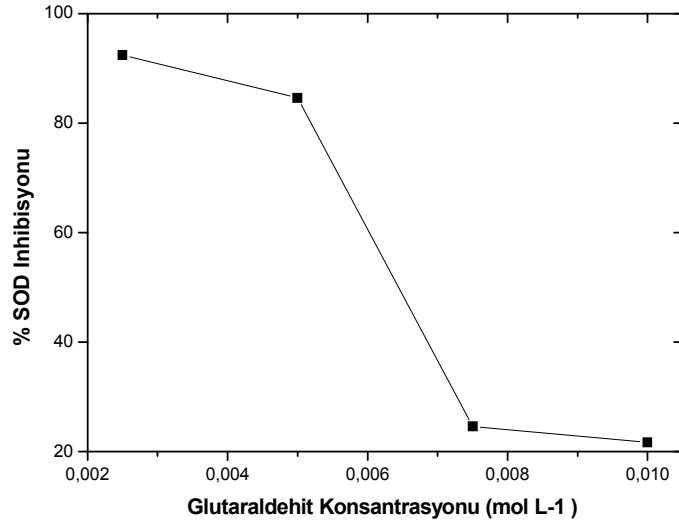
Şekil 5.1 Değişik J-KMS oranlarının %SOD inhibisyonu üzerine etkisi

Jelatin-karboksümetilselüloz oranının artması, enzimin kuvvetlice bağlanmasına neden olmuştur. Yüksek J-KMS oranı, bağlanan enzim miktarının artmasına, dolayısıyla enzim aktivitesinin artmasına yol açmıştır. İleri J-KMS oranları, fazla enzim bağlanması ve taşıyıcı gözeneklerinin küçülmesine neden olmuştur (Emregül vd. 1996). Substrat ve ürün giriş çıkışının azalmasıyla, ileri J-KMS oranlarında SOD inhibisyonunda düşüş gözlenmiştir. 0,05 w/w J-KMS oranı ve altında taşıyıcının şişmesine bağlı olarak, mekanik dayanıksızlık söz konusudur.

En uygun taşıyıcı oranı 0,100 w/w J-KMS oranı olarak belirlenmiştir.

5.1.2 SOD aktivitesi üzerine glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi

SOD' un J-KMS taşıyıcı sistemine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0,0025-0,01 mmolL⁻¹ konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır (Şekil 5.2).



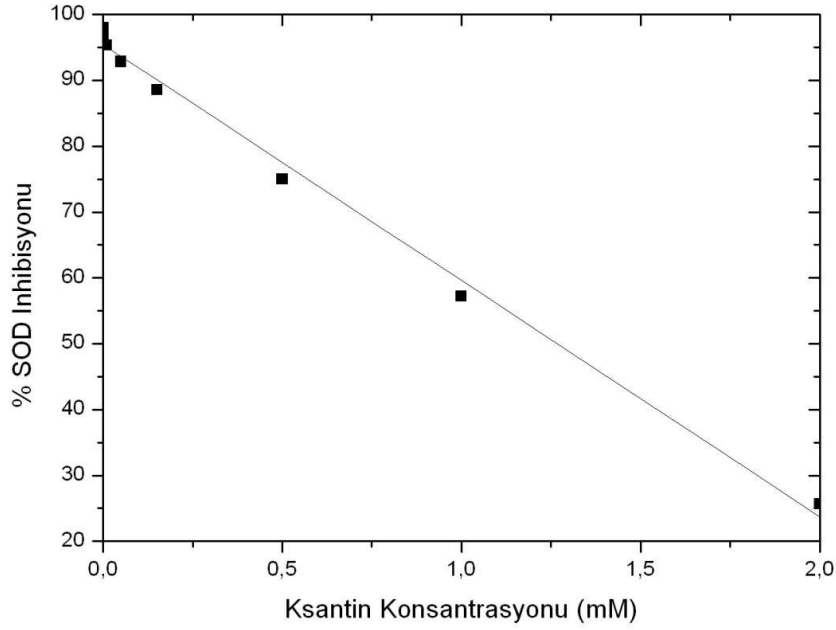
Şekil 5.2 Değişik glutaraldehit konsantrasyonlarının %SOD inhibisyonu üzerine etkisi

Artan glutaraldehit konsantrasyonu ile çapraz bağ sayısı artmıştır. Bu da, sıkı bir jel yapısı oluşturmuştur. Dolayısıyla; substrat ve ürünün içeri giriş ve çıkışı kısıtlanacağından, artan çapraz bağlayıcı konsantrasyonuna bağlı olarak inhibisyonda bir düşüş gözlemlenmiştir. Ayrıca, fazla glutaraldehit konsantrasyonu, enzimin inaktivasyonuna neden olmuştur. 0,0025 mmolL⁻¹ glutaraldehit konsantrasyonunda mekanik dayanıksızlık gözlemlenmiştir.

En uygun glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

5.1.3 Ksantin konsantrasyonu

Jelatin-karboksimetilselüloz oranı 0,100 w/w ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olan immobilize SOD ile değişik Ks konsantrasyonları denenmiştir (Şekil 5.3).



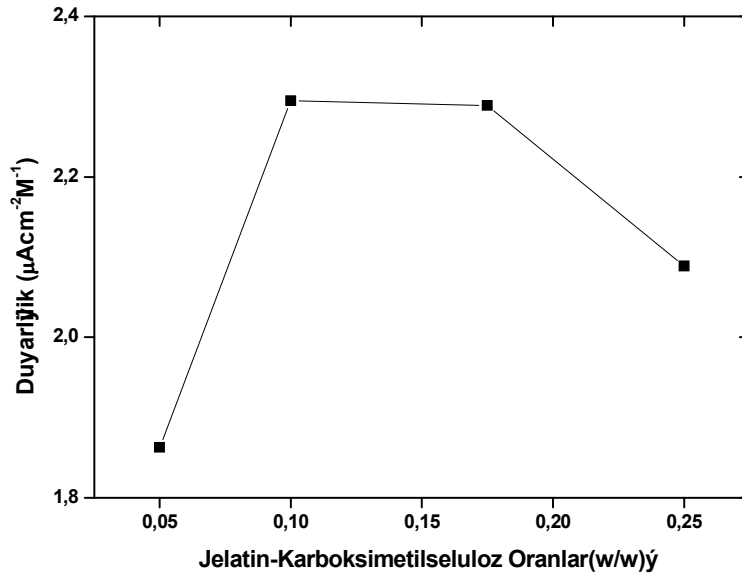
Şekil 5.3. Ksantin konsantrasyonuna bağlı olarak %SOD inhibisyonundaki değişim

Ksantin konsantrasyonunun $0,00125-2 \text{ mmolL}^{-1}$ aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir. Ks konsantrasyonunun artmasıyla SOD inhibisyonunda bir düşüş gözlemlenmiştir. Kalibrasyon grafiğinden de görüleceği gibi oldukça geniş bir doğrusal aralık elde edilmiştir.

5.2 İmmobilize Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Elektrokimyasal Metod ile Optimizasyonu

5.2.1 SOD aktivitesi üzerine J-KMS oranlarının etkisi

İmmobilizasyon şartlarının elektrokimyasal olarak optimize edilmesinde ilk olarak değişik J-KMS oranları denenmiştir. Jelatin-karboksimetilselüloz oranları 0,05-0,25 w/w olacak şekilde SOD enzimi taşıyıcıya $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ glutaraldehit kullanılarak immobilize edililerek optimum J-KMS oranı tespit araştırılmıştır (Şekil 5.4).



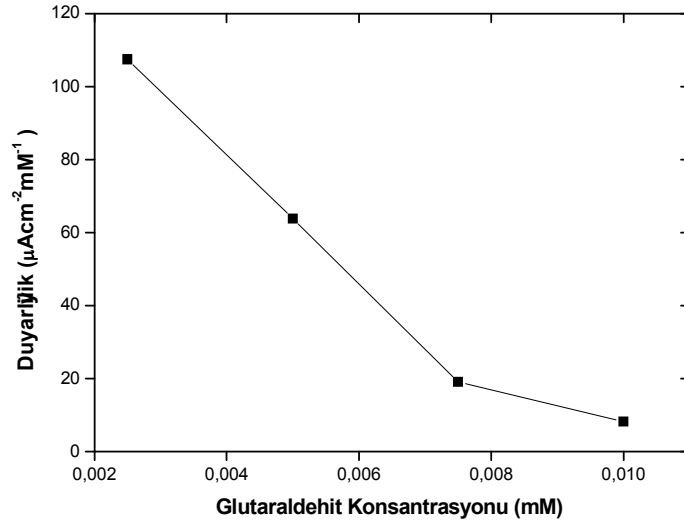
Şekil 5.4 J-KMS oranlarına bağlı olarak akım yoğunluğundaki değişim

Artan J-KMS oranı ile enzimin taşıyıcı bağlanması artmıştır. Böylece, enzim aktivitesi ve elektron aktarımının artmasıyla duyarlılık yükselmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi J-KMS oranı 0,100 w/w olarak belirlenmiştir. İleri oranlarda, gözenek yapısındaki değişikliğe bağlı olarak elektron aktarımının azalmasına bağlı olarak duyarlılıkta düşüş gözlemlenmiştir.

Jelatin-karboximetilseluloz 0,05 w/w oranında enzim sızıntısı gözlenmiştir. Bu yüzden enzim aktivitesi düşük çıkmıştır.

5.2.2 SOD aktivitesi üzerine glutaraldehit konsantrasyonunun etkisi

SOD' un J-KMS taşıyıcı sistemine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0,0025-0,01 mmolL⁻¹ konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır (Şekil 5.5).

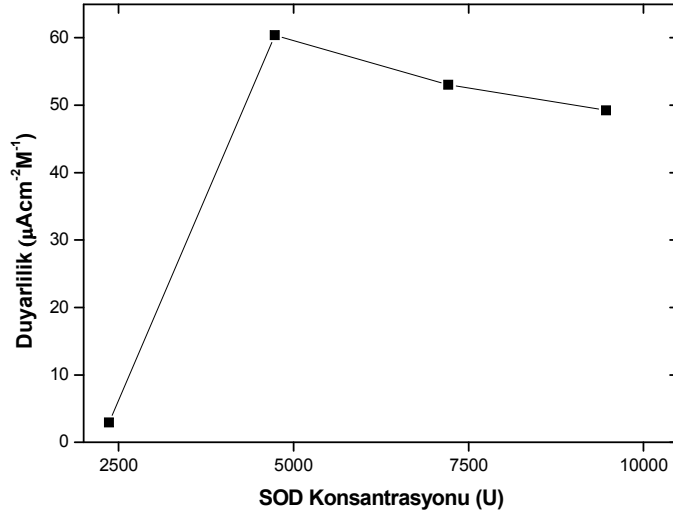


Şekil 5.5 Değişik glutaraldehit konsantrasyonlarının bağlı olarak duyarlılıktaki değişim

En uygun glutaraldehit konsantrasyonu $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Glutaraldehit konsantrasyonlarındaki artış ile enzimin taşıyıcıya bağlanması artmış, bu da difüzyon sınırlamasına neden olmuştur. Yüksek glutaraldehit konsantrasyonu, enzim inaktivasyonuna, elektron aktarımının azalmasına ve buna bağlı olarak da duyarlılıkta düşüşe neden olmuştur (Sungur vd. 2004, Emregül 2005).

5.2.3 Enzim konsantrasyonu

Enzim konsantrasyonlarının akım yoğunluğuna etkisi amperometrik olarak araştırılmıştır. Jelatin-karboksimetilselüloz oranı ve glutaraldehit konsantrasyonu sabit tutularak hazırlanan enzim elektrotları, 2366-9466 U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında hazırlanmış, değişik enzim konsantrasyonları içeren enzim elektrotlarının amperometrik cevabı tespit edilmiştir (Şekil 5.6).

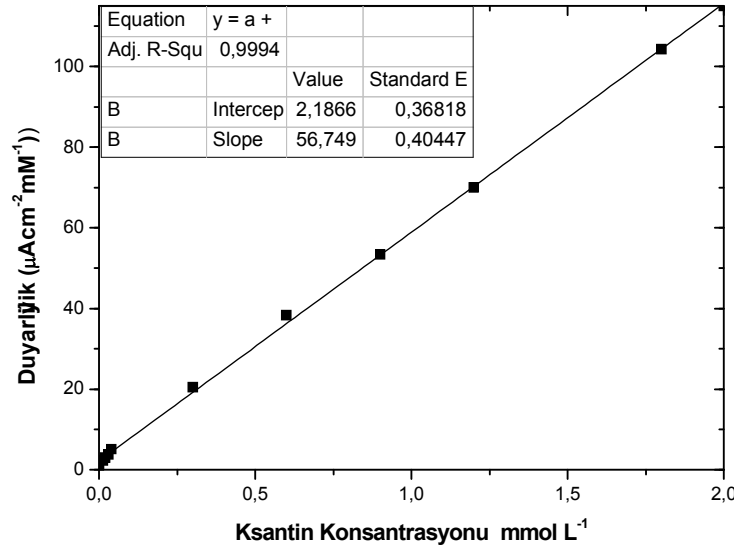


Şekil 5.6 J-KMS-SOD elektrotlarında değişik enzim konsantrasyonlarının amperometrik cevaba etkisi

Artan enzim konsantrasyonuna bağlı olarak, akım yoğunluğunda artış görülmüştür. Maksimum akım yoğunluğu 4733 U (1 mg) enzim konsantrasyonunda elde edilmiştir, ileri konsantrasyonlarda düşüş gözlenmiştir. Çalışmada J-KMS taşıyıcı sistemi ve glutaraldehit konsantrasyonu sabit tutulduğundan, bu muhtemelen artan enzim-enzim çapraz bağlanmasıyla açıklanabilir. Aynı zamanda artan enzim yüklemesi taşıyıcı gözeneklerinde aşırı doymuşlaştıkça, bu da ürün ve substratın difüzyonunu engellemektedir (Bayramoğlu vd. 1992, Emregül 2005). J-KMS-SOD biyosensörü için optimum enzim konsantrasyonu 4733 U olarak tespit edilmiştir ve J-KMS-SOD biyosensörü çalışmaları 4733 U konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, artan konsantrasyonlarda cevap zamanı da uzamaktadır.

5.2.4 Ksantin konsantrasyonu

Jelatin-karboksimetilselüloz oranı 0,100 w/w ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olan immobilize SOD elektrotu ile değişik Ks konsantrasyonları (0,00125-2 mmolL⁻¹) denenmiş ve cevabı tespit edilmiştir (Şekil 5.7).

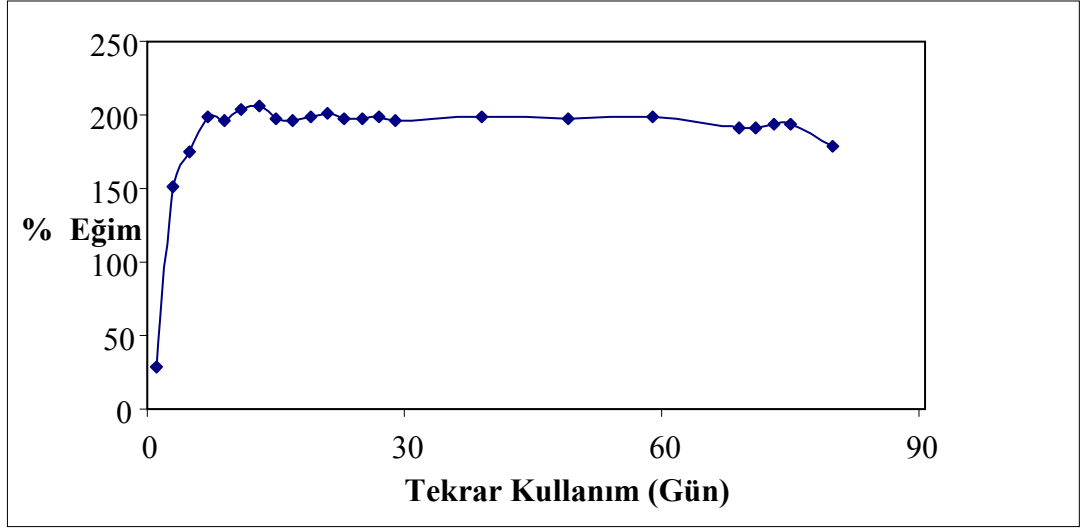


Şekil 5.7 J-KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği

Oluşturulan kalibrasyon grafiğinden görüleceği gibi doğrusal aralık oldukça geniştir. J-KMS-SOD biyosensörünün cevabı $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olup R^2 değeri 0,9994 olarak bulunmuştur. Tayin sınırı sinyal gürültü oranı 3 de $1,25 \mu\text{molL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir.

5.3 J-KMS-SOD Elektrotunun Ömrü

Optimum immobilizasyon koşulları; J-KMS oranı 0,100 w/w, glutaraldehit konsantrasyonu $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ ve enzim konsantrasyonu 4733 U (1 mg) olarak belirlenmiştir. İmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra SOD elektrodu geliştirilmiştir ve elektrotun tekrar kullanılabilirliği tespit edilmiştir (Şekil 5.8). Her kullanımdan sonra elektrotlar fosfat tamponu ($0,05 \text{ mmolL}^{-1}$, pH 7,4) ile yıkanmış ve bir sonraki kullanıma kadar 4°C 'de aynı tampon içinde saklanmıştır.



Şekil 5.8 SOD biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği

J-KMS-SOD biyosensörü 80 günlük süre boyunca aktivitesini korumuştur. Biyosensör yanıtı 80 günlük süre sonunda % 89,82 olmuştur. J-KMS-SOD elektrotunun yanıtındaki azalma, çoğunlukla enzimin deaktivasyonunun bir sonucudur.

Uzun süreli karalılık, uygun immobilizasyon yöntemine ve enzim kaçağını önleyen uygun ortama bağlanabilir. Ayrıca, jelatindeki hidroksil grupları enzim molekülleri ile hidrojen bağı kurma eğilimindedir, bu da enzim kaçağını önler. J-KMS üzerine SOD immobilizasyonu, biyolojik aktiviteyi büyük ölçüde koruyarak, enzim etrafında biyoyumlu mikroçevre sağlamıştır.

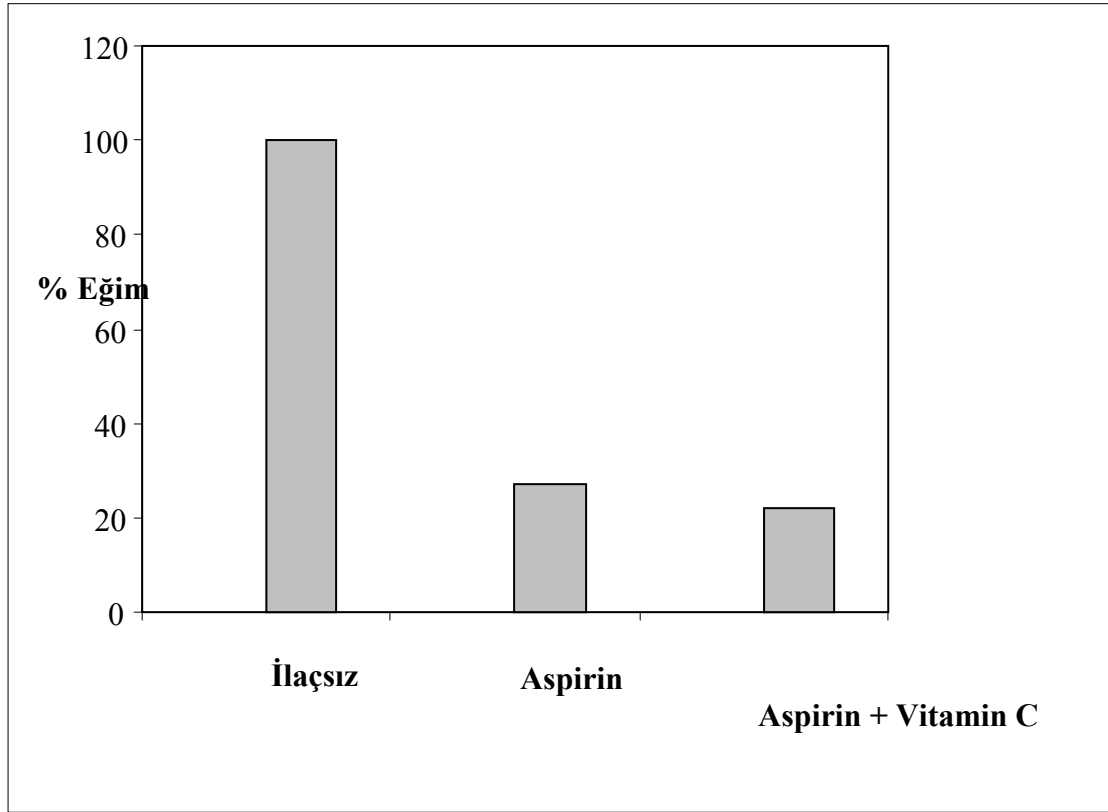
Optimizasyon koşulları belirlenerek geliştirilen J-KMS-SOD biyosensörünün çalışma şartları ve analitik verileri çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1 Sensör için çalışma koşulları ve analitik veriler

Dönüştürücü	Amperometrik H ₂ O ₂ elektrodu
Biyomateryal	SOD
İmmobilizasyon	Çapraz bağlama
Taşıyıcı	J-KMS
Çapraz Bağlayıcı	Glutaraldehit
Tampon	Fosfat Tamponu (0,05 mmolL ⁻¹)
pH	7,4
Sıcaklık (°C)	25±0,5
Substrat	Ks / KsOD sistemi ile üretilen O ₂ ^{•-}
Kalibrasyon grafiği denklemi [y =akım yoğunluğu (μA cm ⁻²); x = Ksantine Konsantrasyonu (mmolL ⁻¹)]	$y=(56,75\pm0,4)x + (2,19\pm0,4)$
Korelasyon katsayısı	0,9994
Doğrusal aralık (mmolL ⁻¹)	$1,25 \times 10^{-3}$ –2
Minimum tayin sınırı (mmolL ⁻¹)	$1,25 \times 10^{-3}$
Yanıt süresi (s)	2
Ksantin Konsantrasyonu (mmolL ⁻¹)	$1,25 \times 10^{-3}$ –2
Analiz süresi (dk)	10
Kullanım süresi (gün)	80

5.4 Radikal Kovucu Moleküller Üzerine Testler

Biyosensör, invitro koşullarda asetilsalisilik asit bazlı ilaçların radikal kovucu özelliklerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Biyosensörün yanıtı O₂^{•-} yokluğunda ve radikal kovucu moleküllerin varlığında tespit edilmiştir. Aspirin ve C vitamini içeren Aspirin, serbest radikalleri kovucu kapasitesini göstermek için kullanılmıştır. Radikal kovucu olarak kabul edilen moleküllerin antioksidan özellikleri, radikal kovucu molekülün varlığı ve yokluğunda kalibrasyon eğrisinin yüzde eğim değerlerine göre değerlendirilmiştir (Şekil 5.9).

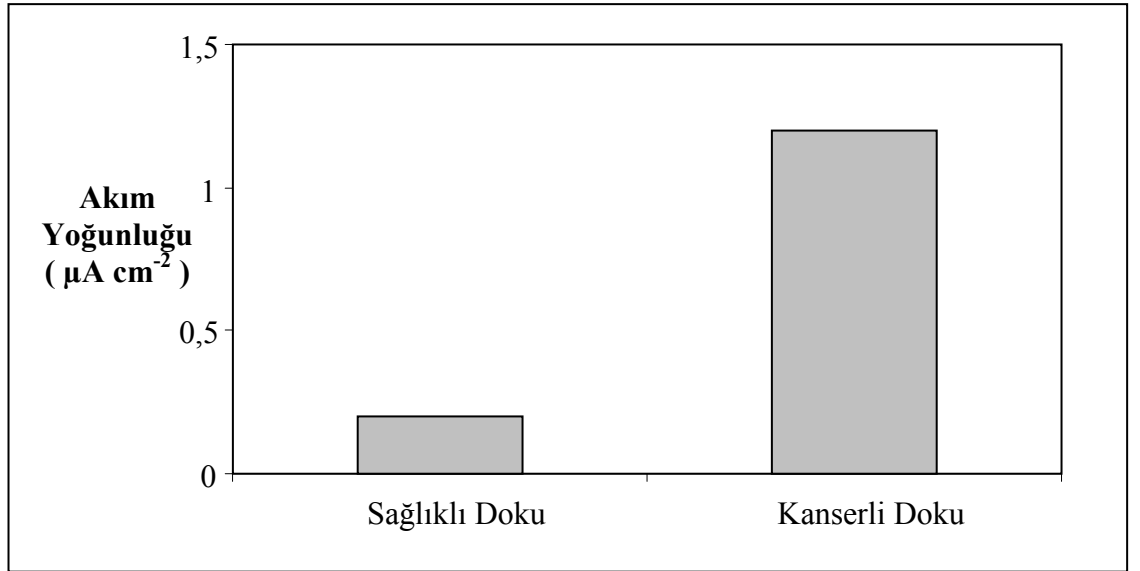


Şekil 5.9 J-KMS-SOD biyosensörü kullanılarak asetilsalisilik asit bazlı ilaçların antioksidan özelliklerinin invitro belirlenmesi, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların varlığında ($12,5 \text{ g L}^{-1}$) ve yokluğunda J-KMS-SOD biyosensörünün $\text{O}_2^{\cdot-}$ e duyarlılığı

Antioksidan özellikteki bir molekülün eklenmesi, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ile antioksidan moleküllerinin etkileşmesi sonucunda çözeltide $\text{O}_2^{\cdot-}$ konsantrasyonunun azalması, sinyal gücünde azalmaya neden olmuştur. Ortama salınan H_2O_2 miktarında, dolayısıyla amperometrik sinyalde bir azalma olmuştur. Geliştirilen J-KMS-SOD biyosensörü, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların antioksidan özelliklerinin invitro belirlenmelerinde kullanılmıştır ve C vitamini içeren aspirinin içermeyene göre antioksidan özelliğinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

5.5 Sağlıklı ve Kanserli Dokular Üzerine Testler

Sağlıklı ve kanserli meingioma (grade I, who 2,000, A.Ü. Beyin ve Sinir Cerrahisi, Doç. Dr Ayhan Attar’ dan alınmıştır.) beyin dokusu üzerinde biyosensör yanıtı test edilmiştir. Bu amaçla 0,5 g doku 3 ml fosfat tamponu içinde homojenize edilmiştir. Fosfat tamponu ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,5) içeren hücrede J-KMS-SOD biyosensörü kararlı hale getirildikten sonra, 500 μl homojenize sağlıklı ve kanserli doku içeren çözeltilerden ilave edilmiş ve sinyaldeki değişim tespit edilmiştir. Sağlıklı veya kanserli doku olmasına bağlı olarak, biyosensörden farklı sinyaller elde edilmiştir (Şekil 5.10). Yanıt doku içindeki $\text{O}_2^{\cdot-}$ konsantrasyonu ile orantılı olmuştur. Sağlıklı dokuya göre, kanserli beyin dokusu büyük miktarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ içermektedir. Süperoksit radikali, canlılarda moleküler oksijenden ara ürün olarak otooksidasyon prosesleri ve enzimler aracılığı ile normal metabolizmada oluşmaktadır. Kanser, yaşlanma, ateroskleroz, diabet, hipertansiyon gibi kontrol edilemeyen durumlarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ oluşmakta, tersinir ve tersinmez hasarlara neden olmaktadır.



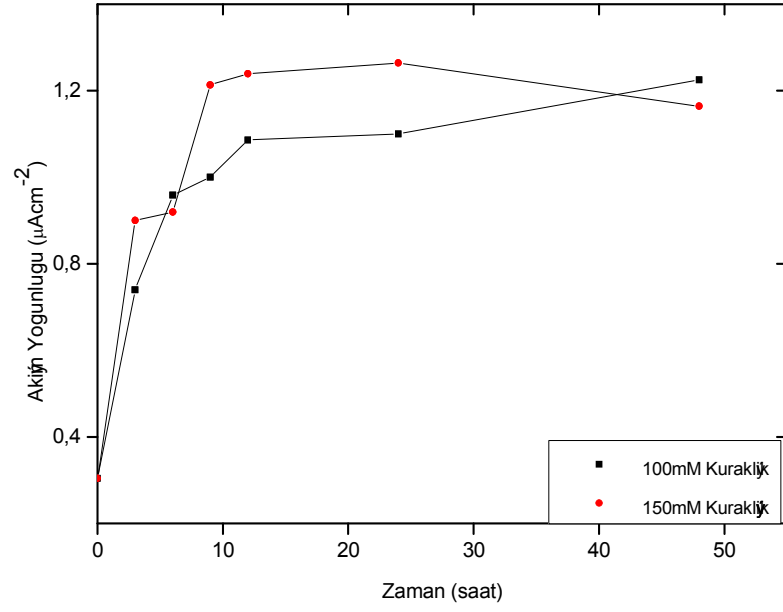
Şekil 5.10 J-KMS-SOD biyosensör sinyalinin homojenize sağlıklı ve kanserli doku ilavesi ile değişimi

5.6 Strese Maruz Kalmış Domates Bitkilerinde Süperoksit Tayini

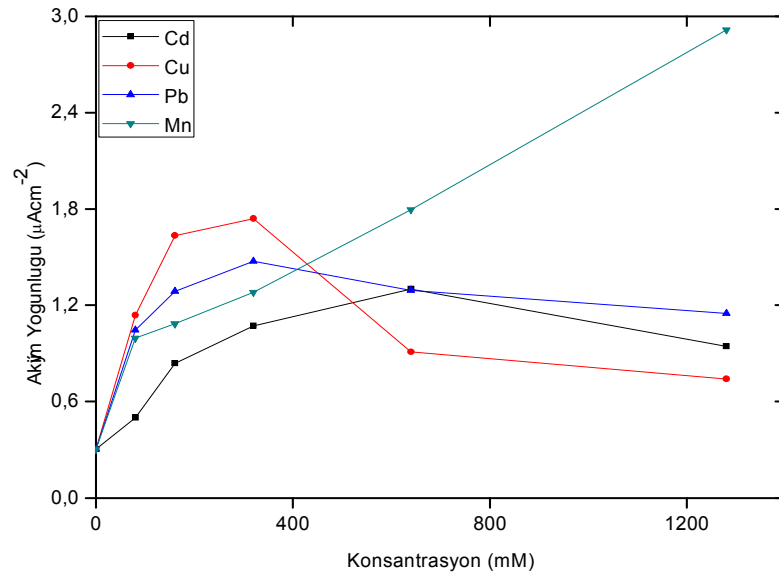
Geliştirilen biyosensör kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkilerinde süperoksit tayini için kullanılmıştır. Kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkileri sıvı azotta ezilmiş, fosfat tamponu ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,4) içinde homojenize edilmiştir.

Kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkileri üzerine biyosensör yanıtı test edilmiştir. Bu amaçla 0,5 g strese maruz kalmış bitki 3 ml PB tamponunda homojenize edilmiştir. Fosfat tamponu ($0,05 \text{ molL}^{-1}$, pH 7,4) içeren hücrede J-KMS-SOD biyosensörü kararlı hale getirildikten sonra, 500 μl homojenize strese maruz kalmış bitki içeren çözeltilerden ilave edilmiş ve sinyaldeki değişim tespit edilmiştir. Strese maruz kalmış bitki kontrole göre, biyosensörde farklı sinyaller vermiştir (Şekil 5.11-5.14). Yanıt, strese maruz kalmış bitki içindeki $\text{O}_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olmuştur. Kontrole göre strese maruz kalmış bitki büyük miktarda $\text{O}_2^{\bullet-}$ içermektedir.

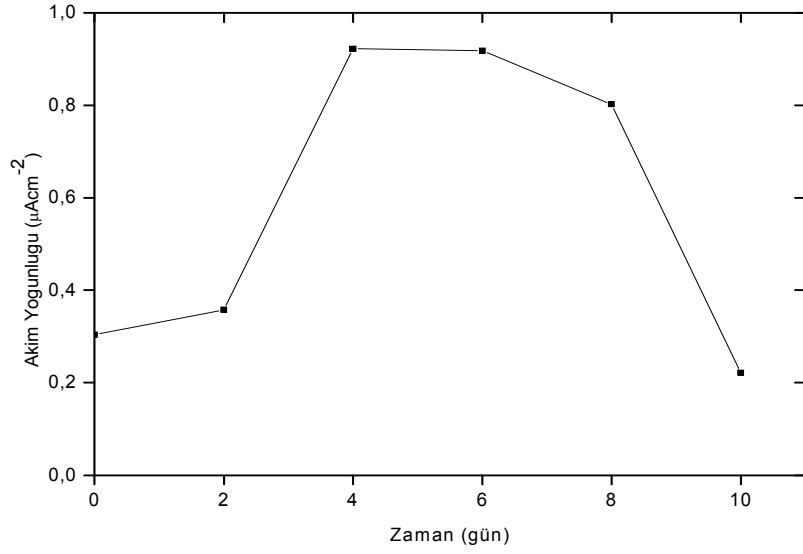
Süperoksit radikali, normalde canlılarda moleküler oksijenden ara ürün olarak otooksidasyon prosesleri ve enzimler aracılığı ile normal metabolizmada oluşmaktadır. Stres koşulları altında (tuz, kuraklık, soğuk) bitkilerde su ve mineral alımının kısıtlanması ile stomal kapanma gerçekleşir ve bu durum, gelişen bitkilerde CO_2 ' nin alımının azalmasına neden olur. Tüm bunlar, kuantum verimini azaltır ve fotosentetik aparatın reaksiyon merkezlerindeki eksitasyon enerjisinin artışına neden olur (Stuhlfauth vd. 1990).



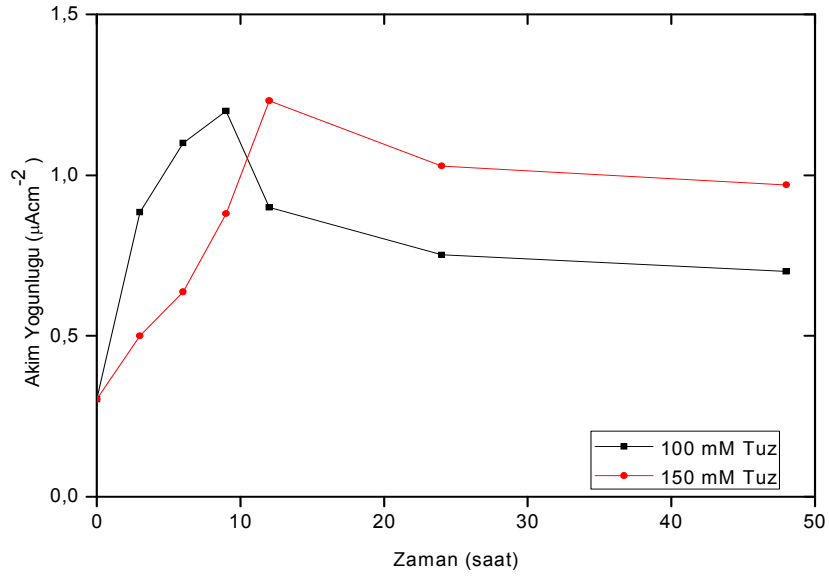
Şekil 5.11 Kuraklık stresinin süperoksit radikali üzerine etkisi



Şekil 5.12 Ağır metal stresinin süperoksit radikali üzerine etkisi



Şekil 5.13 Soğuk stresinin süperoksit radikali üzerine etkisi



Şekil 5.14 Tuz stresinin süperoksit radikali üzerine etkisi

Süperoksit radikali, normalde canlılarda moleküler oksijenden ara ürün olarak otooksidasyon prosesleri ve enzimler aracılığı ile normal metabolizmada oluşmaktadır. Stres koşulları altında (tuz, kuraklık, soğuk) bitkilerde su ve mineral alımının kısıtlanması ile stomal kapanma gerçekleşir ve bu durum gelişen bitkilerde CO₂'nin

alımının azalmasına neden olur. Bu durum, fotosentez sırasında elektronların O_2 molekülüne transferi sonucunda reaktif $O_2^{\bullet-}$ radikali üretilir. Süperoksit kendisi fazla reaktif değildir ancak daha çok H_2O_2 ve daha sonra $OH^{\bullet}$ oluşturmak suretiyle etkili olur (Halliwell ve Gutteridge 1981).

Stres koşullarındaki yüksek elektron taşınım hızı, elektronların CO_2 yerine moleküler oksijene verilmesine ve böylece aktif oksijen partüküllerinin oluşumuyla birlikte bitkide oksidatif strese neden olmaktadır. ROP'lar oksidatif hasar ile hücre yapı ve fonksiyonunu bozabildikleri için hücre açısından potansiyel zarara sahiptirler. Bu zararları engellemek için hücreler antioksidanlara ve antioksidan enzimlere sahiptirler (Kaminaka vd. 1999, Corpas vd. 2006).

Bitki dokularındaki SOD aktivitesinin çeşitli stres faktörleri etkisiyle değiştiği bilinmektedir (Van Camp vd. 1996, Schwanz vd. 1996). Bitkilerde bulunan SOD enzimleri üç izoform gösterir; CuZnSOD, MnSOD, ve FeSOD. SOD izozimleri hücrenin değişik bölümlerinde lokalize olmuşlardır. MnSOD mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. FeSOD esas olarak kloroplastta bulunur ancak peroksizomlarda da varlığı tespit edilmiştir. Kloroplast fotosentez merkezi olduğu için ROP'ların verdiği hasara karşı çok duyarlıdır ve burada ROP'lar fotosentetik elektron transferinden kaçan O_2 ve elektronlar sebebiyle oluşur. Oksidatif hasar ile başa çıkabilmek için bitkiler, kloroplastta bulunan ROP yok edici enzimlerden olan CuZnSOD'ı devreye sokarlar. CuZnSOD aynı zamanda sitozolde, peroksizomda ve apoplastta da bulunur. SOD izozimlerinin sayısı ve tipleri bitkinin türüne, yaşına ve çevre koşullarına göre farklılık gösterir (Kaminaka vd.1999, Corpas vd. 2006).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, süperoksit radikalının tayininde spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek süperoksit dismutaz biyosensörü geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, jelatin-karboksimetilseluloz enzim immobilizasyonunda taşıyıcı materyal olarak glutaraldehit çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır.

Tezde, SOD'un doğrudan elektron transferi temeline dayanan J-KMS-SOD biyosensörü, $O_2^{\bullet-}$ tayini için geliştirilmiştir. Biyosensör, Pt elektrot yüzeyine SOD'un J-KMS içine immobilizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen biyosensör Ks-KsOD sisteminin oluşturduğu $O_2^{\bullet-}$ 'nin kimyasal ve elektrokimyasal tayininde kullanılmıştır.

Tez üç kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda Pt elektrot yüzeyine SOD'un J-KMS içine immobilizasyonunun optimizasyonu kimyasal metod ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla glutaraldehit konsantrasyonu, J-KMS oranı gibi parametrelerin incelenmiş ve J-KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

İkinci kısımda Pt elektrot yüzeyine SOD'un J-KMS içine immobilizasyonunun optimizasyonu elektrokimyasal metod ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enzim konsantrasyonu, glutaraldehit konsantrasyonu, J-KMS oranı, gibi parametrelerin değişimleri incelenmiş ve geliştirilen J-KMS-SOD biyosensörünün kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen kimyasal ve elektrokimyasal sonuçlar karşılaştırılmıştır. İmmobilizasyon koşulları optimize edildikten sonra J- KMS-SOD biyosensörü geliştirilmiştir.

Üçüncü kısımda J- KMS-SOD biyosensörü, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların serbest radikalleri uzaklaştırması özelliklerinin ve sağlıklı, kanserli insan dokularının antiradikal aktivitelerinin tayininde kullanılabilirliği test edilmiştir. Ayrıca J-KMS-SOD biyosensörü kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresi gibi çevresel streslere maruz bırakılmış domates ve kontrol bitkilerinde $O_2^{\bullet-}$ tayini için kullanılmıştır.

Mikrotabaka yüzeyine SOD immobilize edilmiştir. SOD enziminin immobilizasyonu için J-KMS taşıyıcı materyal olarak seçilmiştir. SOD enzimi, değişik J-KMS taşıyıcı sistemine çapraz bağlayıcı glutaraldehit kullanılarak immobilize edilmiştir. Mikrotabakanın her bir kuyucuğunun yüzeyi, SOD enzimi, J-KMS oranında (0,05-0,250 w/w), glutaraldehit (0-0,01 mmolL⁻¹) içeren immobilizasyon jeli ile kaplanarak immobilize SOD mikrotabaka elde edilmiştir. Çalışmada Süperoksit Anyon Assay Kit (Sigma) kullanılmıştır. Süperoksit Anyon Assay Kit, O₂⁻ tarafından luminolün oksidasyonu sonucunda kemilüminesans ışık oluşumuna dayanmaktadır. Kit, pozitif kontrol olarak O₂⁻ oluşturuçu sistem (Ks/KsOD) ve baskılayıcı sistem olarak SOD enzimi içermektedir (negatif kontrol). SOD varlığında Ks/KsOD sistemi ile oluşan O₂⁻ hemen H₂O₂'e dönüştürülmüş ve böylece luminesans yoğunluğunda bir artış görülmemiştir.

Mikrotabaka yüzeyine J-KMS taşıyıcı sistemi kullanılarak SOD immobilize edilmiştir. Değişik J-KMS oranları (0,05-0,250 w/w) kullanılarak immobilizasyonda en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır. En uygun taşıyıcı oranı 0,100 w/w olarak tespit edilmiştir. SOD'un J-KMS taşıyıcı sistemine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0-0,01 mmolL⁻¹ konsantrasyon aralığında glutaraldehit kullanılarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır. En uygun glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Jelatin-karboksimetilseluloz oranı 0,100 w/w ve glutaraldehit konsantrasyonu 0,005 mmolL⁻¹ olan immobilize SOD ile değişik Ks konsantrasyonları denenmiştir. Ksantin konsantrasyonu 0,00125-2 mmolL⁻¹ aralığında doğrusal olduğu tespit edilmiştir.

Platin elektrot yüzeyine SOD'un J-KMS içine immobilizasyonunun optimizasyonu elektrokimyasal metod ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon şartlarının optimize edilmesinde ilk olarak değişik J-KMS oranları denenmiştir. Jelatin-karboksimetilseluloz oranları 0,05- 0,25 w/w olacak şekilde SOD enzimi taşıyıcıya glutaraldehit (0,005 mmolL⁻¹) kullanılarak immobilize edililerek optimum jelatin-karboksimetilseluloz oranı

tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda en iyi J-KMS oranı 0,001 w/w olarak belirlenmiştir.

Enzim konsantrasyonlarının duyarlılığa etkisi amperometrik olarak araştırılmıştır. Enzim elektrotları, 2366-9466 U aralığında değişen enzim konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Değişik enzim konsantrasyonları içeren enzim elektrotlarının amperometrik cevabı tespit edilmiştir. Maksimum duyarlılık 4733 U (1 mg) enzim konsantrasyonunda elde edilmiştir, ileri konsantrasyonlarda düşüş gözlenmiştir. J-KMS-SOD biyosensörü için optimum enzim konsantrasyonu 4733 U olarak tespit edilmiştir ve J-KMS-SOD biyosensörü çalışmaları 4733 U konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir.

Değişik glutaraldehit konsantrasyonları ($0,0025-0,01 \text{ mmolL}^{-1}$), SOD (4733 U) enziminin immobilizasyonunda kullanılmış ve optimum glutaraldehit konsantrasyonu tespit edilmiştir. J-KMS-SOD biyosensörü için optimum glutaraldehit konsantrasyonu $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir ve J-KMS-SOD biyosensörü çalışmaları $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ glutaraldehit konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir.

Jelatin-karboksimetilseluloz oranı 0,100 w/w olan immobilize SOD elektrotu ile değişik Ks konsantrasyonları ($0,125 \mu\text{mol}^{-1}-2 \text{ mmolL}^{-1}$) denenmiş ve değişik konsantrasyon aralığına cevabı tespit edilmiştir. Artan Ks konsantrasyonuna bağlı olarak J-KMS-SOD biyosensörünün cevabı artmıştır.

Optimum immobilizasyon koşulları; J-KMS oranı 0,100 w/w, glutaraldehit konsantrasyonu $0,005 \text{ mmolL}^{-1}$ ve enzim konsantrasyonu 4733 U (1 mg) olarak belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz elektrotun tekrar kullanılabilirliği tespit edilmiştir. J-KMS-SOD biyosensörü 80 günlük süre boyunca aktivitesini korumuştur. Biyosensör yanıtı 80 günlük sonunda % 89,82 olmuştur.

Biyosensör, invitro koşullarda asetilsalisilik asit bazlı ilaçların radikal kovucu özelliklerini değerlendirmek için kullanılmıştır. Biyosensörün yanıtı $\text{O}_2^{\bullet-}$ yokluğunda ve radikal kovucu moleküllerin varlığında tespit edilmiştir. Aspirin ve C vitamini içeren

Aspirinin, serbest radikalleri kovucu kapasitesini göstermek için kullanılmıştır. Radikal kovucu olarak kabul edilen moleküllerin antioksidan özellikleri, radikal kovucu molekülün varlığı ve yokluğunda kalibrasyon eğrisinin yüzde eğim değerlerine göre değerlendirilmiştir.

Antioksidan özellikteki bir molekülün eklenmesi, $O_2^{\bullet-}$ ile antioksidan taneciklerinin etkileşmesi sonucunda çözeltide $O_2^{\bullet-}$ 'i konsantrasyonunun azalması, sinyal gücünde azalmaya neden olmuştur. Ortama salınan H_2O_2 miktarında, dolayısıyla amperometrik sinyalde bir azalma olmuştur. Geliştirilen J-KMS-SOD biyosensörü, asetilsalisilik asit bazlı ilaçların antioksidan özelliklerinin invitro belirlenmelerinde kullanılabilmektedir.

Sağlıklı ve kanserli meingioma (grade I, who 2,000) beyin dokusu üzerinde biyosensör yanıtı test edilmiştir. Sağlıklı veya kanserli doku olmasına bağlı olarak biyosensörden farklı sinyaller elde edilmiştir. Yanıt, doku içindeki $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olmuştur. Sağlıklı dokuya göre kanserli beyin dokusu büyük miktarda $O_2^{\bullet-}$ içermektedir. Süperoksit radikali, normalde yaşayan canlılarda moleküler oksijenden ara ürün olarak otooksidasyon prosesleri ve enzimler aracılığı ile normal metabolizmada oluşmaktadır. Kanser, yaşlanma, atheroskleroz, diabet, hipertansiyon gibi kontrol edilemeyen durumlarda $O_2^{\bullet-}$ oluşmakta, tersinir ve tersinmez hasarlara neden olmaktadır.

Geliştirilen biyosensör kuraklık, tuz, soğuk, ağır metal stresine maruz kalmış domates bitkilerinde $O_2^{\bullet-}$ tayini için kullanılmıştır. Strese maruz kalmış bitki, kontrole göre biyosensörde farklı sinyaller vermiştir. Yanıt, strese maruz kalmış bitki içindeki $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılı olmuştur. Kontrole göre strese maruz kalmış bitki büyük miktarda $O_2^{\bullet-}$ içermektedir.

Geliştirilen biyosensör 80 günlük süre sonunda aktivitesini % 89,82 korumuştur. Geliştirilen biyosensörün cevabı $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu ile orantılıdır ve tayin sınırı $0,125 \mu\text{molL}^{-1}$ 'dir. Birçok patolojik durumda $O_2^{\bullet-}$ konsantrasyonu artmaktadır. J-KMS-SOD biyosensörü kan plazmasında, idrarda ve dokularda kullanılabilir. Geliştirilen biyosensör oldukça ucuz olup hazırlamasının kolay olması, seçiciliği ve ömründen

dolayı avantajlıdır. Sonuç olarak SOD enzimi doğal bir polimer olan J-KMS'a ilk kez immobilize edilmiştir, duyarlılığını korumuştur ve uygun saklama koşullarında tekrar tekrar kullanılabilmiştir.

KAYNAKLAR

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D. and Collin, P. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, Vol.74; pp.324–329.
- Alina, O., Bartosz, G. and Biliński, T. 2010. Oxidative stress during aging of the yeast in a stationary culture and its attenuation by antioxidants. *Cell Biol. Int.*, Vol.34; pp.731-734.
- Auche`re, F. and Rusnak, F. 2002. What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo? *J. Biol. Inorg. Chem.*, Vol.7; pp.664–667.
- Aruoma, O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, Vol.32 (7); pp.671-683.
- Banci, L., Bertini, I., Cantini, F., D’Onofrio, M. and Viezzoli, M. S. 2002. *Protein Sci.*, Vol.11; pp.2479-2492.
- Bafana A., Dutt S., Kumar S., and Ahuja P. S. 2011. Superoxide dismutase: an industrial perspective, *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol.31(1); pp.65-76.
- Bayramoglu, Z., Akbulut, A. and Sungur, S. 1992. *Bioorg Med Chem. Lett.* Vol.2; pp.427.
- Bertini, I., Mangani, S. and Viezzoli, M. S. 1998. *Adv. Inorg. Chem.*, Vol.45; pp.127-250.
- Billard, P. and DuBow, M. S. 1998. Bioluminescence-based assays for detection and characterization of bacteria and chemicals in clinical laboratories. *Clin. Biochem.*, Vol.31; pp.1-14.
- Branda, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L. and Parker, N. 2004. *Free Radical Biol. Med.*, Vol.37; pp.755-767.
- Broun, G.B., Moncke, G. and Wingard, L.B. 1978. *Enzyme Engineering*. Plenum Press, New York.
- Campanella, L., Favero, G., Persi, L. and Tomassetti, M. 2000. New biosensor for superoxide radical used to evidence molecules of biomedical and pharmaceutical interest having radical scavenging properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol.23; pp.69–76.
- Campanella, L., Favero, G., Persi, L. and Tomassetti, M. 2001. Evaluation of radical scavenging properties of several plants, fresh or from a herbalist’s, using a

- superoxide dismutase biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol.24; pp.1055–1064.
- Campanella L., Bonanni A., Bellantoni D., Favero G. and Tomassetti M. 2004. Comparison of fluorimetric, voltammetric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.36; pp.91-99.
- Carey, F.A. and Sundberg, R.J.1984. *Advanced organic chemistry*, second ed., Plenum, New York.
- Carroll, E. 1987. Cross. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, Vol.107; pp.526-545.
- Cepinskas, G., Rui, T. and Kvietys, P.R. 2002. Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.33; pp.433–440.
- Chang, T.M.S., 1976. Microencapsulation of enzymes and biologicals. K., MOSBACH. *Methods Methods in Enzymology*, pp.201–218. Academic Pres, New York.
- Chen,C. X., West, A. C., Cropek, D. M. and Banta, S. 2008. Detection of the Superoxide Radical Anion Using Various Alkanethiol Monolayers and Immobilized Cytochrome c. *Anal. Chem.*, Vol.80, pp.9622–9629.
- Chen, R., Warden, J. T. and Stenken, J. A. 2004. *Anal. Chem.* Vol.76; pp.4734-4740.
- Chawdhury, F.H. and Neale, S.M. 1963. *J. Polymer Sci.* Vol.1; pp.2881-2891.
- Chibata, I., 1978. *Immobilized Enzymes. Research and Development*. Kodansha, Tokyo.
- Choi, M. M. F. 2004. *Microchim. Acta.*, Vol.148; pp.107–132.
- Clark, L.C. and Lyons, C. 1962. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol.102; pp.29–45.
- Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Del Rio, R. A. and Trelease, R. N. 1998. Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in cotyledons of oilseed plants. *New Phytol.* Vol.138; pp.307-314.
- Corpas, F. J., Fernandez-Ocana, A., Carreras, A., Valderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., Rodriguez-Serrano, M., Chaki, M., Pedrajas, J. R., Sandalio, L. M., Del Rio, L. A. and Barroso, J.B. 2006. The Expression of Different Superoxide Dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea Europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiol.* Vol.47(7); pp.984–994.

- Cortina-Puig M., Munoz-Berbel X., Calas-Blanchard C. and Marty J. L. 2009. Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples. *Talanta*, Vol.79; pp.289-294.
- Cui, Y., Barford, J.P. and Renneberg, R. 2007. *Biosens. Bioelectron.* Vol.22; pp.2754–2758.
- Curulli, A., Dragulescu, S., Cremisini, C. and Palleschi, G. 2001. Bioenzyme amperometric probes for choline and choline esters assembled with nonconducting electrosynthesized polymers. *Electroanalysis*, Vol.13; pp.236-241.
- Darley-Usmar, V. and Halliwell, B. 1996. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmaceut. Res.*, Vol.13 (5); pp.649-662.
- Di, J., Bi, S. and Zhang, M. 2004. Third-generation superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol–gel thin film on gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol.19; pp.1479–1486.
- Durst, R.A., Siggaard-Anderson, O., Burtis C.A. and Ashwood, E.R. 1999. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd edition; 133-149, Philadelphia, WB Saunders.
- Emregül, E., Sungur, S. and Akbulut U. 1996. Effect of chromium salts on invertase immobilization onto carboxymethylcellulose-gelatin carrier system. *Biomaterials*, Vol.17; pp.1423-1427.
- Emregül, E. 2005. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol.383; pp.947-954.
- Feldman, P. L., Griffith, O. W. and Stuerhr, D. J. 1993. The surprising life of nitric oxide. *C&EN*, Vol.71 (51); pp.26-38.
- Fink, R. C. and Scandalios, J. G. 2002. Molecular evolution and structure function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys*, Vol.399; pp.19–36.
- Fridovich, I. 1970. *J. Biol. Chem.* Vol.245; pp.4035-4057.
- Fridovich, I. 1997. *J. Biol. Chem.* Vol.272; pp.18515–18517.
- Fridovich, I. 1978. *Science*, Vol.201; pp.875-880.
- Fridovich, I. 1972. *Acc. Chem. Res.*, Vol.5; pp.321.

- Ge, B., Scheller, F.W. and Lisdat, F. 2003. Electrochemistry of immobilized CuZnSOD and FeSOD and their interaction with superoxide radicals. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.18; pp.295-302.
- Gooding, J.J. 2006. *Analytica Chimica Acta*, Vol.559; pp.137.
- Hall, E.A.H. 1990. *Biosensors*, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press., s; 3-30.
- Halliwel, B. 1997. Antioxidant and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* Vol.55 (1); pp.44-52.
- Halliwel, B. 1991. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, Vol.91; pp.14-21. (a)
- Halliwel, B. 1991. Drug antioxidant effects. *Drugs*, Vol.42(4); pp.569-605. (b)
- Halliwel, B. and Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, Vol.219; pp.1–14.
- Halliwel, B. and Gutteridge, J.M.C. 1981. *FEBS Lett.*, Vol.128; pp.347-353.
- Harbour, J.R. and Hair, M.L. 1978. *J. Phys. Chem.*, Vol.82; pp.1397–1399.
- Harrison, D.J., Turner, R.F.B. and Baltes, H.P. 1988. Characterization of perfluorosulfonic acid polymer coated enzyme electrodes and a miniaturized integrated potentiostat for glucose analysis in whole blood. *Anal. Chem.*, Vol.60; pp.2002–2007.
- Haseloff, R.F., Ebert, B. and Wischnewsky, G.G. 1991. *Anal. Chim. Acta*, Vol.243; pp.221–225.
- Hill, H.A. and Davis, J.J. 1999. Biosensors: past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.*, Vol.27; pp.331-335.
- Horozova, E., Dodevska, T. and Dimcheva, N. 2008. *J. Univ. Chem. Tech. Met.*, Vol.43; pp.59–64.
- Ji X., Ren J., Jin J. and Nakamura T. 2007. A sensor for superoxide in aqueous and organic/aqueous media based on immobilized cytochrome c on binary self assembled monolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.23; pp.241-247.
- Jimenez, J.R., Mata-Granados, J.M. and Luque de Castro, M.D. 2007. *Electrophoresis*, Vol.28; pp.789–798.
- Jin, W. and Brennan, J.D. 2002. *Anal. Chim. Acta*, Vol.461; pp.1–36.

- Kalyanaraman, B., Perez-Reys, E. and Mason, R.P. 1980. Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of guinone anticancer drugs. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol.630; pp.119.
- Kehrer, J. P. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* Vol.149; pp.43–50.
- Kehrer, J. P. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev. Toxicol.*, Vol.23 (1); pp.21-48.
- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S. and Scouten, W.H., 1983. Immobilized Enzymes in Solid Phase Biochemistry (W. H., SCOUTEN). *Chemical Analysis*. John Wiley and Sons. New York, pp. 253–392.
- Kim, S-W., ‘Development of Enzyme Immobilization Technique’, Bioprocess Engineering Laboratory, Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University.
- Kour, H. and Perkins, M.J. 1991. The free radical chemistry of food additives, In Ed: Arvoma O.I, Halliwell B. *Free radicals and food additives*, New York.
- Leonard, B. E. 2001. *Int. J. Dev. Neurosci.*, Vol.19; pp.305-312.
- Liang, L. P. and Patel, M. J. 2004. *Neurochem.*, Vol.90; pp.1076-1084.
- Liu H., Tian Y., and Xia P. 2008. Pyramidal, Rodlike, Spherical Gold Nanostructures for Direct Electron Transfer of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase: Application to Superoxide Anion Biosensors. *Langmuir*, Vol.24; pp.6359-6366.
- Luisi, P.L. and Magid, L.J., 1986. . Solubilization of Enzymes and Nucleic Acids in Hydrocarbon Micellar Solutions. *Critical Reviews in Biochemistry*, Vol.20 (4): pp.409–474.
- Lvovich, V. and Scheeline, A. 1997. Amperometric sensors for simultaneous superoxide and hydrogen peroxide detection. *Anal. Chem.*, Vol.69; pp.454–462.
- Malitesta, C., Palmisano, F., Torsi, L., Zambonin, P.G. 1990. Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an electropolymerised poly(o-phenylenediamine) film. *Anal. Chem.*, Vol.62; pp.2735-2740.
- Marletta, M.A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, Vol.78; pp.927-930.
- Marletta, M.A. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, Vol.268 (17); pp.12231-12234.

- Martinez-Pérez, D., Ferrer, M.L. and Mateo, C.R. 2003. *Anal. Biochem.*, Vol.322; pp.238–242.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. J. 1969. *Biol. Chem.*, Vol.244; pp.6049-6055.
- Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M. and Luong, J. H. 2000. Fiber-optic biosensors-Trends and advances. *Analytical Science*, Vol 16 July; pp.677-692.
- Mello, L.D. and Kubota, L.T. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem.*, Vol.77; pp.237–256.
- Morgan, C.L., Newman, D.J. and Price, C.P. 1996. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clin. Chem.*, Vol.42; pp.193-209.
- Naughton, D.P., Grootveld, M., Blake, D.R., Guestrin, H.R. and Narayanaswamy, R. 1993. *Biosens.Bioelectr.*, Vol.8; pp.325-329.
- Ohsaka, T., Tian, Y., Shioda, M., Kasahara, S. and Okajima, T. 2002. *Chem. Commun.*, pp.990-991.
- Onar, M. K. 1990. *Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Derg.*, Vol.7 (3); pp.285-293.
- Özsöz, M. 2005. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri. Gıda kongresi (19-21 Nisan 2005 Bornova/İzmir) Sözlü bildiriler s:266-273.
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E. E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E. A. and Waterbury, J. 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*, Vol.424; pp.1037–1042.
- Pandey, P.C. and Weetall, H.H. 1994. Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation. *Anal. Chem.*, Vol.66; pp.1236-1241.
- Pastor, I., Esquembre, R., Micol, V., Mallavia, R., Mateo, C.R. 2004. *Anal. Biochem.*, 334; 335–343.
- Paul, A., Belton, A., Nag, S., Martin, I., Grotewiel, M. S. and Duttaroy, A. 2007. Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging. *Mech. Ageing Dev.*, Vol.128; pp.706–716.
- Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D. and Tainer, J. A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*, Vol.1804; pp.245–262.
- Prasad, K., Kalra, J. and Bhardwaj, B. 1989. *Br.J. Exp. Pathol.* Vol.70; pp.463-468.

- Prieto-Simón, B., Cortina, M., Campàs, M. and Calas-Blanchard, C. 2008. Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sensors and Actuators B*, Vol.129; pp.459-466.
- Ramanathan, S., Ensor, M. and Daunert, S. 1997. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends Biotechnol.*, Vol.15; pp.500-506.
- Reichl, S., Vocks, A., Petkovic, M., Schiller, J. and Arnhold, J. 2001. *Free Radical Res.*, Vol.35; pp.723–733.
- Salinas-Castillo, A., Pastor, I., Mallavia, R. and Mateo, C. R. 2008. Immobilization of a trienzymatic system in a sol–gel matrix: A new fluorescent biosensor for xanthine. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.24; pp.1053-1056.
- Salvemini, D. and Botting, R. 1993. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *TIPS*, Vol.141; pp.36-42.
- Sang, M. I., Bier, F. F. and Scheller, F. W. 1995. *Bioelectrochem. Bioeng.*, Vol.38; pp.419-422.
- Scheller, F.W., Pfeiffer, D., Schubert, F., Reneberg, R. and Kirstein, D. 1987. Application of enzyme amperometric biosensors to analysis of real objects. In: Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (Eds.), *Biosensors: Fundamental and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK (Chapter 18).
- Schwanz, P., Picon, C., Vivin, P., Dreyer, E., Guehl, J. M. and Polle, A. 1996. Responses of Antioxidative Systems to Drought Stress in Pendunculate Oak and Maritime Pine as Modulated by Elevated CO₂. *Plant Physiol.* Vol.110(2); pp.393-402.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fisher, E.I. and Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.*, Vol.18; pp.567–579.
- Singh, S., Singhal, R. and Malhotra, B.D. 2007. *Anal. Chim. Acta*, Vol.582; pp.335–343.
- Stohs, S. J. and Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.18(2); pp.321-336.
- Stuhlfauth, T., Scheuermann, R. and Fock, H. P. 1990. Light Energy Dissipation under Water Stress Conditions: Contribution of Reassimilation and Evidence for Additional Processes. *Plant Physiol.* Vol.92(4); pp.1053-61.
- Sudha, C., Lata S. M. and Tejraj, M. A. 2010. Interpenetrating polymer network blend microspheres of chitosan and hydroxyethyl cellulose for controlled release of isoniazid. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol.47; pp.171-179.

- Sungur, S., Emregül, E., Günendi, G. and Numanoglu, Y. 2004. J Biomater. Appl. Vol.18(4); pp.265.
- Tammeveski, K., Tenno, T. T., Mashirin, A. A., Hillhouse, E. W., Manning, P. and Mcneil, C. J. 1998. Free Radic. Res. Comm., Vol.25; pp.973-978.
- Telefoncu, A. 1997. Biyosensörler. Biyokimya lisansüstü yaz okulu 20-26 Haziran 1999 Kusadası, Türkiye. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, 1-9.
- Tian, Y., Mao, L., Okajima, T. and Ohsaka T. 2004. Electrochemistry and Electrocatalytic Activities of Superoxide Dismutases at Gold Electrodes Modified with a Self-Assembled Monolayer. Anal. Chem. Vol.76; pp.4162-4168.
- Tian, Y., Shioda, M., Kasahara, S., Okajima, T., Mao, L., Hisabori, T. and Ohsaka T. 2002. A facilitated electron transfer of copper-zinc superoxide dismutase (SOD) based on a cysteine-bridged SOD electrode. Biochimica et Biophysica Acta., Vol.1569; pp.151-158.
- Urdike, S. J. and Hicks, G.P. 1967. The enzyme electrode. Nature, Vol.214; pp.986-988.
- Van Camp, W., Capiou, K., Van Montagu, M., Inzé, D. and Slight, L. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. Plant Physiol. Vol.112(4); pp.1703-14.
- Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems Engineering, Vol.84(1); pp.1-12.
- Wang, S.S., 1993. Chemistry of Protein Conjugation and Cross Linking. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Wang, J. 1995. Electroanalysis and biosensors. Anal. Chem., Vol.67; pp.487-492.
- Wang Y., Wu Y., Wang J. and Di J. 2009. Disposable superoxide anion biosensor based on superoxide dismutase entrapped in silica sol-gel matrix at gold nanoparticles modified ITO electrode. Bioprocess Biosyst. Eng., Vol.32; pp.531-536.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buchmann, A.F. and Kula, M.R., 1981. Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration. Biotechnology and Bioengineering, Vol.23; pp.2789-2802.
- Wollenberger, U., Schubert, F., Pfeiffer, D. and Scheller, F.W. 1993. Trends Biotechnol., Vol.6; pp.255-262.

- Xiaojun, J., Chen, Alan, C., West, Donald, M., Cropek, and Scott B. 2008. Detection of the superoxide radical anion using various alkanethiol monolayers and immobilized. Cytochrome, Anal. Chem., Vol.80; pp.9622-9629.
- Zhou, Y. L., Liao, J. M., Chen, J. and Liang, Y. 2006. Macromolecular crowding enhances the binding of superoxide dismutase to xanthine oxidase: Implications for protein protein interactions in intracellular environments. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Vol.38; pp.1986-1994.
- Ziegler, C. and Gopel, W. 1998. Biosensor development. Curr. Opin. Chem. Biol., Vol.2; pp.585-591.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge KOCABAY
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 01.07.1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çankaya Atatürk Anadolu Lisesi (Atatürk Lisesi), Ankara
(2004)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2009)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya (Biyokimya) Anabilim Dalı
(Şubat 2009 – Ağustos 2011)