

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Zuzana Jurečková

Detekce oxidačního stresu pomocí elektrochemických DNA
biosenzorů

Detection of Oxidative Stress Using Electrochemical DNA Biosensors

Diplomová práce

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

Praha 2015

Tato diplomová práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt GP13-23337P) a Grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze (projekt GAUK 430214/2014/B-CH/PřF).

Prohlášení

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

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

V Praze dne 21. srpna 2015

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na vývoj, charakterizaci a využití jednoduchého a levného elektrochemického DNA biosenzoru pro detekci poškození DNA způsobeného oxidačním stresem.

První část práce je věnována přípravě a charakterizaci celokoplošné uhlíkové filmové elektrody (ls-CFE) modifikované uhlíkovými nanotrubičkami (CNT/ls-CFE). Uhlíkové nanotrubičky zlepšují elektrochemické vlastnosti převodníku a zvyšují množství naadsorbované DNA na povrchu elektrody. Testování elektrodového povrchu modifikovaného vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT) bylo provedeno pomocí cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) s použitím redoxního systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a square wave voltametrie (SWV) bez použití redoxního indikátoru. Uhlíkové nanotrubičky se ukázaly jako nevhodný materiál pro náš typ biosenzoru, ale je možné je využít v analytické chemii pro stanovování elektroaktivních látek.

Druhá část práce se zabývá aplikací DNA biosenzoru při detekci poškození DNA oxidačním stresem. Byl zvolen biosenzor na bázi ls-CFE, jehož hlavní výhody jsou rychlá příprava, jednoduchá mechanická obnova elektrodového povrchu, dobrá reprodukovatelnost měření, absence problémů spojených s „historií elektrody“. Oxidační stres vyvolaný galvanostaticky generovanými hydroxylovými radikály způsobující poškození DNA byl zkoumán za použití CV, EIS a SWV na DNA/ls-CFE. Získané výsledky potvrdily, že oxidační stres způsobuje poškození DNA, dochází k oxidaci DNA bází, vzniku jednořetězcových zlomů DNA dvoušroubovice, které odpadávají z povrchu elektrody.

Abstract

Presented Diploma Thesis is focused on the development, characterization, and utilization of simple and inexpensive electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA damage caused by oxidative stress.

The initial part of the work is devoted to preparation and characterization of a large-surface carbon film electrode (ls-CFE) modified with carbon nanotubes (CNT/ls-CFE). Carbon nanotubes improve electrochemical properties of the transducer and increase the amount of adsorbed DNA on the electrode surface. Testing of the electrode surface modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) was performed using cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using a redox system $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ and using square wave voltammetry without any redox indicator. Carbon nanotubes have proved to be unsuitable material for our type of biosensor, but it can be used in analytical chemistry for the determination of electroactive substances.

The second part of this Thesis deals with the application of the prepared DNA biosensor for the detection of DNA damage by oxidative stress. The biosensor based on the ls-CFE was chosen for this purpose, having several advantages, such as its fast preparation, a simple mechanical renewal of the electrode surface, a good reproducibility of measurements, an absence of problems connected with "electrode history". Oxidative stress, induced by galvanostatically generated hydroxyl radicals, causing DNA damage was investigated using CV, EIS, and SWV at the DNA/ls-CFE. The obtained results confirmed that the oxidative stress causes DNA damage and leads to the oxidation of DNA bases, formation of single strand breaks of the DNA double-stranded structure, which falls off from the electrode surface.

Klíčová slova

Velkoplošná uhlíková filmová elektroda
Uhlíkové nanotrubičky
DNA biosenzor
Cyklická voltametrie
Elektrochemická impedanční spektroskopie
Square wave voltametrie
Detekce poškození DNA
Oxidační stres
Hydroxylové radikály

Key Words

Large-Surface Carbon Film Electrode
Carbon Nanotubes
DNA Biosensor
Cyclic Voltammetry
Electrochemical Impedance Spectroscopy
Square Wave Voltammetry
DNA Damage Detection
Oxidative Stress
Hydroxyl radicals

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školitelidoc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé práci. Dále děkuji Mgr. Andree Hájkové za milou spolupráci.

Mé poděkování patří také rodičům, kteří mě podporují a umožňují mi studium na vysoké škole, a mým přátelům za všestrannou podporu.

Seznam použitých zkratk

c	molární koncentrace (mol/l)
CNT	uhlíkové nanotrubičky
CNT/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami
CR2	mikrokystalický grafit CR2
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/CNT/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami a DNA
DNA/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná DNA
DNA/MWCNT/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná víceštěnými uhlíkovými nanotrubičkami a DNA
DPV	diferenční pulzní voltametrie
E	elektrický potenciál (V)
E_A	oxidační potenciál (V)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
E_K	redukční potenciál (V)
$\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$	redoxní systém $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$
I	elektrický proud (A)
I_A	výška (velikost elektrického proudu) anodického píku (A)
I_K	výška (velikost elektrického proudu) katodického píku (A)
I_p	výška (velikost elektrického proudu) píku (A)
$I_{p,A}$	elektrický proud píku, výška píku adenosinu (A)
$I_{p,G}$	elektrický proud píku, výška píku guanosinu (A)
j	proudová hustota (A/m^2)
ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda
MWCNT	víceštěné uhlíkové nanotrubičky
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R_{CT}	odpor přenosu náboje (Ω)
SWCNT	jednoštěné uhlíkové nanotrubičky

SWCNT-COOH	karboxylované jednotěnné uhlíkové nanotrubičky
SWV	square wave voltametrie
t	čas (s)
ΔE_p	rozdíl hodnot potenciálů (V)

Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Cíl práce.....	10
1.2	Oxidační stres	10
1.3	Uhlíkové elektrody	12
1.3.1	Uhlíková filmová elektroda.....	12
1.3.2	Uhlíkové nanotrubičky	13
1.3.3	Elektrochemické DNA biosenzory.....	14
1.4	Použité elektrochemické techniky	17
1.4.1	Cyklická voltametrie (CV)	17
1.4.2	Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)	18
1.4.3	Square wave voltametrie (SWV).....	19
2	Experimentální část	20
2.1	Reagencie.....	20
2.2	Aparatura	21
2.3	Pracovní postupy	21
2.3.1	Příprava velkoplošné uhlíkové elektrody modifikové uhlíkovými nanotrubičkami.....	21
2.3.2	Příprava DNA biosenzoru	23
2.3.3	Generování hydroxylových radikálů	24
2.3.4	Elektrochemická měření.....	25
3	Výsledky a diskuze	26
3.1	Příprava a charakterizace elektrochemického DNA biosenzoru modifikovaného uhlíkovými nanotrubičkami.....	26
3.2	Oxidace hydrochinonu hydroxylovými radikály	34
3.3	Hodnocení poškození DNA způsobeného oxidačním stresem	37
4	Závěr	45
5	Literatura.....	46

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout jednoduchý biosenzor založený na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě modifikované uhlíkovými nanotrubičkami a nízkomolekulární DNAs lososích spermíí (imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu) umožňující detekci poškození DNA pomocí technik cyklické voltametrie (CV), elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a square wave voltametrie (SWV).

Aplikačním cílem práce bylo ověřit použitelnost takto připraveného DNA biosenzoru při detekci poškození DNA, které bylo způsobeno oxidačním stresem.

1.2 Oxidační stres

Oxidační stres je spojovaný s patologickým mechanismem mnoha nemocí jako ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova a Parkinsonova choroba), rakovina, diabetes mellitus, zánětlivá onemocnění, mutageneze, psychické onemocnění a stárnutí [1-10].

Oxidační stres je definován jako nerovnováha mezi produkcí volných radikálů a reaktivních metabolitů, nazývaných oxidanty, a jejich odstraňujícím ochranným mechanismem nazývaným antioxidační systém. Tato nerovnováha vede k poškozování důležitých biomolekul a orgánů s možným dopadem na celý organismus.

Mezi přirozené zdroje oxidačního stresu patří tzv. reaktivní formy kyslíku: superoxidový anion (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\bullet OH$), které mohou poškozovat proteiny, nukleové kyseliny a buněčné membrány [11-13].

Reaktivní formy kyslíku vznikají jako vedlejší produkty kyslíkového metabolismu, v důsledku γ -záření nebo v přítomnosti nadbytku volných přechodných kovů [14] a mohou reagovat s DNA [15-18].

Oxidační stres vyvolává více než 100 různých oxidačních změn ve struktuře DNA [19]. Oxidační poškození páteře DNA může vést k jednořetězcovým, dvouřetězcovým zlomům nebo ke změně ve struktuře DNA. Existuje alespoň pět tříd, kde generované

OH radikály způsobují oxidační poškození v DNA (oxidace bází, apurinová/apyrimidinová místa, DNA-DNA vnitřetězcové můstky, zlomy DNA a příčná vazba mezi DNA a proteinem) [20]. K oxidaci bází dochází převážně na atomech uhlíku, které tvoří elektrofilní centra [21,22].

Oxidační reakcí purinů a pyrimidinů v DNA vznikají různé produkty [2]. Nejvýznamnějšími produkty oxidace guanosinu a adenosinu v DNA je 8-oxo-7,8-dihydroguanosin (8-oxoguanosin), který je mutagenní a může blokovat transkripci [18, 23, 24] a 8-oxo-7,8-dihydroadenosin [25].

Hydroxylový radikál je nejreaktivnější formou z reaktivních forem kyslíku s vysokým pozitivním redukčním potenciálem. Nejčastěji vzniká Fentonovou reakcí mezi H_2O_2 a iontem přechodného kovu v nižším mocenství, nejčastěji Fe^{2+} , Cu^+ [2, 3, 26].

Při oxidaci vody, které je umožněno vysokým přepětím tvorby kyslíku na povrchu borem dopované diamantové elektrody (BDDE), vzniká velké množství hydroxylových radikálů (1.1), které jsou silnými oxidanty a zajišťují přímou oxidaci organických látek [27, 28].



Toho se využívá například při technologiích čištění průmyslových odpadních vod obsahujících organické látky, které se elektrochemicky oxidují. BDDE vykazuje vysokou chemickou a elektrochemickou stabilitu. Její použití na oxidaci organických látek vede k úplné mineralizaci na CO_2 a to s vysokou účinností [29-31].

Extrémně reaktivní OH radikály způsobují oxidační poškození dvouřetězcové DNA a je velmi důležité vysvětlit a charakterizovat interakční mechanismus mezi DNA a OH radikály [32].

1.3 Uhlíkové elektrody

Hlavní vliv na analytické parametry voltametrického stanovení a elektrické vodivosti má materiál, ze kterého je pracovní elektroda vyrobena. Uhlíkové elektrody jsou oceňovány pro svou nízkou cenu, nízké proudové pozadí, široké potenciálové okno, nízký šum a nepodstatné množství odpadu. Nejdůležitějším faktorem je odolnost vůči pasivaci, protože elektrochemické zanášení elektrodového povrchu tvoří problém prakticky při všech elektrochemických analýzách. Chemická regenerace použitá před každým měřením přispívá ke zlepšení opakovatelnosti stanovení.

Kompozitní pevné elektrody na bázi uhlíku se úspěšně uplatňují v oblasti anodické oxidace i katodické redukce. Skládají se nejméně z jedné nevodivé části (parafin, polyethylen, polystyren, teflon) a jedné vodivé části - uhlík, který se může vyskytnout v různých strukturách (grafitový prášek, pyrolytický grafit, skelný uhlík, uhlíkové nanočástice, uhlíková vlákna, saze) [33].

Povrch pevných uhlíkových kompozitních elektrod se nejčastěji využívá v leštěné formě. Často může být povrch také upraven rtuťovým filmem, silikagelem, uhlíkovými nanotrubičkami [34, 35] nebo biopolymerem DNA [36, 37].

Běžně používanými typy uhlíkových pracovních elektrod jsou pastová elektroda, elektroda z pyrolytického grafitu nebo skelného uhlíku nebo je alternativou uhlíková filmová elektroda použitá v této diplomové práci [38].

1.3.1 Uhlíková filmová elektroda

Jedním z druhů složených uhlíkových pevných elektrod jsou uhlíkové filmové elektrody, kdy je film nanesen na pevnou elektrodu, se kterou je vodivě spojen.

Uhlíkový film na povrchu běžně používané elektrody poskytuje několik výhod. Nový film se aplikuje pro každé měření a jeho odstranění je jednoduché a rychlé, kdy se pouze film setře o filtrační papír. Ke zlepšení signálů mohou vést úpravy složení uhlíkového filmu (platinizovaným diamantem modifikovaný uhlíkový film [39], supertenký uhlíkový film, uhlíkové filmy modifikované grafitovým práškem a uhlíkovými nanotrubičkami)[40].

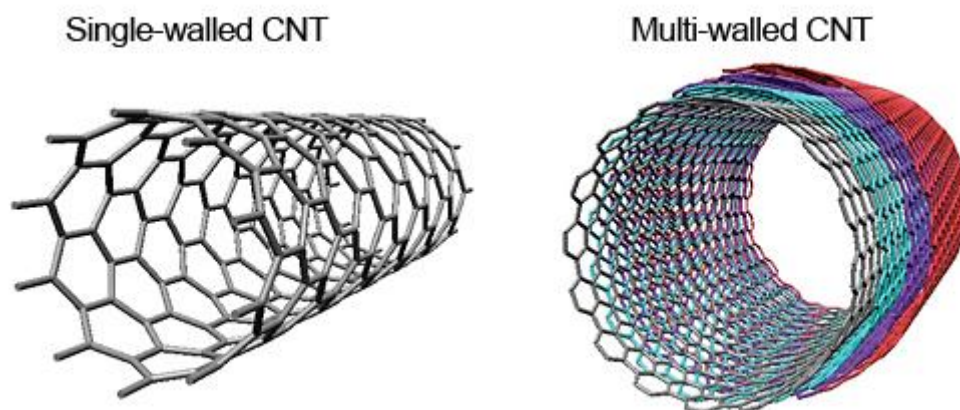
Filmy složené z vodivých uhlíkových mikročástic a nevodivého polymeru se uplatňují také k rozšíření potenciálového okna pracovních elektrod, na kterých není možné realizovat stanovení v oblasti kladných potenciálů, protože dochází k vlastní oxidaci elektrodového materiálu (stříbrné amalgámové elektrody [41-44]).

Modifikované uhlíkové filmy se používají ve většině odvětví analytické chemie: v ampérometrii [45, 46], kapalinové chromatografii [47], NMR spektroskopii [45] či v kombinaci elektrochemie s optickými metodami [48].

1.3.2 Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky (CNT) jsou označovány jako jeden z nejdůležitějších materiálů budoucnosti díky svým pozoruhodným vlastnostem a možnostmi využití v široké škále aplikací (detektory, plynové senzory, biosenzory, elektronická zařízení, v biomedicíně, v lékařství) [49].

První zmínka o existenci vícevrstevných uhlíkových nanotrubiček (MWCNT) byla uveřejněna v roce 1991 profesorem Sumio Iijimou [50]. O dva roky později objevil i jednovrstevné uhlíkové nanotrubičky (SWCNT) a velmi brzo bylo zjištěno, že tyto nové struktury mají neobyčejné vlastnosti, což vedlo k dalšímu výzkumu [51].



Obr. 1.1
Jednovrstevné (vlevo) a vícevrstevné (vpravo) uhlíkové nanotrubičky [52].

CNT mohou být popsány jako jedna vrstva grafitu srolovaná do hladkého válce (SWCNT) nebo jako soubor soustředných SWCNT, kdy strukturu trubičky tvoří více srolovaných vrstev grafitu s různými průměry (MWCNT), jejich vnější průměr se pohybuje od 3 nm do 30 nm a mohou mít 5-20 vrstev. SWCNT jsou užší a jejich vnější průměr je v rozmezí 1-2 nm (obr. 1.1) [50, 51, 53-55].

Výsledky studií ukazují, že aplikace uhlíkových nanotrubiček v materiálech vede ke zvýšení pevnosti, pružnosti, mají nízkou hustotu, vysokou tepelnou vodivost a vynikající elektrickou vodivost[56].

CNT mají velký specifický povrch, tzn. velký poměr délka/průměr, který má schopnost reagovat se svým okolím. Stěny CNT nejsou reaktivní, ale lze je funkcionalizovat navázáním funkčních skupin pomocí kovalentních vazeb (-COOH, -OH, -C=O), funkční skupiny se váží na otevřené konce nebo volná místa v uhlíkové síti přímo na povrch uhlíkových nanotrubiček [57-60]. Je to atraktivní materiál se zajímavými chemickými, mechanickými, strukturními a elektronickými vlastnostmi [54, 55].

V analýze nukleových kyselin se poslední dobou uplatňují také uhlíkové elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami, které zvětšují pracovní povrch elektrody a tím zvyšují citlivost stanovení DNA [61].

1.3.3 Elektrochemické DNA biosenzory

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) patří mezi nejzákladnější molekuly v organismu, nositelka genetické informace. Více než 50 let bylo vynakládáno úsilí k objasnění úlohy DNA v široké řadě systémů. S rostoucími znalostmi o tom, jak jsou DNA a geny kódovány, se stále zvyšuje poptávka po jednoduchých a spolehlivých metodách pro jejich analýzu [62].

DNA podstupuje řadu strukturálních změn jako je oxidace bází DNA a cukerné složky nebo uvolňování bází stejně jako zlomy vláken způsobené reaktivními formami kyslíku, druhem reaktivního dusíku nebo síry [63, 64], jiným druhem genotoxických látek [65].

Malé molekuly xenobiotických sloučenin jsou známy reverzibilní interakcí s dvouřetězcovou DNA prostřednictvím

- 1) elektrostatické interakce s negativně nabitou cukr-fosfátovou kostrou,
- 2) interakce navázáním do žlábků DNA,
- 3) interkalace mezi naskládané páry bází DNA [66-68].

Vrstvy nukleových kyselin kombinované s elektrochemickými převodníky přinášejí nový typ afinitního biosenzoru schopného rychle rozeznat a sledovat DNA-vázající organické sloučeniny [69].

Elektrochemické biosenzory se úspěšně používají pro řadu použití včetně sledování poškození DNA, studování interakcí DNA s genotoxickými látkami (karcinogeny, mutageny, toxiny, léčiva nebo drogy), také detekce specifických mutací v DNA sekvencích [70].

Reaktivní formy kyslíku se tvoří jak endogenně (během aerobní metabolismus, při patologických podmínkách) nebo exogenně (po vystavení UV-záření, ionizačnímu záření, environmentálním mutagenům nebo karcinogenům). Za celý den se vyskytne v buňce asi deset tisíc milionů příležitostí k poškození DNA [65]. Nahromadění oxidačního poškození DNA je spojováno se stárnutím a různými nemocemi jako rakovina a neurodegenerativní onemocnění.

Změněné chemické, fyzikálně-chemické a strukturální vlastnosti poškozené DNA se odrážejí v redoxním chování, které může být využito v mnoha technikách pro detekci poškození DNA [37]. Analytické metody musí rychle a citlivě detekovat jak poškození DNA, tak i látky, které interagují s DNA a způsobují poškození. Interakce DNA s různými typy látek byla studována pomocí mnoha metod např. gelovou elektroforézou [71, 72], NMR, fluorescencí [73,74], UV-VIS spektroskopií a také elektrochemií [75-80].

Elektrochemické DNA biosenzory nejsou využívány jen k detekci, ale také k vyvolání a řízení DNA poškození na elektrodovém povrchu prostřednictvím elektrochemického generování poškozujících látek (radikály) [37].

Od roku 1960 byla zkoumána elektrochemie DNA na různých elektrodových materiálech. Práce Palečka se zaměřila na použití rtuťových elektrod, na kterých se DNA snadno adsorbuje. Použití rtuti, i když citlivé metody, je problematické z důvodu toxicity. Z toho důvodu byl hledán další vhodný elektrodový materiál. Uhlík je levný a relativně chemicky nereaktivní, čehož se využilo pro použití jednorázových senzorů. Pro moderní elektrochemii je uhlík k dispozici v různých formách (borem dopovaná

diamantová elektrody, pyrolytický grafit, elektroda ze skelného uhlíku). Všechny předchozí materiály byly využity pro elektrochemickou detekci DNA [82-84].

DNA biosenzory jsou propojená zařízení bioreceptoru a chemického převodníku, které používají DNA jako biomolekulární rozpoznávací prvek, pro měření specifické vazby DNA obvykle elektrickým, optickým nebo tepelným přenosem signálů [85].

Mezi elektrochemickými převodníky uhlíkové elektrody (elektrody ze skelného uhlíku, elektroda z pyrolytického grafitu, uhlíková pastová elektroda, uhlíková filmová elektroda, tištěná uhlíková elektroda, elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami) vykazují několik unikátních vlastností. Široké potenciálové okno v kladných hodnotách umožňuje citlivou elektrochemickou detekci oxidačního poškození DNA sledováním oxidačních píků DNA bázi[86].

Nejjednodušší metodou imobilizace DNA na povrch elektrody je adsorpce. Hladký povrch uhlíkové elektrody je předupraven vložением pozitivního potenciálu po určitou dobu. Elektrochemická aktivace uhlíkového povrchu zvyšuje jeho drsnost a hydrofilní charakter [87, 88]. Poté je elektrochemická adsorpce provedena z roztoku DNA za stálého míchání a vloženího potenciálu 0,5 V po určitou dobu podle koncentrace DNA. Vložený potenciál zlepšuje stabilitu imobilizované DNA během elektrostatické přitažlivosti mezi pozitivně nabitým povrchem uhlíkové elektrody a negativně nabitou cukr-fosfátovou kostrou [37].

Povrch uhlíkových elektrod v biosenzorech se často modifikuje různými způsoby, což vede rychlejšímu elektrodovému ději nebo snadnějšímu přístupu látky k povrchu elektrody, čímž se zvyšuje citlivost stanovení.

Nanostrukturované rozhraní mezi holou elektrodou a DNA tvořené různými materiály jako zlaté nanočástice a uhlíkové nanomateriály (SWCNT, MWCNT, uhlíkové nanovlákná, grafen, nanodestičky oxidu grafenu) [90-99] představuje jiný přístup ke zlepšení odezvy biosenzoru kvůli vlastní elektroaktivitě, efektnímu elektrodovému povrchu a dalším [100, 101].

1.4 Použité elektrochemické techniky

1.4.1 Cyklická voltametrie (CV)

CV je pravděpodobně nejuniverzálnější elektroanalytickou technikou pro studování elektroaktivních látek. Je často první volbou pro elektrochemické vyšetřování sloučenin, biologického materiálu na elektrodovém povrchu. Účinnost voltametrických výsledků je v jejich schopnosti rychle pozorovat redoxní chování v širokém rozsahu potenciálů [102]. Je málo používaná pro kvantitativní stanovení, ale je široce využívána pro studium redoxních procesů, pro porozumění vznikajícím meziproduktům, pro získání stability reakčních produktů.

U cyklické voltametrie je elektrodový potenciál lineárně závislý na čase a nejčastěji se využívá tříelektrodového zapojení. Tato technika je založena na vkládání a měření potenciálu mezi referentní a pracovní elektrodou, zatímco se sleduje velikost protékajícího proudu mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Získaná data se zaznamenávají jako závislost elektrického proudu (I) na elektrickém potenciálu (E). Proud roste, dokud potenciál nedosáhne redoxního potenciálu analytu a poté klesá, protože koncentrace analytu je v okolí elektrody vyčerpána.

Reverzibilní redoxní děj je charakterizován stejným tvarem redukčního (katodického) a oxidačního (anodického) píku a potenciálový rozdíl mezi píky v dokonalém případě $|E_A - E_K| = 59/z$, ale prakticky tato hodnota bývá pro jednoelektronový redoxní systém 70-100 mV. Poměr ideálních píků proudu je $I_K/I_A=1$. Větší potenciálový rozdíl a asymetrické píky značí kvazireverzibilní nebo ireverzibilní redoxní systém [103-105].

U DNA biosenzorů se CV využívá pro detekci změny v potenciálových a proudových signálech při rozpoznávání DNA, hodnocení poškození DNA nebo při detekci hybridizace DNA. CV při poškození DNA využívá běžně používaný redoxní indikátor $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, který je záporně nabitý, stejně jako kostra DNA, což mezi nimi způsobuje elektrostatické repulze. Změna proudového signálu je úměrná množství naadsorbované DNA na elektrodě [106, 107].

1.4.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

EIS je v současné době jednou z nejjednodušších přímých experimentálních technik, která umožňuje efektivně a citlivě charakterizovat elektrodové povrchy, odráží jejich elektrické a strukturní vlastnosti. Metoda umožňuje zkoumání kinetiky přenosu elektronů a vodivosti elektroaktivní vrstvy na povrchu elektrody.

Změny ve struktuře DNA ovlivňují přenos náboje a tím i jeho odporové vlastnosti. Metoda se hlavně využívá při studování hybridizace DNA, imunotestech, afinitních vlastnostech látek a při studiu poškození DNA [108].

Výhodou této techniky je poskytování komplexních informací o elektrochemickém chování zkoumaného systému (kinetika nebo mechanismus elektrodového děje).

Na elektrodu je vkládáno napětí a je měřena proudová odezva. Měří se odpor systému podle Ohmova zákona, jelikož je použito střídavé napětí, odpor systému je závislý na frekvenci a nazývá se impedance. Impedance se vyjadřuje pomocí komplexních čísel a má dvě složky (reálnou a imaginární), které jsou závislé na frekvenci [109].

Naměřená data se prezentují jako závislost Z'' (imaginární složka impedance závislá na frekvenci) na Z' (reálná složka nezávislá na frekvenci). Graf této závislosti se nazývá Nyquistův graf a má charakteristický půlkruhový tvar. Oblast vysokých frekvencí půlkruhu naznačuje faradayický transport elektronů a lineární část ukazuje difúzi řízený proces iontů blízko elektrodového povrchu [110].

Existují dva modely pro měření EIS

- 1) nefaradayický, bez přítomnosti redoxního indikátoru a
- 2) faradayický, s přítomností redoxního indikátoru ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$).

Měření se provádí při formálním potenciálu redoxního páru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, který musí zajistit dosažení rovnováhy v systému.

Na přenos náboje a na odporové vlastnosti mají vliv změny ve struktuře DNA. Přítomnost DNA na elektrodě se projeví zvětšením půlkruhu, kvůli elektrostatické repulzi negativně nabitého $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a negativně nabitě cukr-fosfátové kostře DNA. Velká molekula DNA blokuje povrch elektrody a brání přenosu iontů indikátoru k elektrodě, tím dochází ke zvyšování odporu. Při poškození DNA může dojít ke strukturálním změnám (rozevření dvoušroubovice, vznik jednořetězcových zlomů),

keré způsobí odpadávání DNA z elektrody a to se projeví poklesem půlkruhu Nyquistova grafu [99,107, 111, 112].

1.4.3 Square wave voltametrie (SWV)

SWV je výkonná elektrochemická technika vhodná pro analytickou aplikaci, mechanické studování elektrodoých procesů s vysokou citlivostí, která je způsobena minimalizací kapacitního proudu, a elektrokinetických měření. V současné době je považována za jednu z nejmodernějších voltametrických technik, které sjednocují výhody pulzních technik (zvýšená citlivost), cyklické voltametrie (pohled na elektrodoý mechanismus) a impedančních technik (kinetická informace o rychlosti elektrodoých dějů).

Metoda, při které se na pracovní elektrodu vkládá potenciál lineárně se měnící s časem. Tento potenciál se moduluje střídavým napětím o malé amplitudě (kolem 10 mV a frekvenci okolo 100 Hz). Proudová odezva se měří pouze ke konci každého vloženého pravoúhlého pulsu. SW voltamogram má tvar píku [113-115].

SWV se často používá při zkoumání poškození DNA imobilizované na povrchu elektrody, využívá se oxidačních píků guanosinu (I_G) aadenosinu (I_A). Pokles odezvy těchto píků vypovídá o degradaci DNA, která může být způsobena rozevřením dvoušroubovice DNA v důsledku interkalace látky mezi vlákna DNA, což má za následek vzniku jednořetězcových zlomů [38].

2 Experimentální část

2.1 Reagencie

Roztok DNA (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním 100 mg nízkomolekulární DNA z lososích spermií v 10 ml fosfátového pufru o pH 6,8.

Uhlíkové nanotrubičky (SWCNT, MWCNT, SWCNT-COOH, směs CNT) o koncentraci 5 mg/ml byly suspendovány v deionizované vodě a následně sonikovány v ultrazvuku (PS 02000 Ultrasonic Compact Cleaner 1,25 l, PowerSonic, SR) po dobu 15 minut a před každým použitím promíchány pomocí třepačky Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA).

Fosfátový pufr (PBS) o koncentraci 0,1 mol/l a pH 6,8 byl připraven rozpuštěním 35,8 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a 13,8 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) v deionizované vodě. Celkový objem připraveného roztoku byl 1,0 l.

Ekvimolární směs hexakynoželezitanu draselného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) a hexakynoželezitanu draselného (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven v 500-ml odměrné baňce rozpuštěním 0,1651 g $K_3[Fe(CN)_6]$ a 0,2101 g $K_4[Fe(CN)_6]$ ve fosfátovém pufru o pH 6,8.

Roztok hydrochinonu (p.a., Lachema, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l byl připraven rozpuštěním 0,011 g hydrochinonu v deionizované vodě (Milli-Q Plus, Millipore, USA). Celkový objem připraveného roztoku byl 100 ml.

Dalšími použitými chemikáliemi byly: mikrokrystalický grafit CR 2 (99,5 %, zrnitost 3,5-5,5 μm , Graphite Týn, Týn nad Vltavou, ČR), obalový pěnový polystyren, 1,2-dichlorethan (čistota p.a., Merck, Německo), methanol (čistota p.a., Lach-Ner, ČR) vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (Sigma-Aldrich, USA), jedностěnné uhlíkové nanotrubičky (Sigma-Aldrich, USA), karboxylované jedностěnné uhlíkové nanotrubičky (SWCNT-COOH), (Sigma-Aldrich, USA), směs fullerenu, cylindrických a jedностěnných uhlíkových nanotrubiček (Alfa Aesar, Německo).

2.2 Aparatura

Cyklická voltametrie (CV), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), square wave voltametrie (SWV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) byly měřeny přístrojem Micro Autolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko). Pro měření CV, SWV a DPV byl použit software GPES (General Purpose Electrochemical System), verze 4.9, a pro měření EIS byl použit software FRA (Frequency Response Analysis), verze 4.9. Micro Autolab III/FRA 2 byl řízen stolním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Výsledky byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a grafy byly vytvořeny v programu Origin Pro verze 8.0 (OriginLab, USA). Všechna měření probíhala v tříelektrodové zapojení.

Pracovní elektrodou byla pevná platinová elektroda (typ 6.1204.120, Metrohm, Švýcarsko) pokrytá vrstvou uhlíkového filmu, tím byla vytvořena velkoplošná uhlíková filmová elektroda (ls-CFE). Argentchloridová elektroda (typ RAE 113, 1 mol/l KCl, Monokrystaly, ČR) byla použita jako referenční elektroda a jako pomocná byla použita platinová elektroda (typ PPE, Monokrystaly, ČR).

Pro aktivaci elektrody a akumulaci DNA na povrch pracovní elektrody byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR) se softwarem Polar Pro, verze 5.1.

Hydroxylové radikály byly generovány galvanostaticky rozkladem vody na borem dopované diamantové elektrodě (BDDE) při určité proudové hustotě (j) pomocí přístroje Micro Autolab III/FRA 2 za použití softwaru GPES.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava velkoplošné uhlíkové elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubičkami

Jako pracovní elektroda byla použita pevná platinová elektroda, rozměr platinového disku byl $(2,0 \pm 0,1)$ mm a průměr plastového těla vyrobeného z polyether ether ketonu (PEEK) byl 7,0 mm (obr. 2.1). Povrch pracovní elektrody byl pokryt uhlíkovým filmem (ls-CFE) (obr. 2.2).



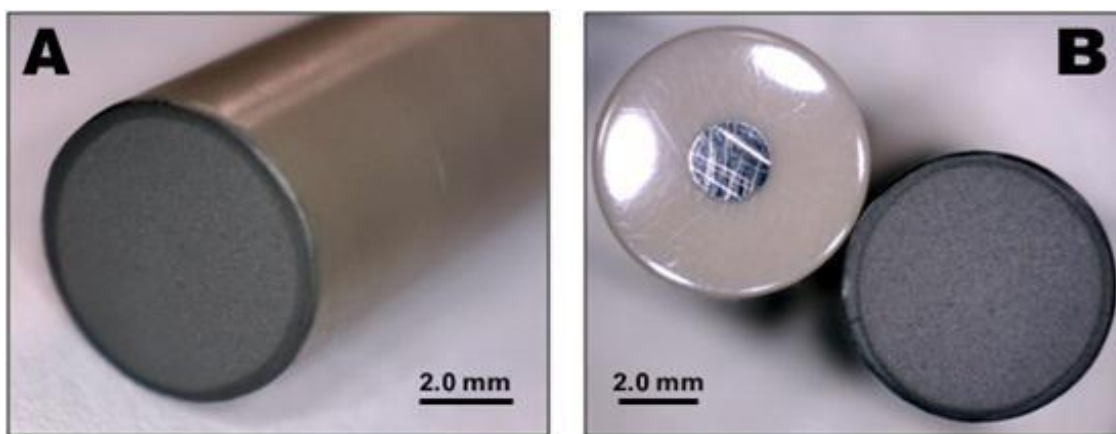
Obr. 2.1

Podkladová pevná platinová elektroda, fotografii poskytuje výrobce [116].

Uhlíkový inkoust byl vytvořen smícháním 0,09 g uhlíku (mikrokrystalický grafit CR 2) a 0,01 g polystyrenu s 0,5 ml 1,2-dichlorethanu. Připravený inkoust byl promíchán pomocí třepačky Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) po dobu 2 min, stejně jako před každým nanesením filmu. Na povrch elektrody byla nanášena vrstva inkoustu o objemu 10 μ l pomocí automatické pipety (Biohit, Finsko). Film se nechal zaschnout přibližně 2 min. Po vytěkání rozpouštědla se na povrchu elektrody vytvořil kompaktní film.

Modifikace elektrody byla provedena pokrytím povrchu Is-CFE. Její povrch byl před modifikací elektrochemicky upraven. Po úpravě se na povrch pracovní elektrody nanasla suspenze uhlíkových nanotrubiček (CNT, SWCNT, MWCNT) pomocí automatické pipety a nechala se schnout asi 20 min. Poté bylo možné velkoplošnou uhlíkovou filmovou elektrodu modifikovanou uhlíkovými nanotrubičkami (CNT/Is-CFE) použít k měření.

Po každém měření nebo při mechanickém poškození byl uhlíkový film odstraněn setřením o filtrační papír, zbytky filmu byly odstraněny methanolem a na elektrodu se mohl nanést nový film.



Obr. 2.2

Fotografie (A) Is-CFE a (B) povrchu podkladové elektrody před a po nanesení uhlíkového filmu; fotografováno pomocí Microscope Camera, Digitus, Taiwan.

2.3.2 Příprava DNA biosenzoru

Elektrochemická aktivace Is-CFE

Na elektrodu byl vložen potenciál 1,6 V po dobu 240 s (pro CV, EIS) a 1,5 V po dobu 180 s (pro SWV) v PBS za stálého míchání, z důvodu odstranění zoxidovaných a naadsorbovaných látek z povrchu uhlíkového filmu.

Modifikace uhlíkovými nanotrubičkami

Po elektrochemické aktivaci bylo na uhlíkový povrch nanášeno 5 μ l CNT pomocí automatické pipety a necháno uschnout.

Akumulace DNA na povrch CNT/Is-CFE

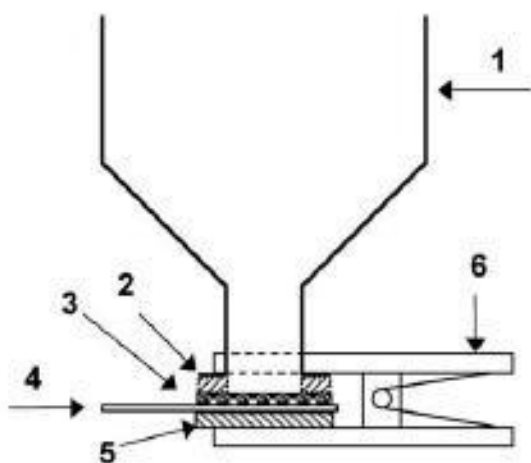
Příprava DNA biosenzoru byla realizována akumulací DNA z roztoku připraveného rozpuštěním 100 mg DNA v 10 ml PBS na povrch CNT/Is-CFE. Roztokem bylo během akumulace mícháno a při tom byl na elektrodu vkládán potenciál 0,5 V po dobu 1 min. Tímto způsobem byla připravena velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná uhlíkovými nanotrubičkami a DNA (DNA/CNT/Is-CFE).

2.3.3 Generování hydroxylových radikálů

Borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) pro generování hydroxylových radikálů byla připravena chemickou depozicí par za použití směsi plynů $\text{CH}_4/\text{H}_2/\text{B}_2\text{H}_6$ obsahujících 1 % uhlíku s 10 ppm B_2H_6 přidaného pro dopování borem. Tlak v systému byl 18,67 kPa a teplota křemíkového nosiče byla 800 °C. Průměr BDD byl 6 mm.

OH radikály byly generovány galvanostaticky v 10 ml v 0,1 mol/l PBS (pH=6,8) na BDDE při proudové hustotě $= 10, 30$ a 50 mA/cm^2 po dobu 1, 3, 5, 10, 20 a 30 min za stálého míchání. Aktivovaná DNA/ls-CFE byla ponořena při generování radikálů do roztoku PBS po určený čas, vzdálenost mezi elektrodou a BDDE byla 5 mm. Poté byla DNA/ls-CFE vyjmuta, opláchnuta deionizovanou vodou a byla provedena měření podle podmínek uvedených v 2.3.4.

Na obr. 2.3 je znázorněno schéma uspořádání BDDE použité při generování radikálů v této diplomové práci.



Obr. 2.3

Detailní schéma skleněné nádoby s přichycenou BDD elektrodou, 1) skleněná nádoba, 2) vitonové těsnění, 3) BDD, 4) měděný plíšek, 5) izolační podložka, 6) svorka [117].

2.3.4 Elektrochemická měření

Cyklická voltametrie (CV)

CV byla měřena v 10 ml ekvimolární směsi ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ při laboratorní teplotě. Rychlost polarizace byla 50 mV/s s potenciálovým krokem 5 mV a potenciálovým rozsahem od 500 mV do -100 mV. Zaznamenány byly tři skeny a vyhodnocován byl vždy až třetí sken, který přepisoval voltamogram skenu druhého. Získané výsledky prezentovaly ustálený stav.

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

EIS byla měřena v 10 ml ekvimolární směsi ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ při laboratorní teplotě a při potenciálu 225 mV odpovídajícímu formálnímu redoxnímu potenciálu tohoto indikátoru. Rozsah použitých frekvencí byl 0,1 až 5000 Hz (měřeno 51 bodů), potenciálová amplituda byla 10 mV. Byl hodnocen nárůst nebo pokles odporu přenosu náboje (R_{CT}), vyhodnocení bylo prováděno pomocí funkce *Fit* a data byla korigována na geometrickou plochu pracovní elektrody 38,5 mm².

Square wave voltametrie (SWV)

SWV byla měřena v 10 ml 0,1 mol/l PBS (pH=6,8), při laboratorní teplotě s následujícími parametry: potenciálový rozsah od 0 V do 1,7 V, frekvence 200 Hz, potenciálový krok 0,015 V, amplituda potenciálu 0,05V. Získaný voltamogram byl upraven na základní linii.

Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

DPV byla naměřena v 10 ml roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v PBS při potenciálovém rozsahu od 0,7 V do -0,25 V s potenciálovým krokem 3 mV, modulační amplitudou 50 mV a modulačním časem 100 ms.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Příprava a charakterizace elektrochemického DNA

biosenzoru modifikovaného uhlíkovými nanotrubičkami

Z důvodu zlepšení elektrochemických vlastností převodníku a zvýšení množství naadsorbované DNA byl povrch pracovní elektrody ls-CFE modifikován vícestěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT). Povrch elektrody byl zkoumán cyklickou voltametrií (CV), elektrochemickou impedanční spektroskopií (EIS) s pomocí redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/l}$, pH 6,8) a squarewave voltametrií bez použití redoxního indikátoru. MWCNT byly na ls-CFE nanášeny o koncentraci 5 mg/ml a nanesený objem byl 5 μl (MWCNT/ls-CFE).

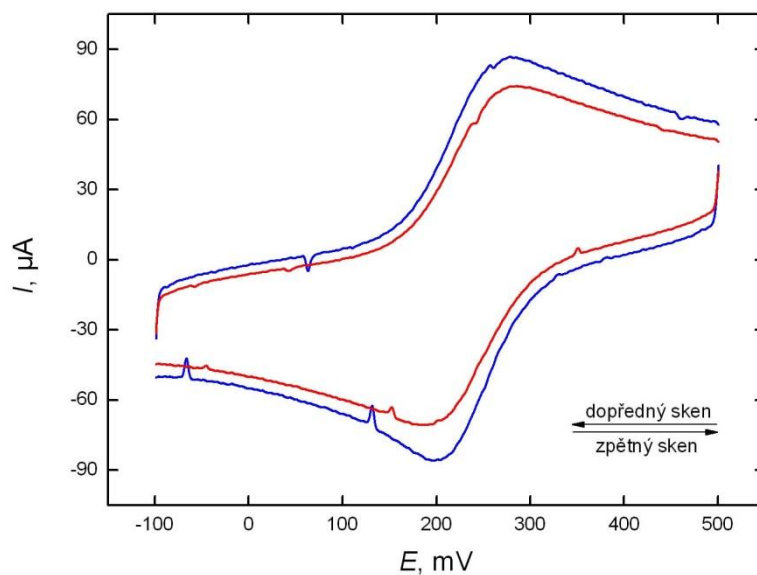
Na obr. 3.1 jsou představeny cyklické voltamogramy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ pro MWCNT/ls-CFE a DNA/MWCNT/ls-CFE a na obr. 3.2 jsou cyklické voltamogramy pro nemodifikovanou ls-CFE a DNA/ls-CFE. Potenciálový rozsah byl nastaven od 500 mV do -100 mV. Pro hodnocení jednotlivých signálů CV byl použit potenciálový rozdíl mezi píky a poměr píků proudu. Vyhodnocení voltamogramů je uvedeno v tabulce 3.1.

Při porovnání MWCNT/ls-CFE a ls-CFE bylo zaznamenáno zmenšení rozdílu hodnot potenciálů (ΔE_p) z 130 mV pro nemodifikovanou ls-CFE na 73 mV pro MWCNT/ls-CFE. Jednalo se o pokles o 57 mV, který indikoval zlepšení reverzibility systému $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Současně byla změna v maximálních proudech píků, kdy docházelo k nárůstu katodického signálu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ z 51,92 μA pro nemodifikovanou ls-CFE na 66,80 μA pro MWCNT/ls-CFE a u anodického signálu byl nárůst z 54,27 μA pro ls-CFE na 69,21 μA pro MWCNT, což značilo zlepšení vodivosti povrchu MWCNT/ls-CFE.

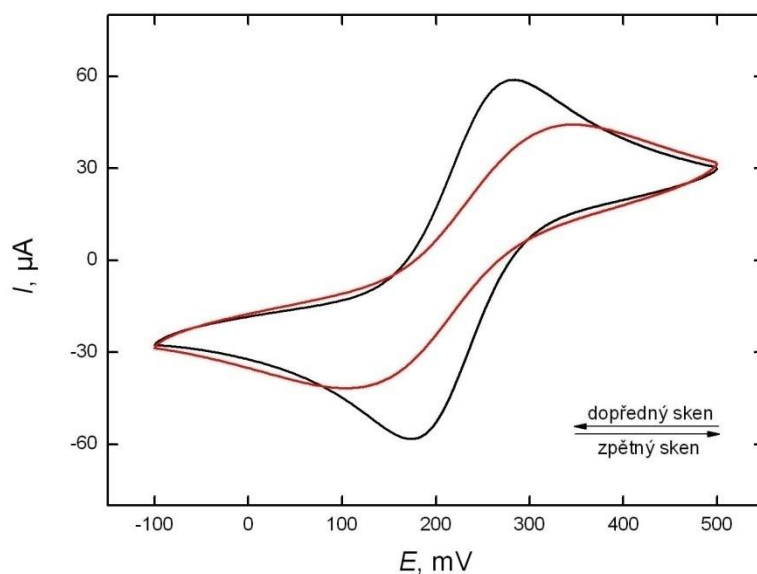
Důležité bylo také vyhodnocení signálů indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na elektrodách před a po modifikaci DNA. Rozdíl mezi maximem výšky píku proudu u aktivované elektrody a maximem výšky píku proudu u elektrody s akumulovanou DNA, tedy množství naakumulované DNA, je důležité při měření poškození DNA, protože potřebujeme, co největší okno pro detekci poškození DNA. V případě holé elektrody

Is-CFE byl rozdíl ΔE_p 66 mV a rozdíl proudů pro anodický pík byl 15,21 μA , pro katodický pík byl 16,23 μA . Po modifikaci elektrody vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami a následně DNA byl rozdíl $\Delta E_p = 9$ mV a rozdíl anodických píků 6,82 μA a katodických píků 10,42 μA , tedy lepší reverzibilita systému, ale menší proudové detekční okno pro hodnocení poškození DNA než u nemodifikované elektrody uhlíkovými nanotrubičkami.



Obr. 3.1

Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na MWCNT/Is-CFE (modrá křivka) a na DNA/MWCNT/Is-CFE (červená křivka). Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do -100 mV. Zobrazen vždy třetí sken.



Obr. 3.2

Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE (černá křivka) a na DNA/ls-CFE (červená křivka). Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do -100 mV. Zobrazen vždy třetí sken.

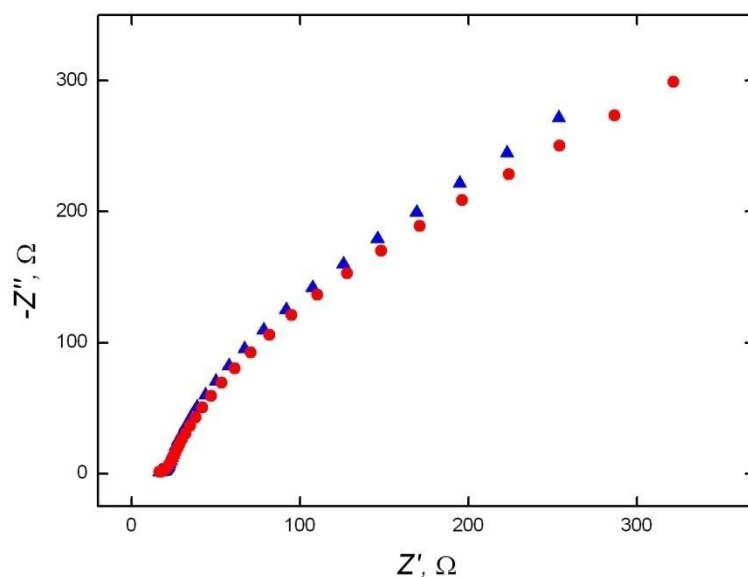
Tab.3.1

Vyhodnocení elektrochemických vlastností pro různé typy elektrod.

Typ elektrody	MWCNT/ls-CFE	DNA/MWCNT/ls-CFE	ls-CFE	DNA/ls-CFE
I_K [μA]	66,80	56,38	51,92	35,69
I_A [μA]	69,21	62,39	54,27	39,06
I_K/I_A	0,97	0,90	0,96	0,91
E_K [mV]	205	199	154	121
E_A [mV]	278	281	284	317
$E_A - E_K$ [mV]	73	82	130	196

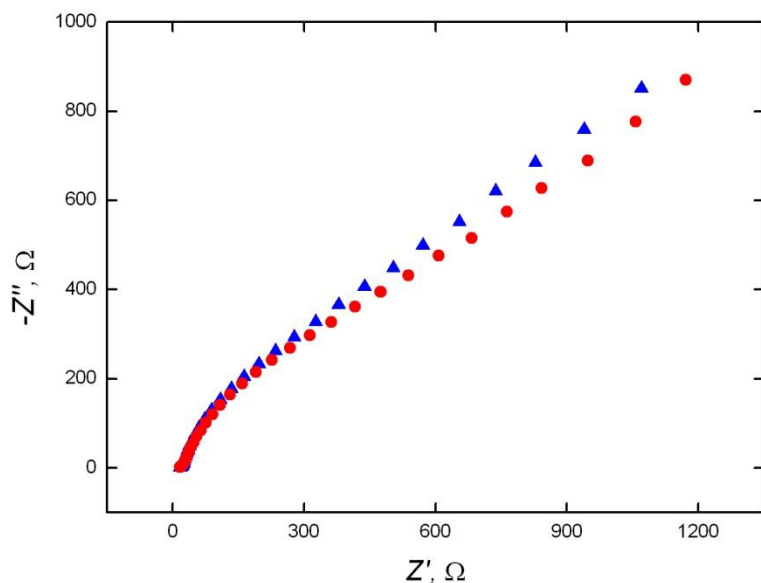
Povrch elektrod byl dále charakterizován pomocí elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) s indikátorem $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Byl sledován odpor přenosu náboje R_{CT} .

Na obr. 3.3 jsou zobrazeny Nyquistovy grafy pro MWCNT/ls-CFE a DNA/MWCNT/ls-CFE měřené při frekvenci 0,1 až 5000 Hz. Tvar získaných Nyquistových grafů neodpovídá půlkruhovému tvaru, a proto nebyly odečteny hodnoty R_{CT} . Obr. 3.4 ukazuje Nyquistovy grafy, které byly změřeny od nižší frekvence (0,01 až 5000 Hz), tato proměřená frekvence nepřinesla lepší výsledky. Na grafech lze vidět, že MWCNT/ls-CFE má povrch vylepšený uhlíkovými nanotrubičkami natolik, že naakumulovaná vrstva DNA již pomocí EIS nelze rozlišit. Pro srovnání na obr. 3.5 jsou zobrazeny impedanční spektra měřená na ls-CFE a DNA/ls-CFE. Detekce poškození DNA s pracovní elektrodou MWCNT/ls-CFE pomocí techniky EIS tedy není možná.



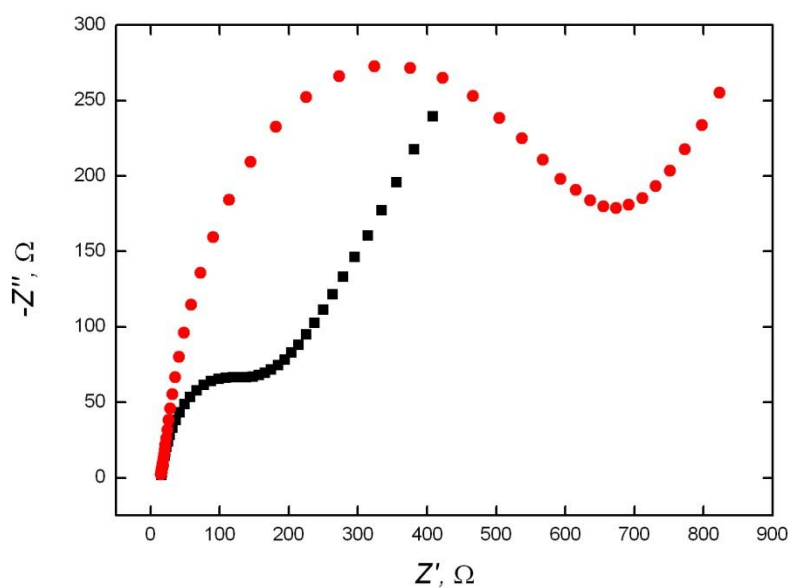
Obr. 3.3

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na MWCNT/ls-CFE (modrá křivka) a na DNA/MWCNT/ls-CFE (červená křivka). Frekvence 0,1 až 5000 Hz, amplituda 10 mV.



Obr. 3.4

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na MWCNT/ls-CFE (modrá křivka) a na DNA/MWCNT/ls-CFE (červená křivka). Frekvence 0,01 až 5000 Hz, amplituda 10 mV.



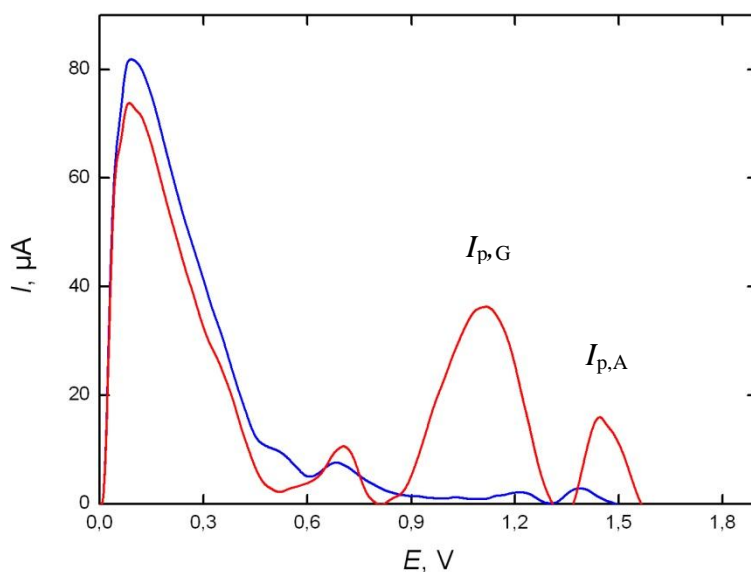
Obr. 3.5

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na aktivované ls-CFE (černá křivka) a na DNA/ls-CFE (červená křivka). Frekvence 0,1 až 5000 Hz, amplituda 10 mV.

Pro ověření, zda je na DNA/MWCNT/ls-CFE naakumulovaná vrstva DNA a jestli je tato pracovní elektroda vhodná pro detekci poškození DNA, byla využita metoda squarewave voltametrie. Měření probíhalo v 10 ml 0,1 mol/l PBS (pH=6,8) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V.

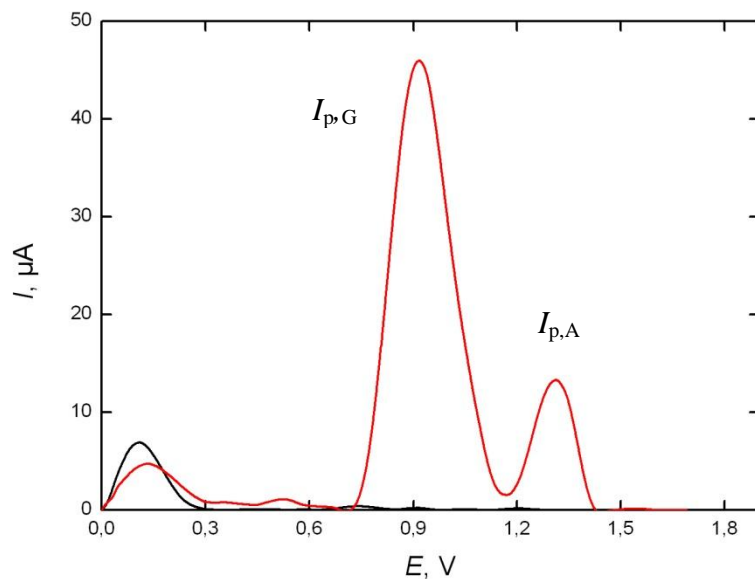
Na obr. 3.6 jsou představeny squarewave voltamogramy pro MWCNT/ls-CFE a DNA/MWCNT/ls-CFE a na obr. 3.7 jsou voltamogramy pro nemodifikovou elektrodu uhlíkovými nanotrubičkami ls-CFE a DNA/ls-CFE.

Při porovnání MWCNT/ls-CFE a ls-CFE, MWCNT měly vyšší signál pozadí v měřeném potenciálovém rozsahu. Výška guanosinového píku ($38,4 \mu\text{A}$) měřená na DNA/MWCNT/ls-CFE byla nižší než $46,9 \mu\text{A}$ měřená na ls-CFE. Pro adenosinový pík tomu bylo naopak, hodnota $19,6 \mu\text{A}$ na DNA/MWCNT/ls-CFE byla vyšší než $10,6 \mu\text{A}$ naměřené na ls-CFE. Na DNA/MWCNT/ls-CFE došlo i k posunu signálů směrem k vyšším potenciálům a tvary píků nebyly symetrické. Vhodnější pracovní elektrodou pro měření SWV se jevila nemodifikovaná ls-CFE.



Obr. 3.6

Square wave voltamogramy měřené v PBS na MWCNT/ls-CFE (modrá křivka) a na DNA/MWCNT/ls-CFE (červená křivka) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V. Voltamogramy jsou korigovány na základní linii.



Obr. 3.7

Square wave voltamogramy měřené v PBS na ls-CFE (černá křivka) a na DNA/ls-CFE (červená křivka) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V. Voltamogramy jsou korigovány na základní linii.

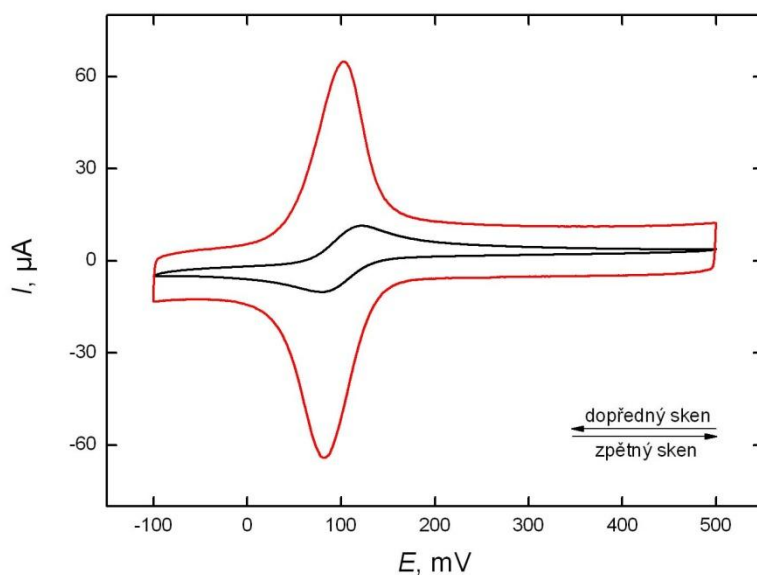
Pro modifikaci ls-CFE byly vyzkoušeny i jiné druhy uhlíkových nanotrubiček: jednotěnné uhlíkové nanotrubičky (SWCNT), karboxylované jednotěnné uhlíkové nanotrubičky (SWCNT-COOH) a směs uhlíkových nanotrubiček (fullereny, cylindrické a jednotěnné uhlíkové nanotrubičky). Byly testovány různé způsoby nanášení (ponoření, nakápnutí) i koncentrace uhlíkových nanotrubiček. Nejlepší výsledky modifikace povrchu ls-CFE přinesly MWCNT, výsledky měření byly popsány výše. Pro detekci poškození DNA oxidačním stresem byla zvolena jako pracovní elektroda ls-CFE.

Uhlíkové nanotrubičky se ukázaly jako nevhodný materiál pro náš typ biosenzoru, ale je možné je využít v analytické chemii pro stanovování elektroaktivních látek. Jako příklad využití MWCNT/ls-CFE byla změřena CV (obr. 3.8) a diferenční pulzní voltmetrie (DPV), (obr. 3.9) hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) v PBS na pracovní elektrodě MWCNT/ls-CFE a ls-CFE.

DPV byla naměřena v potenciálovém rozsahu od 0,7 V do -0,25 V s potenciálovým krokem 3 mV, modulační amplitudou 50 mV a modulačním časem 100 ms.

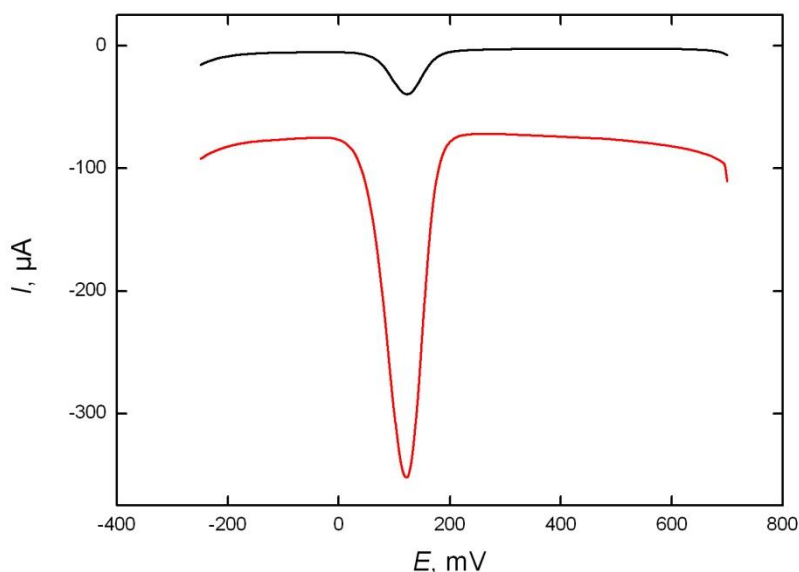
Po vyhodnocení signálů CV byly výšky píků hydrochinonu měřené na MWCNT/lis-CFE pětikrát vyšší, než výšky píků naměřené na lis-CFE. Výška anodického ($57 \mu\text{A}$) a katodické píku ($58 \mu\text{A}$) měřené na MWCNT/lis-CFE a I_A ($11,4 \mu\text{A}$), I_K ($10,8 \mu\text{A}$) na lis-CFE.

Po modifikování lis-CFE MWCNT došlo při měření metodou DPV k zesílení signálu hydrochinonu osmkrát ($-279 \mu\text{A}$) oproti použité lis-CFE ($-35,5 \mu\text{A}$).



Obr. 3.8

Cyklické voltamogramy roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na lis-CFE (černá křivka) a na MWCNT/lis-CFE (červená křivka). Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do -100 mV . Zobrazen vždy třetí sken.



Obr. 3.9

DP voltamogramy roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na ls-CFE (černá křivka) a na MWCNT/ls-CFE (červená křivka). Měřeno při potenciálovém rozsahu od 700 do -250 mV.

3.2 Oxidace hydrochinonu hydroxylovými radikály

Generování hydroxylových radikálů na BDDE galvanostatickou elektrolýzou vody bylo vyzkoušeno na oxidaci hydrochinonu. Hlavním produktem oxidace hydrochinonu je 1,4-benzochinon, který se dále oxiduje na kyselinu maleinovou, kyselinu šťavelovou a konečným produktem je CO_2 [118].

OH radikály byly generovány galvanostaticky v 10 ml roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) v 0,1 mol/l PBS (pH=6,8) na BDDE při proudové hustotě $j = 10$ a 50 mA/cm^2 po dobu 10, 20 a 30 min. Před prvním voltametrickým měřením byl roztok hydrochinonu ve voltametrické nádobce probubláván dusíkem po dobu 5 min a před každým opakovaným měřením byl znovu probubláván alespoň po dobu 30 s. Oxidace hydrochinonu byla měřena metodou CV a DPV s pracovní elektrodou ls-CFE.

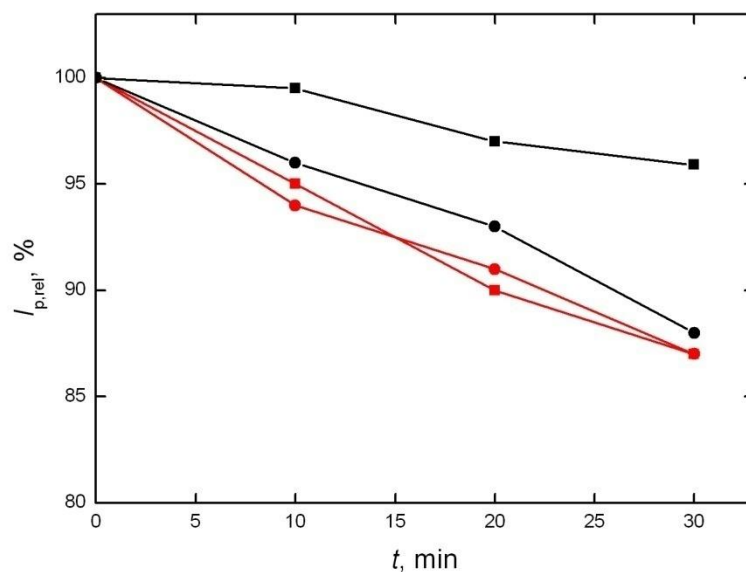
CV byla změřena v 10 ml roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$) v PBS ($c = 0,1 \text{ mol/l}$, pH=6,8) při potenciálovém rozsahu od 500 mV do -100 mV.

Diferenční pulzní voltametrie (DPV) patří mezi populární techniky, která má schopnost eliminovat nabíjecí proud a tím snížit limity detekce analytů oproti běžným

voltametrickým a polarografickým technikám. V této práci byla použita pro měření oxidace hydrochinonu OH radikály pomocí ls-CFE. Měření bylo provedeno v 10 ml roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, pH=6,8) při potenciálovém rozsahu od 0,7 V do -0,25 V.

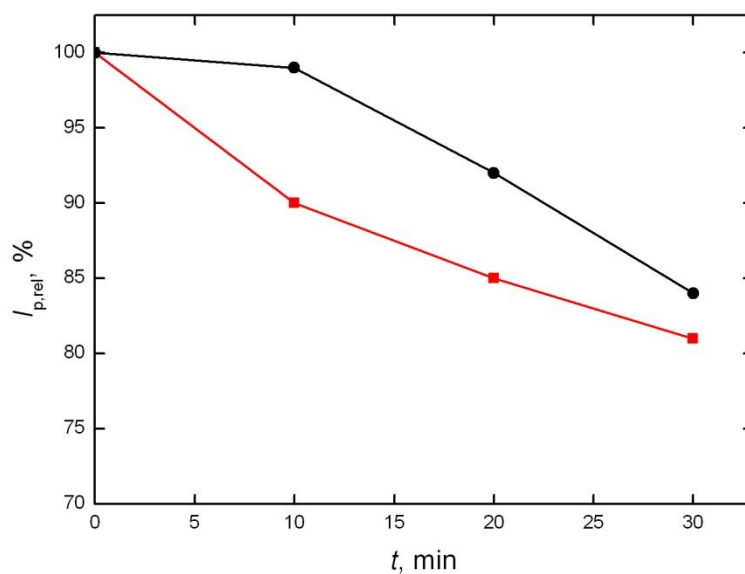
Závislost $I_{p,rel}$ na času generování OH radikálů byla měřena v roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) pomocí CV (obr. 3.10) a DPV (obr. 3.11). Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami naměřenými v roztoku hydrochinonu v čase $t = 0$ min na ls-CFE, přičemž tyto hodnoty byly brány jako 100 %.

Na obr. 3.10 a 3.11 je z klesajících křivek vidět, že s rostoucím časem dochází k oxidaci většího množství hydrochinonu. U cyklických voltamogramů při proudové hustotě 10 mA/cm² došlo po 30 min k poklesu anodického i katodického píku o 13%, při proudové hustotě 50 mA/cm² byl I_A na 96 % a I_K na 88 %. Na DP voltamogramech lze také vidět, že více OH radikálů bylo produkováno při proudové hustotě 10 mA/cm², kdy došlo po 30 min k poklesu I_p o 19% a u $j=50$ mA/cm² o 16%. U vyšší proudové hustoty 50 mA/cm² je rychlost oxidace nižší než u proudové hustoty 10 mA/cm², v důsledku zvýšení vedlejších reakcí (vývoj kyslíku) nebo rozkladem elektrolytu, což se projevuje na cyklických voltamogramech větším rozdílem mezi anodickým a katodickým píkem [119].



Obr. 3.10

Závislost $I_{p,rel}$ roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v PBS na času generování OH radikálů, měřeno na ls-CFE technikou CV. Červené křivky $j=10$ mA/cm², černé křivky $j=50$ mA/cm², čtverec - anodický pík, kruh- katodický pík.



Obr. 3.11

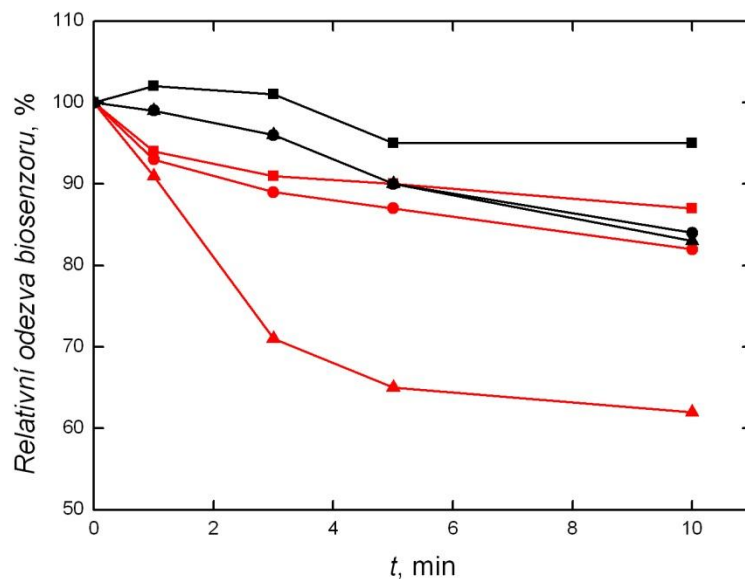
Závislost $I_{p,rel}$ roztoku hydrochinonu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l) v PBS na času generování OH radikálů, měřeno na ls-CFE technikou DPV. Červená křivka $-j=10$ mA/cm², černá křivka $-j=50$ mA/cm².

3.3 Hodnocení poškození DNA způsobeného oxidačním stresem

Pro vyšetření poškození DNA oxidačním stresem, který byl způsoben hydroxylovými radikály ($\bullet\text{OH}$) generovanými galvanostaticky z borem dopované diamantové elektrody v roztoku PBS, byly použity techniky CV, EIS a SWV.

Základní měření byla provedena v roztoku redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v 0,1 mol/l PBS (CV, EIS) a v roztoku 0,1 mol/l PBS (SWV). Biosenzor byl následně přenesen do roztoku 0,1 mol/l PBS, kde po dobu 1, 3, 5, 10, 20 a 30 min byly generovány hydroxylové radikály z BDDE. Po dokončení poškozování vrstvy DNA byl biosenzor přenesen do roztoku $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, kde byly získány záznamy CV, EIS a v roztoku PBS, kde byl získán záznam z SWV. Pro hodnocení signálů byly použity hodnoty, pro CV výška anodického I_A a katodického proudu I_K , pro EIS odpor povrchu R_{CT} redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a pro SWV signál guanosinu $I_{\text{p,G}}$. K měření byly použity pracovní elektrody ls-CFE a DNA/ls-CFE.

Na obr. 3.12 byla zjišťována vhodná proudová hustota pro poškozování DNA. Byly naměřeny cyklické voltamogramy na DNA/ls-CFE, kdy hydroxylové radikály byly produkovány při proudové hustotě 10, 30 a 50 mA/cm^2 pro časy 1, 3, 5, a 10 min. Při proudové hustotě 10 mA/cm^2 došlo po 10 min k poklesu I_K o 5 % oproti výšce katodického píku nepoškozené DNA a I_A pokles o 13 %, zvýšení proudové hustoty na 30 mA/cm^2 vedlo k dalšímu poklesu I_K na 84 % a I_A na 82 %. Největší snížení I_K (83%) a I_A (62%) bylo při proudové hustotě 50 mA/cm^2 , která byla zvolena jako nejvhodnější pro generování OH radikálů, které vedou k poškození DNA.



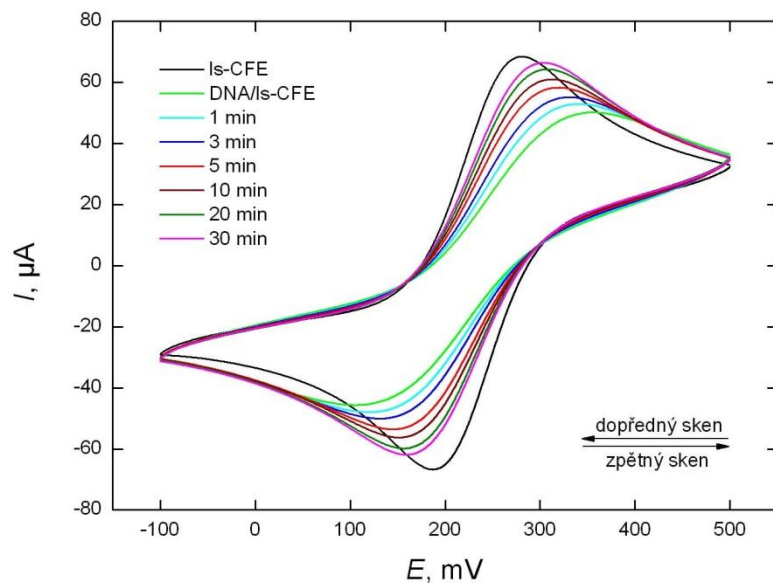
Obr. 3.12

Závislost relativní odezvy biosenzoru (vyhodnoceno ze změny I_K , I_A) na času generování OH radikálů při různých proudových hustotách. Měřeno na DNA/ls-CFE technikou CV. Černé křivky $-I_K$, červené křivky $-I_A$, čtverec $-j=10 \text{ mA/cm}^2$, kruh $-j=30 \text{ mA/cm}^2$, trojúhelník $-j=50 \text{ mA/cm}^2$.

Při zvolené proudové hustotě 50 mA/cm^2 byly naměřeny cyklické voltamogramy (obr. 3.13), Nyquistovy grafy (obr. 3.14) a SWvoltamogramy (obr. 3.15), které poskytují zhodnocení míry poškození DNA pro DNA/ls-CFE biosenzor.

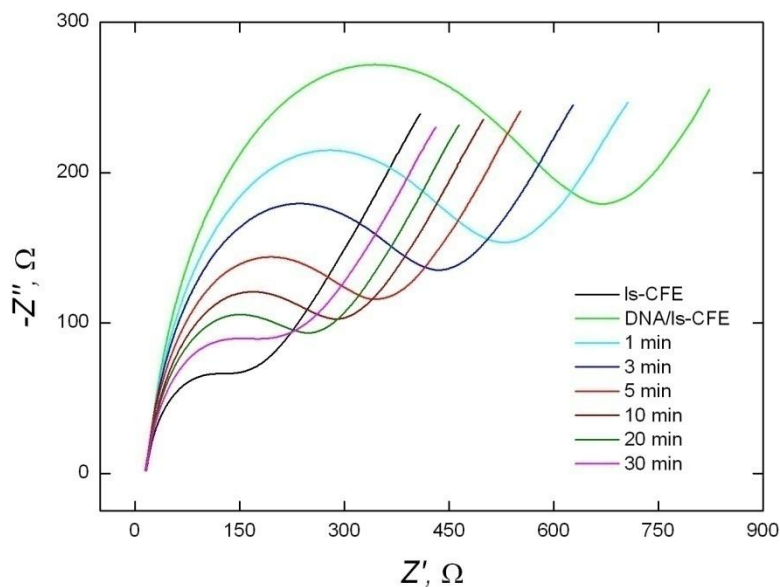
Obr. 3.13 představuje cyklické voltamogramy poškození DNA v závislosti na času inkubace biosenzoru v roztoku PBS při galvanostatickém generování OH radikálů. Signály I_K a I_A při době poškozování 1, 3, 5, 10, 20 a 30 min měly rostoucí tendenci vzhledem k signálu nepoškozené DNA naakumulované na ls-CFE. Míra poškození DNA byla závislá na době generování OH radikálů, které způsobují oxidační stres.

Obr. 3.14 zobrazuje Nyquistovy grafy, u kterých došlo k viditelnému snižování hodnot R_{CT} s rostoucím časem poškozování DNA OH radikály. Došlo k rozevření dvoušroubovice DNA a následně ke vzniku jednořetězcových zlomů, které odpadávaly z DNA/ls-CFE, což vedlo ke snižování signálu R_{CT} .



Obr. 3.13

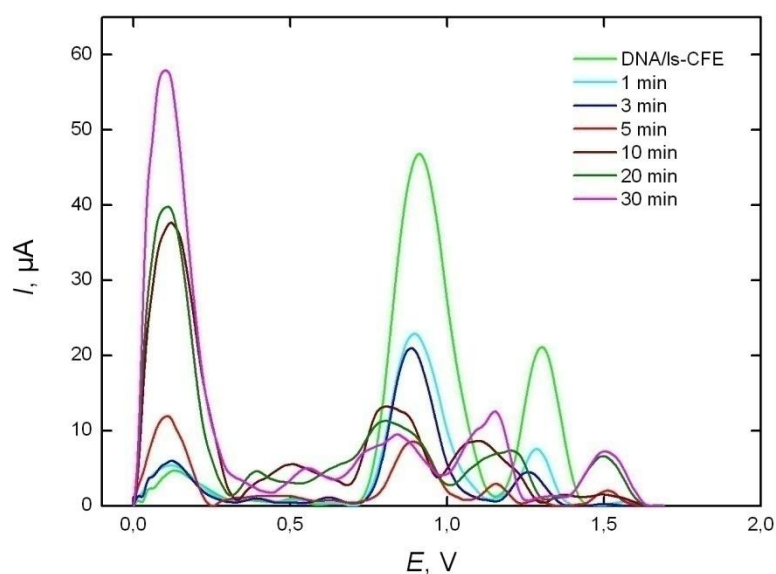
Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované Is-CFE (černá křivka) a na DNA/Is-CFE (zelená křivka). Proudová hustota použita při generování OH radikálů na BDDE byla 50 mA/cm^2 . Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do -100 mV. Zobrazen vždy třetí sken.



Obr. 3.14

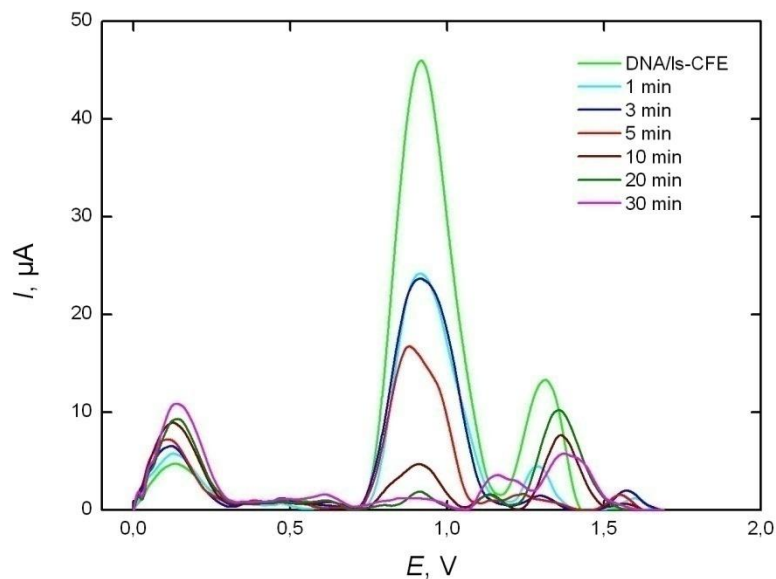
Nyquistovy grafy redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované Is-CFE (černá křivka) a na DNA/Is-CFE (zelená křivka). Frekvence 0,1 až 5000 Hz, amplituda 10 mV. Proudová hustota použita při generování OH radikálů na BDDE byla 50 mA/cm^2 .

Na obr. 3.15 jsou naměřené SW voltamogramy oxidačního poškození DNA. Na naměřených křivkách lze vidět, že při proudové hustotě 50 mA/cm^2 došlo k velice rychlému poškození DNA. V 10. min poškození již nešlo vyhodnotit $I_{p,G}$, protože došlo ke vzniku dalších oxidačních produktů, pravděpodobně 8-oxo-7,8-dihydroguanosinu a 8-oxo-7,8-dihydroadenosinu. SW voltamogramy byly proto znovu změřeny i při menší proudové hustotě (10 mA/cm^2). Na obr. 3.16 došlo ke zpomalení oxidace DNA a bylo možno pozorovat postupné klesání $I_{p,G}$, teprve ve 30. min došlo ke vzniku dalších oxidačních produktů.



Obr. 3.15

SW voltamogramy měřené v PBS na DNA/ls-CFE (zelená křivka) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V. Proudová hustota použita při generování OH radikálů na BDDE byla 50 mA/cm^2 . Voltamogramy jsou korigovány na základní linii.

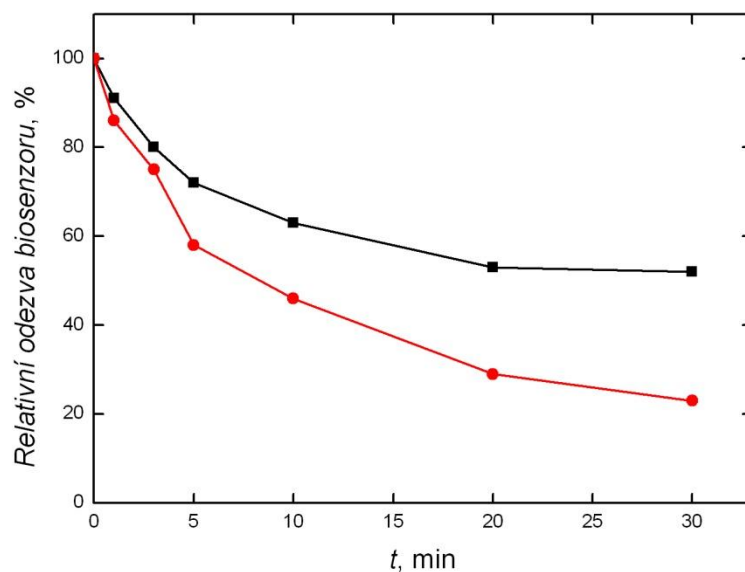


Obr. 3.16

SW voltamogramy měřené v PBS na DNA/ls-CFE (zelená křivka) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V. Proudová hustota použita při generování OH radikálů na BDDE byla 10 mA/cm^2 . Voltamogramy jsou korigovány na základní linii.

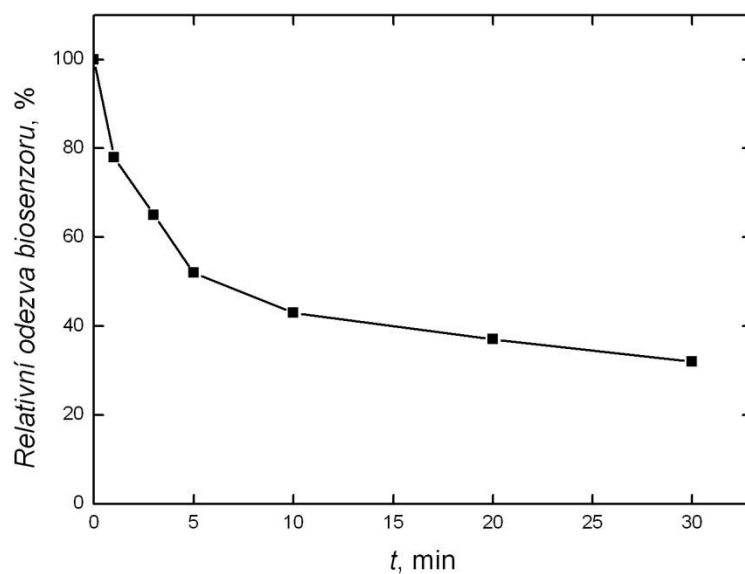
Na obr. 3.17 jsou zjednodušené křivky zobrazující průběh míry poškození DNA oxidačním stresem na DNA/ls-CFE (obr 3.13) pomocí I_K , I_A naměřené CV. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami naměřenými na biosenzoru s nepoškozenou DNA v čase 0 min, tyto hodnoty byly brány jako 100%. U křivek lze pozorovat, že s rostoucím časem poklesly I_K i I_A , po 10 min došlo k poklesu katodického píku o 54 % a anodického píku o 47 %. Po dalších 10 min byl I_K na 29 % a I_A na 53 % nepoškozené DNA. Ve 30. min už docházelo k menšímu poklesu I_K (23%) a I_A (52%) oproti výšce píků ve 20. min.

Relativní odezva DNA biosenzoru získaná pomocí R_{CT} z měření EIS je zobrazena na obr. 3.18. Po 30 min inkubace DNA/ls-CFE v PBS při generování hydroxylových radikálů zůstalo zachováno 32 % nepoškozené DNA.



Obr. 3.17

Závislost relativní odezvy biosenzoru (vyhodnoceno ze změny I_K , I_A) na času generování OH radikálů při proudové hustotě $50\text{mA}/\text{cm}^2$. Měřeno na DNA/Is-CFE technikou CV. Černá křivka - I_K , červená křivky $-I_A$.

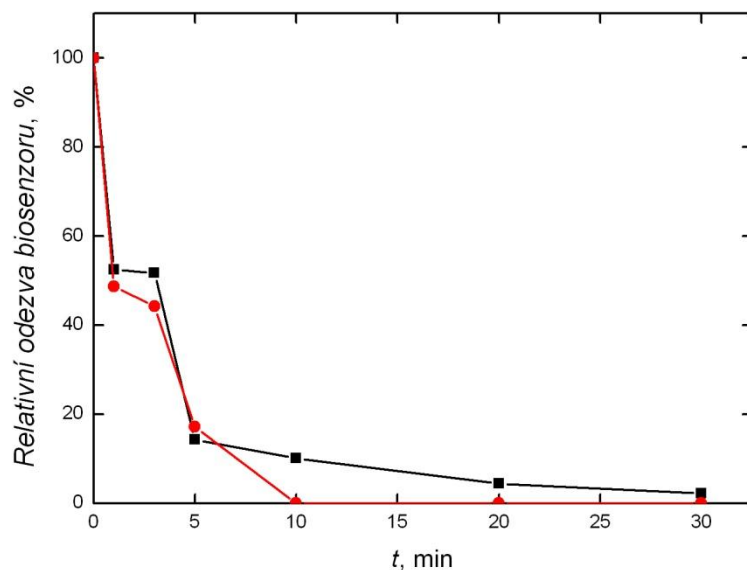


Obr. 3.18

Závislost relativní odezvy biosenzoru (vyhodnoceno R_{CT}) na času generování OH radikálů při proudové hustotě $50\text{mA}/\text{cm}^2$. Měřeno na DNA/Is-CFE technikou EIS.

Další zpracovaný záznam poškození DNA měřený technikou SWV na DNA/Is-CFE je uveden na obr 3.19. Graf obsahuje procentuální vyhodnocení poklesu $I_{p,G}$ pro poškození DNA porovnané se signály nepoškozené vrstvy DNA biosenzoru. Z poklesu křivek u proudové hustoty 50 i 10 mA/cm² lze vidět, že po 3. min poškození DNA OH radikály došlo k mírnějšímu poklesu $I_{p,G}$ oproti dalším naměřeným hodnotám. Z průběhu naměřených dat můžeme usuzovat, že došlo nejdříve k oxidaci bází, které jsou přístupné OH radikálům v 1. min, a poté ve 3. min se rozvinula dvoušroubovice DNA, což zpřístupnilo pro elektrochemickou oxidaci nové množství dříve elektrochemicky intaktních bází. Hydroxylové radikály mohly snadněji oxidovat dostupnější báze, a tím došlo v dalších minutách větší míře poškození a k prudšímu poklesu $I_{p,G}$. Tohoto jevu si lze všimnout i na obr. 3.17 a 3.18, kde ve 3. min také došlo ke zmírnění poklesu křivek, ale není to tak viditelné jako při naměření dat technikou SWV.

V čase 10 min při proudové hustotě 10 mA/cm² pokles $I_{p,G}$ o 90 % oproti hodnotě $I_{p,G}$ bez poškození DNA. Při dalším poškození DNA klesl signál guanosinu téměř na nulu, u proudové hustoty 50 mA/cm² byla oxidace bází DNA ještě rychlejší.



Obr. 3.19

Závislost relativní odezvy biosenzoru (vyhodnoceno $I_{p,G}$) na času generování OH radikálů při proudové hustotě 50 mA/cm² (červená křivka) a při 10 mA/cm² (černá křivka). Měřeno na DNA/Is-CFE technikou SWV.

Přehled vyhodnocených signálů z měření poškození DNA, po působení OH radikálů na DNA/ls-CFE, pomocí různých elektrochemických technik je uveden v tabulce 3.2. Proudová hustota pro generování hydroxylových radikálů byla 50 mA/cm² pro metody CV, EIS a SWV, pro kterou bylo změřeno i poškození při proudové hustotě 10 mA/cm².

Porovnáním hodnot ze tří různých elektrochemických technik byl získán obraz o postupném poškozování vrstvy DNA vlivem působení hydroxylových radikálů, které způsobují oxidační stres.

Tab.3.2

Vyhodnocení poškození DNA způsobeného oxidačním stresem.

Čas poškození, min	Podíl nepoškozené DNA, %				
	ΔI_K	ΔI_A	ΔR_{CT}	$\Delta I_{p,G}$	$\Delta I_{p,G}^*$
0	100	100	100	100	100
1	86	91	78	49	52
3	75	80	65	44	51
5	58	72	52	17	14
10	46	63	43	0	10
20	29	53	37	0	4
30	23	52	32	0	2

* proudová hustota 10 mA/cm²

4 Závěr

V předložené diplomové práci byla provedena optimalizace přípravy a charakterizace elektrochemického DNA biosenzoru modifikovaného uhlíkovými nanotrubičkami.

Biosenzor byl založen na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE), která byla modifikována vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT), a nízkomolekulární DNA z lososích spermií imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu. Uhlíkový film byl složen ze směsi 0,09 g mikrokrytalického grafitu CR 2a 0,01 g polystyrenu v 0,5 ml 1,2-dichlorethanu. Modifikace MWCNT proběhla nanosením 5 μ l směsi o koncentraci 5 mg/ml na ls-CFE. Velkoplošná uhlíková elektroda modifikovaná vícečetnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT/ls-CFE) byla použita pro přípravu zmíněného DNA biosenzoru (DNA/MWCNT/ls-CFE). Pomocí cyklické voltametrie (CV), elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a square wave voltametrie (SWV) byla testována vhodnost modifikace elektrody uhlíkovými nanotrubičkami. Uhlíkové nanotrubičky se ukázaly jako nevhodný materiál pro náš typ biosenzoru, ale uplatnění MWCNT/ls-CFE je možné v analytické chemii pro stanovování elektroaktivních látek.

Oxidační poškození DNA způsobují reaktivní radikály kyslíku, které mohou způsobit změny ve struktuře DNA, což způsobuje řadu onemocnění. Pro detekci poškození DNA oxidačním stresem (vytvořen pomocí galvanostaticky generovaných hydroxylových radikálů na borem dopované diamantové elektrodě) byl použit nemodifikovaný DNA biosenzor (DNA/ls-CFE). Velikost poškození byla měřena pomocí CV a EIS s použitím redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ v PBS a bez redoxního indikátoru pomocí SWV. Získané výsledky potvrdily, že interakce DNA s hydroxylovými radikály způsobuje poškození DNA. Dochází k oxidaci bází DNA, vznikají jednořetězcové zlomy, které odpadávají z povrchu elektrody.

V práci představený DNA biosenzor tedy představuje levný a jednoduchý způsob, jak detekovat poškození DNA oxidačním stresem způsobeným hydroxylovými radikály.

5 Literatura

- [1] Cunningham R.P.: DNA repair: Caretakers of the genome?, *Current Biology*, 7, R576-R579 (1997).
- [2] Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford (2007).
- [3] Breen A.P., Murphy J.A.: Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 18, 1033-1077 (1995).
- [4] Kuchino Y., Mori F., Kasai H., Inoue H., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E., Nishimura S.: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues, *Nature*, 327, 77-79 (1987).
- [5] Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, 349, 431-434 (1991).
- [6] Struthers L., Patel R., Clark J., Thomas S.: Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues, *Analytical Biochemistry*, 255, 20-31 (1998).
- [7] Ames B.N.: Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer, *Free Radical Research Communications*, 7, 121-128 (1989).
- [8] Collins A., Cadet J., Epe B., Gedik C.: Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop „DNA Oxidation“ held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997, *Carcinogenesis*, 18, 1833-1836 (1997).

- [9] Park E.-M., Shigenaga M.K., Degan P., Korn T.S., Kitzler J.W., Wehr C.M., Kolachana P., Ames B.N.: Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 3375-3379 (1992).
- [10] Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K., Walter P.B., Woodall A.A., Yeo H.C., Ames B.N.: DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 288-293 (1998).
- [11] Storz G., Imlay J.A.: Oxidative stress, *Current Opinion in Microbiology*, 2, 188-194 (1999).
- [12] Dröge W.: Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological Reviews*, 82, 47-95 (2002).
- [13] Sies H.: Oxidative stress: Oxidants and antioxidants, *Experimental Physiology*, 82, 291-295 (1997).
- [14] LeDoux S.P., Driggers W.J., Hollensworth B.S., Wilson G.L.: Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA, *Mutation Research*, 434, 149-159 (1999).
- [15] Beckman K.B., Ames B.N.: Oxidative decay of DNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 19633-19636 (1997).
- [16] Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.P., Ravanat J.L., Sauvaigo S.: Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mutation Research*, 424, 9-21 (1999).

- [17] Murata-Kamyia N., Kamiya H., Muraoka M., Kaji H., Kasai H.: Comparison of oxidation products from DNA components by irradiation and Fenton-type reactions, *Journal of Radiation Research*, 38, 121-131 (1997).
- [18] Schärer O.D.: Chemistry and biology of DNA repair, *Angewandte Chemie*, 42, 2946-2974 (2003).
- [19] Burrows C.J., Muller J.G.: Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chemical Reviews*, 98, 1109-1152 (1998).
- [20] Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J.L.: Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 131, 1-87 (1997).
- [21] Nilsen H., Krokan H.E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance, *Carcinogenesis*, 22, 987-998 (2001).
- [22] Ďuračková Z., Knasmüller S.: *The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy*, Slovak Academic Press, Bratislava (2007).
- [23] Wang D., Kretzner D.A., Essigmann J.M.: Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: Insights from studies using defined lesions, *Mutation Research*, 400, 99-115 (1998).
- [24] Hirano T.: Alcohol consumption and oxidative DNA damage, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8, 2895-2906 (2011).
- [25] Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L.: Radiation-induced damage to cellular DNA: Measurement and biological role, *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 293-299 (2005).

- [26] Leonard S.S., Harris G.K., Shi X.: Metal-induced oxidative stress and signal transduction, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 37, 1921-1942 (2004).
- [27] Musilová J., Barek J., Pecková K.: Použití diamantových filmových elektrod dopovaných borem pro stanovení organických látek, *Chemické Listy*, 103, 469-478 (2009).
- [28] Comninellis C., Pulgarin C.: Anodic oxidation of phenol for waste water treatment, *Journal of Applied Electrochemistry*, 21, 703-708 (1991).
- [29] Kariyajjanavar P., Narayana J. Nayaka Y.A., Umanaik M.: Electrochemical degradation and cyclic voltammetric studies of textilereactive azo dye Cibacron Navy WB, *Portugaliae Electrochimica Acta*, 28, 265-277 (2010).
- [30] Canizares P., Gadri A., Lobato J., Nasr B., Paz R., Rodrigo M.A., Saez C.: Electrochemical oxidation of azoic dyes with conductive-diamond anodes, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45, 3468-3473 (2006).
- [31] Martinez-Huitle C.A., Brillas E.: Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods. A general review, *Applied Catalysis B: Environmental*, 87, 105-145 (2009).
- [32] Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A.M.: In situ DNA oxidative damage by electrochemically generated hydroxyl free radicals on a boron-doped diamond electrode, *Langmuir*, 28, 4896-4901 (2012).
- [33] Brett C.M.A., Brett M.O.: *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press, Oxford (1994).
- [34] Navrátil T., Barek J.: Analytical applications of composite solid electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 131-147 (2009).

- [35] Feng M., Han H., Zhang J., Tachikawa H.: Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, v knize *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications* (ed.: Zhang X., Ju H., Wang J.), Elsevier, London (2008).
- [36] Marazza G., Lucarelli F., Mascini M.: Carbon electrodes in DNA hybridisation research, v knize *Electrochemistry of Nucleic Acids And Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (ed.: Paleček E., Scheller F., Wang J.), Elsevier, Amsterdam (2005).
- [37] Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage, *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 621-628 (1998).
- [38] Wang J.: *Analytical Electrochemistry*, 2. vydání, John Wiley, Hoboken (2001).
- [39] Zhao H.X., Liu A.P., Qiu X., Shen G.X.: Oxidation behavior of glucose on platinized diamond-like carbon film electrode, *Journal of Inorganic Materials*, 25, 1325-1329 (2010).
- [40] Wang Z.H., Li Z.G., Zhou S.P.: Voltammetric behavior of embedded super-thin carbon film electrode and its application, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 33, 523-526 (2005).
- [41] Barek J., Yosypchuk B.: Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 189-203 (2009).
- [42] Kinoshita K.: *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, John Wiley and Sons, New York (1988).

- [43] McCreery R.L.: Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics, *Electroanalytical Chemistry*, 17, 221-374 (1991).
- [44] Leon Y., Leon C.A., Radovic L.R.: Interfacial chemistry and electrochemistry of carbon surfaces, *Chemistry and Physics of Carbon*, 24, 213-310 (1994).
- [45] Jirimali H.D., Nagarale R.K., Saravanakumar D., Lee J.M., Shin W.: Hydroquinone modified chitosan/carbon film electrode for the selective detection of ascorbic acid, *Carbohydrate Polymers*, 92, 641-644 (2013).
- [46] You T.Y., Niwa O., Chen Z.L., Hayashi K., Tomita M., Hirono S.: An amperometric detector formed of highly dispersed Ni nanoparticles embedded in a graphite-like carbon film electrode for sugar determination, *Analytical Chemistry*, 75, 5191-5196 (2003).
- [47] You T.Y., Niwa O., Tomita M., Hirono S.: Characterization of platinum nanoparticle-embedded carbon film electrode and its detection of hydrogen peroxide, *Analytical Chemistry*, 75, 2080-2085 (2003).
- [48] Anjo D.M., Brown S., Wang L.: Performance evaluation of an easily prepared optically transparent carbon-film electrode, *Analytical Chemistry*, 65, 317-319 (1993).
- [49] Dai L.M., Soundarajan P., Kim T.: Sensors and sensor arrays based on conjugated polymers and carbon nanotubes, *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1753-1772 (2002).
- [50] Iijima S.: Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354, 56-58 (1991).
- [51] Iijima S., Ichihashi T.: Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter, *Nature*, 363, 603 - 605 (1993).

- [52] <http://fractalmind.tumblr.com/page/10>, staženo 8.7.2015.
- [53] Aqel A., Ammar R.A.A., Al-Warthan A., El-Nour K. M. M.: Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation, *Arabian Journal of Chemistry*, 5, 1-23 (2012).
- [54] Sáez de Ibarra Y., Gaitero J.J., Erkizia E., Campillo I.: Atomic force microscopy and nanoindentation of cement pastes with nanotube dispersions, *Physica Status Solidi*, 203, 1076-1081 (2006).
- [55] Liu Ch, Cheng H.M.: Carbon nanotubes: Controlled growth, *Materials Today*, 16, 1-10 (2013).
- [56] Ebbesen T.W.: Carbon nanotubes, *Physics Today*, 49, 26- 35 (1996).
- [57] Lin T., Bajpai V., Dai L.: Chemistry of carbon nanotubes, *Australian Journal of Chemistry*, 56, 635-651 (2003).
- [58] Wong S.S., Joselevich E., Woolley A.T., Cheung Ch.L., Lieber Ch.M.: Covalently functionalized nanotubes as nanometre-sized probes in chemistry and biology, *Nature*, 394, 52-55 (1998).
- [59] Dai L., He P., Li S.: Functionalized surfaces based on polymers and carbon nanotubes for nanotechnological applications, *Nanotechnology*, 14, 1081-1097 (2003).
- [60] Liu Z., Shen Z., Zhu T., Hou S., Ying L., Shi Z., Gu Z.: Organizing single-walled carbon naotubes on gold using a wet chemical self-assembling technique, *Langmuir*, 16, 3569-3573 (2000).
- [61] Gooding J.J.: Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: Areview on electrochemistry and applications for sensing, *Electrochimica Acta*, 50, 3049-3060, (2005).

- [62] Batchelor-McAuley C., Wildgoose G.G., Compton R.G.: The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 3183-3190 (2009).
- [63] Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J.: Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease, *The FASEB Journal*, 17, 1195-1214 (2003).
- [64] Barzilai A., Yamamoto K.I.: DNA damage responses to oxidative stress, *DNA Repair*, 3, 1109-1115 (2004).
- [65] Friedberg E.C.: DNA damage and repair, *Nature*, 421, 436-440 (2003).
- [66] Paleček E., Fojta M.: Detecting DNA hybridization and damage, *Analytical Chemistry*, 73, 74A-83A (2001).
- [67] Fojta M.: Electrochemical sensors for DNA interactions and damage, *Electroanalysis*, 14, 1449-1463 (2002).
- [68] Erdem A.: Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74, 318-325 (2007).
- [69] Paleček E., Bartošík M.: Electrochemistry of nucleic acids, *Chemical Reviews*, 112, 3427-3481 (2012).
- [70] Fojta M.: Detecting DNA Damage with Electrodes, v knize *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins - Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (ed.: Paleček E., Scheller F., Wang J.), Elsevier, Amsterdam, 385-431(2005).

- [71] Morris I.D., Ilott S., Dixon L., Brison D.R.: The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development, *Human Reproduction*, 17, 990-998 (2002).
- [72] Lee R.F., Steinert S.: Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals, *Mutation Research*, 544, 43-64 (2003).
- [73] Gao X., Stassinopoulos A., Gu J., Goldberg I.H.: NMR studies of the post-activated neocarzinostatin chromophore-DNA complex. Conformation changes induced in drug and DNA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 3, 795-809 (1995).
- [74] Sandström K., Wärmländer S., Leijon M., Gräslund A.: ¹H NMR studies of selective interaction of norfloxacin with double-stranded DNA, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304, 55-59 (2003).
- [75] Shen H., Shao X., Xu H., Li J., Pan S.: In vitro study of DNA interaction with trichlorobenzenes by spectroscopic and voltammetric techniques, *International Journal of Electrochemical Science*, 6, 532-547 (2011).
- [76] Wang Y.X., Ni Y.N., Kokot S.: Investigation of interaction of carbofuran and DNA by voltammetry and fluorescence with the aid of chemometrics, *Chinese Chemical Letters*, 21, 963-967 (2010).
- [77] Wang Q., Gao F., Yue X., Li W., Liu A., Jiao K.: Electrochemical studies on the binding of a carcinogenic anthraquinone dye, Purpurin (C.I. 58 205) with DNA, *Dyes and Pigments*, 84, 213-217 (2010).

- [78] Hajian R., Ekhlesi E., Daneshvar R.: Spectroscopic and electrochemical studies on the interaction of epirubicin with fish sperm DNA, *E-Journal of Chemistry*, 9, 1587-1598 (2012).
- [79] Hajian R., Takavol M.: Interaction of anticancer drug methotrexate with ds-DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods, *E-Journal of Chemistry*, 9, 471-480 (2012).
- [80] Radi A.E., Wahdan T., Anwar Z., Mostafa H.: Electrochemical and spectroscopic studies on the interaction of gatifloxacin, moxifloxacin and sparfloxacin with DNA and their analytical application, *Electroanalysis*, 22, 2665-2671 (2010).
- [81] Paleček E.: Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, *Nature*, 188, 656- 657 (1960).
- [82] Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A.M.: Boron doped diamond electrode pre-treatments effect on the electrochemical oxidation of dsDNA, DNA bases, nucleotides, homopolynucleotides and biomarker 8-oxoguanine, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 648, 60-66 (2010).
- [83] De-los Santos-Álvarez P., Lobo-Castanón M. J., Miranda- Ordieres A.J., Tunón-Blanco P.: Voltammetric determination of underivatized oligonucleotides on graphite electrodes based on their oxidation products, *Analytical Chemistry*, 74, 3342-3347 (2002).
- [84] Brett C.M.A., Oliveira Brett A.M., Serrano S.H.P.: On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 366, 225-231 (1994).

- [85] Labuda J., Oliveira-Brett A.M., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 82, 1161-1187 (2010).
- [86] Diculescu V.C., Paquim A.M.C., Oliveira-Brett A.M.: Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage, *Sensors*, 5, 377-393 (2005).
- [87] Wang J., Cai X.H., Jonsson C., Balakrishnan M.: Adsorptive stripping potentiometry of DNA at electrochemically pretreated carbon paste electrodes, *Electroanalysis*, 8, 20-24 (1996).
- [88] Wang J., Cai X.H., Rivas G., Shiraishi H., Dontha N.: Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips, *Biosensors and Bioelectronics*, 12, 587-599 (1997).
- [89] Skládal P.: *Biosenzory*, Masarykova univerzita v Brně, Brno, 3-12 (2002).
- [90] Wang J.: Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review, *Electroanalysis*, 17, 7-14 (2005).
- [91] Wang J.: Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions. *Small*, 1, 1036-1043 (2005).
- [92] Trojanowicz M.: Analytical applications of carbon nanotubes: A review, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 480-489 (2006).
- [93] Balasubramanian K., Burghard M.: Biosensors based on carbon nanotubes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 452-468 (2006).

- [94] Kim S.N., Rusling J.F., Papadimitrakopoulos F.: Carbon nanotubes for electronic and electrochemical detection of biomolecules, *Advanced Materials*, 19, 3214-3228 (2007).
- [95] Guo S.J., Wang E.K.: Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles, *Analytica Chimica Acta*, 598, 181-192 (2007).
- [96] Pumera M., Sánchez S., Ichinose I., Tang J.: Electrochemical nanobiosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123, 1195-1205 (2007).
- [97] Shao Y.Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I.A., Lin Y.H.: Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review, *Electroanalysis*, 22, 1027-1036 (2010).
- [98] Kuila T., Bose S., Khanra P., Mishra A.K., Kim N.H., Lee J.H.: Recent advances in graphene-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4637-4648 (2011).
- [99] Pumera M.: Graphene in biosensing, *Materials Today*, 14, 308-315 (2011).
- [100] Galandová J., Ziyatdinová G., Labuda J.: Disposable electrochemical biosensor with multiwalled carbon nanotubes-chitosancomposite layer for the detection of deep DNA damage, *Analytical Sciences*, 24, 711-716 (2008).
- [101] Hlavatá L., Beniková K., Vyskočil 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).
- [102] Kissinger P.T., Heineman W.R.: Cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education*, 60, 702-706 (1983).

- [103] Kounaves S.P.: Voltammetric techniques, v knize *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, 709-726 (1997).
- [104] Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E.: Electrochemical biosensors- Sensors principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400-1458 (2008).
- [105] Ting B.P., Zhang J., Gao Z., Ying J.Y.: A DNA biosensor based on detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 282-287 (2009).
- [106] Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E.: Electrochemical biosensors- Sensors principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400-1458 (2008).
- [107] Ferancová A., Beníková K., Galandová J., Siroťová L., Labuda J.: Tests of lipid peroxidation products using the DNA based electrochemical biosensor, *Acta Chimica Slovenica*, 1, 58-71 (2008).
- [108] Labuda J., Bubnicová K., Kovalová L., Vaníčkova M., Mattusch J., Wennrich R.: Voltammetric detection of damage to DNA by arsenic compounds at a DNA biosensor, *Sensors*, 5, 411-423 (2005).
- [109] Tatarkovič M., Broncová G., Kronďák M.: Elektroimpedanční spektroskopie a její využití v chemické analýze, *Chemické Listy*, 106, 1067-1074 (2012).
- [110] Park J., Park S.: DNA hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool, *Sensors*, 9, 9513-9532 (2009).
- [111] Park J., Park S.: DNA hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool, *Sensors*, 9, 9513-9532 (2009).
- [112] Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E.: Electrochemical biosensors- Sensor principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400-1458 (2008).

- [113] Kounaves, S.P.: Voltammetric techniques, v knize *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, 709-726 (1997).
- [114] Kalvoda R., Kůta J.: Moderní polarografické a voltametrické metody, *Chemické Listy*, 74, 674-693 (1980).
- [115] Mirceski V., Gulaboski R., Lovric M., Bogeski I., Kappl R., Hoth M.: Square-wave voltammetry: A review on the recent progress, *Electroanalysis*, 25, 2411-2422 (2013).
- [116] <http://www.metrohm.com/products-overview/%7B95F79A61-1D01-48DB-A513-31916AE2C78B%7D?fromElectrodeFinder=true>, staženo 1.8.2015.
- [117] Barek J., Fischer J., Navrátil T., Pecková K., Yosypchuk B., Zima J.: Nontraditional electrode materials in environmental analysis of biologically active organic compounds, *Electroanalysis*, 19, 2003-2014 (2007).
- [118] Trabelsi H., Bensalah N., Gadri, A.: Anodic oxidation of aqueous wastes containing hydroquinone on BDD electrode, *Journal of Advanced Oxidation Technologies*, 18, 155-160 (2015).
- [119] Sires I., Brillas E., Cerisola G., Panizza M.: Comparative depollution of mecoprop aqueous solutions by electrochemical incineration using BDD and PbO₂ as high oxidation power anodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 613, 151-159 (2008).