

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Tomáš Otépka

ELEKTROCHEMICKÝ VÝZKUM NOVÝCH REDOXNÍCH
INDIKÁTORŮ PRO DETEKCI POŠKOZENÍ DNA

Electrochemical Investigation of Novel Redox Indicators for
Detection of DNA Damage

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. června 2018.

Abstrakt

Cílem této práce bylo zkoumání nových redoxních systémů, které by bylo možné využít pro detekci poškození DNA na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE). Jako slibné se nabízely komplexy 1,10-fenantrolinu (phen) a iontů přechodných kovů. Konkrétně byly provedeny pokusy s komplexy kobaltaných iontů a phen, jejichž příprava byla provedena slitím roztoků obou složek v příslušném poměru. Chování komplexů v této směsi bylo porovnáno se syntetizovaným komplexním kationtem $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, a to jednak s využitím voltametrické techniky, jednak spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Analýzy na m-AgSAE probíhaly s využitím techniky diferenční pulsní voltametrie (DPV) ve vodném prostředí. Jako základní elektrolyt byl zvolen $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$, který poskytoval nejširší potenciálové okno v katodické oblasti potenciálů. Nízkomolekulární DNA z lososího spermatu byla využita v následujícím modifikační kroku pro vytvoření modifikované elektrody. Poškození DNA bylo provedeno vystavením takto připraveného biosenzoru UV-C záření o vlnové délce 254 nm. Poškozená DNA naadsorbovaná na m-AgSAE byla testována pomocí DPV v elektrochemické cele obsahující ionty Co^{2+} nebo komplex Co^{2+} a phen, obojí o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na získaných voltamogramech byla sledována potenciální interakce těchto indikátorů a poškozené DNA a výsledek byl porovnán s výsledky interakce indikátorů s nepoškozenou DNA. Komplexy Co^{2+} s phen neposkytly příznivé výsledky, naopak jako slibné se jeví samotné ionty Co^{2+} , pomocí nichž bylo možné sledovat poškození DNA UV-C zářením, jehož míra závisela na době ozařování.

Klíčová slova

nové redoxní indikátory, komplexy 1,10-fenantrolinu, ionty kobaltu, elektrochemické DNA biosenzory, diferenční pulsní voltametrie, stříbrná pevná amalgámová elektroda, detekce poškození DNA

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	6
1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1 Struktura a vlastnosti 1,10-fenantrolinu	8
2.1.1 Komplexy 1,10-fenantrolinu	9
2.2 DNA a zdroje jejího poškození	13
2.3 Diferenční pulzní voltametrie	15
2.4 Pracovní elektroda	15
3. Experimentální část	17
3.1 Použité chemikálie	17
3.2 Použitá aparatura	18
4. Výsledky a diskuze	20
4.1 Závislost na pH	20
4.2 Absorpční spektrum fenantrolinu	21
4.3 Detekce iontů kovů a kalibrační závislost	21
4.4 Voltametrické výsledky směsi Co^{2+} a phenu	23
4.5 Komplex $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$	26
4.6 Spektrofotometrické vlastnosti studovaných látek	27
4.7 Detekce DNA	30
4.8 Detekce poškozené DNA	32
5. Závěr	35
Literatura	36

Tato bakalářská práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR P206/12/G151).

Děkuji doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytl v průběhu práce na bakalářské práci. Vážím si jeho trpělivosti a nasazení při konzultacích nad postupem práce.

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	adenin
A ^{ox}	oxidovaná forma adeninu
C	cytosin
CPD	dimer cyklobutanpyrimidinu
CV	cyklická voltametrie
DPV	diferenční pulsní voltametrie
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál
E_s	počáteční potenciál regenerace
E_f	konečný potenciál regenerace
G	guanin
G ^{ox}	oxidovaná forma guaninu
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K	rovnovážná konstanta
I_p	výška proudového píku
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
phen	1,10-fenantrolin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCE	nasyčená kalomelová elektroda
T	thymin
UV	ultrafialová oblast spektra
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast spektra

1. Úvod

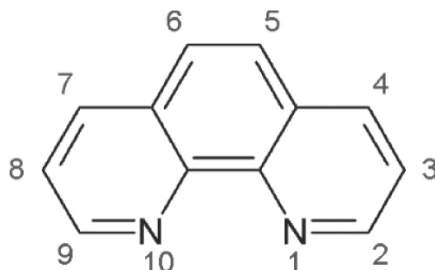
Nalezení účinných metod pro analýzu poškozené DNA je nadále ve velkém zájmu vědecké veřejnosti. DNA podléhá řadě degradačních strukturních změn v důsledku vnějších vlivů (např. slunečního záření či karcinogenních složek potravy), příčinou ale mohou být také poruchy metabolismu organismu.

Tato práce se snaží najít alternativní možnost k již zavedeným metodám sledujícím poruchy v sekvenci DNA. Elektrochemie nabízí v tomto směru řadu variant. V předkládané bakalářské práci jsou studovány nové redoxní indikátory – kobaltnaté ionty a jejich komplexy s 1,10-fenantrolinem, u nichž se zkoumá interakce s DNA a možnost indikace poškození DNA. Při voltametrických analýzách je použita technika diferenční pulsní voltametrie (DPV) na stříbrné pevné amalgámové elektrodě, která má značnou výhodu – v porovnání se systémy využívající kapalnou rtuť je netoxická, další pozitivum spočívá v jejích nízkých pořizovacích nákladech. Pro poškození struktury DNA je v práci použito UV záření typu C o vlnové délce 254 nm.

2. Teoretická část

2.1 Struktura a vlastnosti 1,10-fenantrolinu

1,10-Fenantrolin (phen) je heterocyklická organická látka tvořená třemi aromatickými kruhy, které obsahují dva atomy dusíků, jak je znázorněno na obr. 1. Za normálních podmínek se jedná o bílou krystalickou látku rozpustnou ve vodě. Mnohem lépe se rozpouští v ethanolu, benzenu, etheru a zředěných kyselinách [1]. Phen je planární, hydrofobní molekulou, typicky dvojnásobným ligandem v komplexech kovů a představuje významnou molekulu v koordinační chemii [2]. Atomy dusíku v molekule phenu vytvářejí koordinační vazby přednostně s kationty přechodných kovů. Ve vodném prostředí se phen chová jako slabá zásada a tvoří oktaedrální komplexy typu $[M(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[M(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ a $[M(\text{phen})_3]^{2+}$, kde M představuje přechodné kovy čtvrté periody periodické tabulky. Stabilita komplexu se řídí Irwing-Wiliamsovou řadou [3], přičemž konstanty stability se pohybují v rozmezí od 4,13 pro $[\text{Mn}(\text{phen})]^{2+}$ až 9,25 pro $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$. Deficit π elektronů molekuly phenu z něj dělá dobrého akceptora π -elektronů, a podílí se tak na stabilitě komplexu kovů přechodných prvků při jejich nízkých oxidačních stavech.



Obr. 2.1: Strukturální vzorec 1,10-fenantrolinu.

Deriváty a komplexy phenu se díky svým strukturálním vlastnostem využívají jako interkalační činidla nebo látky vázající se do žlábků DNA či RNA [2]. Některé komplexy kovů jako $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ štěpí kostru DNA, čehož je využíváno v molekulární biologii.

Ve vodném roztoku phen absorbuje záření o vlnové délce 229 nm a 265 nm při elektronovém přechodu $\pi \rightarrow \pi^*$ do energeticky nejnižšího singletového stavu [2].

Phen je ve vodném prostředí relativně chemicky inertní kromě reakcí vedoucích ke vzniku solí a komplexotvorných reakcí [1]. Platí však, že nukleofilní reagenty jsou vázány do polohy 2, 9 a 4, 7. Nejvíce aktivními místy pro elektrofilní reagenty jsou polohy 5, 6 a 3, 8, kde je elektronová hustota molekuly vyšší. Toho se využívá při syntéze derivátů phenu, nitrace či

sulfonace phenu za drastických podmínek.

Fenantrolin je také znám pro svou inhibiční schopnost u řady metaloenzymů. Poprvé byla tato vlastnost popsána u karboxypeptidasy A, pro jejíž katalytickou aktivitu je nepostradatelný Zn^{2+} [4]. Při kontaktu s phenem je zinečnatý iont odtržen od enzymu a chelátován.

Tab. 1.1: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti a další charakteristiky 1,10-fenantrolinu

CAS registrační číslo	66-71-7
Relativní molekulová hmotnost	180,209
H-věty	H301-H410
P-věty	P273-P301 + P310-P501
Teplota tání	114-117 °C

2.1.1 Komplexy 1,10-fenantrolinu

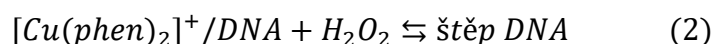
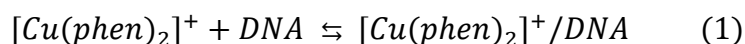
Byla studována řada komplexů phenu s přechodnými kovy, jako jsou Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ln^{3+} , Ru^{2+} , Rh^{3+} a Os^{2+} , především pro svou schopnost interakce s DNA, která indukuje poškození DNA, jako je sestřih polynukleotidového řetězce [2]. Typ interakce závisí nejenom na formě DNA, ale také na struktuře komplexu phenu. Tyto komplexy nejčastěji interkalují do A-DNA, B-DNA, zatímco interkalace do levotočivé Z-DNA je vzácná, a to v důsledku odlišného uspořádání párů bází. Další možností interakce těchto komplexů s DNA je vnoření ligandu do malého či velkého žlábků polynukleotidového řetězce. To je umožněno hydrofobními efekty mezi částí molekuly phenu a kostrou DNA. Na základě NMR a spektrálních studií komplexů phenu bylo zjištěno, že při interakci s DNA vzniká nekovalentní vazba elektrostatickými silami, hydrofobním efektem proti menšímu žlábků DNA, nebo částečnou interkalací ligandu komplexu do sekvence bází DNA nacházejících se na větším žlábků [5].

Po interakci komplexů phenu může následovat zlom vlákna DNA, který z obecného hlediska nastává skrze hydrolýzu [2]. Centrální atom komplexu interaguje s fosfátovou skupinou, čímž zaniká fosfoesterová vazba. Další možností je oxidativní cesta. V posledním případě může docházet ke vzniku radikálů na cukerné složce polynukleotidového řetězce v důsledku reakce s vodíkovými atomy na deoxyribose. Radikál se přeskupí a způsobí zlom vlákna DNA. Mechanismus sestřihu je silně ovlivněn přechodným kovem vázaným k molekule phenu. Zatímco komplexy Cu^+ a Fe^{2+} štěpí vlákno oxidativně, u zinečnatých iontů byly pozorovány hydrolytické vlastnosti.

Vazebný a štěpící účinek těchto komplexů může být zvýšen adicí funkčních skupin na molekulu phenu [2].

Komplexy mědi

Komplexy phenu s centrálním atomem mědi vykazují nukleasovou aktivitu, která byla studována Sigmanem a jeho kolegy poprvé při inhibici DNA polymerasy I bakterie *Escherichia coli* [6,7]. Zprvu se předpokládalo, že citlivost tohoto enzymu k phenu je dána katalytickým iontem zinku v aktivní části enzymu. Ve skutečnosti je DNA polymerasa I inhibována v důsledku sestřihu DNA po reakci s $[Cu(phen)_2]^+$ a H_2O_2 . Peroxid vodíku se generuje *in situ*. Analýza štěpených fragmentů odhalila, že sestřih je způsoben oxidací cukerné složky DNA. Reakční mechanismus aktivity nukleasy vyžaduje navázání $[Cu(phen)_2]^+$ na DNA v takové orientaci, kde měďný iont komplexu má přístup k C-1 vodíku deoxyribosy malého žlábků vlákna DNA.



Rovnice (1) a (2) naznačují, že vazba mezi DNA a měďným komplexem phenu je nekovalentní [7]. $[Cu(phen)_2]^+$ má strukturu planární.

Pro výzkum interakce komplexů mědi s DNA byla aplikována řada technik: z elektrochemických DPV, cyklická voltametrie (CV), square wave voltametrie; z oblasti optických technik pak UV spektrofotometrie, cirkulární dichroismus a celá řada dalších technik jako HPLC nebo rentgenová difrakce [8].

$[Cu(phen)_2]^{2+}$ je elektrochemicky aktivní látka, jejíž elektrochemické chování závisí na materiálu použité elektrody [8]. V práci [8] poskytla analýza roztoku tohoto komplexu na elektrodě se skelným uhlíkem lépe definovanou a citlivější elektrochemickou odezvu než na elektrodě zlaté. Experiment provedený CV ukázal klesající katodický i anodický elektrický proud s přidávkou roztoku DNA. Anodický proud navíc klesá rychleji než katodický, což lze vysvětlit tak, že DNA má větší vliv na oxidační chování komplexu. Interkalační vlastnost tohoto komplexu naznačuje posun potenciálu píku katodického i anodického směrem ke kladným hodnotám. Posun k záporným hodnotám potenciálu by naopak byl sledován, pokud by se molekula elektrostaticky vázala se záporně nabitou deoxyriboso-fosfátovou kostrou DNA. Výsledky dalších analýz lze dohledat v článku [8].

Absorpční maximum na UV spektru systému $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ -DNA je pro volný $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ i navázaný komplex na DNA při vlnové délce přibližně 263 nm [8].

Komplexy zinku

Bylo zjištěno, že komplexy zinku a phenu poskytují voltametrickou odezvu při redukčním potenciálu -1,300 V na kapající rtuťové elektrodě (vs. SCE) [9]. Analýza proběhla v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 9. S přidávkou roztoku DNA klesla proudová odezva a potenciál píku se posunul k zápornějším hodnotám. U složitějších komplexů iontů zinku a phenu byly objeveny antibakteriální účinky [10]. Spektrofotometrické studie zjistily, že komplex iontů zinku a phenu neabsorbuje záření o vlnové délce větší než 350 nm [11]. V oblasti UV je absorpční křivka komplexu iontů zinku podobná komplexu iontů železa i phenu samotnému. Samotný zinečnatý iont vykázal nulovou absorpci.

Komplexy železa

$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ je komplex známý pod názvem ferroin a je významným indikátorem při redoxních titracích se standardním potenciálem 1,06 V. Redukovaná forma má tmavě červenou barvu, oxidovaná pak světle modrou. Na základě studie [12] byl systém komplexu iontů železa a phenu detekován technikou CV na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE), $E_{1/2} = -0,863$ V (vs. SCE). V přítomnosti DNA byl $E_{1/2} = -0,864$ V. DNA tak polohu půlvolného potenciálu nijak neovlivnila. Dá se tak předpokládat, že obě poloviny redoxní dvojice $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ interagují s DNA stejnou měrou.

Komplexy kobaltu

Kobalt je považován za esenciální prvek v lidském organismu a je součástí například vitamínu B₁₂ [13]. Jeho příjem v nižších nebo vyšších hodnotách oproti hodnotám, které jsou považovány za optimální a fyziologické, může vést k toxicitě. Pro jeho stanovení v biologických a přírodních vzorcích proto byla zavedena řada metod.

Technika adsorpční voltametrie s HMDE byla použita pro stanovení Co^{2+} [13]. Metoda využívá phen jako chelatační činidlo, které je dostatečně selektivní a lze jej využít pro stanovení Co^{2+} i v přítomnosti vyšší koncentrace Zn^{2+} . V práci [13] autoři zkoumali také vliv chemických a fyzikálních parametrů (adsorpční potenciál, koncentrace phenu, pH roztoku, adsorpční čas, teplota) na výšku proudové odezvy po ustanovení termodynamické rovnováhy formace komplexu phenu a po jeho naadsorbování pomocí konvekce na HMDE.

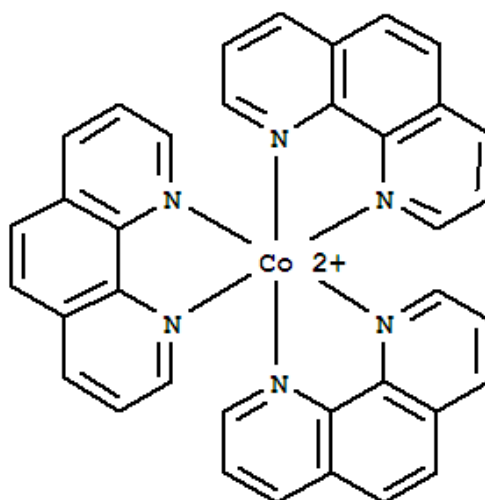
V jiném vědeckém článku byl komplex $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$ (obr. 2) využit pro své interkalační vlastnosti do DNA a tato interakce byla sledována pomocí CV na HDME (vs. SCE) [12]. Formální potenciál systému $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}/[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$ byl spočten jako průměr katodického a anodického potenciálu při nejvyšší proudové odezvě a činil 0,140 V. V přítomnosti DNA se píky posunuly ke kladným hodnotám jak v katodické oblasti potenciálů, tak v anodické. Posun formálního potenciálu ke kladným hodnotám naznačuje, že Co^{3+} a Co^{2+} mají k DNA rozdílné vazebné vlastnosti. Systém Co^{2+} se váže k DNA asi $2\times$ silněji. To bylo zjištěno porovnáním rovnovážných konstant, jejichž poměr byl určen pomocí Nernstovy rovnice (3) pro reverzibilní redoxní reakce jednotlivých oxidačních stavů komplexu kobaltu s DNA.

Poměr rovnovážných konstant jednotlivých oxidačních stavů redoxního systému vázaného k DNA lze spočítat z následujícího vztahu:

$$E_b^{\circ'} - E_f^{\circ'} = 0,059 \log (K^{2+} / K^{3+}) \quad (3)$$

kde $E_b^{\circ'}$ a $E_f^{\circ'}$ jsou formální potenciály $3+/2+$ systému vázaného (bound) a nevázaného (free) k molekule DNA, K^{2+} a K^{3+} rovnovážné vazebné konstanty systému navázaného k DNA ve dvou oxidačních stavech.

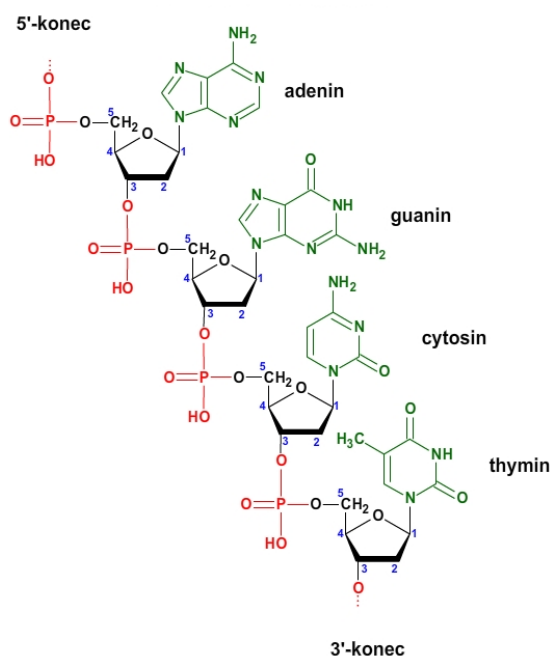
Po interakci komplexu kobaltu s DNA lze také sledovat pokles proudové odezvy [14]. To lze vysvětlit pomalu difundující DNA, která interaguje s komplexem.



Obr. 2.2: Strukturální vzorec $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$.

2.2 DNA a zdroje jejího poškození

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je významnou molekulou eukaryotických organismů a nositelkou genetické informace. V organismu se nejčastěji vyskytuje ve formě B-DNA jako pravotočivá dvoušroubovice. Jedná se o biopolymer skládající se z řady nukleotidů vázaných fosfodiesterovou vazbou (obr. 3). Nukleotid je tak základní jednotkou DNA a obsahuje dusíkatou heterocyklickou bázi, deoxyribózu a zbytek kyseliny fosforečné. Existence dvoušroubovice je závislá na komplementaritě a párování bází skrze vodíkové můstky. V molekule DNA se adenin (A) váže s thyminem (T) dvěma vodíkovými vazbami, guanin (G) s cytosinem (C) třemi vodíkovými vazbami. Pořadí bází určuje primární strukturu DNA a druh genetické informace uložené v ní.



Obr. 2.3: Primární struktura části jednovláknové DNA. Převzato z [15]

Poškozením DNA se většinou rozumí nežádoucí změna v její primární struktuře. Zdroj tohoto poškození může být fyzikálního původu (UV záření, ionizující záření), chemického původu (složky cigaretového kouře a jiných zplodin, karcinogenní akrylamid v tepelně upravených potravinách) nebo biologického původu (viry). Mnoho různorodých látek reaguje a váže se k DNA kovalentně či nekovalentně, a mění tak její strukturu, což může vést k poruše replikace a transkripce DNA [16,17]. Dlouhodobé, ale i náhodné, vystavení lidského organismu řadě genotoxických látek může způsobit nežádoucí poškození genomu, násobení mutací a rozvoj řady nemocí (např. rakoviny). Na druhou stranu onkologické postupy jako je radioterapie

nebo chemoterapie využívají hromadění specifických DNA lézí v organismu, které působí na populaci rakovinných buněk letálně a snižují jejich počty. Proto je výzkum metod pro detekování těchto změn v sekvenci DNA stále aktuální. Vyvinuty pro tento účel byly například elektrochemické DNA biosensory, které nalézají uplatnění nejenom v klinické diagnóze, ale i při monitorování polutantů v životním prostředí a jsou ceněné pro svou citlivost a rychlost detekce. Většina biosensorů využívá elektrod z uhlíkového materiálu, který poskytuje široké anodické potenciálové okno pro detekci oxidativního poškození DNA [22].

Oxidativní poškození DNA může být způsobeno například reaktivními formami kyslíku (ROS) a může vést k řadě modifikací DNA [16,17]. Kromě chemických zdrojů, jako je Fentonova reakce, jsou ROS také produktem UV a ionizujícího záření nebo buněčného metabolismu. K těmto interakcím dochází v organismu běžně a obvykle je chybná sekvence DNA enzymaticky opravena nebo řízeně zlikvidována. Nejčastějším produktem oxidativního poškození DNA je 8-oxo-7,8-dihydroguanin, metabolit guaninu, který nejspíše ze všech bází podléhá oxidaci. Tento produkt se stal biomarkerem poškozené DNA a buněčného oxidačního stresu. Pro jeho detekci se dnes využívá techniky HPLC s elektrochemickou detekcí, mnohem častější je však HPLC-MS/MS.

K oxidativnímu poškození DNA může také dojít po kontaktu DNA s ionty těžkých kovů, jako jsou Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} [17]. Za využití DPV na elektrodě ze skelného uhlíku (GCE) byl tento typ poškození dedukován ze zvýšeného oxidačního píku G^{ox} a A^{ox} a z nového píku související s oxidací těžkého kovu.

Poškození dvouřetězcové DNA také často vede ke změně afinity nukleových kyselin k redoxním indikátorům (interkalační činidla), a tím i k změnám elektrického/elektrochemického signálu, čehož se využívá při detekci poškození DNA [19].

Nukleové báze, jako jsou adenin, guanin nebo cytosin, lze detekovat elektrochemicky prostřednictvím jejich redukce na elektrodách na bázi rtuti (HDME, m-AgSAE) [17]. Voltametrické signály změřené na těchto elektrodách jsou silně citlivé na změny ve struktuře DNA.

Některé cizorodé látky se mohou k DNA vázat i nekovalentně. Sledování těchto interakcí je tedy založeno na odlišném elektrochemickém chování těchto látek v přítomnosti DNA a v její absenci [17]. Detekci lze provádět za různých podmínek. Jednou z možností je měřit interakci obou složek jejich smícháním v roztoku, druhou je modifikace elektrody pomocí DNA ponořenou v roztoku cizorodé látky a sledování interakce na povrchu elektrody. Méně často se pak využívá modifikace elektrody cizorodými látkami, zatímco DNA je ponechána v roztoku.

V této práci byla využita nízkomolekulární DNA z lososího spermatu. Ta byla cíleně poškozena pomocí UV-C záření (254 nm) a změna v sekvenci sledována elektrochemicky pomocí DPV na m-AgSAE za využití redoxních systémů, které běžně interagují s nepoškozenou DNA. Elektroda byla modifikovaná vrstvou DNA.

UV-C záření je mutagenní a působí na organismus cytotoxicky [18,19]. Jedná se o složku světelného záření o vlnové délce nižší než 280 nm, která je za normálních podmínek absorbována ozonovou vrstvou ve stratosféře. Vysokoenergetické krátkovlnné fotony absorbované chromofory mohou vést k tvorbě singletového kyslíku nebo volných radikálů schopných destrukce buněčných membrán a komponent. Ačkoliv si organismy vytvořily přirozenou obranu proti UV záření ve formě UV-absorbujících pigmentů, jako je melanin u člověka nebo flavonoidy u vyšších rostlin, není možné plně zabránit kontaktu záření s povrchovou tkání. Dimery cyklobutanpyrimidinu (CPD) a 6-4 fotoprodukty (deriváty pyrimidinu) představují dvě základní třídy mutagenních DNA lézí vyvolaných UV zářením. Dewarovy izomery se tvoří fotoizomerizací 6-4 fotoproduktů při vlnové délce větší než 290 nm. Obě třídy lézí deformují DNA helix a způsobují jeho ohyb. Při studiu rakoviny kůže vyvolané UV-B zářením na myších bylo zjištěno, že CPD se tvoří především v oblasti genu kódující protein p53 zodpovědný za regulaci exprese mnoha genů. Také bylo zjištěno, že CPD inhibuje aktivitu DNA polymerázy. Neopravené DNA léze interferují s replikací a transkripcí DNA, což může vést k chybně přeloženému genetickému kódu, mutacím a buněčné smrti.

2.3 Diferenční pulzní voltametrie

DPV je voltametrická technika, při níž se sleduje závislost proudu na potenciálu, který se mění s časem lineárně. Podstatou DPV jsou napěťové pulsy o malých amplitudách (v řádu desítek mV), které se vkládají na potenciál v krátkých časových intervalech [20]. Systém registruje rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulzu a na jeho konci. Přítomnost redoxního systému, který je danou elektrodou detekovatelný, se projeví na voltamogramu proudovou odezvou – píkem. Poloha píku představuje kvalitativní informaci o dané látce, výška píku má naopak charakter kvantitativní.

2.4 Pracovní elektroda

V této práci byla využita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná amalgámová elektroda (m-AgSAE) jako pracovní elektroda. Amalgámové elektrody představují netoxickou náhradu rtuťových elektrod, elektrochemickými vlastnostmi a rozsahem potenciálového okna se blíží

HDME [21]. Meniskus elektrody se musí po určité době obnovovat, amalgamovat. V prvním kroku amalgamace se povrch elektrody oleští o vodnou suspensi aluminy asi po dobu 1 min. Po očištění deionizovanou vodou je povrch elektrody ponořen do kapalně rtuti a elektrodou je mícháno asi po dobu 15 s do vytvoření na pohled viditelného menisku. Amalgamace elektrody se doporučuje provádět jednou týdně. Ke zvýšení citlivosti a reprodukovatelnosti měření se využívá postupů aktivace a regenerace m-AgSAE. Elektrochemická aktivace se využívá vždy před zahájením práce nebo po delší časové odmlce (cca 1 hodina) a vkládá se při ní na pracovní elektrodu potenciál -2200 mV po dobu 300 s v 0,2 mol.dm⁻³ KCl. I po jednotlivých analýzách dochází k automatickému obnovování povrchu elektrody vložím potenciálu o desítky mV pozitivnější, než dochází k vývoji vodíku či rozkladu roztoku základního elektrolytu. Zajistí se tak zpětná redukce stříbra elektrody a odstranění naadsorbovaných skupin. Pro zabránění nadměrné akumulace iontů kovů z roztoku na elektrodě se využívá postupu regenerace, kdy měřicí program vkládá rychle za sebou předem zvolený kladnější a zápornější potenciál v několika cyklech. Dojde tak k rozpuštění nežádoucích kovů uložených v povrchu elektrody.

Nespornou výhodou stříbrných amalgámových elektrod je jejich mechanická stabilita v běžných roztocích, vysoké přepětí vodíku, v katodické oblasti může poskytnou poměrně široké potenciálové okno [21]. Jelikož je stříbro méně ušlechtilým kovem než rtuť podle Beketovovy řady kovů, je potenciálové okno v anodické oblasti limitováno už poměrně při nízkých hodnotách potenciálu v důsledku rozpouštění materiálu elektrody. Nevýhodou m-AgSAE je její častá pasivace, může také docházet k reakcím s materiálem elektrody, což negativně ovlivní výsledek měření. Není navíc jisté, že nově vytvořený meniskus bude podávat stejnou odezvu analytu jako předchozí.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Zásobní roztok 1,10-fenantrolinu ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci $0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním $0,1802 \text{ g}$ v deionizované vodě a zředěním na celkový objem 100 ml .

Dále byl připraven Brittonův-Robinsonův pufr pro úpravu pH prostředí. Kyselá složka tlumivého roztoku o koncentraci $0,04 \text{ mol.dm}^{-3}$ byla připravena smícháním $2,71 \text{ ml}$ 85% kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice), $2,31 \text{ ml}$ 99% kyseliny octové (p.a., Penta, Praha), rozpuštěním $2,473 \text{ g}$ pevné kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno) a doplněním na celkový objem 1000 ml deionizovanou vodou. Bazická složka pufru o koncentraci $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ byla připravena rozpuštěním $8,0 \text{ g}$ pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a doplněním na celkový objem 1000 ml .

Roztok chloridu draselného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) o koncentraci $0,2 \text{ mol.dm}^{-3}$ využívaný pro aktivaci amalgámové elektrody byl připraven rozpuštěním $14,91 \text{ g}$ a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 1000 ml .

Směs kyseliny octové a octanu sodného byla připravena smícháním $5,8 \text{ ml}$ 99% kyseliny octové (p.a., Penta, Praha), rozpuštěním $13,608 \text{ g}$ octanu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a doplněním deionizovanou vodou na celkový objem 1000 ml . Octanový pufr byl připraven o koncentraci $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$. Jako základní elektrolyt byl dále připraven roztok dusičnanu draselného (p.a., Lachema, Brno) o koncentraci $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ a roztok chloridu draselného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) o stejné koncentraci a oba roztoky byly uchovány v zásobní láhvi o objemu 1000 ml .

Roztoky hexahydrátu chloridu kobaltnatého (p.a., Lachema, Brno) a $99,5\%$ pentahydrátu síranu měďnatého (p.a., Lach-Ner, Neratovice) byly připraveny o koncentraci $0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$. Do objemu 100 ml byly zředěny zvlášť octanovým pufrem, $0,1 \text{ M}$ chloridem draselným a dusičnanem draselným v odměrných baňkách.

Laboratorně připravený komplex $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{NO}_3)_3$ (připraveno na Fakultě chemické a potravinářské technologie, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Slovensko) o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ byl rozpuštěn a zředěn do objemu 100 ml zásobním roztokem $0,1 \text{ M}$ chloridu draselného.

Nízkomolekulární dsDNA z lososích spermíí (dsDNA, Sigma-Aldrich, Japan) bylo naváženo 10 mg a rozpuštěno v Eppendorf zkumavce v 1 ml NaCl (p.a., Lach-Ner, Neratovice) o koncentraci $0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$. Roztok dsDNA byl skladován v mrazničce (při $-18 \text{ }^\circ\text{C}$) a před prací

s roztokem bylo vždy potřeba jej volně rozmrazit při laboratorní teplotě.

Deionizovaná voda (Millipore Milli-Q Plus System, Millipore, USA) byla využita při ředění některých roztoků a čištění laboratorního nádobí a elektrod.

3.2 Použitá aparatura

Voltametrické analýzy probíhaly v tříelektrodevém zapojení pomocí voltametrického systému Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha) skládajícího se z pracovní m-AgSAE, referentní argentchloridové elektrody (3M KCl, typ 10-20+, Elektrochemické detektory, Turnov) a pomocné platinové elektrody. Během analýz byla použita rychlost polarizace $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, výška pulzu -50 mV a šířka pulzu 100 ms . Pokud bylo využito regeneračních potenciálů při měření, probíhala regenerace ve 150 zvolených cyklech. Počáteční a konečný regenerační potenciál byl volen podle okolností. Míchací zařízení bylo automaticky spuštěno během aktivace pracovní elektrody či před zahájením vlastní analýzy. DPV měření byla zaznamenána v programu Polar 5.1 (Polaro-Sensors, Praha) v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Před každým voltametrickým měřením bylo potřeba z roztoku odstranit rozpuštěný vzdušný kyslík, který jinak interferuje při analýzách a znesnadňuje detekci redukujících se analytů. Kyslík se nechal vybublat plynným dusíkem v uzavřené voltametrické cele. Plynný dusík se vedl promývačkou naplněnou deionizovanou vodou do uzavřené elektrochemické cely s roztokem. Uložený byl v tlakové láhvi.

Před zahájením práce bylo vždy potřeba upravit pracovní elektrodu dle potřeb. Každý den byla provedena její aktivace roztokem KCl o koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po delší pracovní odmlce nebo při ireverzibilní modifikaci povrchu elektrody předcházelo aktivaci vyleštění povrchu elektrody vodnou suspenzí aluminu a její opětovná amalgamace (meniskus elektrody byl vytvořen namočením vyleštěného povrchu elektrody do kapalné rtuti a mícháním elektrodou po dobu asi 15 s). Elektrody se také oplachovaly deionizovanou vodou před i po aktivaci pracovní elektrody a mezi jednotlivými analýzami.

Přesné pH Brittonova-Robinsonova pufru bylo měřeno pomocí pH-metru Jenway 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK). pH metr byl kalibrován standardními pufrů o hodnotách pH 4,0 7,0 a 10,0. Pufrů byly skladovány v chladničce (při $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Spektrofotometrická měření byla provedena na přístroji Agilent 8453 v programu UV-Visible ChemStation 9.01 (obojí Agilent, USA) v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Měřené roztoky byly při analýzách umístěny v křemenné kyvetě o šířce $1,0 \text{ cm}$. Pro poškození DNA bylo využito UV-C záření o vlnové délce 254 nm .

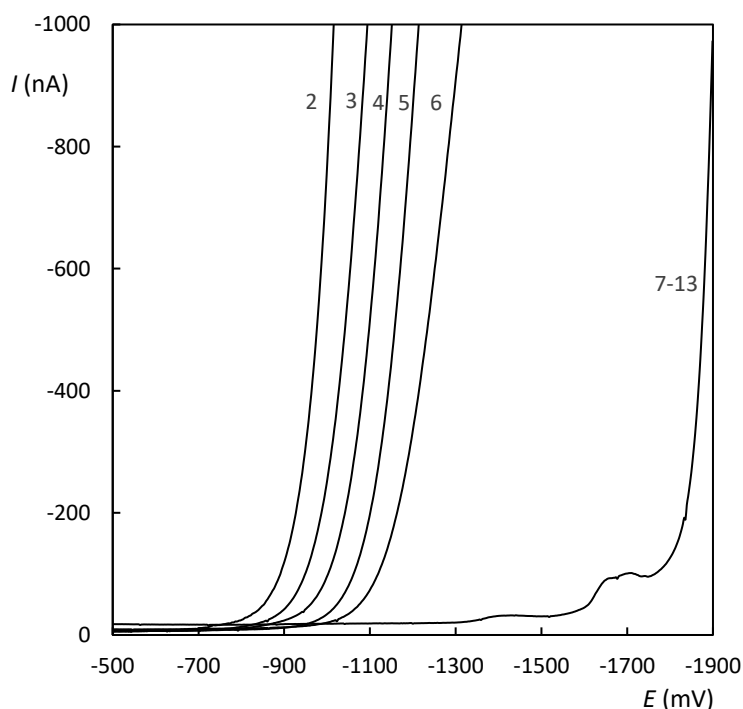
Zdrojem záření byla UV lampa (model IV, výkon 2×15 W, P-LAB, Praha).

4. Výsledky a diskuze

4.1 Závislost na pH

V první fázi práce byly změřeny voltamogramy phenu v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru při pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 a 13. Koncentrace roztoku phenu byla připravena $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v desetimilitrové odměrné baňce. Jednotlivá pH roztoků byla připravena postupným přidáváním zásadité složky do složky kyselé do požadovaného pH, které se měřilo pH metrem. Ten byl předem kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů. Do elektrochemické cely se vždy vylil celý objem odměrné baňky.

S rostoucím pH Brittonova-Robinsonova pufru lze pozorovat rozšiřující se potenciálové okno (obr. 4.1). Při pH 2 – 6 sledujeme pravidelný posun konce potenciálového okna k zápornějším hodnotám potenciálu. Při pH 7 dochází k většímu potenciálovému skoku a k vývoji vodíku dochází až při potenciálu menším než -1800 mV. Podobnou šířku potenciálového okna pak poskytuje i prostředí o pH 8 – 13. V celé oblasti potenciálů však nepozorujeme žádný významný pík, který by náležel phenu. Přítomnost phenu v roztoku dokazuje pouze skutečnost, že dochází ke skokové změně v šířce potenciálového okna. Bez této látky se předpokládá pravidelný posun potenciálového okna až do pH 13. Phen se v kyselém prostředí formuje v protonované formě, atom vodíku váže koordinačně [1], to může být důvod, proč se přítomnost phenu projeví až při pH větším než 6.

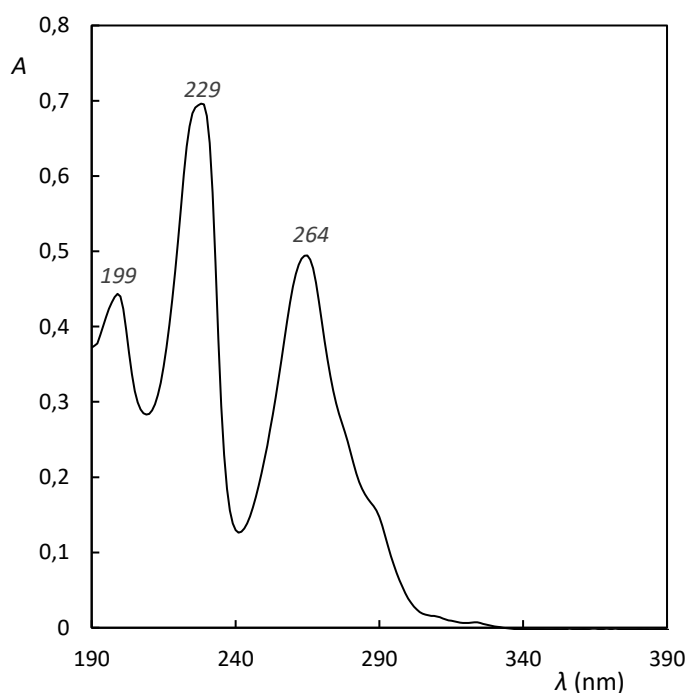


Obr. 4.1: DP voltamogramy phenu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na *m*-AgSAE v prostředí BR pufru o pH 2,0 (2), 3,0 (3), 4,0 (4), 5,0 (5), 6,0 (6) a 7,0 – 13,0 (7-13; voltamogram ukázán jako ilustrativní).

4.2 Absorpční spektrum fenantrolinu

Byl připraven roztok phenu o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v desetimilitrové odměrné baňce ředěný deionizovanou vodou, který byl proměřen spektrofotometricky v oblasti vlnové délky 190 nm až 700 nm. Roztok byl změřen v křemenné kyvetě o tloušťce 1,0 cm. Jako blank byla použita deionizovaná voda.

Změřené absorpční spektrum phenu o koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ připraveného v deionizované vodě je zobrazeno na obr. 4.2. Absorpční maxima poskytl látka při vlnových délkách 199 nm, 229 nm a 264 nm.



Obr. 4.2: Absorpční spektrum phenu ($c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) ve vodném prostředí změřené na UV/VIS spektrofotometru proti deionizované vodě. Kurzívou jsou označeny vlnové délky při lokálních absorpčních maximech v nm.

4.3 Detekce iontů kovů a kalibrační závislost

Druhá fáze spočívala v nalezení vhodného elektrolytického prostředí pro analýzy iontů přechodných kovů a další měření. Byla proto voltametriky proměřena potenciálová okna octanového pufru, KCl a KNO_3 , vše o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v objemu asi 10 ml. Směs kyseliny octové a octanu sodného poskytla nejužší potenciálové okno. K jejímu rozkladu docházelo již při potenciálu -1000 mV. Roztok KNO_3 se rozkládal při potenciálu kolem -1600 mV a roztok 0,1M KCl až při potenciálu kolem -1800 mV.

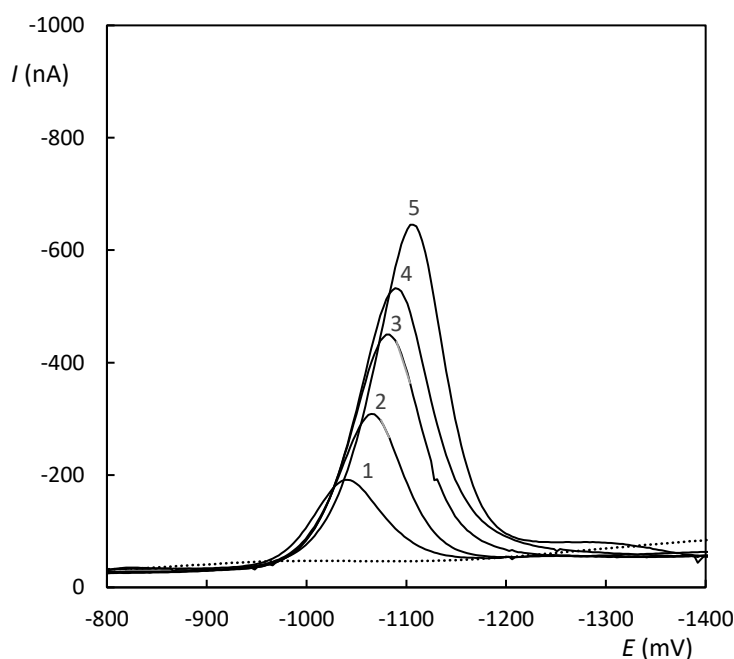
Ve všech prostředích bylo zároveň zkoumáno, zda roztoky obsahující ionty Co^{2+} a Cu^{2+}

vykazovaly odezvu na voltamogramu ve formě charakteristického píku, který by reflektoval redukující se iont kovu na povrchu elektrody při elektrolýze. Roztoky Co^{2+} a Cu^{2+} byly zředěny na koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ v desetimilitrové odměrné baňce takovým roztokem elektrolytu, ve kterém byly ionty přechodných kovů připraveny. Elektrochemická cela se naplňovala objemem asi 10 ml. Nejlepší podmínky pro měření ze základních elektrolytů poskytoval 0,1M KCl.

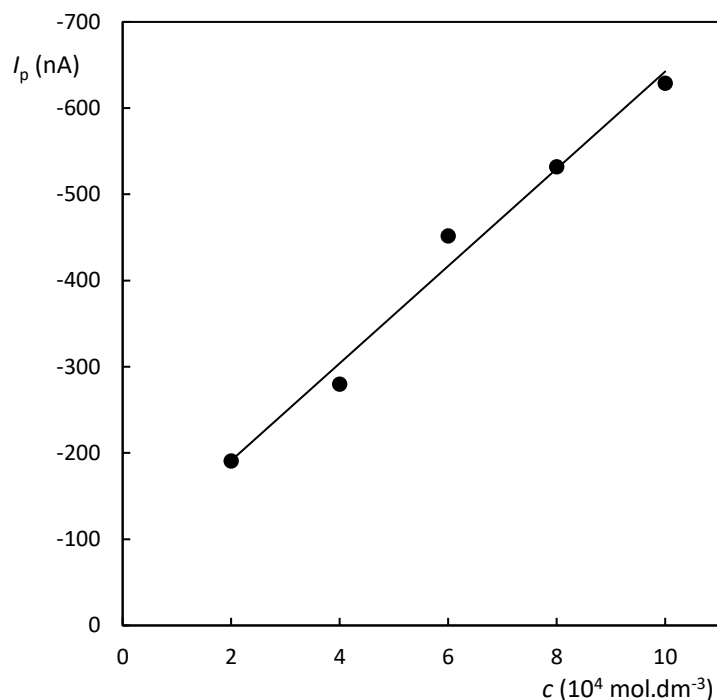
Dobře vyvinutý voltametrický pik poskytly pouze Co^{2+} v prostředí 0,1M KCl. Redukce Cu^{2+} iontů se nezobrazila na voltamogramu v žádném z proměřovaných základních elektrolytů. Naopak redukce Co^{2+} se projevila píkem na voltamogramu při potenciálu kolem -1100 mV při koncentraci roztoku Co^{2+} $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Pro další pokusy se z iontů přechodných kovů pracovalo s Co^{2+} a jako ideální základní elektrolyt byl zvolen 0,1M KCl.

U Co^{2+} se následně proměřila voltametricky proudová odezva koncentrační řady $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$, $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ zředěním zásobního roztoku do 10 ml objemu odměrné baňky. Každá koncentrační hladina byla proměřena pětkrát s využitím regeneračních potenciálů. Z proudových píků byla sestavena kalibrační křivka závislosti na koncentraci Co^{2+} .

Na obr. 4.3 je zobrazen výsledek voltametrického měření kalibrační řady Co^{2+} a na obr. 4.4 zpracovaná kalibrační přímka. Na voltametrickém záznamu lze zaznamenat posun potenciálu k zápornějším hodnotám s rostoucí koncentrací Co^{2+} .



Obr. 4.3: DP voltamogramy Co^{2+} na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí základního elektrolytu KCl ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) s vloženou regenerací $E_s = -200 \text{ mV}$ a $E_f = -1700 \text{ mV}$. Koncentrace Co^{2+} v roztoku KCl: $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ (1), $4 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ (2), $6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ (3), $8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ (4), $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ (5). Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.



Obr. 4.4: Kalibrační křivka vyhodnocená z výšek píků (I_p) pro koncentrační rozsah $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ za podmínek uvedených v obr. 4.3.

Rovnice přímky získaná lineární regresi výšek píků závislých na koncentraci Co^{2+} (obr. 4.4):

$$I_p = -5,64 \cdot 10^5 c - 78,4 \quad (R^2 = 0,9845) \quad (4)$$

kde I_p je maximální hodnota proudového píku [nA] a c molární koncentrace Co^{2+} [mol.dm^{-3}].

4.4 Voltametrické výsledky směsi Co^{2+} a phenu

Také roztok phenu zředěný na koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$ roztokem $0,1 \text{ M KCl}$ v objemu 10 ml byl změřen pětkrát DP voltametrií s využitím regeneračních potenciálů. Po analýze směsi obsahující molekulu phen bylo vždy potřeba obnovit amalgamací rtuťový meniskus na pracovní elektrodě pro další voltametrická měření. Dále se sledovala změna voltametrické odezvy Co^{2+} (10 ml , $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$) při napipetování postupně $50 \mu\text{l}$, $150 \mu\text{l}$ a $800 \mu\text{l}$ roztoku phenu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$, v součtu přídavek 1 ml). Jednotlivé přídávky byly proměřeny vždy pětkrát. Stejně se postupovalo při dávkování Co^{2+} do roztoku phenu. Dále bylo také za využití regeneračních potenciálů proměřeno, jak ovlivní namáčení pracovní elektrody v roztoku phenu ($c = 1 \cdot 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$) voltamogram Co^{2+} o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$. Elektroda byla po namočení vždy ještě opláchnuta deionizovanou vodou a jemně utřena buničinou. Ze zásobního roztoku laboratorně připraveného komplexu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ bylo proměřeno množství o objemu

10 ml technikou DPV s využitím regenerace.

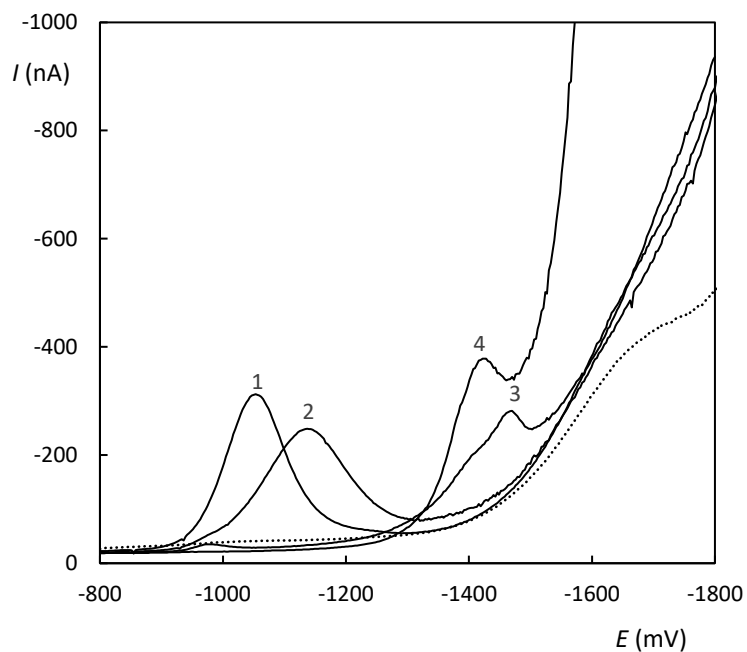
Ani v prostředí 0,1M KCl neposkytl phen statisticky významný pík, který by v katodické oblasti voltamogramu signalizoval jeho elektrochemickou aktivitu. Dalším krokem výzkumu bylo voltametrické proměření směsi Co^{2+} a phenu, zda slitím obou složek vzniká elektrochemicky redukovatelný komplex, který by byl využit v dalších krocích.

Přidávání malých množství phenu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) do roztoku Co^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) posouvá pík Co^{2+} k zápornějším hodnotám potenciálu, a navíc dochází k poklesu proudu píku, jak je znázorněno na obr. 4.5. Možným vysvětlením snižování píku je pasivace amalgámové elektrody molekulami phenu, které ulpí na povrchu (menisku) elektrody, a tak dojde ke snížení proudové odezvy při redukci Co^{2+} . Neobvyklý je ale posun potenciálu, který pasivací lze vysvětlit těžko. Vliv na posun může mít vznik složitějších komplexových struktur phenu, Co^{2+} a molekul vody, které se vodíkovými můstky mohou vázat k dusíkům molekuly phenu [1]. Molekula phenu také může reagovat se samotným materiálem pracovní elektrody, tedy rtuťovým meniskem, a tak pozměnit její elektrochemické vlastnosti. Kombinace zmíněných vlivů je možná. Skutečné příčiny tohoto chování by měly být předmětem dalšího studia.

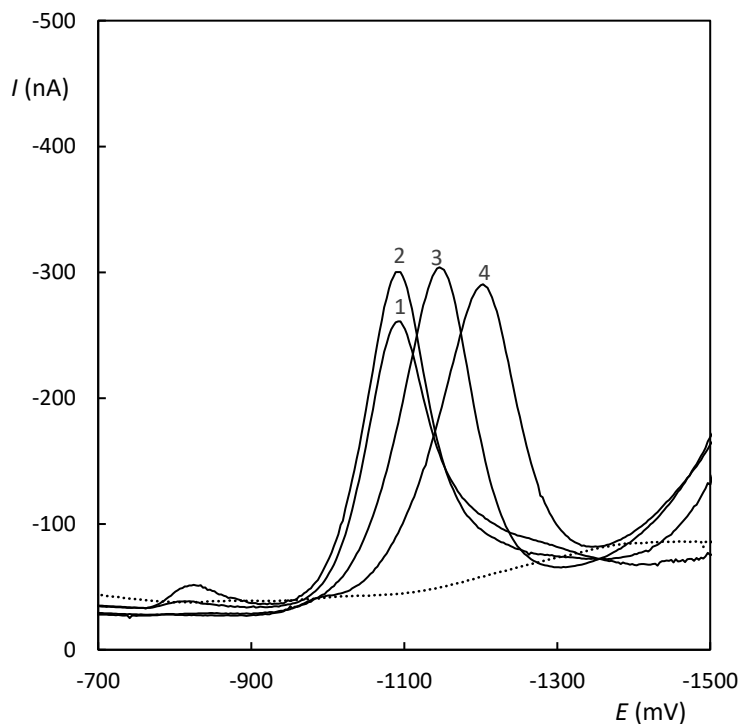
Většinou již po přidavku 100 μl phenu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) dochází k zužování potenciálového okna v katodické oblasti. Při prvních přidavcích lze při nastavení většího měřitelného rozsahu proudů zaregistrovat pík při potenciálu kolem -1800 mV o velikosti až -5 μA . To by mohlo být vysvětleno registrací katalytického vodíku jako produktu proběhlé elektrolýzy. Po dalších přidavcích pozorujeme na voltamogramu už jen zúžení potenciálového okna kolem -1700 mV.

Při opačném postupu, tedy přidáváním Co^{2+} do roztoku phenu, nepozorujeme kromě zúžení potenciálového okna žádnou změnu. Pokud je množství phenu ve srovnání s Co^{2+} v nadbytku, na voltamogramu se nevyskytuje žádný pík a potenciálové okno je užší. Na obr. 4.6 lze sledovat změnu potenciálu pro proudový pík při voltametrickém měření Co^{2+} už jen po namočení pracovní elektrody do roztoku phenu. Při interakci phenu s materiálem elektrody dochází k ireverzibilní modifikaci menisku elektrody a k jejímu znehodnocení pro jiná měření.

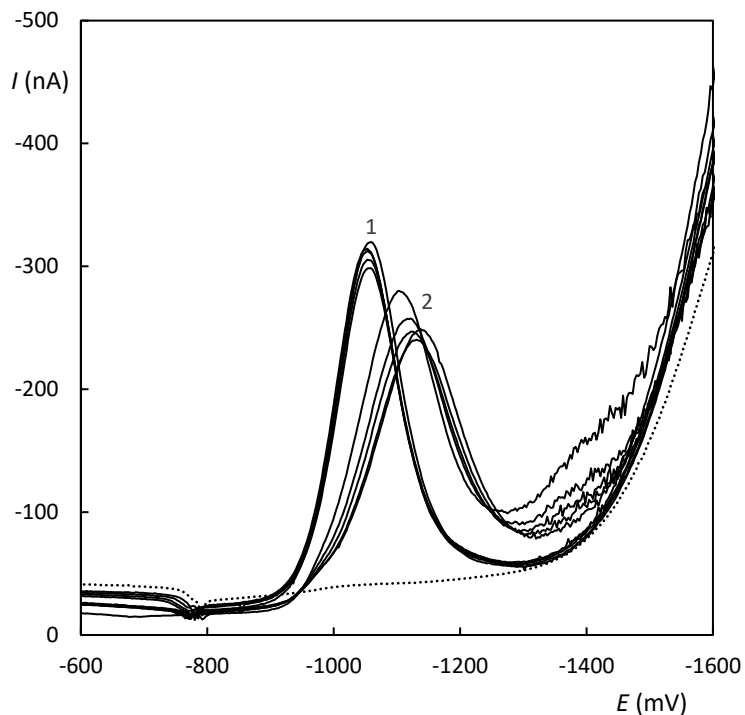
Důkazem může být opakování měření Co^{2+} (obr. 4.7). Ačkoliv byla elektroda důkladně očištěna deionizovanou vodou a aktivována, většinou pak poskytla pík charakteristický pro redukci Co^{2+} při vyšším potenciálu a s malou proudovou odezvou, nebo neposkytla pík žádný. Tato komplikace se tak musela řešit opětovnou amalgamací pracovní elektrody a důkladným očištěním veškerého pracovního nádobí deionizovanou vodou.



Obr. 4.5: Vývoj voltametrické odezvy Co^{2+} ($1, c = 1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$) s přidavky phenolu ($c = 1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$): $50 \mu\text{l}$ (2), $200 \mu\text{l}$ (3), $1000 \mu\text{l}$ (4). Měření proběhlo v základním elektrolytu KCl ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) na $m\text{-AgSAE}$ s vloženou regenerací $E_s = -200 \text{ mV}$ a $E_f = -1500 \text{ mV}$. Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.



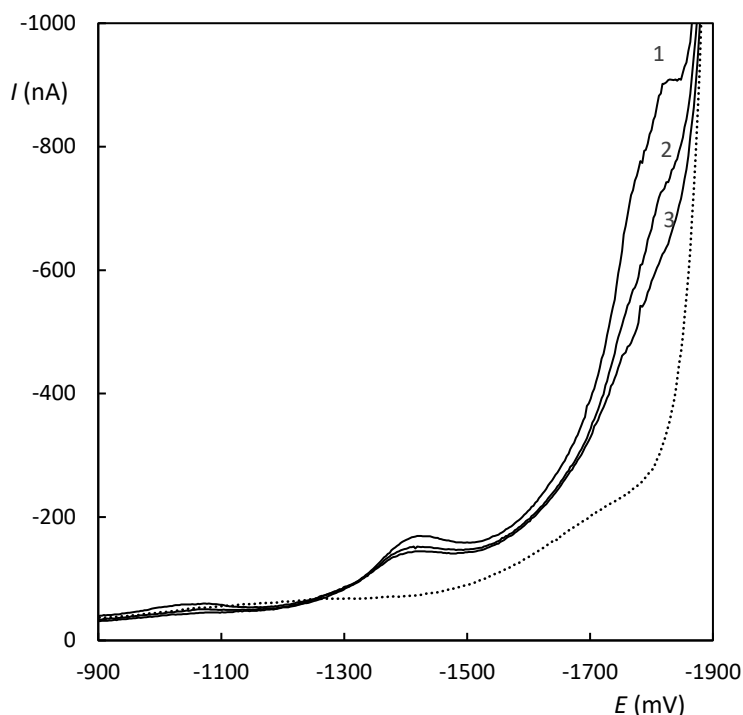
Obr. 4.6: Vývoj proudové odezvy Co^{2+} ($1, c = 1.10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$) na DP voltamogramu v prostředí KCl ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$) na $m\text{-AgSAE}$ s vloženou regenerací $E_s = -200 \text{ mV}$, $E_f = -1500 \text{ mV}$. Po dobu 30 s byla $m\text{-AgSAE}$ namáčena v roztoku phenolu ($c = 0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$), opláchnuta deionizovanou vodou a takto upravená využita na další měření. Úprava elektrody a měření v roztoku Co^{2+} probíhaly v několika po sobě následujících opakováních: 1. opakování (2), 2. opakování (3), 3. opakování (4). Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.



Obr. 4.7: Opakovaná měření Co^{2+} (1, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pomocí DPV na $m\text{-AgSAE}$ v základním elektrolytu KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Za stejných podmínek pak byl opakovaně změřen přídavek $50 \mu\text{l}$ phenu (2, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) k roztoku Co^{2+} . Použity byly regenerační potenciály $E_s = -200 \text{ mV}$ a $E_f = -1500 \text{ mV}$. Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.

4.5 Komplex $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$

Laboratorně připravený komplexový kation $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl podroben voltametrické analýze v prostředí $0,1\text{M}$ KCl . Záznam voltametrie je zobrazen na obr. 4.8. Na základě voltametrie nelze srovnáním s připraveným komplexem spolehlivě určit, zda se pouhým slitím Co^{2+} a roztoku phenu vytvoří jejich komplex.



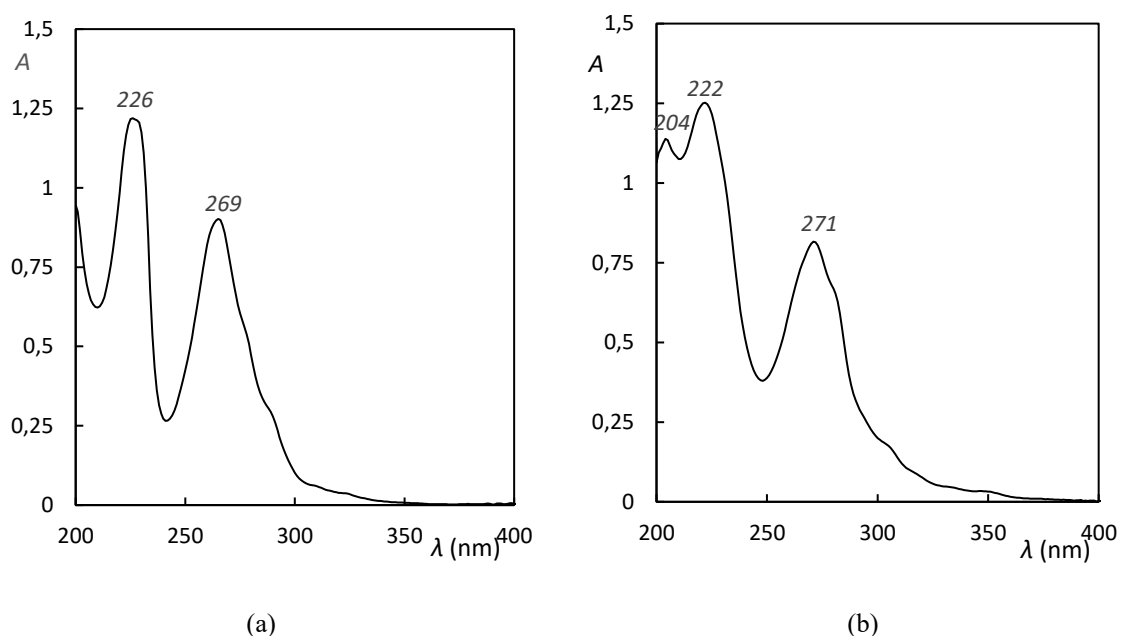
Obr. 4.8: DP voltamogramy $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na $m\text{-AgSAE}$ v prostředí KCl ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s vloženou regenerací $E_s = -200 \text{ mV}$, $E_f = -1600 \text{ mV}$. Zaznamenány jsou tři po sobě jdoucí měření (1,2,3). Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.

4.6 Spektrofotometrické vlastnosti studovaných látek

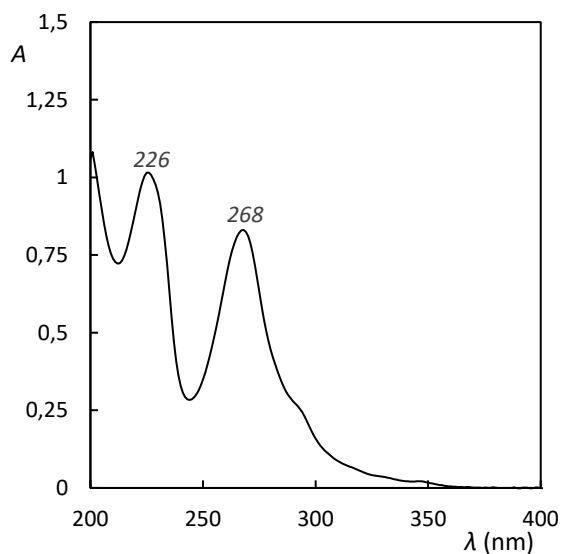
Vznik komplexu slitím Co^{2+} a phenu se studoval i spektrofotometricky za využití UV/VIS spektrofotometru. Absorpční spektra byla proměřena při rozmezí vlnových délek 190 nm až 700 nm u phenu o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, u roztoku Co^{2+} o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a u komplexu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ o koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; všechny připraveny zředěním roztokem 0,1M KCl do desetimililitrových baněk. Dále byl smíchán roztok Co^{2+} a phenu o koncentracích v poměru 1:2 a v poměru 1:3 v prostředí 0,1M KCl v desetimililitrové baňce. Oba roztoky byly spektrofotometricky proměřeny po pětiminutovém stání a poté ještě po dvou týdnech.

Nejprve byl proměřen v prostředí základního elektrolytu (0,1M KCl) phen a laboratorně připravený komplexový kationt $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (obr. 4.9). Co^{2+} neabsorbovaly záření ve zvolené oblasti vlnových délek. V literatuře nebylo dohledáno, jaká forma komplexu se slitím obou složek vytváří. Nebylo ani nalezeno, zda pouhým slitím se komplex formuje. Příprava komplexového kationtu tak byla čistě na úrovni zkoušky. Co^{2+} a phen byly proto slity v poměru koncentrací 1:2 a 1:3. Poměr 1:2 byl zvolen pro případ, že vzniká komplexový kationt $[\text{Co}(\text{phen})_2]^{2+}$, poměr 1:3 pro komplexový kationt $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+/3+}$. Asi 5 minut po přípravě a řádném promíchání byly obě směsi spektrofotometricky analyzovány v prostředí 0,1M KCl

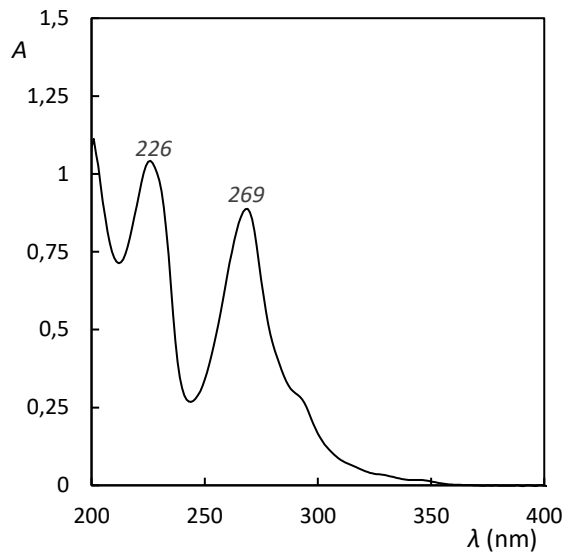
(obr. 4.10). Srovnáním absorpčních maxim těchto směsí s absorpčními maximy zobrazenými v obr. 4.9 lze usoudit, že ve směsi nedošlo ke vzniku žádaného komplexu. Absorpční maxima obou změřených směsí jsou vesměs shodná s absorpčními maximy phenu v prostředí 0,1M KCl. Obě připravené směsi byly ještě spektrofotometricky proměřeny po dvou týdnech (obr. 4.11). Podle záznamu obr. 4.11 se absorpční maxima obou proměřených směsí změnila. Na obr. 4.12 lze navíc zaznamenat, že absorpční křivka směsi, která byla připravena slitím Co^{2+} a phenu v poměru 1:2, nápadně opisuje absorpční křivku laboratorně připraveného $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ měřeného v 0,1M KCl. Je tak možné, že formace komplexu Co^{2+} a phenu je závislá na čase. V takovém případě pravděpodobně selhává naše premisa, že smícháním Co^{2+} a phenu v poměru 1:2 vzniká $[\text{Co}(\text{phen})_2]^{2+}$. Na otázku, jaký komplex vzniká, jsme ale prozatím nenašli uspokojivou odpověď.



Obr. 4.9: Absorpční spektrum phenu (a) ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a komplexu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (b) ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) změřená na UV/VIS spektrofotometru proti 0,1M KCl. Kurzívou jsou označeny vlnové délky při lokálních absorpčních maximech v nm.

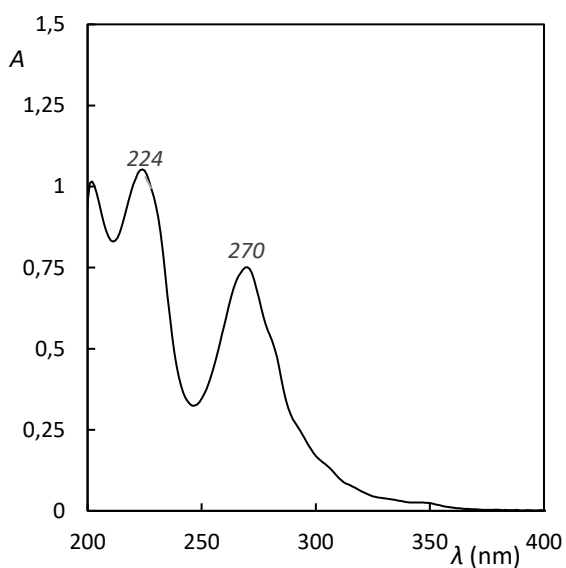


(a)

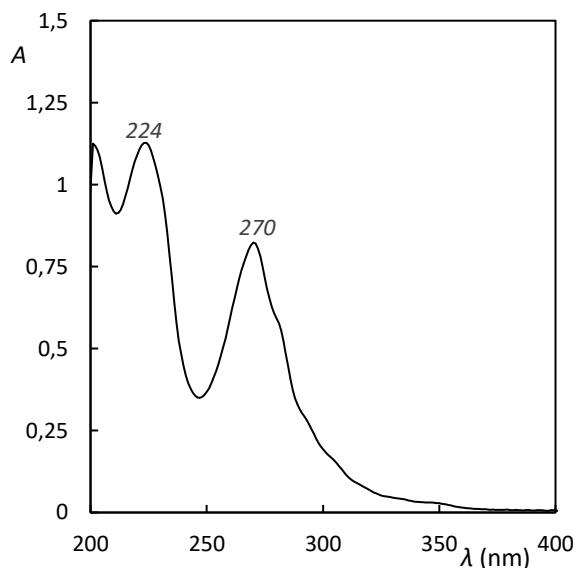


(b)

Obr. 4.10: Absorpční spektra směsi phenu ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a Co^{2+} (a: $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, b: $c = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) změřená na UV/VIS spektrofotometru proti 0,1M KCl. Kurzívou jsou označeny vlnové délky při lokálních absorpčních maximech v nm.

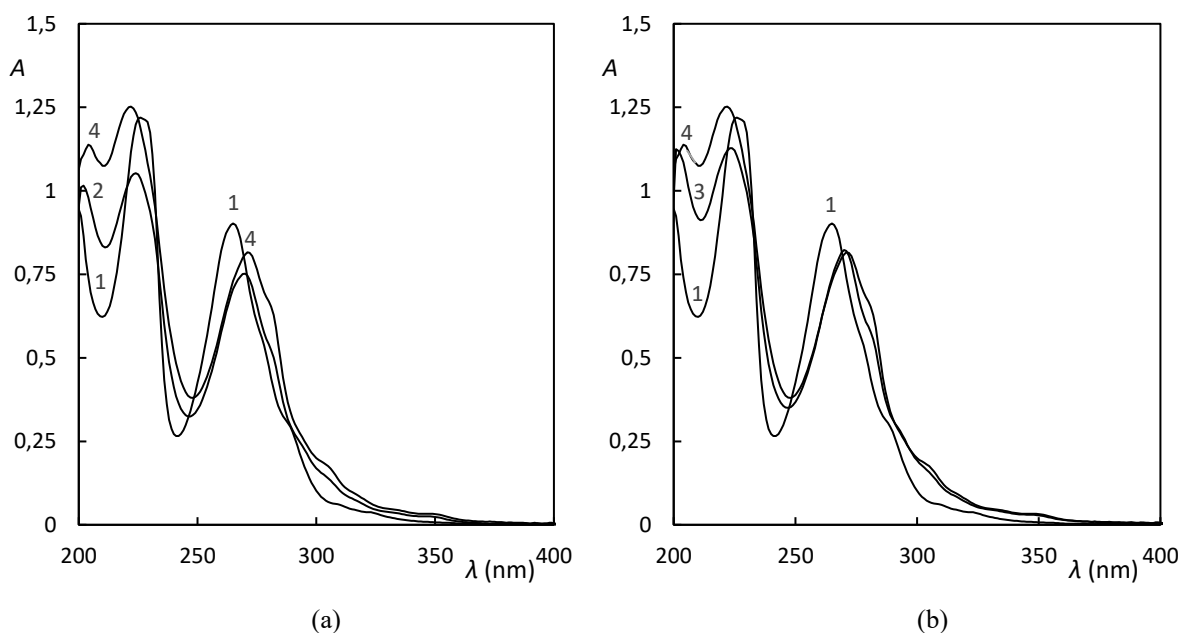


(a)



(b)

Obr. 4.11: Absorpční spektra směsi phenu ($c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a Co^{2+} (a: $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, b: $c = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) změřená na UV/VIS spektrofotometru proti 0,1M KCl v čase 2 týdnů od přípravy směsi. Kurzívou jsou označeny vlnové délky při lokálních absorpčních maximech v nm.



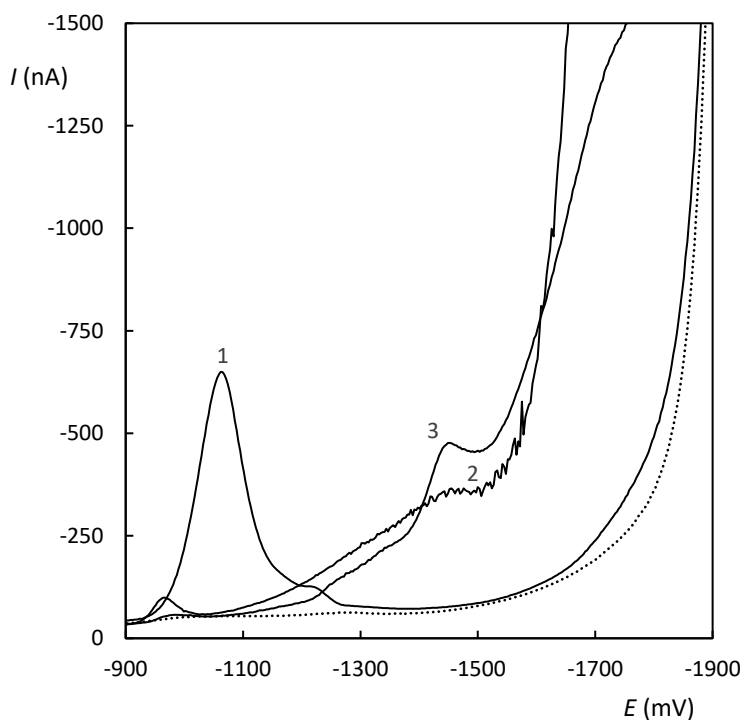
Obr. 4.12: Srovnání absorpčních spekter phenolu (1, $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), směsi Co^{2+} a phenolu změřené po dvou týdnech (2,3) a komplexu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (4, $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechna měření byla provedena v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na UV/VIS spektrofotometru. V grafu (a) je znázorněno absorpční spektrum Co^{2+} a phenolu o koncentraci v poměru 1:3 (2), v grafu (b) je koncentrace phenolu a Co^{2+} 1:2 (3).

4.7 Detekce DNA

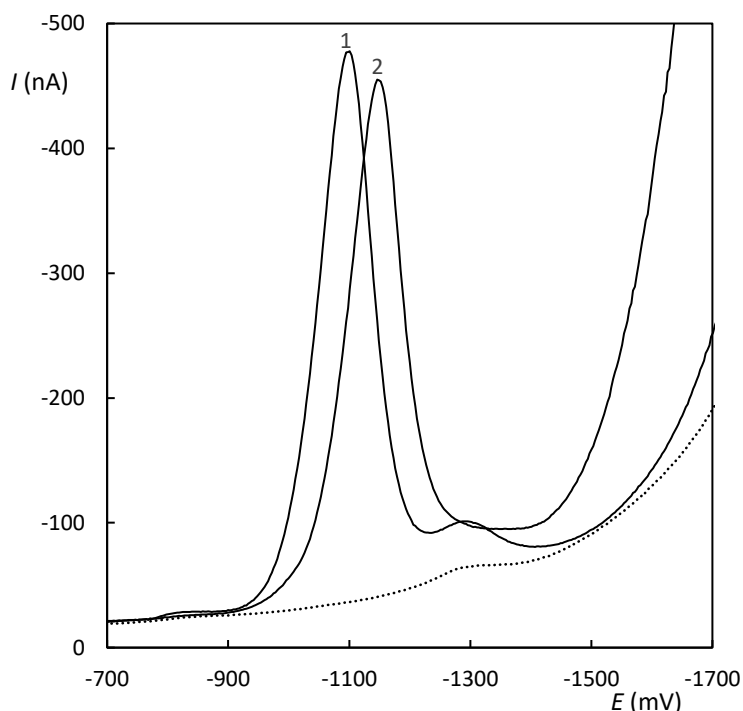
V poslední fázi voltametrické práce byl povrch pracovní elektrody modifikován deoxyribonukleovou kyselinou mícháním elektrody v jejím roztoku NaCl ($c = 0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) po dobu asi 1 min. DNA modifikovaná pracovní elektroda byla využita pro voltometrii dosud proměřených sloučenin, tedy Co^{2+} , komplexového kationtu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, phenolu a směsi Co^{2+} s phenem. Modifikaci vždy předcházela analýza redoxního systému Co^{2+} (10 ml, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), phenolu (10 ml, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), komplexního kationtu $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ (10 ml, $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) nebo směsi Co^{2+} a phenolu (koncentrace v různých poměrech). Redoxní systémy byly podruhé proměřeny modifikovanou pracovní elektrodou. Při všech měřeních bylo využito regenerace elektrody. Elektroda byla po modifikaci opláchnuta vždy ještě deionizovanou vodou a usušena jemně buničinou. Po analýze modifikovanou DNA bylo většinou potřeba obnovit meniskus pracovní elektrody amalgamací.

Významná změna signálu použitím modifikované elektrody byla zaregistrována pouze u Co^{2+} a u směsi Co^{2+} s phenem. Voltametrická odezva směsi s modifikovanou elektrodou je zobrazena na obr. 4.13. Na voltamogramu tohoto záznamu lze registrovat hůře vyhodnotitelný pík při -1450 mV. Na obr. 4.14 je zobrazeno, jak se změní odezva Co^{2+} o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v prostředí 0,1M KCl s použitím DNA modifikované pracovní elektrody. Při

tomto měření bylo využito regeneračních potenciálů. Analýza s modifikovanou i nemedifikovanou elektrodou proběhla pětkrát. Na tomto záznamu se výška prvního píku sníží a potenciál píku posune po modifikaci elektrody k zápornější hodnotě asi o 50 mV, což může signalizovat blíže nespécifikovanou interakci Co^{2+} a DNA a jejich elektrochemickou aktivitu. Této změny ve voltametrické odezvě bylo dále využito při detekci poškození DNA (prostřednictvím UV-C záření) přítomné na povrchu pracovní elektrody.



Obr. 4.13: Ovlivnění proudové odezvy systému Co-phen pomocí DNA přítomné na povrchu modifikované elektrody. K roztoku Co^{2+} (1, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) bylo přidáno 125 μl roztoku phenu (2, $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Tato směs byla následně proměřena na m-AgSAE modifikované DNA (3). Všechna měření probíhala technikou DPV v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.



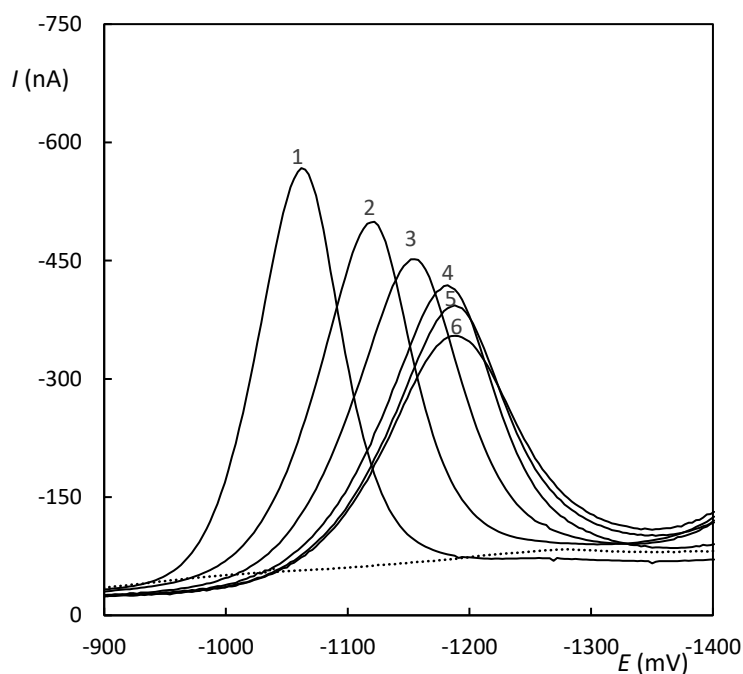
Obr. 4.14: Ovlivnění proudové odezvy Co^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) pomocí DNA přítomné na povrchu modifikované elektrody. Měření před (1) i po (2) modifikaci elektrody bylo provedeno technikou DPV v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na m-AgSAE s vloženou regenerací $E_s = -200 \text{ mV}$, $E_f = -1700 \text{ mV}$. Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.

4.8 Detekce poškozené DNA

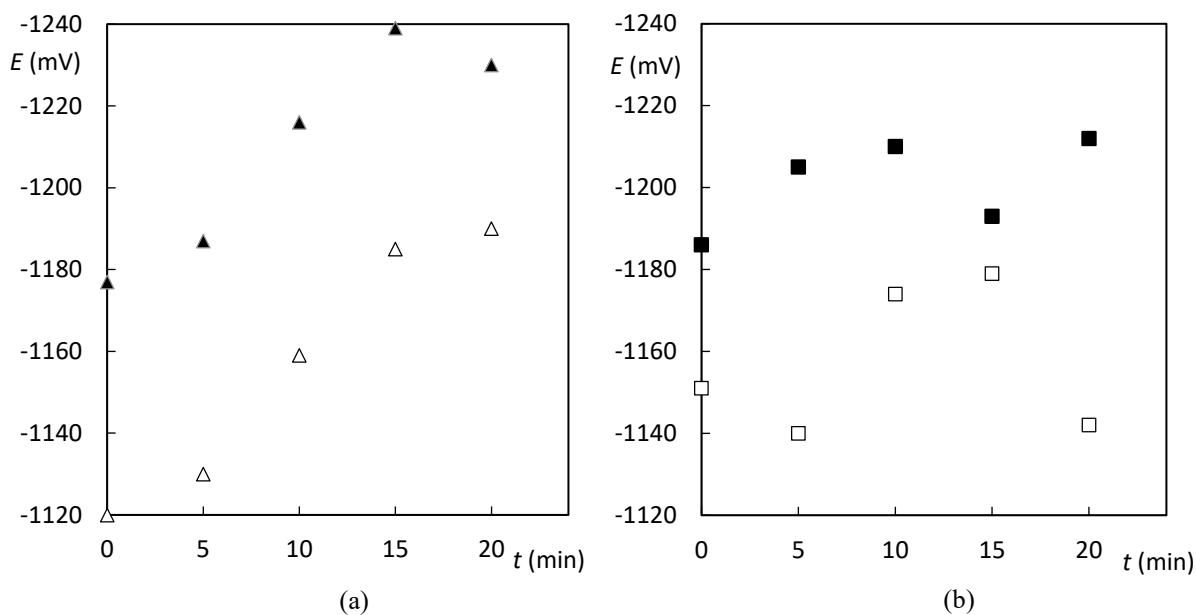
Čerstvě modifikovaná elektroda s DNA byla vystavena UV-C záření, jehož zdrojem byla UV lampa. Zvolená vlnová délka byla 254 nm. Elektroda byla upevněna nástavcem a povrch elektrody byl nastaven čelem k UV záření, a to ve vzdálenosti 1 nebo 3 cm od zdroje záření. Doba vystavení UV-C světlu byla 5, 10, 15 a 20 min, přičemž po uplynutí jednotlivých časových intervalů byla pracovní elektroda s poškozenou DNA připojena k elektrodovému systému. Poškození DNA bylo proměřeno voltametricky s využitím regenerace i s její absencí. Jednotlivá měření byla provedena pětikrát za sebou. Proměřen s taktó modifikovanou elektrodou byl redoxní systém Co^{2+} o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na voltamogramu tak byl zaznamenán pík Co^{2+} , proudová odezva při modifikaci elektrody nepoškozenou DNA (poškozená DNA v čase 0 min) a proudová odezva při ozáření DNA modifikovanou na elektrodě v časech vystavení UV-C záření po čase 5, 10, 15 a 20 min.

Kromě Co^{2+} poskytovaly ostatní redoxní systémy (phen, Co-phen a $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$) proměnlivé záznamy voltamogramů při měření elektrodou modifikovanou poškozenou DNA i s využitím regeneračních potenciálů. Další práce tak byla pouze zaměřena na kombinaci Co^{2+} s poškozenou DNA modifikovanou na elektrodě. Na rozdíl od ostatních voltametrických

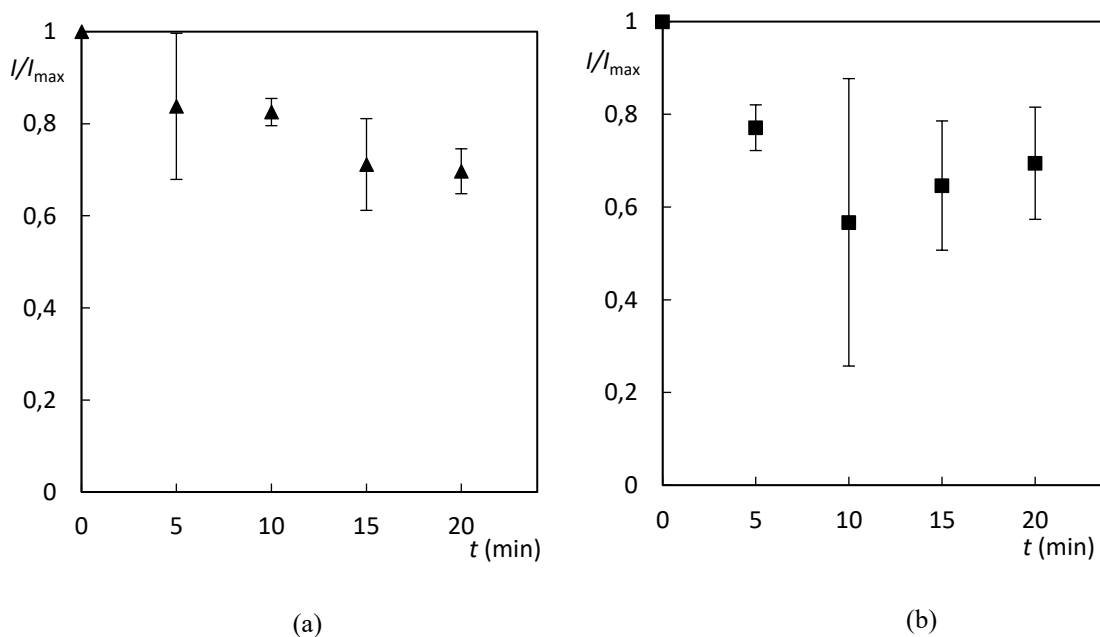
analýz, kde bylo proměřeno celé katodické potenciálové okno, zde byla proměřena pouze oblast od -800 mV do -1400 mV, tedy oblast, kde docházelo k námi sledovaným elektrochemickým změnám. Obr. 4.15 zachycuje změnu odezvy proudového píku po vystavení DNA záření UV-C v čase. Na záznamu je pozorována proudová odezva píku s klesající tendencí a posun píku k zápornějším potenciálům po každém pětiminutovém vystavení záření. UV záření může být zdrojem oxidativního poškození DNA [16]. Oxidované skupiny molekuly DNA mohou stát při elektrolýze za posunutím proudového píku směrem k zápornějším hodnotám potenciálu. Stejně tak ale mohou reagovat s materiálem povrchu pracovní elektrody a ovlivnit tak její elektrochemické vlastnosti. Snižování signálu může znamenat, že s rostoucím poškozením DNA dochází k větší pasivaci pracovní elektrody a přístup Co^{2+} k povrchu elektrody je při elektrolýze ztížen nebo že množství Co^{2+} je v roztoku sníženo s rostoucím množstvím různých lézí v DNA, které vznikly po ozáření a které svázaly koordinačně kovalentní vazbou Co^{2+} do struktury DNA, a tak již nejsou elektrochemicky aktivní. Na obr. 4.16 je sledována změna potenciálů, ve kterých mají proudové píky svá maxima, měřená v pětiminutových intervalech, kdy je DNA vystavena působení UV-C záření, za různých podmínek. Stejně tak je sledován vývoj výšky proudové odezvy na grafu obr. 4.17. Zobrazené hodnoty jsou průměrem tří měření. Využití regenerace poskytlo přesnější výsledky.



Obr. 4.15: Detekce poškozené DNA sledovaná změnou voltametričké odezvy Co^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Všechna měření probíhala v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) s vloženou regenerací $E_s = -800 \text{ mV}$, $E_f = -1400 \text{ mV}$. Měření probíhala v následujících krocích: 1. analýza Co^{2+} nemodifikovanou $m\text{-AgSAE}$ (1), 2. analýza Co^{2+} modifikovanou $m\text{-AgSAE}$ pomocí nativní DNA (2), 3. analýza Co^{2+} modifikovanou $m\text{-AgSAE}$ s poškozenou DNA (3 – 6). Poškození DNA bylo uskutečněno na $m\text{-AgSAE}$ pomocí UV-C záření (254 nm) a změřeno po 5 min (3), 10 min (4), 15 min (5) a 20 min (6) celkové expozice záření. Povrch modifikované elektrody se nacházel asi 3 cm od zdroje záření. Základní elektrolyt je značen tečkovanou čarou.



Obr. 4.16: Změna elektrického potenciálu s časem expozice DNA vůči UV-C záření. Poškození DNA měřeno technikou DPV na modifikované $m\text{-AgSAE}$ v roztoku Co^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$) v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$). Situace (a) byla provedena dvakrát s regenerací elektrody ($E_s = -800 \text{ mV}$, $E_f = -1400 \text{ mV}$), situace (b) byla provedena dvakrát bez regenerace elektrody. Modifikovaný povrch elektrody se nacházel asi 1 cm před zdrojem UV-C záření.



Obr. 4.17: Míra poškození DNA vyjádřena relativně k I_{\max} (proudové odezvě systému s nepoškozenou DNA) v závislosti na čase expozice DNA vůči UV-C záření. Poškození DNA měřeno technikou DPV na modifikované $m\text{-AgSAE}$ v roztoku Co^{2+} ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.dm}^{-3}$) v prostředí KCl ($c = 0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$). Situace (a) byla provedena s regenerací elektrody ($E_s = -800 \text{ mV}$, $E_f = -1400 \text{ mV}$), situace (b) byla provedena bez regenerace elektrody. Modifikovaný povrch elektrody se nacházel asi 1 cm před zdrojem UV-C záření.

5. Závěr

Cílem práce bylo nalézt takový redoxní systém, který by jasně, například po interkalaci do struktury dvojšroubovice DNA, podával stanovitelný signál poškození DNA. Ideální představa pak byla, že by takový systém podával rozlišitelný a reprodukovatelný signál pro DNA nepoškozenou a DNA poškozenou UV zářením s využitím voltametrických technik, konkrétně tedy s DPV na m-AgSAE v tříelektrodovém zapojení.

Komplexy phenu, tedy teoretické redoxní indikátory nativní a poškozené DNA, se však ukázaly jako nevhodné v kombinaci s m-AgSAE, jak vyplynulo z výsledků práce. Tyto komplexy neposkytují v žádném z měření jasný signál a modifikují rtuťový meniskus tak, že je nutné pak pro nová měření pracovní elektrodu ošetřit amalgamací. Příčinu tohoto chování lze vysvětlit pasivací pracovní elektrody či ireverzibilní reakcí se rtuťovým meniskem, které tak mění elektrochemické vlastnosti elektrody. Naopak dobře stanovitelné na m-AgSAE byly ionty Co^{2+} , pro něž byla sestavena lineární kalibrační řada. Většina analýz proběhla v 0,1M KCl, neboť ten poskytoval na m-AgSAE nejširší potenciálové okno. Jako významné se v závěru pro detekci poškozené DNA jevíly Co^{2+} .

DNA byla imobilizována na povrch pracovní elektrody jejím mícháním v připraveném roztoku DNA. Proudový pík Co^{2+} se snižoval s časem vystavení DNA vůči UV-C záření o vlnové délce 254 nm. Zároveň došlo k posunu píku k zápornějším hodnotám potenciálu po každých 5 minutách expozice záření. Co^{2+} se tak jevíly jako možný indikátor poškozené DNA.

Na výzkum lze dále navázat využitím jiných ligandů komplexů, jako je třeba derivát použitého phenu – 5-nitro-1,10-fenantrolin, případně pokusy opakovat a provést na typově jiné pracovní elektrodě, jako je například leštěná stříbrná pevná amalgámová elektroda.

Literatura

1. Schilt, A. A.: *Analytical Applications of 1,10-Phenanthroline and Related Compounds*. Illinois, Pergamon Press 1969.
2. Bencini, A.; Lippolis, V.: 1,10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes. *Coordination Chemistry Reviews* **254**:17–18, 2096–2180 (2010).
3. Irving, H.; Williams, R. J. P.: The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society* **637**, 3192–3211 (1953).
4. Felber, J.-P.; Coombs, T. L.; Vallee, B. L.: The mechanism of inhibition of carboxypeptidase A by 1,10-phenanthroline. *Biochemistry* **1**:2, 231–238 (1962).
5. Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K.: Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chemistry Reviews* **99**:9, 2777–2795 (1999).
6. Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M.: Chemical nucleases. *Chemistry Reviews* **93**:6, 2295–2316 (1993).
7. McMillin, D. R.; McNett, K. M.: Photoprocesses of copper complexes that bind to DNA. *Chemistry Reviews* **98**:3, 1201–1219 (1998).
8. Ni, Y.; Lin, D.; Kokot, S.: Synchronous fluorescence, UV–visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA. *Analytical Biochemistry* **352**:2, 231–242 (2006).
9. Hui, N.; Liang, A.; Xue, C.; Sun, W.: Polarographic determination of DNA based on its interaction with the phenanthroline–zinc(II) complex. *Journal of the Serbian Chemical Society* **80**:1, 87–96 (2015).
10. Islas, M. S.; Martínez Medina, J. J.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; Ferrer, E. G.; Williams, P. A. M.: Comparisons of the spectroscopic and microbiological activities among coumarin-3-carboxylate, *o*-phenanthroline and zinc(II) complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **198**:5, 212–221 (2018).
11. Brandt, W. W.; Kruse J. M.: Investigation and application of the zinc-1,10-phenanthroline complexes. *Analytical Chemistry* **24**:8, 1306–1308 (1952).

12. Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J.: Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *Journal of the American Chemical Society* **111**:24, 8901–8911 (1989).
13. Bebeki, V. I.; Voulgaropoulos, A. N.: Investigation for the determination of ultra trace amounts of Co^{2+} complexed with 1,10-phenanthroline by adsorptive voltammetry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **342**, 352–356 (1992).
14. Carter, M. T.; Bard, A. J.: Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA. *Journal of the American Chemical Society* **109**:24, 7528–7530 (1987).
15. <http://www.studiumbiochemie.cz/na.html>, staženo 17.8.2018.
16. Diclescu, V. C.; Paquim, A.-M. C.; Brett, A. M. O.: Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. *Sensors* **5**, 377–393 (2005).
17. Fojta, M.; Daňhel, A.; Havran, L.; Vyskočil V.: Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair. *Trends in Analytical Chemistry* **79**, 160–167 (2016).
18. Sinsha, R. P.; Häder, D.-P.: UV-induced DNA damage and repair: A review. *Photochemical and Photobiological Sciences* **1**:4, 225–236 (2002).
19. Hlavata, L.; Benikova, K.; Vyskocil, V.; Labuda, J.: Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode. *Electrochimica Acta* **71**, 134–139 (2012).
20. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.: *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2. vyd. New York, John Wiley and Sons 2001.
21. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: Electrodes of nontoxic solid amalgams for electrochemical measurements. *Electroanalysis* **14**:24, 1733–1738 (2002).
22. Vyskočil, V.; Hájková, A.: Uhlíkové elektrody modifikované deoxyribonukleovou kyselinou jako nástroje pro elektrochemickou detekci jejího poškození. *Chemické Listy* **110**:3, 207–214 (2016).