

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Zuzana Jurečková

Nový elektrochemický biosenzor pro detekci poškození DNA  
založený na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě

Novel Electrochemical Biosensor for the Detection of DNA Damage Based  
on a Large-Surface Carbon Film Electrode

Bakalářská práce

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

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v rámci Univerzitního výzkumného centra UNCE 204018/304018/2012 v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857. Poděkování za její finanční podporu patří Grantové agentuře České republiky (projekt GP13-23337P).

## **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 25. května 2013

## Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na vývoj a využití jednoduchého a levného elektrochemického DNA biosenzoru pro detekci poškození DNA způsobeného chemickými karcinogeny. K jeho přípravě byla použita velkoplošná uhlíková filmová elektroda (ls-CFE), jejíž hlavní výhody jsou rychlá příprava, jednoduchá mechanická obnova elektrodového povrchu, dobrá reprodukovatelnost měření, absence problémů spojených s „historií elektrody“ a jednoduchá chemická modifikace.

První část práce je věnována výzkumu složení suspenze uhlíkového inkoustu, které bylo optimalizováno a testováno pomocí redoxního systému  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  užitím cyklické voltametrie (CV), dále pak optimalizaci přípravy DNA biosenzoru (DNA/ls-CFE) a jeho charakterizaci, která byla provedena za použití dvou elektrochemických technik – CV a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS).

Druhá část práce se zabývá aplikací nově připraveného DNA biosenzoru při detekci poškození DNA modelovými chemickými karcinogeny. Přímá interakce DNA s fluorenem a 2-aminofluorenem (2-AF) byla zkoumána za použití CV a EIS na DNA/ls-CFE. Získané výsledky potvrdily, že interakce DNA s fluorenem a 2-AF způsobuje poškození DNA, což vede ke vzniku zlomu vláken, která odpadávají z povrchu elektrody. Tím byla také ověřena aplikovatelnost tohoto nového elektrochemického DNA biosenzoru.

## Abstract

Presented Bachelor Thesis is focused on the development and utilization of a simple and inexpensive electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA damage caused by chemical carcinogens. A large-surface carbon film electrode (ls-CFE), 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”, and simple chemical modification, was used for its preparation.

The initial part of the work is devoted to the investigation of the composition of a carbon ink suspension, which was optimized and tested using a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  redox system by cyclic voltammetry (CV), further to the optimization of the DNA biosensor (DNA/ls-CFE) preparation and to its characterization, which was performed using two electrochemical techniques – CV and electrochemical impedance spectroscopy (EIS).

The second part of this Thesis deals with the application of the newly prepared DNA biosensor for the detection of DNA damage by model chemical carcinogens. The direct interaction of DNA with fluorene and 2-aminofluorene (2-AF) was investigated using CV and EIS at the DNA/ls-CFE. The obtained results confirmed that the interaction of DNA with fluorene and 2-AF causes DNA damage, leading to the formation of strand breaks, which falls off from the electrode surface. Thus, the applicability of this novel electrochemical DNA biosensor was verified, too.

## **Klíčová slova**

Velkoplošná uhlíková filmová elektroda  
Nový elektrochemický DNA biosenzor  
Cyklická voltametrie  
Elektrochemická impedanční spektroskopie  
Detekce poškození DNA  
Chemické karcinogeny  
Fluoren  
2-Aminofluoren

---

## **Key Words**

Large-Surface Carbon Film Electrode  
Novel Electrochemical DNA Biosensor  
Cyclic Voltammetry  
Electrochemical Impedance Spectroscopy  
DNA Damage Detection  
Chemical Carcinogens  
Fluorene  
2-Aminofluorene

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé práci.

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

## Seznam použitých zkratek

2-AF	2-aminofluoren
2-NF	2-nitrofluoren
$c$	molární koncentrace (mol/l)
$c_m$	hmotnostní koncentrace (g/l)
CR2	mikrokrytalický grafit CR2
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná DNA
$E$	elektrický potenciál (V)
$E_A$	oxidační potenciál (V)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
$E_K$	redukční potenciál (V)
$Fe^{II}/Fe^{III}$	redoxní systém $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$
GC	skelný uhlík
$I$	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)
ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda
$n$	počet měření
$n_i$	pořadové číslo měření
NPAHy	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAHy	polyaromatické uhlovodíky
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
$R_{CT}$	odpor přenosu náboje ( $\Omega$ )
$t$	čas (s)
$v$	rychlost polarizace (mV/s)

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
1.1	Cíl práce .....	9
1.2	Uhlíkové elektrody .....	9
1.2.1	DNA biosenzory .....	10
1.2.2	Oxidační a redukční signály DNA.....	11
1.3	Elektrochemické techniky .....	12
1.3.1	Cyklická voltametrie (CV) .....	12
1.3.2	Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS).....	13
1.4	Fluoren.....	14
1.4.1	Metabolismus .....	14
1.5	2-Aminofluoren .....	15
1.5.1	Metabolismus .....	16
<b>2</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>17</b>
2.1	Přístroje a zařízení .....	17
2.2	Chemikálie a roztoky.....	17
2.3	Pracovní postupy .....	18
2.3.1	Příprava velkoplošné uhlíkové filmové elektrody.....	18
2.3.2	Příprava DNA biosenzoru .....	20
2.3.3	Elektrochemická měření .....	20
2.3.4	Vyhodnocování výsledků .....	21
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>23</b>
3.1	Elektrochemická charakterizace a optimalizace přípravy velkoplošné uhlíkové filmové elektrody .....	23
3.2	Detekce poškození DNA chemickými karcinogeny .....	36
<b>4</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>44</b>



# 1 Úvod

## 1.1 Cíl práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo optimalizovat přípravu a provést následnou charakterizaci nového elektrochemického DNA biosenzoru založeného na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (1s-CFE) a nízkomolekulární DNA (izolované z lososích spermií a imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu) s použitím technik cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS).

Aplikačním cílem práce bylo ověřit použitelnost takto připraveného DNA biosenzoru při detekci poškození DNA, která byla způsobena modelovými chemickými karcinogeny – fluorenem a 2-aminofluorenem.

## 1.2 Uhlíkové elektrody

Hlavním faktorem ovlivňujícím analytické parametry voltametrického stanovení a elektrické vodivosti je druh materiálu, ze kterého je elektroda vyrobena. Uhlíkové elektrody jsou oceňovány pro svoji nízkou cenu, nízký šum, široké potenciálové okno, zanedbatelné množství odpadu a především pro svoji odolnost vůči pasivaci, což je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem, protože elektrochemické zanášení elektrodového povrchu představuje překážku prakticky při všech elektrochemických analýzách. Ke zlepšení opakovatelnosti stanovení může přispět chemická regenerace aplikovaná před každým měřením.

Složené pevné elektrody (tzv. kompozitní elektrody) na bázi uhlíku se úspěšně používají v oblasti anodické oxidace i katodické redukce. Skládají se alespoň z jedné vodivé a izolující části (teflon, polyethylen, polystyren, parafín). Vodičem v těchto pevných kompozitních elektrodách je uhlík vyskytující se v různých strukturních typech (grafitový prášek, skelný uhlík, uhlíková vlákna, pyrolytický grafit, uhlíkové nanočástice) [1]. Mechanická odolnost kompozitu umožňuje jejich využití v průtokových systémech [2]. Povrch složených pevných uhlíkových elektrod se nejčastěji používá v leštěné formě, ale může být také modifikován filmem rtuti, silikagelu, uhlíkových nanotrubiček [2, 3] nebo také filmem biopolymeru DNA [4, 5].

Jedním z druhů pevných uhlíkových kompozitních elektrod jsou uhlíkové filmové elektrody. Uhlíkový film nanesený na běžně používaných elektrodách nabízí několik výhod. Nový film je aplikován pro každé měření a jeho likvidace je jednoduchá a rychlá, pouze se odstraní film otřením o filtrační papír. Úpravy ve složení filmu mohou vést k získání lepších signálů. Filmy skládající se z vodivých uhlíkových mikročástic a nevodivého polymeru se používají také k rozšíření potenciálového okna pracovních elektrod, na kterých není možné provádět stanovení v oblasti kladných potenciálů z důvodu oxidace vlastního elektrodového materiálu (např. stříbrných amalgámových elektrod [6]).

### 1.2.1 DNA biosenzory

Elektrochemické DNA biosenzory představují rychlejší, citlivější, levnější a prostorově méně náročné nástroje [7] pro charakterizaci a kvantifikaci oxidativního poškození bázi DNA [9, 10] oproti převládajícím membránovým blotům [8] a imunochemickým metodám, které se většinou používají společně s tradičními metodami jako chromatografie či hmotnostní spektrometrie. DNA biosenzory je možné využít při diagnostice lidských onemocnění na základě genetické mutace či při detekci bakteriální kontaminace potravin a životního prostředí [11].

Aplikace elektrochemických technik v oblasti technologií biosenzorů DNA představují v současné době dynamicky se rozvíjející oblasti. Je to způsobeno především poměrně nízkou cenou, malou spotřebou energie, přenosností elektroanalytických přístrojů a rychlým vývojem jednoduchých biosenzorů. Hlavní procesy podílející se na funkci elektrochemického DNA biosenzoru jsou rozpoznání analytu, indikace a přenos signálu (většinou ve formě elektrického proudu či jiné elektrické veličiny, např. frekvence [12]) přes elektrochemické převodníky, na kterých je imobilizována DNA.

DNA představuje citlivou rozpoznávací vrstvu spojenou s převodníkem signálu a malé změny ve struktuře DNA ovlivňují elektrochemické reakce probíhající na povrchu převodníku (pracovní elektrody).

Mohou být detekovány tři druhy těchto změn:

- 1) zlomy vláken DNA (vznik mezer v cukr-fosfátové kostře),
- 2) změny vlastních redoxních signálů bázi DNA v důsledku chemického poškození,
- 3) detekce interagujících látek pomocí specifických signálů aduktů DNA [13].

Individuální imobilizační procesy (např. afinita vázání dvojice avidin–biotin či kovalentní navázání methandiiminu) často závisí na vlastnostech převodníku [4]. Úpravou povrchu je možné získat vysoce specifický a citlivý detektor.

Jako vhodné převodníky pro imobilizaci DNA se v minulosti osvědčily např. rtuťové elektrody [5] či elektrody na bázi rtuťových amalgámů [6], tužkové uhlíkové elektrody (PGE) [6, 14], kompozitní pevné elektrody (CSE), borem dopované diamantové filmové elektrody (BDDFE) [15], uhlíkové pastové elektrody (CPE) [16] nebo sítotiskové uhlíkové elektrody (SPCE). Cena sítotiskových elektrod, které jsou vyráběny jen pro jedno použití, je relativně nízká, nemají chemickou historii, ale je problematické při jejich výrobě zaručit neměnnou kvalitu elektrodového povrchu jednotlivých kusů elektrod. Navíc je jejich likvidace v rozporu s konceptem ekologické analytické chemie [17]. Jako jednou z možných alternativ k těmto elektrodám může být chápána i velkoplošná uhlíková filmová elektroda (Is-CFE) [18] použitá v této bakalářské práci.

## 1.2.2 Oxidační a redukční signály DNA

Elektroaktivita nukleových kyselin byla objevena asi před 50 lety. Nukleové kyseliny jsou obvykle silně adsorbovány na elektrodách, nejsnadněji se adsorbují nukleové kyseliny na místech obsahujících guanosin. Nevratná adsorpce nukleových kyselin byla pozorována např. u rtuťových a uhlíkových elektrod. Imobilizovaná DNA na elektrochemickém převodníku poskytuje signály pouze nevratné oxidace nebo redukce bází, které poskytují informace o změnách ve struktuře a koncentraci DNA. Tato vlastnost se využívá při detekci poškození DNA [12].

Redukce bází DNA, konkrétně cytidinu a adenosinu, byly pozorovány na rtuťové elektrodě, jejíž potenciálové okno je obvykle mezi 0 V a  $-2$  V, v neutrálním a slabě zásaditém prostředí za podmínek, kdy neprobíhá redukce zahrnující základní protonaci molekuly DNA [19]. Naproti tomu potenciálové okno většiny pevných elektrod je posunuto přibližně o 1 V k pozitivnějším hodnotám. Pevné elektrody jsou tak lepší pro studium oxidace nukleových bází a rtuťové elektrody zase více vyhovují pro zkoumání jejich redukce [20, 21].

Elektrochemická impedanční studie byla použita ke zkoumání adsorpce a oxidace guaninu a jeho odpovídajících nukleotidů (guanosinu a adenosinu) na elektrodách ze skelného uhlíku (GCE) [22]. Studie zabývající se vlivem různých koncentrací DNA

a různých použitých potenciálů ukazuje, že všechny tři báze jsou adsorbovány na elektrodě a blokují její povrch [23].

Cukerná složka kostry DNA je elektroaktivní na měděném povrchu a měřitelná pomocí AC voltametrie [24]. Vícesytné alkoholy, všechny aldehydy a sacharidy mohou být detekovány v alkalickém prostředí pulzní ampérometrickou detekcí (PAD) s využitím zlaté nebo platinové elektrody [25]. Z tohoto důvodu je možné pomocí této techniky detekovat nukleotidy obsahující sacharidovou skupinu.

## 1.3 Elektrochemické techniky

### 1.3.1 Cyklická voltametrie (CV)

Cyklická voltametrie patří mezi rozšířené elektrochemické techniky. Poskytuje možnost pozorovat redoxní a oxidační píky elektrochemicky aktivních analytů, které pomáhají při zkoumání elektrodových procesů. U CV je elektrodový potenciál lineárně závislý na čase. U této techniky se využívá tříelektrodové zapojení. Potenciál je vkládaný a měřený mezi referentní a pracovní elektrodou a proud je měřený mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Získaná data jsou prezentována jako závislost elektrického proudu ( $I$ ) na elektrickém potenciálu ( $E$ ). Proud vzrůstá do té doby, než potenciál dosáhne redoxního potenciálu analytu, poté klesá, protože kolem elektrody je koncentrace analytu vyčerpaná. Pokud je redoxní děj reverzibilní, je charakterizován stejným tvarem redukčního (katodického) a oxidačního (anodického) píku. Potenciálový rozdíl mezi píky je v ideálním případě  $|E_A - E_K| = 59/z$ , ale prakticky je tento rozdíl pro jedoelektronový systém 70-100 mV. Poměr maximálních proudů píků je  $I_A/I_K = 1$ . Větší rozdíly  $|E_A - E_K|$  a asymetrické píky značí kvazireverzibilní nebo zcela ireverzibilní redoxní systém [26].

CV je využívána k detekci nebo charakterizaci redoxních reakcí velkého množství elektroaktivních sloučenin. V případě DNA biosenzorů jsou změny v potenciálových a proudových signálech využívány při detekci DNA, hodnocení poškození DNA nebo při detekci hybridizace [26]. Poškození DNA bývá zkoumáno CV pomocí běžně používaného redoxního indikátoru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ . Na povrchu elektrody je imobilizována vrstva DNA, která je detekovatelná prostřednictvím elektrostatických repulzí mezi redoxním indikátorem  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , který je záporně nabitý, a kostrou

DNA (fosfátové zbytky), která je také záporně nabitá. Změna proudového signálu je úměrná množství DNA adsorbované na povrchu elektrody [26].

### 1.3.2 Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

V současnosti je jednou z nejjednodušších experimentálních technik, která poskytuje účinnou a citlivou charakterizaci elektrodového povrchu, odráží jeho elektrické a strukturní vlastnosti. Nejčastěji se používá při studiu DNA hybridizace, imunotestů, při studiu poškození DNA a afinity látek. EIS umožňuje studium kinetiky přenosu elektronů a vodivosti elektroaktivní vrstvy na povrchu elektrody [30].

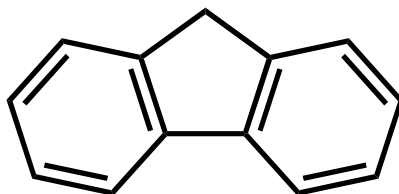
Změny ve struktuře DNA mají vliv na přenos náboje a na odporové vlastnosti. Získaná data jsou prezentována jako závislost  $Z''$  (imaginární složka závislá na frekvenci) na  $Z'$  (reálná složka nezávislá na frekvenci). Grafickým vyjádřením této závislosti získáme Nyquistův graf, který má půlkruhový tvar, kde oblast vysokých frekvencí půlkruhu naznačuje faradayický transport elektronů a lineární část popisuje difúzi řízený proces iontů v blízkosti elektrodového povrchu. Tvar půlkruhu je důležitý pro interpretaci naměřených dat [28].

Byly zavedeny dva modely, nefaradayický, bez přítomnosti redoxního indikátoru, a faradayický, který obsahuje redoxní indikátor ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ). Měření se uskutečňuje při formálním potenciálu redoxního páru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , který zajišťuje dosažení rovnováhy v systému. Přítomnost DNA na elektrodě se projeví nárůstem půlkruhu, kvůli elektrostatickému odpuzování negativně nabitých  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  a negativně nabitých cukr-fosfátové kostry DNA. Velká molekula DNA zabraňuje přenosu malých iontů indikátoru k elektrodě, a tím dochází ke zvyšování odporu. Velikost půlkruhu popisuje celkový ohmický odpor vrstvy na povrchu pracovní elektrody [29]. Hybridizace nebo poškození DNA se projeví poklesem půlkruhu. Při poškození DNA může dojít ke strukturálním změnám dvoušroubovice, může nastat rozevření dvoušroubovice a vznik jednořetězcových zlomů, které odpadávají z elektrody. Odpor se snižuje, protože je umožněn přenos iontů indikátoru k elektrodě [27-30].

V dnešní době je metoda EIS významně citlivější než ampérometrie, voltametrie nebo potenciometrie, které měly převahu v dřívějších studiích [28].

## 1.4 Fluoren

Při laboratorní teplotě je fluoren (viz obr. 1.1, číslo CAS 86-73-7) bílý krystalický prášek s teplotou tání 111-114 °C. Je nerozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v benzenu a diethyletheru [31].



**Obr. 1.1**

Strukturní vzorec fluorenu.

Fluoren patří do skupiny polyaromatických uhlovodíků (PAHů), které jsou velkou skupinou cizorodých polutantů rozšířených v životním prostředí. Vyskytují se ve fosilních palivech i jako produkty nedokonalého spalování, v půdách, sedimentech. PAHy byly izolovány ze vzduchu, vody, říčních a mořských sedimentů. Jsou silně toxické, často mají karcinogenní, teratogenní a mutagenní vlastnosti [32-34].

Fluoren a jeho deriváty jsou hlavním ekologickým problémem spojeným s ropou a ropnými skvrnami, spalováním odpadu a průmyslovými odpadními vodami. Využívá se v průmyslu jako základní materiál pro barviva a pro opticky zjasňující prostředky [32-34].

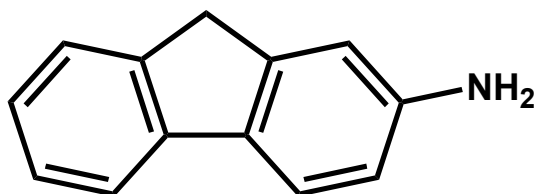
### 1.4.1 Metabolismus

Chemická struktura fluorenu, včetně aromatických a alicyklických zbytků, nabízí mnoho možností pro biochemický rozpad [35]. Mikroorganismy hrají důležitou roli při rozpadu aromatických uhlovodíků v půdních a vodních ekosystémech. Mikrobiální metabolismus nízkomolekulárních aromatických uhlovodíků, jako je naftalen, je dobře známý[34]. Naproti tomu je relativní nedostatek informací o bakteriálním metabolismu látek, které obsahují pětičlenný kruh s aromatickými kruhy, jako inden, fluoren, acenaften a fluoranthen [34].

Při kometabolickém rozpadu fluorenu byly pozorovány některé jeho metabolity, byly identifikovány jako fluoren-9-on, 9-hydroxyfluoren, indan-1-on. Metabolismus 9-hydroxyfluorenu, fluoren-9-onu a indan-1-onu byl dále zkoumán. 9-Hydroxyfluoren byl rozložen v bakteriích *Mycobacterium* sp. kmen BB1 na fluoren-9-on. Indan-1-on a fluoren-9-on nebyly dále metabolizovány. Výskyt fluoren-9-onu, 9-hydroxyfluorenu, indan-1-onu jako meziproductů metabolismu fluorenu byl popsán i v jiných mikroorganismech (*Arthrobacter* sp. kmen F101) [36-38].

## 1.5 2-Aminofluoren

Při laboratorní teplotě je 2-aminofluoren (2-AF, viz obr. 1.2, číslo CAS 153-78-6) žlutý krystalický prášek s teplotou tání 124-128 °C. Je nerozpustný ve vodě a je citlivý na delší vystavení na vzduchu.



**Obr. 1.2**  
Strukturální vzorec 2-aminofluorenu.

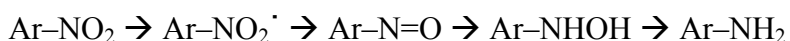
2-AF patří do skupiny aromatických aminů, které představují důležitou skupinu silných mutagenů [39]. Z tohoto důvodu patří mezi hlavní látky spojené se zvýšenou mírou výskytu rakoviny [40, 41]. Původně byl vyvinut jako pesticid, ale testy toxicity odhalily jeho karcinogenní vlastnosti [42]. V současné době je 2-AF používán jako modelová látka z důvodu její prokázané silné vazby na DNA. 2-AF, stejně jako většina nukleofilních sloučenin, nereaguje přímo s buněčnými strukturami. Proces aktivace vyžaduje metabolickou přeměnu na velmi elektrofilní molekuly vyvolávající škodlivé účinky, například kovalentní interakce s proteiny nebo DNA [43].

## 1.5.1 Metabolismus

Aromatické aminy jsou metabolity nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAHů), a v důsledku toho mohou být použity jako biomarkery expozice těchto karcinogenních a mutagenních látek [44].

NPAHs vstupují do těla přes kůži, zažívacím traktem nebo vdechnutím [40]. Typický zástupce NPAHů je 2-nitrofluoren (2-NF), který významně přispívá k mutagenitě výfukových plynů, ve kterých se vyskytuje [45]. V savčích játrech prochází 2-NF nitroredukcí (cytochromem P<sub>450</sub> na 2-AF v mikrosomální frakci jater) následovanou *N*-acetylací arylaminu *N*-acetyltransferázou a *N*-formylací jaterní formamidázou. Střevní bakterie mají převažující funkci v redukci 2-NF *in vivo* [46].

Buněčná nitro redukce probíhá podle následujícího schématu [40]:



*N*-acetylace a *N*-formylace jsou procesy, které vedou k metabolické aktivaci karcinogenních arylaminů tvořících 2-acetaminofluoren a 2-formylaminofluoren [43, 47].

*N*-acetyl- a *N*-formylderiváty jsou vylučovány ve velmi malém množství do moči a stolice, což naznačuje další biotransformaci [48].



## 2 Experimentální část

### 2.1 Přístroje a zařízení

Cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) byly měřeny přístrojem Micro Autolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko). Pro měření CV 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. Oba softwary pracovaly v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Získané výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a grafy byly vytvořeny v programu Origin Pro verze 8.0 (OriginLab, USA). Při všech měřeních bylo použito tříelektrodové zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentschloridová elektroda (typ RAE 113, 1 mol/l KCl, Monokrystaly, ČR) a jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (typ PPE, Monokrystaly, ČR). Pracovní elektrodou byla pevná zlatá elektroda (typ 6.1204.140, Metrohm, Švýcarsko) pokrytá vrstvou uhlíkového filmu, tím byla vytvořena velkoplošná uhlíková filmová elektroda (Is-CFE).

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

### 2.2 Chemikálie a roztoky

K přípravě všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda produkovaná systémem Millipore Q-plus systém, (Millipore, USA). Další použité chemikálie byly:

- *mikrokuličky skelného uhlíku* (typ 2, zrnitost 0,4-12  $\mu\text{m}$ , Alfa Aesar, USA)
- *mikrokrystalický grafit CR 2* (99,5%, zrnitost 3,5-5,5  $\mu\text{m}$ , Graphite Týn, ČR)
- *1,2-dichlorethan* (čistota p.a., Merck, Německo)
- *toluen* (čistota p.a., Lach-Ner, ČR)
- *obalový pěnový polystyren*
- *fluoren* (98%, Sigma-Aldrich, ČR), koncentrace  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l
- *2-aminofluoren* (98%, Sigma-Aldrich, ČR), koncentrace  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l
- *ethanol* (96%, Lach-Ner, ČR)
- *dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného* (čistota p.a., Lach-Ner, ČR)

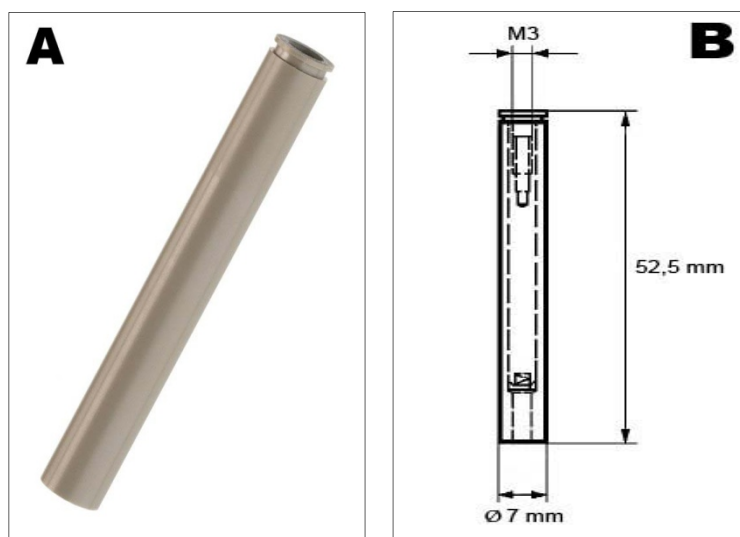
- *monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného* (čistota p.a., Sigma-Aldrich, ČR)
- *fosfátový pufr (PBS)*, koncentrace 0,1 mol/l, pH 6,7
- *ekvimolární směs  $K_4[Fe(CN)_6]$  a  $K_3[Fe(CN)_6]$  v PBS*, koncentrace  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l (oba čistota p.a., Lachema, ČR)
- *roztok DNA v PBS*, koncentrace 10 mg/ml, připraven z nízkomolekulární DNA z lososích spermii (Sigma-Aldrich, ČR)

## 2.3 Pracovní postupy

### 2.3.1 Příprava velkoplošné uhlíkové filmové elektrody

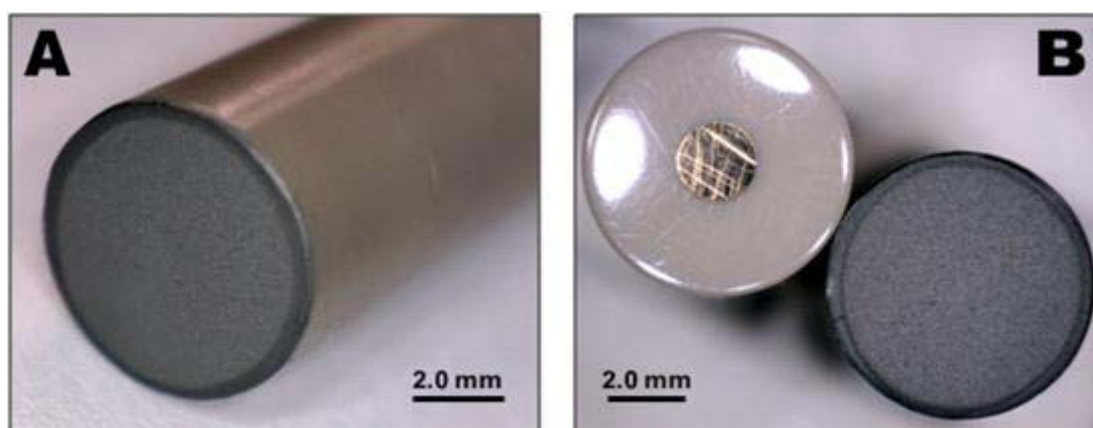
Jako pracovní elektroda byla použita pevná zlatá elektroda, jejíž povrch byl pokryt uhlíkovým filmem (Is-CFE) (obr. 2.1 a 2.2). Rozměr zlatého disku elektrody byl  $(2,0 \pm 0,1)$  mm a průměr plastového těla vyrobeného z polyether ether ketonu (PEEK) byl 7,0 mm.

Uhlíkový inkoust byl připraven smícháním 0,09 g uhlíku (mikrokuličky skelného uhlíku nebo mikrokrytalický grafit CR 2) a 0,01 g polystyrenu s 0,5 ml 1,2-dichlorethanu nebo toluenu. Toto složení uhlíkového filmu bylo přejato z práce [49] a dále testováno, poté bylo zvoleno nejvhodnější složení uhlíkového inkoustu. Inkoust byl promíchán pomocí třepačky Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) po dobu 2 min, stejně jako před každým nanesením filmu. Na elektrodu byla nanášena vrstva inkoustu o objemu 10  $\mu$ l pomocí automatické pipety (Biohit, Finsko). Čas schnutí uhlíkového inkoustu se lišil podle typu rozpouštědla, pro 1,2-dichlorethan to byly 2 min a pro toluen 3 min. Po vytěkání rozpouštědla se na povrchu elektrody vytvořil uhlíkový film a elektrodu bylo možné použít k měření. Po každém měření nebo při mechanickém poškození byl uhlíkový film pečlivě odstraněn otřením o filtrační papír, jeho zbytky byly smyty ethanolem a na elektrodu byl nanesen nový film.



**Obr. 2.1**

Podkladová pevná zlatá elektroda; (A) fotografie elektrody poskytovaná výrobcem [50] a (B) technický náčrt elektrody.



**Obr. 2.2**

Fotografie (A) is-CFE a (B) povrchu podkladové elektrody před a po nanesení uhlíkového filmu složeného z uhlíku CR 2 a polystyrenu (1,2-dichlorethan jako rozpouštědlo); fotografováno pomocí Microscope Camera, Digitus, Taiwan.

## 2.3.2 Příprava DNA biosenzoru

### *Elektrochemická aktivace ls-CFE*

Byla prováděna z důvodu odstranění zoxidovaných a naadsorbovaných látek z povrchu uhlíkového filmu a to tak, že na elektrodu byl vložen potenciál 1,5 V po dobu 180 s v PBS za stálého míchání.

### *Akumulace DNA na povrch ls-CFE*

Příprava DNA biosenzoru byla provedena akumulací DNA z roztoku připraveného rozpuštěním 100 mg DNA v 10 ml PBS na povrch elektrody. Roztok byl během akumulace míchán a při tom byl na elektrodu vkládán potenciál 0,5 V.

### *Inkubace DNA biosenzoru v roztocích látek*

Byl připraven roztok fluorenu a 2-aminofluorenu (2-AF) o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l v 96% ethanolu a z něj byla připravena koncentrace roztoku  $10^{-5}$  mol/l v PBS, do kterého byla elektroda modifikovaná DNA (DNA/ls-CFE) ponořena po dobu 10 min. Slepé pokusy byly prováděny stejným postupem, pouze inkubace biosenzoru byla provedena v 1% roztoku ethanolu v PBS.

## 2.3.3 Elektrochemická měření

### *Cyklická voltametrie (CV)*

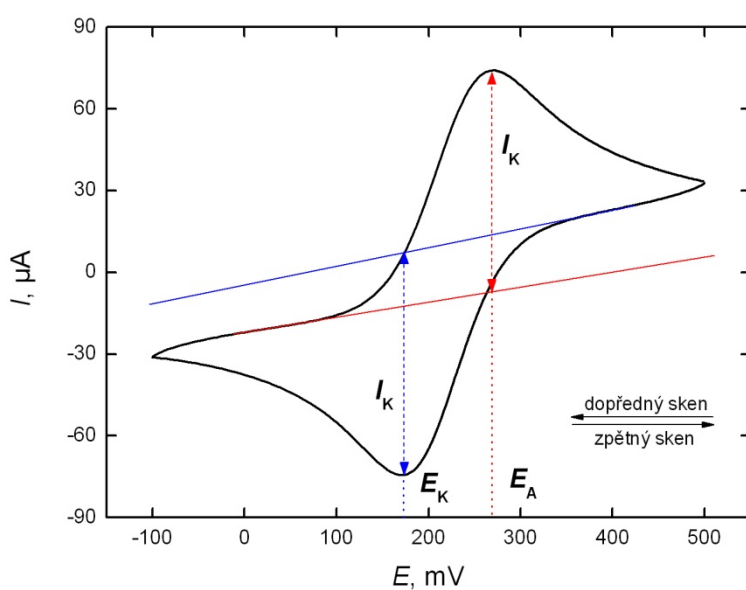
Byla měřena v 10 ml ekvimolární směsi ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l)  $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  při laboratorní teplotě. Měření byla provedena v potenciálovém rozsahu od 500 mV do -100 mV při polarizační rychlosti 50 mV/s s potenciálovým krokem 5 mV, zaznamenány byly tři skeny. Vyhodnocován byl vždy až třetí sken, který přesně přepisoval voltamogram skenu druhého, tudíž byl vyhodnocován již ustálený záznam.

### *Elektrochemická impedanční spektroskopie (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, který odpovídá formálnímu redoxnímu potenciálu použitého indikátoru. Potenciálová amplituda byla 10 mV a rozsah použitých frekvencí byl 0,1 až 5000 Hz (měřeno 51 bodů).

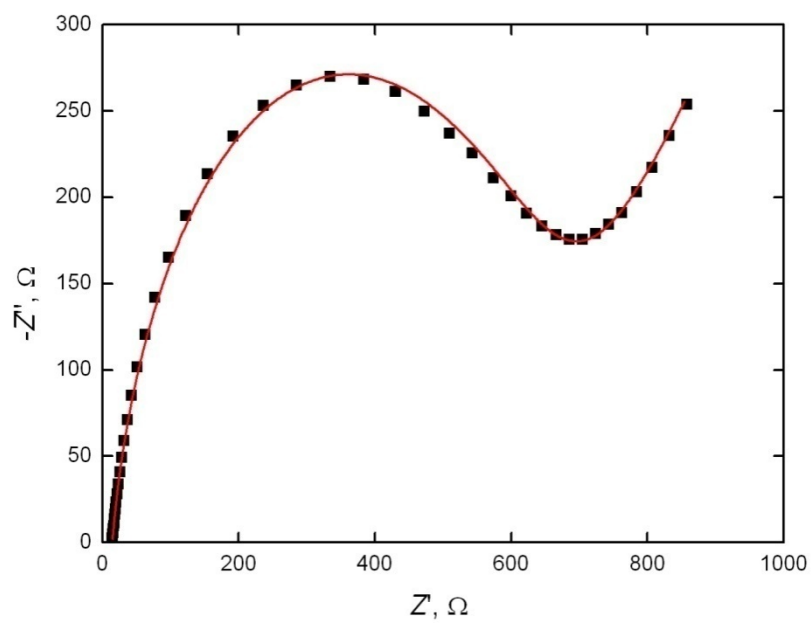
### 2.3.4 Vyhodnocování výsledků

Pro zhodnocení poškození DNA byla použita cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS). Při vyhodnocování cyklického voltamogramu byl zkoumán pokles proudu anodického píku ( $I_A$ ) a katodického píku ( $I_K$ ), rozdíl mezi potenciálem anodického píku ( $E_A$ ) a potenciálem katodického píku ( $E_K$ ) (obr. 2.3). Při měření EIS 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  $38,5 \text{ mm}^2$  (obr. 2.4).



**Obr. 2.3**

Grafické znázornění vyhodnocování CV;  $I_A$  – výška anodického píku,  $I_K$  – výška katodického píku,  $E_A$  – potenciál anodického píku,  $E_K$  – potenciál katodického píku.



**Obr. 2.4**

Grafické znázornění vyhodnocování EIS; černé body – impedanční spektrum (Nyquistův graf), červená křivka – fit spektra.

## 3 Výsledky a diskuze

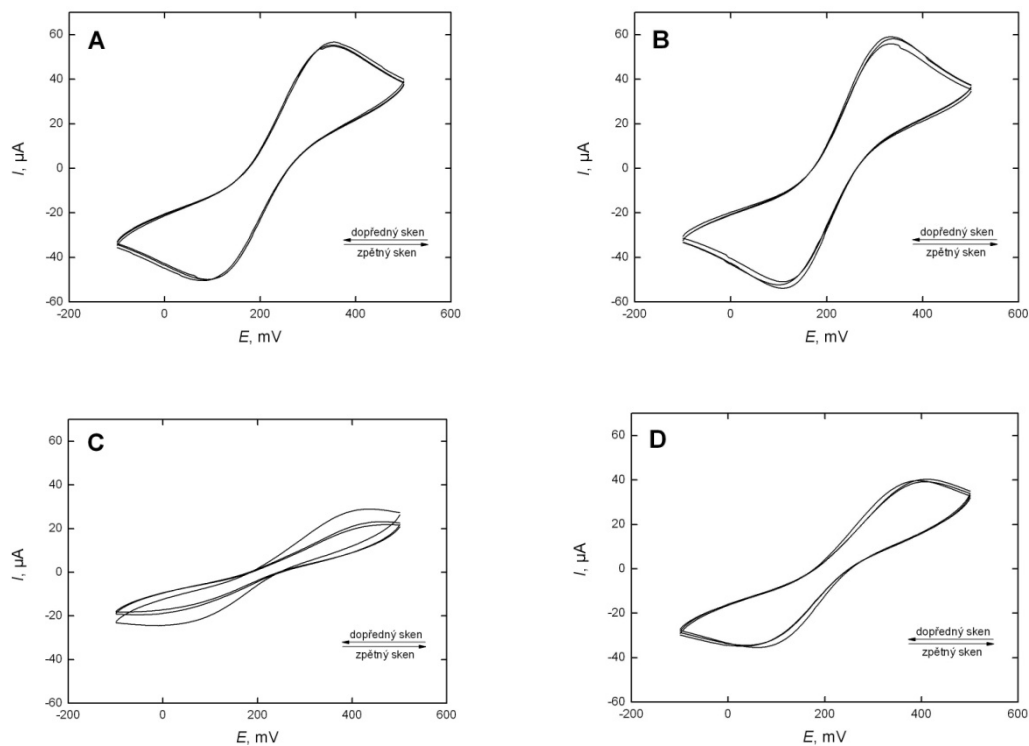
### 3.1 Elektrochemická charakterizace a optimalizace přípravy velkoplošné uhlíkové filmové elektrody

Velkoplošná uhlíková elektroda (ls-CFE) byla připravena a testována na kombinaci více druhů uhlíků a organických rozpouštědel. Vlastnosti uhlíkového filmu byly zkoumány cyklickou voltametří pomocí redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7). Uhlíkový film byl připraven rozpuštěním mikrokrystalického grafitu (CR2) nebo skelného uhlíku (GC) v 500  $\mu\text{l}$  toluenu nebo 1,2-dichlorethanu s polystyrenem. Z připravené směsi bylo použito 10  $\mu\text{l}$  pro nanesení na elektrodu.

Získané cyklické voltamogramy jsou zobrazeny na obr. 3.1. Každý graf obsahuje tři cyklické voltamogramy (třetí sken), které byly naměřeny vždy na nově připraveném uhlíkovém filmu. Potenciálový rozsah byl nastaven od 500 mV do  $-100$  mV. Vyhodnocení voltamogramů je uvedeno v tabulce 3.1.

Složení uhlíkového filmu významně ovlivňuje voltametrické vlastnosti povrchu elektrody, výsledné signály a jejich reprodukovatelnost. Ideální stav povrchu elektrody je charakterizován hodnotou poměru  $I_A/I_K = 1$  a rozdílem hodnot  $|E_A - E_K| = 59$  mV, které značí ideální reverzibilitu redoxního systému  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Nejvyšší oxidační a redukční proudy byly získány při použití uhlíkového filmu B (obr. 3.1), jeho poměr  $I_A/I_K = 0,83$ , ale opakovatelnost byla horší než u filmu A. Uhlíkový film typu B měl také nejmenší rozdíl potenciálů mezi oxidací a redukcí. Kritérii pro výběr filmu byly hodnota poměru  $I_A/I_K$  a rozdíl hodnot potenciálů  $|E_A - E_K|$ , ale také opakovatelnost přípravy filmu. Podle těchto parametrů byl zvolen uhlíkový film typu B se složením směsi: CR2 a toluen.



**Obr. 3.1**

Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na ls-CFE: **A** – CR2 a 1,2-dichlorethan; **B** – CR2 a toluen; **C** – GC a 1,2-dichlorethan; **D** – GC a toluen. Vždy zobrazen třetí sken CV naměřený na třech nových uhlíkových filmech.

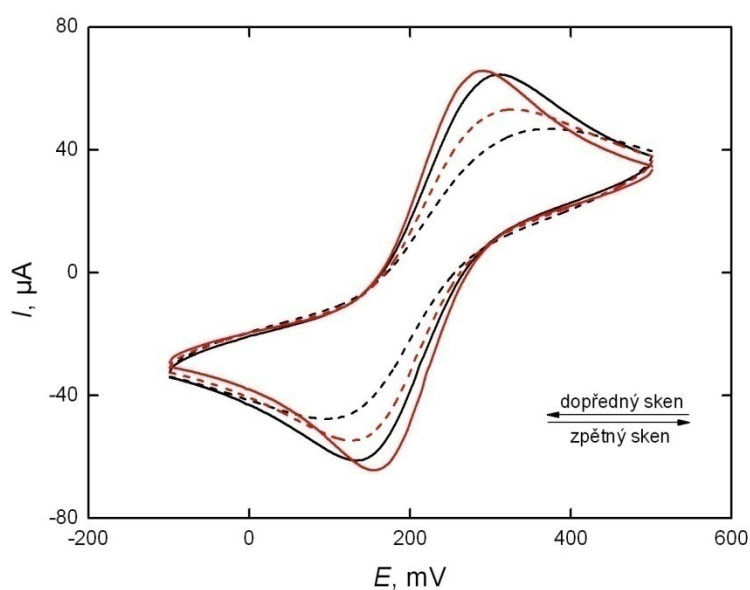
**Tab. 3.1**

Statistické vyhodnocení elektrochemických vlastností pro tři opakovaně připravené uhlíkové filmy.

Typ filmu	A	B	C	D
$I_K$ [ $\mu\text{A}$ ]	36,01	43,83	4,77	17,07
$s_r$ [%]	0,89	1,80	2,14	2,21
$I_A$ [ $\mu\text{A}$ ]	46,89	52,61	13,17	27,33
$s_r$ [%]	0,29	1,53	3,16	1,32
$I_K/I_A$	0,77	0,83	0,36	0,62
$E_K$ [mV]	96	113	-24	56
$s_r$ [%]	4,04	6,24	19,35	14,18
$E_A$ [mV]	346	329	444	394
$s_r$ [%]	3,61	0,96	8,33	5,64
$E_A - E_K$ [mV]	250	216	468	338



Pro uhlíkový film typu B byly změřeny cyklické voltamogramy po elektrochemické aktivaci a akumulaci DNA na elektrodu a stejné cyklické voltamogramy byly zaznamenány i pro druhý nejlepší uhlíkový film typu A (obr. 3.2). Rozdíl mezi maximem výšky píku proudu u aktivované elektrody a maximem výšky píku proudu u elektrody s akumulovanou DNA pro uhlíkový film typu B byl menší než pro uhlíkový film typu A. Tento rozdíl, tedy míra množství naakumulované DNA, je důležitý při měření poškození DNA, protože potřebujeme co největší okno pro detekci poškození DNA. Pro všechna další měření byl tedy na základě tohoto pokusu zvolen uhlíkový film typu A se složením: CR2 a 1,2-dichlorethan.



**Obr. 3.2**

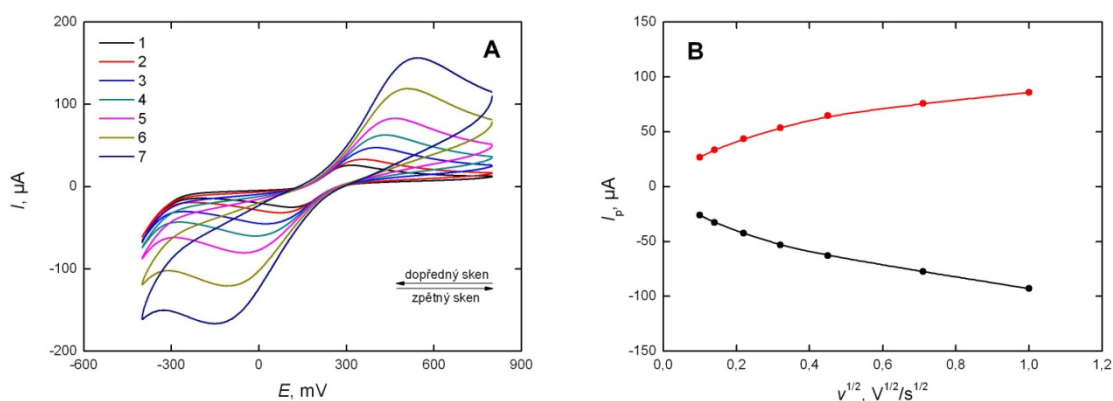
Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS po elektrochemické aktivaci (plná čára) a po akumulaci DNA (čárkovaná čára) měřené na elektrodě s uhlíkovým filmem typu B (červená křivka) a s uhlíkovým filmem typu A (černá křivka). Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do  $-100$  mV.

Pro přípravu biosenzoru byly vyzkoušeny různé časy a potenciály elektrochemické aktivace ls-CFE. Nejvhodnější variantou bylo vložení potenciálu 1,5 V po dobu 180 sekund na ls-CFE v PBS za stálého míchání. Delší čas aktivace už nepřinášel další zlepšení a u kratších časů byla horší opakovatelnost měření.

Pro elektrochemickou charakterizaci elektrodového povrchu byla použita technika CV na ls-CFE. Pomocí ní je možné získat informace o elektrochemickém ději

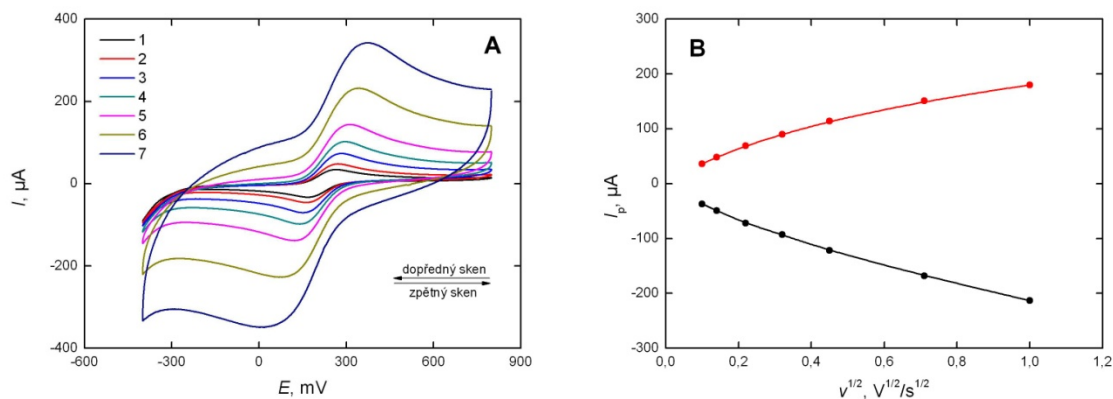
probíhající na elektrodě. Nastavitelnými veličinami CV jsou počáteční a koncový potenciál a rychlost polarizace. Elektrodový děj může být reverzibilní, kvazi-reverzibilní nebo ireverzibilní. Pro zjištění, zda na elektrodě probíhá děj řízený difúzí, se vynáší závislost hodnoty proudu píku ( $I_p$ ) na odmocnině rychlosti polarizace ( $v^{1/2}$ ). Pokud je tato závislost lineární, jedná se o elektrochemický děj řízený difúzí. Z vynesené závislosti  $\log|I_p|$  na  $\log v$  se dá ze získané hodnoty směrnice usuzovat, zda se jedná o děj kontrolovaný difúzí, teoretická hodnota této směrnice je 0,5 [51].

V roztoku PBS obsahujícím redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) byly proměřeny cyklické voltamogramy pro různé rychlosti polarizace: 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV/s. Vždy byly proměřeny tři skeny. Na obr. 3.3 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy měřené na ls-CFE a na obr. 3.4 jsou znázorněny cyklické voltamogramy měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE při rostoucích rychlostech polarizace a k nim příslušné závislosti  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ .



**Obr. 3.3**

(A) Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na ls-CFE při potenciálovém rozsahu od 800 do  $-400$  mV. Rychlost polarizace: 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4), 200 (5), 500 (6), 1000 (7) mV/s. Zobrazen vždy třetí sken. (B) Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS získaná na ls-CFE pro katodickou (černé body) a anodickou (červené body) oblast potenciálového okna.

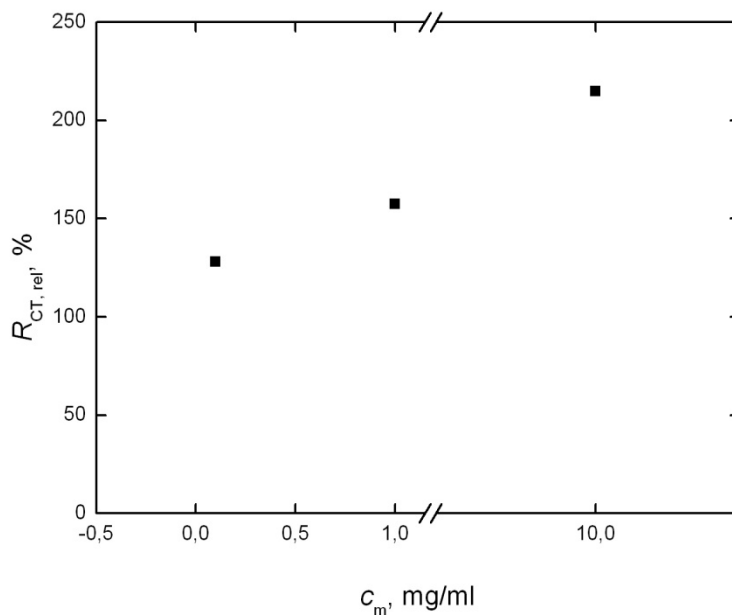


**Obr. 3.4**

(A) Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE, při potenciálovém rozsahu od 800 do  $-400$  mV. Rychlost polarizace: 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4), 200 (5), 500 (6), 1000 (7) mV/s. Zobrazen vždy třetí sken. (B) Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS získaná na elektrochemicky aktivované ls-CFE pro katodickou (černé body) a anodickou (červené body) oblast potenciálového okna.

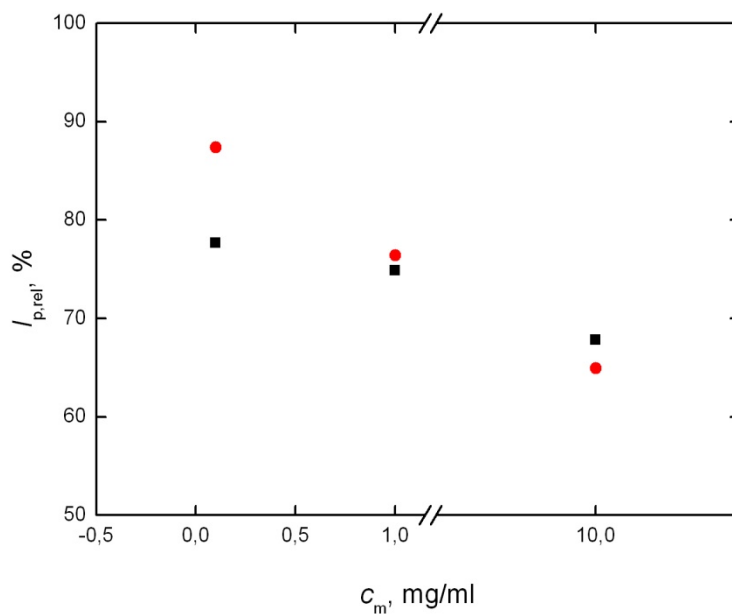
Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  není lineární pro ls-CFE ani pro elektrochemicky aktivovanou ls-CFE, jejich směrnice se neblíží očekávané hodnotě 0,5. To ukazuje, že elektrochemický děj na povrchu elektrody ls-CFE a aktivované ls-CFE je pravděpodobně částečně řízen přenosem hmoty a částečně kinetikou přenosu náboje.

Při přípravě DNA modifikované velkoplošné uhlíkové filmové elektrody (DNA/ls-CFE) byly pro akumulaci DNA nejdříve vyzkoušeny různé hmotnostní koncentrace ( $c_m$ ) DNA roztoků: 0,1; 1 a 10 mg/ml, které byly připraveny rozpuštěním nízkomolekulární DNA v PBS (0,1 mol/l, pH 6,7). Akumulace DNA na ls-CFE byla prováděna při vloženém potenciálu 500 mV po dobu 5 minut. Závislost  $R_{CT,rel}$  (obr. 3.5) a  $I_{p,rel}$  (obr. 3.6) na hmotnostní koncentraci DNA byla měřena v roztoku redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) pomocí EIS a CV. Pro obě techniky bylo měření opakováno třikrát a v grafech byly uvedeny průměry jejich hodnot. Směrodatná odchylka pro tato měření byla do 5 %. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami naměřenými na holé ls-CFE, přičemž tyto hodnoty byly brány jako 100 %.



**Obr. 3.5**

Závislost  $R_{CT,rel}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na koncentraci DNA, měřeno na DNA/ls-CFE technikou EIS. Akumulace DNA byla prováděna při potenciálu 500 mV po dobu 5 minut za stálého míchání.



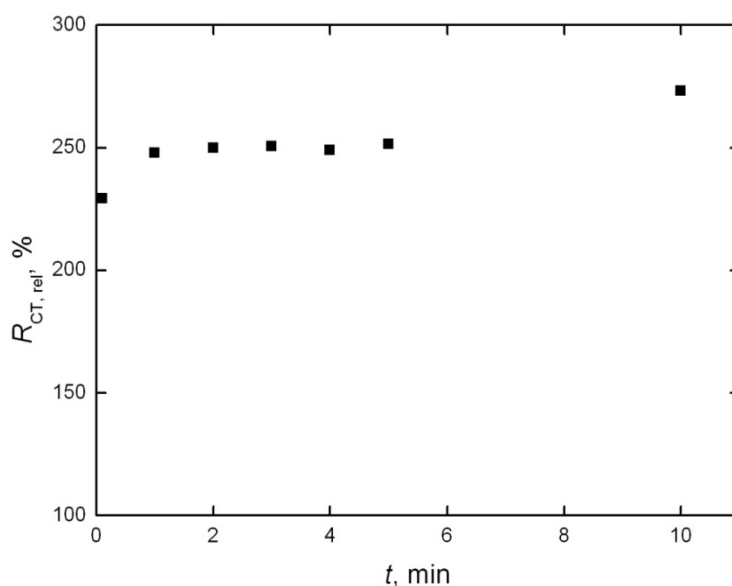
**Obr. 3.6**

Závislost  $I_{p,rel}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na koncentraci DNA, měřeno na DNA/ls-CFE technikou CV. Akumulace DNA byla prováděna při potenciálu 500 mV po dobu 5 minut za stálého míchání. Červené body – anodický pík, černé body – katodický pík.

Vrstva naakumulované nízkomolekulární DNA na elektrodě zabraňuje přenosu malých iontů redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ , v důsledku čehož dochází při měření CV k poklesu výšky píků  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  a u EIS dochází ke zvyšování odporu, a tím k nárůstu půlkruhu křivky oproti ls-CFE.

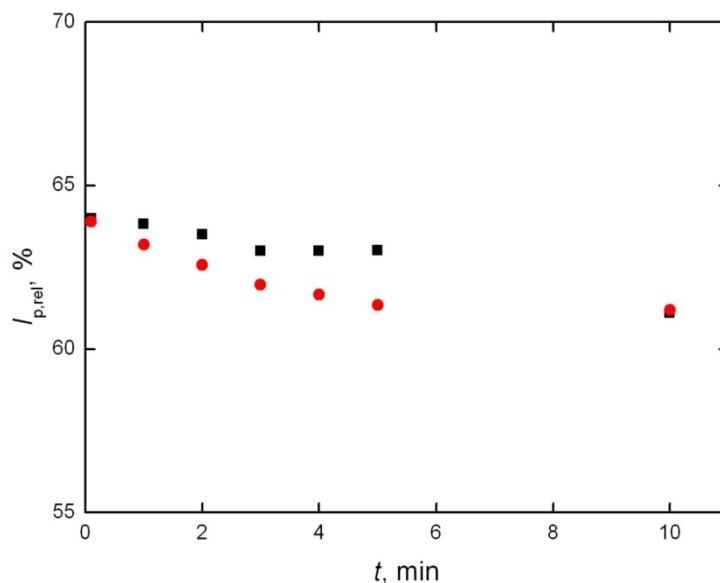
Největší nárůst  $R_{\text{CT,rel}}$  a největší pokles  $I_{\text{p,rel}}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  byl zaznamenán u hmotnostní koncentrace 10 mg/ml, která byla zvolena za optimální koncentraci DNA pro akumulaci na ls-CFE.

Při této koncentraci DNA byl dále pozorován vliv doby akumulace DNA na ls-CFE, zvolené časy byly: 5 s a 1, 2, 3, 4, 5 a 10 minut, měření byla prováděna technikami EIS (obr. 3.7) a CV (obr. 3.8) v PBS pomocí redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l).



### Obr. 3.7

Závislost  $R_{\text{CT,rel}}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na času akumulace DNA, měřeno na DNA/ls-CFE technikou EIS. Akumulace DNA byla prováděna při potenciálu 500 mV z roztoku DNA připraveného rozpuštěním 100 mg DNA v 10 ml PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7).

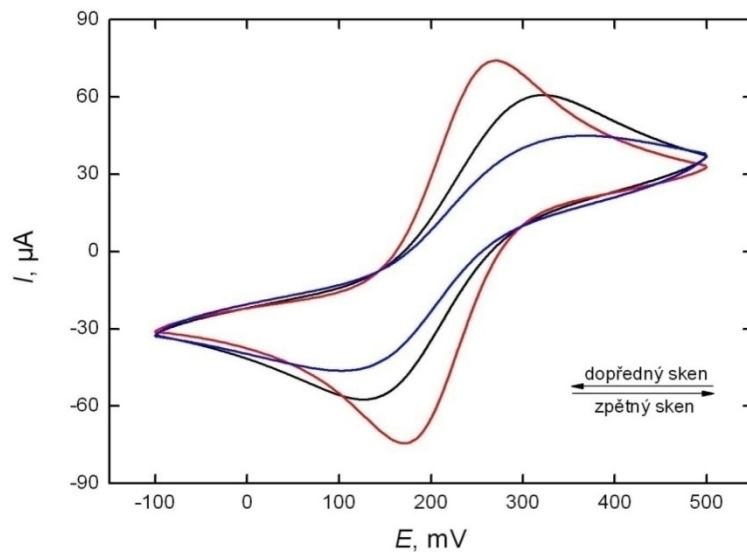


### Obr. 3.8

Závislost  $I_{p,rel}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na času akumulace DNA, měřeno na DNA/ls-CFE technikou CV. Akumulace DNA byla prováděna při potenciálu 500 mV z roztoku DNA připraveného rozpuštěním 100 mg DNA v 10 ml PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7).

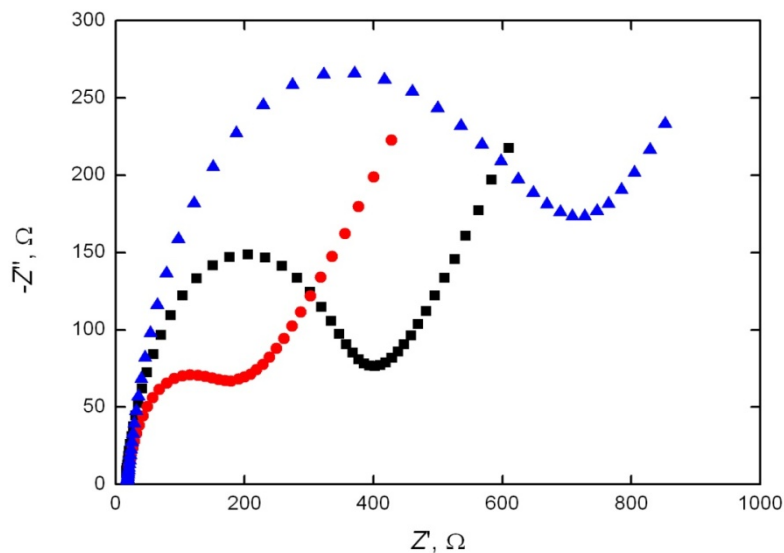
Pro měření EIS a CV se 1 minuta akumulace jevila jako optimální čas. Hodnota  $R_{CT,rel}$  vzrostla na 248 %,  $I_{A,rel}$  klesla na 63 % a  $I_{K,rel}$  klesla na 64 %. Prodloužením času akumulace na 10 minut byly získány hodnoty  $R_{CT,rel} = 273$  %,  $I_{A,rel} = 61$  % a  $I_{K,rel} = 61$  %, toto zlepšení hodnot se lišilo docela nevýznamně a bylo zanedbatelné z časového hlediska přípravy biosenzoru. Doba akumulace DNA byla tedy zvolena na 1 minutu.

Pro zvolené optimální podmínky elektrochemické aktivace (potenciál 1500 mV po dobu 180 sekund za stálého míchání), koncentrace DNA ( $c_m = 10$  mg/ml) a času akumulace DNA (60 sekund) při vloženém potenciálu 500 mV na ls-CFE byly provedeny měření CV (obr. 3.9) a EIS (obr. 3.10). Měření byla provedena pomocí redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7). Vždy byly proměřeny 3 skeny.



**Obr. 3.9**

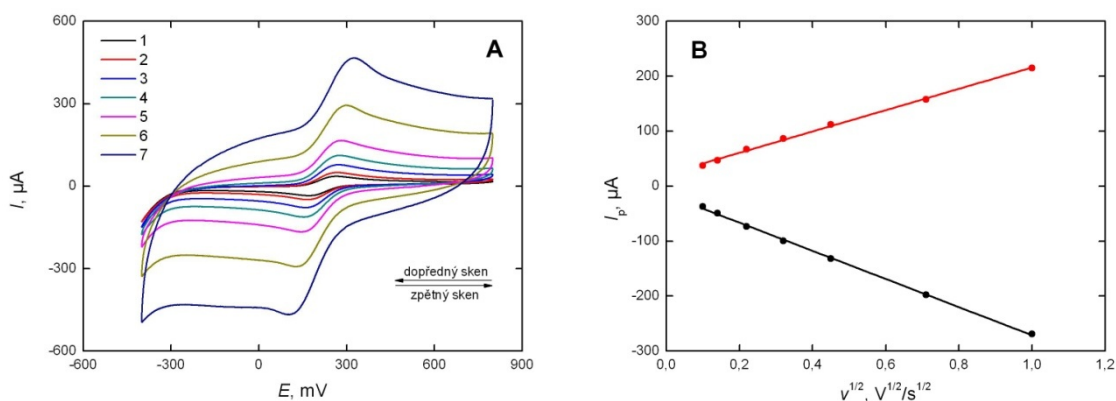
Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky neaktivované ls-CFE (černá křivka), elektrochemicky aktivované ls-CFE (červená křivka) vloženým potenciálem 1,5 V po dobu 180 sekund a na DNA/ls-CFE (modrá křivka) v roztoku DNA ( $c_m = 10$  mg/ml) při vloženém potenciálu 500 mV po dobu 60 sekund. Měřeno při potenciálovém rozsahu od 500 do -100 mV. Zobrazen vždy třetí sken.



**Obr. 3.10**

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru Fe<sup>II</sup>/Fe<sup>III</sup> ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky neaktivované ls-CFE (černá křivka), elektrochemicky aktivované ls-CFE (červená křivka) vloženým potenciálem 1,5 V po dobu 180 sekund a na DNA/ls-CFE (modrá křivka) v roztoku DNA ( $c_m = 10$  mg/ml) při vloženém potenciálu 500 mV po dobu 60 sekund.

Za účelem zjištění, jak vrstva naakumulované DNA ovlivní elektrochemické chování redoxního systému  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ , tedy pro porovnání se záznamy zobrazenými na obr. 3.3 a 3.4, byl stejný experiment proveden i na DNA/ls-CFE. V roztoku PBS obsahujícím redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) byly proměřeny cyklické voltamogramy pro různé rychlosti polarizace: 10, 20, 50, 100, 200, 500 a 1000 mV/s. Cyklické voltamogramy (obr. 3.11) byly měřeny na DNA/ls-CFE při rostoucích rychlostech polarizace, akumulace byla provedena z roztoku DNA ( $c_m = 10$  mg/ml). Vždy byly proměřeny tři skeny.



**Obr. 3.11**

(A) Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na DNA/ls-CFE, při potenciálovém rozsahu od 800 do  $-400$  mV. Rychlost polarizace: 10 (1), 20 (2), 50 (3), 100 (4), 200 (5), 500 (6), 1000 (7) mV/s. Zobrazen vždy třetí sken. (B) Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  pro redoxní indikátor  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS získaná na DNA/ls-CFE pro katodickou (černé body) a anodickou (červené body) oblast potenciálového okna.

Závislost  $I_p$  na  $v^{1/2}$  redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  je lineární pro DNA/ls-CFE, její směrnice se více blíží očekávané hodnotě 0,5, což značí, že se děj na povrchu DNA/ls-CFE stává řízeným difúzí. Tato změna v chování oproti měřením na holé ls-CFE vypovídá o tom, že v přítomnosti vrstvy DNA na povrchu elektrody dochází ke zpomalení difúze, jejíž rychlost se tak stává nejpomalejším členem v celém elektrochemickém procesu. V tabulce 3.2 je uvedeno vyhodnocení veličin CV pro rychlost polarizace 50 mV/s pro použité elektrody (data se vztahují k obr. 3.3, 3.4 a 3.11).

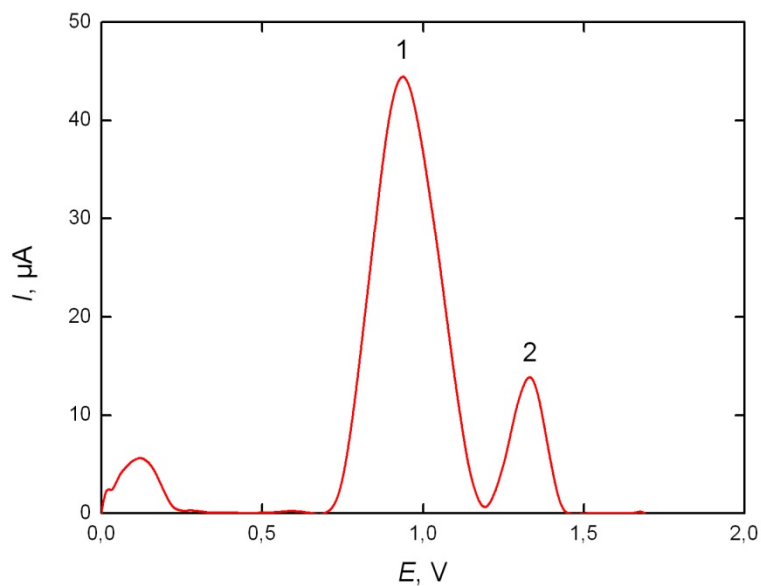


**Tab. 3.2**

Vyhodnocení veličin CV pro rychlost polarizace 50 mV/s na různých elektrodách

Elektroda	$I_K/I_A$ [ $\mu$ A]	$E_A-E_K$ [mV]	Směrnice $\log I_K$ vs. $\log \nu$	Směrnice $\log I_A$ vs. $\log \nu$
ls-CFE	0,98	347	0,32	0,32
Elektrochemicky aktivovaná ls-CFE	1,04	127	0,38	0,35
DNA/ls-CFE	1,10	108	0,43	0,38

Square wave voltametrie je citlivá elektrochemická technika používaná mimo jiné i ke kvantitativnímu stanovení elektrochemicky aktivních látek imobilizovaných na povrchu elektrody. Zde v práci byla použita jako důkaz naakumulování DNA na DNA/ls-CFE prostřednictvím detekce nukleových bází. Square wave voltamogram (obr. 3.12) byl naměřen v PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7) na DNA/ls-CFE, akumulace DNA byla z roztoku DNA ( $c_m = 10$  mg/ml) v PBS. Nejprve byla ls-CFE elektrochemicky aktivována vloženým potenciálem 1,5 V podobu 180 s. Měření bylo provedeno v potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V s frekvencí 200 Hz a při potenciálovém kroku 0,015 V, amplituda potenciálu byla 0,05 V. Získaný voltamogram byl zkorigován na základní linii. Pík nacházející se kolem 0,9 V je oxidačním píkem guanosinu a pík kolem 1,4 V je oxidačním píkem adenosinu [18].



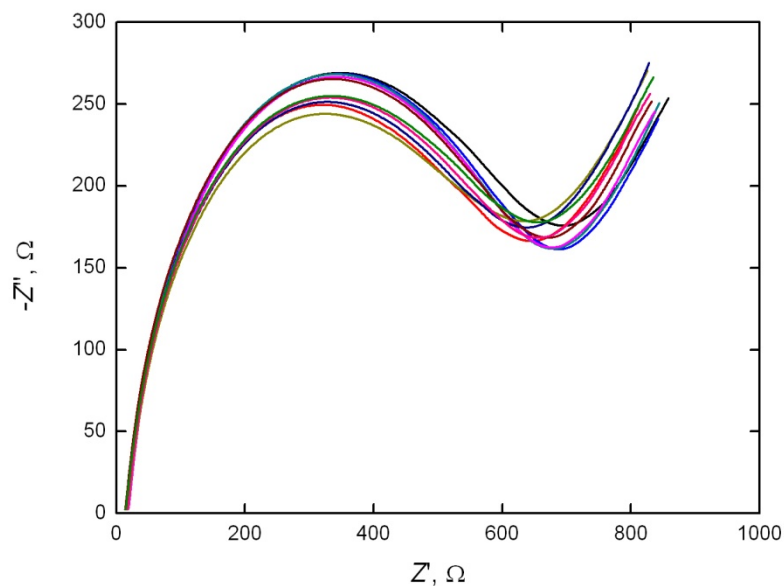
**Obr. 3.12**

Square wave voltamogram měřený v PBS na DNA/ls-CFE při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,7 V: 1 – pík guanosinu, 2 – pík adenosinu. Voltamogram je korigován na základní linii.

Pro zvolené optimální podmínky:

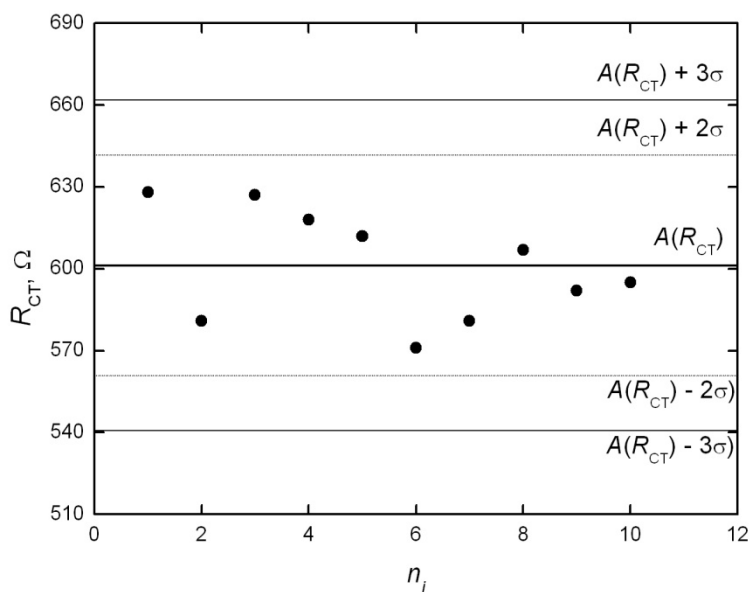
- elektrochemická aktivace – potenciál 1,5 V po dobu 180 sekund za stálého míchání,
- koncentrace DNA –  $c_m = 10$  mg/ml v PBS,
- čas akumulace DNA – potenciál 500 mV po dobu 60 sekund za stálého míchání,

byla technikou EIS změřena opakovatelnost přípravy DNA/ls-CFE pro deset měření. Na obr. 3.13 jsou znázorněny Nyquistovy grafy deseti měření redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS. Vyhodnocené hodnoty  $R_{\text{CT}}$  byly zaneseny do regulačního diagramu (obr. 3.14), získaná průměrná hodnota  $R_{\text{CT}}$  byla  $(0,601 \pm 0,019) \Omega$  ( $s_r = 3,08 \%$ ,  $n = 10$ ). Všechny naměřené hodnoty leží mezi varovnými mezemi.



**Obr. 3.13**

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS při měření opakovatelnosti přípravy DNA/Is-FCE ( $n = 10$ ).



**Obr. 3.14**

Závislost hodnoty  $R_{\text{CT}}$  na pořadovém čísle měření, měřeno technikou EIS na DNA/Is-CFE v prostředí redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS. Vyhodnocení bylo provedeno na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ; hladina hodnot  $A(R_{\text{CT}})$  reprezentuje aritmetický průměr hodnot  $R_{\text{CT}}$  ( $n = 10$ ), hladina hodnot  $A(R_{\text{CT}}) \pm 2\sigma$  reprezentuje varovné meze a  $A(R_{\text{CT}}) \pm 3\sigma$  meze regulační.

## 3.2 Detekce poškození DNA chemickými karcinogeny

Fluoren neobsahuje žádnou funkční skupinu schopnou elektrochemické oxidace nebo redukce. Bylo provedeno stanovení míry poškození DNA vlivem přímé interakce fluorenu s DNA. Jeho zásobní roztok byl připraven o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l v 96% ethanolu a z něj byla připravena koncentrace roztoku  $10^{-5}$  mol/l v PBS, ve kterém byla DNA/ls-CFE inkubována.

2-AF obsahuje aminoskupinu, která je schopná podléhat elektrochemické oxidaci. Jeho zásobní roztok byl připraven stejným způsobem jako pro fluoren.

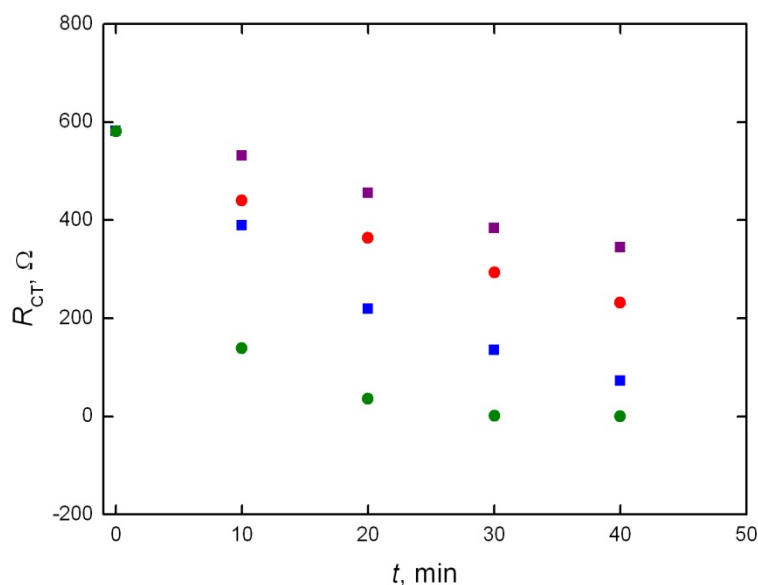
Pro pozorování vlivu času inkubace DNA/ls-CFE na poškození DNA v roztoku fluorenu byla měření provedena technikou EIS (obr. 3.15). Hodnoty  $R_{CT}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS byly získány po inkubaci DNA/ls-CFE v roztoku fluorenu pro zvolené časy: 0, 10, 20, 30 a 40 minut. Při procesu inkubace DNA/ls-CFE v roztoku fluorenu nebylo při jednom měření roztokem mícháno a při dalším mícháno bylo. Stejně měření bylo provedeno i pro DNA/ls-CFE, která byla inkubována v 1% roztoku ethanolu v PBS také bez míchání a s mícháním roztoku. Všechna naměřená data byla přepočítána na hodnotu blanku  $R_{CT}$ , která byla změřena po elektrochemické aktivaci ls-CFE, akumulaci v PBS bez přítomné DNA a inkubaci v 1% roztoku ethanolu v PBS.

U obou měření bylo pozorováno poškození DNA, které se s časem měnilo zanedbatelně u měření bez míchání, u měření s mícháním došlo k největšímu poškození po 10 minutách inkubace v roztoku fluorenu a se zvyšujícím se časem se míra poškození DNA zmenšovala. Doba inkubace DNA/ls-CFE v roztoku fluorenu byla tedy pro další měření zvolena 10 minut, všechna měření byla prováděna bez míchání i s mícháním poškozujícího roztoku.

U měření bez míchání roztoku fluorenu docházelo k postupnému odpadávání DNA z elektrody, u měření s mícháním roztoku fluorenu docházelo také k odpadávání DNA, ale šlo o větší poklesy než u měření bez míchání, což mohlo být způsobeno vírem z míchání, který mohl DNA strhávat z elektrody.

Odpadávání DNA z elektrody by se hypoteticky dalo zabránit např. použitím vysokomolekulární DNA, využitím membrány z nafionu nebo chitosanu pro překrytí vrstvy DNA [52] nebo naakumulovanou DNA na ls-CFE nechat zaschnout a poté

inkubovat v roztoku poškozující látky. Zabráněním odpadávání DNA by se v budoucnu měla zabývat má diplomová práce.



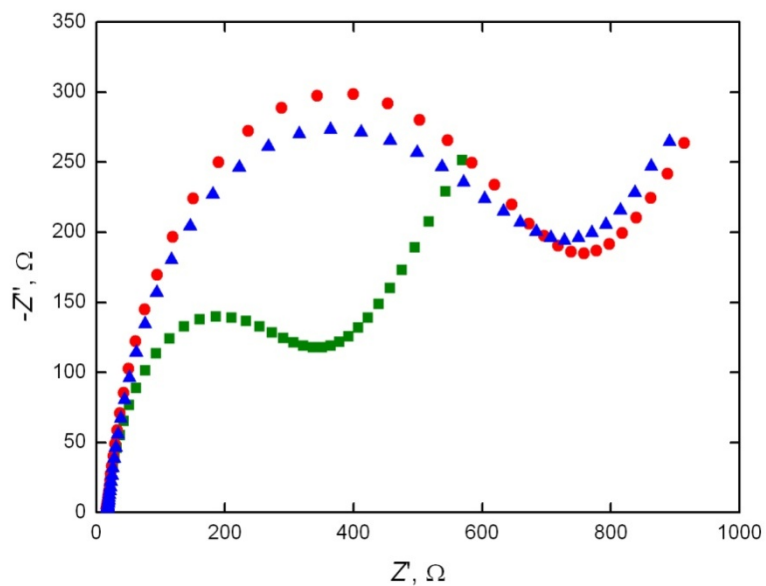
**Obr. 3.15**

Závislost  $R_{CT}$  redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS na času inkubace DNA/ls-CFE v roztoku fluorenu ( $c = 10^{-5}$  mol/l), měřeno technikou EIS. Fialové body – inkubace v PBS bez míchání, červené body – inkubace v roztoku fluorenu bez míchání, modré body – inkubace v PBS s mícháním, zelené body – inkubace v roztoku fluorenu s mícháním.

Za účelem prokázání aplikovatelnosti nově připraveného DNA biosenzoru bylo provedeno měření EIS (obr. 3.16) redoxního indikátoru  $Fe^{II}/Fe^{III}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS:

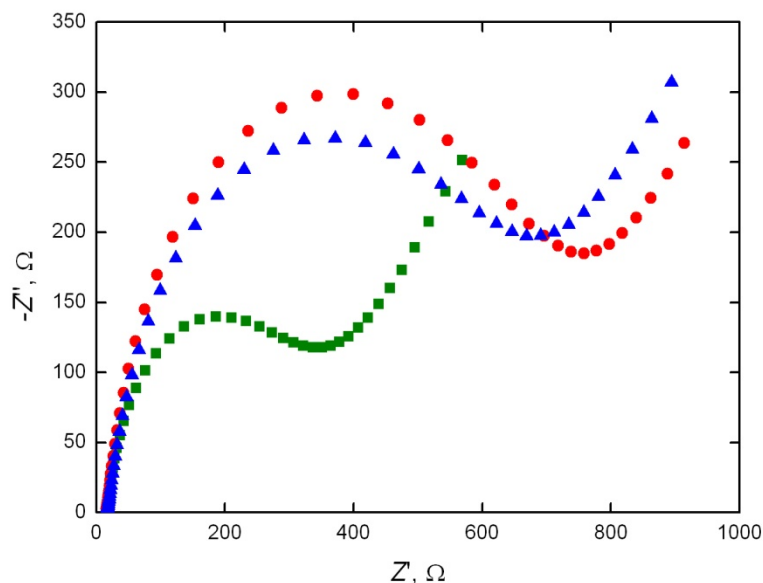
1. na holé elektrodě, která byla elektrochemicky aktivovaná a poté nechána akumulovat v PBS bez přítomné DNA a 10 minut byla inkubována v 1% roztoku ethanolu v PBS (obr. 3.16, zelená křivka),
2. na DNA/ls-CFE, která byla 10 minut inkubována v 1% roztoku ethanolu v PBS (obr. 3.16, červená křivka) a
3. na DNA/ls-CFE, která byla 10 minut inkubována v roztoku fluorenu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v PBS (obr. 3.16, modrá křivka).

Stejně měření EIS bylo provedeno také pro roztok 2-AF o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/l v PBS (obr. 3.17). Při všech výše uvedených inkubacích nebylo prováděno míchání inkubačního roztoku.



**Obr. 3.16**

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE ponechané akumulovat v PBS bez přítomné DNA a 10 minut inkubované v 1% roztoku ethanolu v PBS (zelená křivka), na DNA/ls-CFE, která byla 10 minut inkubována v PBS (červená křivka) a na DNA/ls-CFE, která byla 10 minut inkubována v roztoku fluorenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l) v PBS (modrá křivka). Všechny inkubace byly provedeny bez míchání.

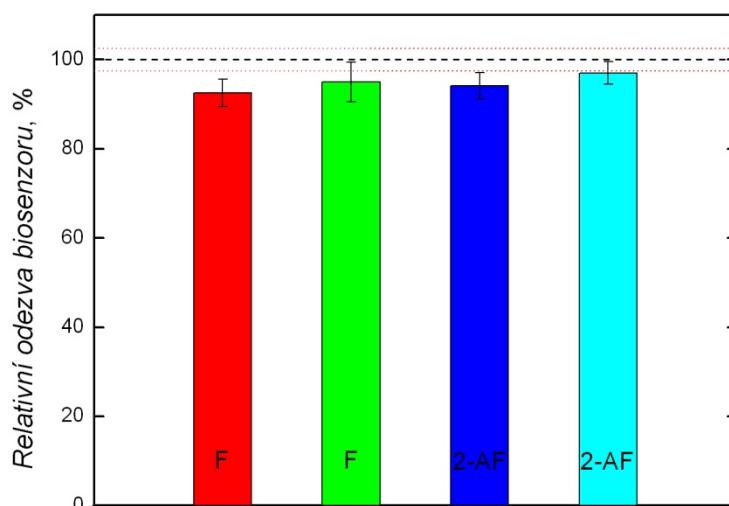


**Obr. 3.17**

Nyquistovy grafy redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-3}$  mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky aktivované Is-CFE ponechané akumulovat v PBS bez přítomné DNA a 10 minut inkubované v 1% roztoku ethanolu v PBS (zelená křivka), na DNA/Is-CFE, která byla 10 minut inkubována v PBS (červená křivka) a na DNA/Is-CFE, která byla 10 minut inkubována v roztoku 2-AF ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l) v PBS (modrá křivka). Všechny inkubace byly provedeny bez míchání.

Při měření EIS došlo k viditelnému snížení hodnoty  $R_{\text{CT}}$  na DNA/Is-CFE inkubované v roztoku fluorenu (obr. 3.18), což svědčilo o poškození DNA. Lze usuzovat, že následkem interkalace fluorenu do struktury DNA dochází ke tvorbě jednořetězcových zlomů, které odpadávají z elektrody a tím se zmenšuje podíl odpudivých interakcí mezi záporně nabitou kostrou DNA a anionty redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ , čímž dochází k poklesu  $R_{\text{CT}}$ . U měření v roztoku 2-AF (obr. 3.18) došlo k podobnému poklesu hodnot  $R_{\text{CT}}$  na DNA/Is-CFE jako u fluorenu. Došlo také pravděpodobně ke vmezeření 2-AF mezi vlákna DNA a ke vzniku jednořetězcových zlomů jako u fluorenu.

Stejné měření, které bylo popsáno výše, bylo zopakováno s mícháním inkubačního roztoku, bylo provedeno pro roztok fluorenu i 2-AF. Získané výsledky jsou také zobrazeny na obr. 3.18 (všechna měření ukázaná na tomto obrázku byla opakována třikrát, v grafu jsou uvedeny průměry získaných hodnot se zobrazenými intervaly spolehlivosti ve formě chybových úseček).



**Obr. 3.18**

Relativní odezva biosenzoru (vyhodnocená ze změny  $R_{CT}$ ) v závislosti na poškození DNA způsobeném inkubací v roztoku fluorenu ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l) (červený sloupec – bez míchání, zelený sloupec – s mícháním inkubovaného roztoku) a v roztoku 2-AF ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l) (modrý sloupec – bez míchání, světle modrý sloupec – s mícháním inkubovaného roztoku). Čárkovaná černá čára – 100% hodnota nepoškozené DNA a červené přerušované čáry představují její interval spolehlivosti.

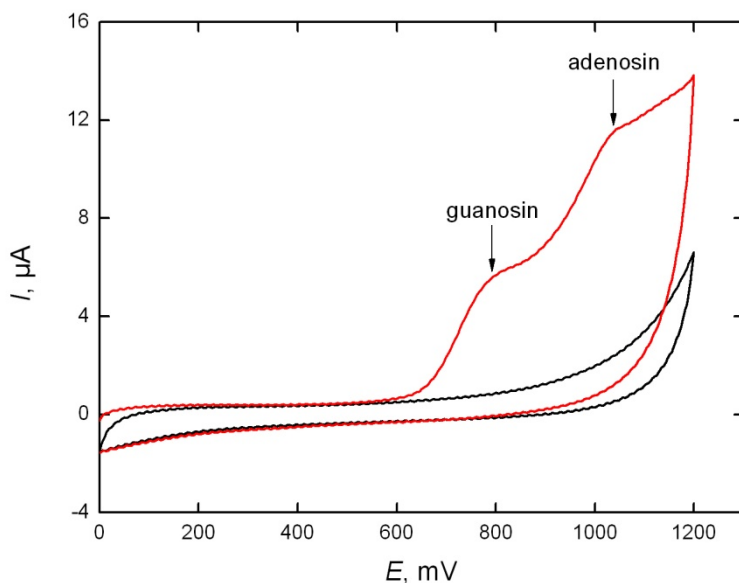
Měření EIS pro poškození DNA v roztoku fluorenu bez míchání ukázalo pokles  $R_{CT}$  o 8,5 % a s mícháním o 6 % proti hodnotě  $R_{CT}$  bez poškození DNA. Výsledkem měření EIS u poškození DNA v roztoku 2-AF bez míchání byl pokles  $R_{CT}$  o 8 % a s mícháním o 2,8 % proti hodnotě  $R_{CT}$  bez poškození DNA. K většímu poškození DNA u obou látek docházelo při měření, kdy nebylo inkubovaným roztokem mícháno. Když bylo inkubačními roztoky mícháno, docházelo vlivem většího odpadávání DNA z povrchu elektrody ke zkreslení výsledků, a celkové poškození se tak jeví menším.

Odezvy DNA biosenzoru na poškození DNA získané pomocí techniky EIS byly také porovnány s výsledky změřenými za stejných podmínek technikou CV (hodnoceno na základě veličin  $I_K$ ,  $I_A$  a  $\Delta E = |E_A - E_K|$ ) a bylo prokázáno, že jsou ve vzájemném souladu (výsledky nebyly z důvodu omezeného rozsahu bakalářské práce do práce detailně začleněny).

Další technikou použitou k potvrzení poškození DNA vlivem interakce s 2-AF byla CV v oblasti kladných potenciálů. Pomocí ní byly změřeny nejprve cyklické



voltamogramy v PBS na ls-CFE a DNA/ls-CFE při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,2 V. Na obr. 3.19 je zobrazen cyklický voltamogram pro holou ls-CFE po elektrochemické aktivaci (černá křivka) a pro DNA/ls-CFE (červená křivka), kde na prvním skenu bylo možné pozorovat anodické píky odpovídající nezoxidovaným bázím guanosinu a adenosinu, které byly také pozorovány při měření pomocí square-wave voltametrie (viz obr. 3.12, str. 32).

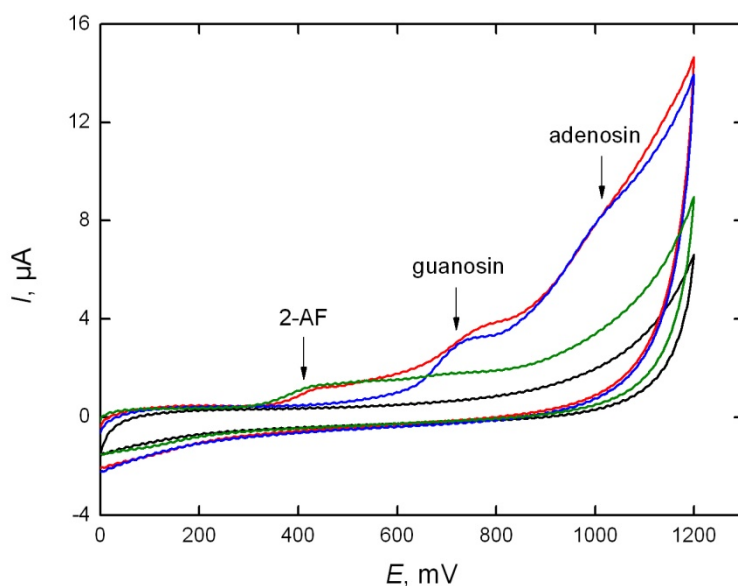


### Obr. 3.19

Cyklické voltamogramy změřené v PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7) na ls-CFE (černá křivka) a na DNA/ls-CFE (červená křivka) při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,2 V. Zobrazeny první skeny.

Nepřímé vyšetření poškození DNA interakcí s 2-AF pak bylo provedeno v prostředí PBS technikou CV na ls-CFE a DNA/ls-CFE při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,2 V (obr. 3.20). První cyklický voltamogram (černá křivka) byl změřen na holé ls-CFE, další (zelená křivka) byl změřen na DNA/ls-CFE (u které byly nejprve zoxidovány báze DNA změřením cyklického voltamogramu po akumulaci DNA) inkubované 10 minut v roztoku 2-AF s mícháním; na voltamogramu je možné pozorovat pík naakumulovaného 2-AF, který nebyl z povrchu DNA/ls-CFE vymyt ani po důkladném opláchnutí – jedná se tedy o prokázání vzniku aduktu interkalativního nebo kovalentního typu, protože bylo předchozím pokusem zjištěno, že na holou ls-CFE se 2-AF samovolně neadsorbuje [49]. Třetí cyklický voltamogram (modrá křivka) byl změřen

na DNA/ls-CFE po 10 minách inkubace v 1% roztoku ethanolu v PBS s mícháním; zde bylo možné pozorovat píky bází DNA (guanosin a adenosin). Poslední cyklický voltamogram (červená křivka) byl změřen na DNA/ls-CFE, která byla inkubována 10 minut v roztoku 2-AF ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l), a lze na něm pozorovat tři píky. První pík patří naakumulovanému 2-AF, druhý guanosinu a třetí adenosinu, které byly poškozeny interakcí s 2-AF. Měření poškození DNA interakcí s 2-AF pomocí CV ukázalo pokles píku guanosinu o 32 % oproti nepoškozené DNA na ls-CFE.



**Obr. 3.20**

Cyklické voltamogramy změřené v PBS ( $c = 0,1$  mol/l, pH 6,7) na holé ls-CFE (černá křivka), na DNA/ls-CFE, která byla inkubována 10 minut v roztoku 2-AF ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l) a báze DNA byly předem zoxidovány (zelená křivka), na DNA/ls-CFE, která byla inkubována 10 minut v 1% roztoku ethanolu v PBS (modrá křivka) a na DNA/ls-CFE, která byla inkubována 10 minut v roztoku 2-AF ( $c = 1 \cdot 10^{-5}$  mol/l), při potenciálovém rozsahu od 0 do 1,2 V. Inkubace byly provedeny s mícháním inkubačního roztoku. Zobrazeny první skeny.

## 4 Závěr

V předložené bakalářské práci byla provedena optimalizace přípravy a charakterizace nového elektrochemického DNA biosenzoru a bylo ukázáno jeho možné využití při detekci poškození DNA chemickými karcinogeny znečišťujícími životní prostředí – polyaromatickým uhlovodíkem fluorenem a jeho aminoderivátem 2-aminofluorenem (2-AF).

Biosenzor byl založen na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (ls-CFE) a nízkomolekulární DNA z lososích spermií imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu. Složení uhlíkového filmu bylo optimalizováno a testováno pomocí cyklické voltametrie (CV), při níž byl využit redoxní indikátor  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  ( $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ). Velkoplošná uhlíková filmová elektroda připravená z uhlíkového inkoustu o optimalizovaném složení (směs 0,09 g mikrokryalického grafitu CR 2 a 0,01 g polystyrenu v 0,5 ml 1,2-dichlorethanu) byla použita pro přípravu zmíněného DNA biosenzoru – velkoplošné uhlíkové filmové elektrody modifikované DNA (DNA/ls-CFE). Pomocí CV a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) byla testována optimální koncentrace DNA a doba její akumulace na ls-CFE. Hmotnostní koncentrace DNA 10 mg/ml byla zvolena jako optimální pro akumulaci na elektrodu při vloženém potenciálu 0,5 V po dobu 1 minuty.

Takto připravená DNA/ls-CFE byla následně použita k detekci poškození DNA chemickými karcinogeny vyskytujícími se v životním prostředí (fluoren, 2-AF). Velikost poškození byla měřena pomocí EIS (CV byla použita pouze jako srovnávací metoda) s použitím redoxního indikátoru  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ . Získané výsledky potvrdily, že přímá interakce DNA s fluorenem a 2-AF způsobuje poškození DNA. Dochází k interkalaci poškozujících látek do dvoušroubovice DNA, a ty tím způsobují vznik jednořetězcových zlomů, které odpadávají z elektrody.

DNA biosenzor vyvinutý v rámci této bakalářské práce představuje levný a snadný způsob pro detekci poškození DNA chemickými karcinogeny. V budoucnu by měla být věnována pozornost další optimalizaci a jeho podrobnější charakterizaci, především pro zlepšení citlivosti měření.

## 5 Literatura

- [1] Brett C. M. A., Brett M. O.: *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*, kap. 7, 129–150. Oxford University Press, Oxford (1994).
- [2] Navrátil T., Barek J.: Analytical applications of composite solid electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 131–147 (2009).
- [3] Feng M., Han H., Zhang J., Tachikawa H.: Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, v *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications* (Zhang X., Ju H., Wang J.), str. 460–494, Elsevier, London (2008).
- [4] Marazza G., Lucarelli F., Mascini M.: Carbon electrodes in DNA hybridisation research, v *Electrochemistry of Nucleic Acids And Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J.), str. 280–294, Elsevier, Amsterdam (2005).
- [5] Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage, *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 621–628 (1998).
- [6] Barek J., Yosypchuk B.: Analytical applications of solid and paste amalgam electrodes, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 39, 189–203 (2009).
- [7] Mirmomtaz E., Ensafi A. A., Soleimani-Zad S.: Determination of amiloride using a ds-DNA-modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals, *Electrochimica Acta*, 54, 1141–1146 (2009).
- [8] Kadioglu E., Sardas S., Aslan S., Isik E., Karakaya A.: Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease, *Biomarkers*, 9, 203–209 (2004).

- [9] Guetens G., De Boeck G., Highley M., van Oosterom A., de Bruijn E.: Oxidative DNA damage: Biological significance and methods of analysis, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 39, 331-457 (2002).
- [10] Birincioglu M., Jaruga P., Chowdhury G., Rodriguez H., Dizdaroglu M., Gates K.: DNA base damage by the antitumor agent 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide (tirapazamine), *Journal of the American Chemical Society*, 125, 11607–11615 (2003).
- [11] Ferancová A., Labuda J.: Elektrochemické biosenzory, v *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii* (Barek J.), str. 69–89, Česká společnost chemická, Praha (2006).
- [12] Wang J.: Electrochemical nucleic acid biosensors, v *Electrochemistry of Nucleic Acids And Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J.), str. 175–190, Elsevier, Amsterdam (2005).
- [13] Paleček E., Fojta M.: Detecting DNA hybridization and damage, *Analytical Chemistry*, 73, 74A–83A (2001).
- [14] Oezcan A., Sahin Y., Oezsoez M.: Electrochemical oxidation of ds-DNA on polypyrrole nanofiber modified pencil graphite electrode, *Electroanalysis*, 19, 2208–2216 (2007).
- [15] Fortin E., Chane-Tune J., Mailley P., Szunerits S., Marcus B., Petit J., Mermoux M., Vieil E.: Nucleosides and ODN electrochemical detection onto boron doped diamond electrodes, *Bioelectrochemistry*, 63, 303–306 (2004).
- [16] Stempkowska I., Liga M., Jasnowska J., Langer J., Filipiak M.: Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode, *Bioelectrochemistry*, 70, 488–494 (2007).

- [17] Barek J.: Perspektivy elektroanalytických metod, v *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii* (Barek J.), str. 3–15, Česká společnost chemická, Praha (2006).
- [18] Vyskočil V., Barek J.: Voltammetric DNA biosensor based on a microcrystalline natural graphite–polystyrene composite transducer, *Procedia Chemistry*, 6, 52–59 (2012).
- [19] Jelen F., Tomschik M., Paleček E.: Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 423, 141–148 (1997).
- [20] Paleček E., Jelen F.: Electrochemistry of nucleic acids, v *Electrochemistry of Nucleic Acids And Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J.), str. 74–153, Elsevier, Amsterdam (2005).
- [21] Tomschik M., Jelen F., Havran L., Trnková L., Nielsen P., Paleček E.: Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 476, 71–80 (1999).
- [22] Oliveira-Brett A. M., Brett C. M. A., Silva L. A.: An impedance study of the adsorption of nucleic acid bases at glassy carbon electrodes, *Bioelectrochemistry*, 56, 33–35 (2002).
- [23] Oliveira-Brett A. M., Silva L. A., Brett C. M. A.: Adsorption of guanine, guanosine, and adenine at electrodes studied by differential pulse voltammetry and electrochemical impedance, *Langmuir*, 18, 2326–2330 (2002).
- [24] Singhal P., Kuhr W.: Direct electrochemical detection of purine- and pyrimidine-based nucleotides with sinusoidal voltammetry, *Analytical Chemistry*, 69, 3552–3557 (1997).

- [25] Johnson D., LaCourse W.: Liquid-chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum-electrodes, *Analytical Chemistry*, 62, 589A–597A (1990).
- [26] Hlavatá L.: Možnosti komplexnej elektrochemickej detekcie štruktúrneho poškodenia DNA, diplomová práca, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava (2011).
- [27] Galandova J., Ziyatdinova G., Labuda J.: Disposable electrochemical biosensor with multiwalled carbon nanotubes–chitosan composite layer for the detection of deep DNA damage, *Analytical Science*, 24, 711–716 (2008).
- [28] Park J., Park S.: DNA Hybridization sensors based on electrochemical impedance spectroscopy as a detection tool, *Sensors*, 9, 9513–9532 (2009).
- [29] Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E.: Electrochemical biosensors – Sensor principles and architectures, *Sensors*, 8, 1400–1458 (2008).
- [30] Labuda J., Bubnicova K., Kovalova L., Vanickova M., Mattusch J., Wennrich R.: Voltammetric detection of damage to DNA by arsenic compounds at a DNA biosensor, *Sensors*, 5, 411–423 (2005).
- [31] Sigma-Aldrich: *Bezpečnostní list*, Praha (2012).
- [32] Kolomytseva M. P., Randazzo D., Baskunov B. P., Scozzafava A., Briganti F., Golovleva L. A.: Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469, *Bioresource Technology*, 100, 839–844 (2009).
- [33] Chupungars K., Rerngsamran P., Thaniyavarn S.: Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Agrocybe* sp. CU-43 and its fluorene transformation, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63, 93–99 (2009).

- [34] Grifoll M., Casellas M., Bayona J. M., Solanas A. M.: Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2910–2917 (1992).
- [35] Casellas M., Grifoll M., Bayona J. M., Solanas A. M.: New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 819–826 (1997).
- [36] Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche C.: Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp., *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1927–1930 (1993).
- [37] Yang Y., Chen R. F., Shiaris M. P.: Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: Preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816, *Journal of Bacteriology*, 176, 2158–2164 (1994).
- [38] Monna L., Omori T., Kodama T.: Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 285–289 (1993).
- [39] Meneni S. R., Shell S. M., Gao L, Jurečka P., Lee W., Sponer J., Zou Y., Chiarelli M. P., Cho B. P.: Spectroscopic and theoretical insights into sequence effects of aminofluorene-induced conformational heterogeneity and nucleotide excision repair, *Biochemistry*, 46, 11263–11278 (2007).
- [40] Moreira J. C., Berek J.: Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, *Química Nova*, 18, 362–367 (1995).



- [41] Ueda O., Kitamura S., Kubo R., Yano Y., Kanzaki Y., Fujimoto T., Tatsumi K., Ohta S.: Metabolism of 2-nitrofluorene, 2-aminofluorene and 2-acylamino fluorenes in rat and dog and the role of intestinal bacteria, *Xenobiotica*, 31, 33–49 (2001).
- [42] Dutta S., Li Y., Johnson D., Dzantiev L., Richardson C. C., Romano L. J., Ellenberger T.: Crystal structures of 2-acetylamino fluorene and 2-aminofluorene in complex with T7 DNA polymerase reveal mechanisms of mutagenesis, *PNAS*, 101, 16186–16191 (2004).
- [43] Luch A.: Nature and nurture – Lessons from chemical carcinogenesis, *Nature Reviews Cancer*, 5, 113–125 (2005).
- [44] Armalis S., Novikova N., Kubiliene E., Zima J., Barek J.: Voltammetric determination of 2-aminofluorene and 2,7-diaminofluorene using carbon paste electrode, *Analytical Letters*, 35, 1551–1559 (2002).
- [45] Schuetzle D., Riley T., Prater T., Harvey T., Hunt D.: Analysis of nitrated polycyclic aromatic-hydrocarbons in diesel particulates, *Analytical Chemistry*, 54, 265–271 (1982).
- [46] Ueda O., Kitamura S., Ohta S.: Metabolism of 2-nitrofluorene, an environmental pollutant, by liver preparations of sea bream, *Pagrus major*, *Xenobiotica*, 32, 667–682 (2002).
- [47] Tatsumi K., Kitamura S., Amano H., Ueda K.: Comparative study on metabolic formation of *N*-arylformamides and *N*-aryl-acetamides from carcinogenic arylamines in mammalian species, *Cancer Research*, 49, 2059–2064 (1989).
- [48] Ueda O., Kitamura S., Tatsumi K.: Further metabolism of 2-formylamino fluorene, a metabolite of 2-aminofluorene, in rats, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, 330–333 (1996).

- [49] Faťárová M.: Voltammetric Determination of DNA Damage Caused by Genotoxic 2-Aminofluorene at a Carbon Film Electrode, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha (2011).
- [50] <http://www.metrohm.com/com/Produkte2/Electrodes/VASolidStateWorking.html?identifier=61204140&language=en&name=61204140>, staženo 14.5.2013.
- [51] Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. John Wiley, 3. vydání, Hoboken (2006).
- [52] Borbélyová M.: Využitie biosenzorov pri hodnotení oxidačných a antioxidačných systémov voči DNA, diplomová práce, Slovenská technická univerzita v Bratislavě, Bratislava (2012).