

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Zuzana Hrochová

**Nový voltametrický DNA biosenzor pro detekci
poškození DNA onkologickými léčivy**

**Novel Voltammetric DNA Biosensor for the Detection
of the DNA Damage Caused by Oncological Drugs**

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

Podpis

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na optimalizaci podmínek pro použití jednoduchého voltametrického DNA biosenzoru, založeného na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě (Is-CFE), při detekci poškození DNA onkologickými léčivými. Is-CFE byla použita pro svoje výhodné vlastnosti, mezi které patří její rychlá příprava, jednoduchá mechanická obnova elektrodového povrchu, dobrá reprodukovatelnost výsledků, jednoduchá chemická modifikace a v neposlední řadě nízké výrobní náklady.

Hlavním optimalizačním parametrem v této práci byl obsah ethanolu v roztoku, ve kterém byl biosenzor inkubován spolu s poškozující látkou. Byly testovány obsahy ethanolu v rozmezí 0 až 50 % (V/V) ethanolu v 0,1 mol/l fosfátovém pufru o pH 7,15 (PBS). Měření po inkubaci biosenzoru byla prováděna pomocí cyklické voltametrie (CV) za přítomnosti redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ v prostředí PBS. Jako optimální obsah ethanolu bylo zvoleno 5 %.

Následně byl DNA biosenzor, jehož příprava byla již dříve optimalizována v předešlé bakalářské práci, využit při detekci poškození DNA modelovým cytostatikem – Elipticinem (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol). Pomocí techniky CV a redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ byla proměřena odezva biosenzoru na poškození DNA přímou interakcí s Elipticinem v závislosti na čase inkubace a koncentraci Elipticinu v inkubačním roztoku. Získané výsledky potvrdily, že při interakci s DNA se Elipticin začleňuje do její struktury, a způsobuje tak její poškození, závislé na obou sledovaných proměnných, ve formě zlomů vláken její dvoušroubovicové struktury.

Abstract

This Bachelor Thesis is focused on the optimization of conditions for the use of a simple voltammetric DNA biosensor, based on a large-surface carbon film electrode (ls-CFE), for the detection of the DNA damage caused by oncological drugs. ls-CFE was used for its advantageous properties, such as its fast preparation, a simple mechanical renewal of the electrode surface, a good reproducibility of results, a simple chemical modification, and, last but not least, low preparation costs.

A content of ethanol in the solution, in which the biosensor was incubated together with the damaging agent, was the main optimization parameter investigated in this Thesis. The contents of ethanol in the range from 0 to 50 % (v/v) of ethanol in 0.1 mol/l phosphate buffer of pH 7.15 (PBS) were tested. After the incubation of the biosensor, the measurements were performed using cyclic voltammetry (CV) in the presence of the redox indicator $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ in PBS. The optimum content of ethanol was found as 5 %.

Afterwards, the DNA biosensor, which preparation was optimized in a previous Bachelor Thesis, was used for the detection of the DNA damage caused by model cytostatic agent – Ellipticine (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol). Using the CV technique and the redox indicator $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, the response of the biosensor to the DNA damage caused by the direct interaction with Ellipticine was measured in the dependence on an incubation time and a concentration of Ellipticine in the incubation solution. The obtained results confirmed that at the interaction of Ellipticine with DNA, Ellipticine is incorporated into the DNA structure, which induces its damage (dependent on both monitored variables) in the form of strand breaks of the DNA double-stranded structure.

Klíčová slova

Velkoplošná uhlíková filmová elektroda

DNA biosenzor

Cyklická volumetrie

Detekce poškození DNA

Cytostatikum

Elipticin

Key words

Large surface carbon film electrode

DNA biosensor

Cyclic voltammetry

DNA damage detection

Oncological drugs

Ellipticine

Poděkování

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

Mé poděkování dále patří mé rodině a mým přátelům za všestrannou pomoc při studiu.

Seznam použitých zkratek

A	absorbance
CV	cyklická volumetrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/ls-CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda modifikovaná DNA
E	elektrický potenciál (V)
E_A	anodický (oxidační) potenciál (V)
E_K	katodický (redukční) potenciál (V)
Fe^{II}/Fe^{III}	redoxní systém $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$
I	elektrický proud (A)
I_A	velikost anodického píku (A)
I_K	velikost katodického píku (A)
I_p	výška píku (A)
ls- CFE	velkoplošná uhlíková filmová elektroda
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
c	molární koncentrace (mol/l)
v	rychlost polarizace (mV/s)

Obsah

1. Teoretická část.....	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Uhlíkové elektrody.....	9
1.2.1 DNA biosenzory	10
1.3 Elektrochemické techniky.....	11
1.3.1 Cyklická voltametrie (CV).....	11
1.4 Elipticin.....	12
1.4.1 Metabolismus	13
2. Experimentální část	15
2.1 Přístroje a zařízení.....	15
2.2 Chemikálie a roztoky	15
2.3 Pracovní postupy	16
2.3.1 Příprava velkoplošné uhlíkové filmové elektrody.....	16
2.3.2 Příprava DNA biosenzoru.....	17
2.3.3 Elektrochemické měření cyklické voltametrie	17
2.3.4 Vyhodnocování výsledků	18
3. Výsledky a diskuze	19
3.1 Charakterizace elektrochemického chování velkoplošné uhlíkové elektrody (ls-CFE).....	19
3.2 Detekce poškození DNA cytostatikem	26
4 Závěr.....	30
5 Literatura.....	31

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo charakterizovat elektrochemické chování velkoplošné uhlíkové filmové elektrody (Is-CFE) v ethanolických roztocích o různé koncentraci s využitím metody cyklické voltametrie a následné využití DNA biosenzoru založeného na Is-CFE a nízkomolekulární DNA (získané z lososích spermií a imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu) pro voltametrickou detekci poškození DNA cytostatickým léčivem Elipticin, který slouží jako modelové cytostatikum.

1.2 Uhlíkové elektrody

Principem voltametrického stanovení je měření proudu, který prochází pracovní elektrodou v závislosti na potenciálu, který je na tuto elektrodu vložen. Je proto velmi důležité, jakou má pracovní elektroda vodivost. Hlavním faktorem, který ovlivňuje vodivost elektrody je materiál, ze kterého je složena. V současné době jsou velmi populární uhlíkové elektrody, které se používají již více než 20 let. Jsou oblíbené díky dobrým elektrochemickým vlastnostem, mezi které patří široké potenciálové okno, nízký šum pozadí, velký povrch elektrody, snadné obnovení povrchu a nízká cena. Asi nejdůležitější vlastnosti uhlíkových elektrod je jejich odolnost vůči pasivaci, která představuje komplikaci při jakékoli elektrochemické analýze [1-3].

Pevné (tzv. kompozitní) elektrody jsou složeny z vodivé a nevodivé (izolační) části. Nejčastějšími elektrodovými materiály kompozitních elektrod jsou zlato, platina nebo uhlík. Jako vodivý materiál pro pevné uhlíkové elektrody se používají nejrůznější formy uhlíku (skelný uhlík, uhlíková vlákna, pyrolytický grafit, uhlíkové nanočástice, uhlíkové pasty a uhlíkové filmy) [1,3-5]. Jako izolační vrstva se nejčastěji používají polymerní materiály, např. Teflon, PVC, polystyren, polyetylen. Kompozitní elektrody se využívají při analýzách, které probíhají v oblasti anodické oxidace i katodické redukce [1,3]. Povrch kompozitních elektrod může být modifikován filmem rtuti, silikagelem, uhlíkovými nanotrubičkami, zlatými nanovláknky či filmem biopolymeru DNA [1,3].

Jednou z modifikací pevných uhlíkových elektrod jsou uhlíkové filmové elektrody. Modifikace spočívá v tom, že na povrch pracovní elektrody se nanese film z uhlíkového inkoustu, který vylepší elektrochemické vlastnosti elektrody. Vylepšení se týká hlavně reprodukovatelnosti výsledků, rozšíření potenciálového rozsahu měření a snadného odstranění a obnovení filmu na povrchu elektrody [1]. Rozšíření potenciálového rozsahu měření se týká elektrod, které nemohou využívat reakce probíhající v oblasti katodické redukce z důvodu nízkého přepětí vodíku (např. zlatá elektroda) [1,5].

1.2.1 DNA biosenzory

Elektrochemické biosenzory jsou senzory, které ve své struktuře obsahují biologickou složku (např. DNA, enzym, tkáň, vrstva buněk). Biosenzor je většinou složen ze tří základních částí:

- a) z části citlivé na konkrétní analyt, která obsahuje biologický materiál,
- b) převodníku mezi vrstvou biologického materiálu a detektorem,
- c) detektoru, který vyhodnotí signál z biologické části.

V případě DNA biosenzorů se jedná o senzory, které mají ve své struktuře zabudovanou DNA [10,11]. DNA může být na povrch elektrody vázána různými mechanismy. Mezi nejjednodušší mechanismy patří prostá fyzikální adsorpce. Další možností je využití chemisorpce, kdy se oligonukleotidové konce DNA s $-SH$ skupinami váží na povrch elektrody a vytváří organizovanou monovrstvu. Mezi alternativy upevnění DNA na povrchu elektrody patří také modifikace samotného povrchu elektrody, který může být modifikován nano- nebo mikročásticemi, hydrofilním či hydrofobním polymerem nebo membránou [7,8,12]. Samostatnou skupinu tvoří DNA biosenzory, kde je DNA zabudována přímo do elektrodového materiálu (např. modifikovaná uhlíková pasta) [12]. DNA biosenzory mají velmi široký rozsah použití, nacházejí uplatnění při měření interakce DNA s nejrůznějšími léčivy, těžkými kovy, polutanty životního prostředí nebo při detekci přítomnosti specifický úseků lidské, zvířecí, bakteriální či virové DNA [10,11]. DNA biosenzory představují moderní směr vývoje analytické chemie a jsou rychlou, levnou, dobře reprodukovatelnou, energeticky nenáročnou a jednodušší alternativou oproti klasicky používaným metodám, jako je gelová elektroforéza či membránové bloty [9,10].

DNA je sama o sobě elektrochemicky aktivní látka. Změně její struktury v důsledku zlomu vlákna, oxidativní změně bází či začlenění látky do jejího řetězce odpovídá změna v poskytovaném signálu [28]. Klinické využití DNA biosenzorů je hlavně v oblasti detekce poškození DNA cytostatiky. Jedná se o cytostatika, která se začleňují do struktury DNA, se kterou tvoří adukty, které jsou následně detekovány. Nejvíce je tato oblast prostudována pro cytostatika s obsahem platiny (cisplatina, karboplatina a oxaliplatina) [12]. Kde platina tvoří komplexy, které se začlení do struktury DNA a následně blokují její transkripci, což vede k apoptóze nádorových buněk [6,7]. Mezi nejpoužívanější elektrody pro detekci poškození DNA cytostatiky patří rtuťové a uhlíkové elektrody [12,14]. Ukazuje se, že uhlíkové elektrody mají mnohem větší efektivitu při měření, a proto se oblast výzkumu zaměřuje právě na konstrukci nových typů uhlíkových elektrod, mezi které patří právě velkoplošná uhlíková filmová elektroda (Is-CFE) [13], která byla používána při měření v této bakalářské práci.

1.3 Elektrochemické techniky

1.3.1 Cyklická voltametrie (CV)

Cyklická voltametrie je metoda odvozená od polarografie. Jedná se o jednoduchou, levnou a široce vyžívanou metodu, která poskytuje informace o elektrodoých procesech. U cyklické voltametrie je elektrodový potenciál lineárně závislý na čase, jedná se tedy o nestacionární techniku. Nejčastěji se používá tříelektrodové uspořádání, kdy proud prochází jen mezi pracovní a pomocnou elektrodou a hodnoty vkládaného potenciálu se měří mezi referentní a pracovní elektrodou za bezproudového stavu. CV je metoda, při které se na pracovní elektrodu vkládá potenciál, který má trojúhelníkový průběh.[4.5.29] Výsledkem závislosti procházejícího elektrického proudu (I , A) na elektrodoém potenciálu (E , V) je polarizační křivka, která má většinou tvar píku. Vzniklý voltamogram může rozdělit na dopředný a zpětný sken.[29,30] Systémem bude procházet proud jen v případě, že v blízkosti pracovní elektrody bude přítomna látka, která je schopna se oxidovat či redukovat. Proud tedy poroste až do okamžiku, kdy v blízkosti elektrody nebude přítomna žádná látka, která by byla schopna redoxní reakce. CV využívá toho, že difúze je poměrně pomalý proces a při dostatečně vysoké

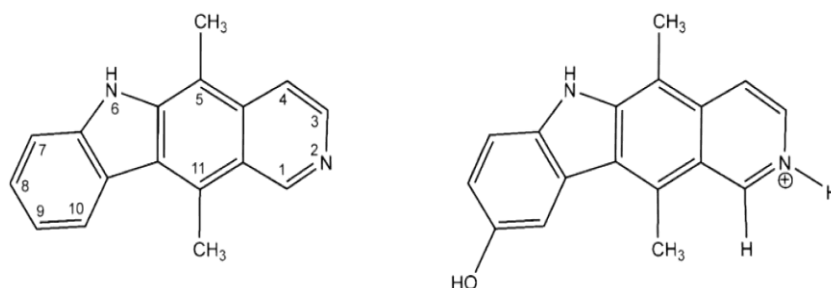
rychlosti polarizace můžeme při zpětném skenu detekovat produkty elektrodové reakce. Můžeme tak charakterizovat děje reverzibilní, ireverzibilní či kvazireverzibilní.[4.5]

Při reakci reverzibilního redoxního systému mají redukční (katodické) a oxidační (anodické) píky stejný tvar. Pokud jsou píky asymetrické, jedná se o systém ireverzibilní či kvazireverzibilní. V ideálním případě by měl být potenciálový rozdíl mezi katodickým a anodickým potenciálem $|E_A - E_K| = 0,59/z$, a poměr maximálního anodického a maximálního katodického proudu by měl být roven jedné. Prakticky je potenciálový rozdíl pro jednoelektronový systém roven hodnotám 70-100 mV.[5, 29]

CV je také hojně využívána při měření s využitím DNA biosenzorů, které detekují přítomnost DNA, její poškození či hybridizaci. Poškození DNA měřené pomocí CV bývá měřeno za přítomnosti redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Změna velikosti proudu procházejícího systémem je úměrná množství adsorbované DNA na povrchu elektrody [28].

1.4 Elipticin

Elipticin, chemickým názvem 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol (obr. 1.1) [31], patří mezi přírodní alkaloidy, které se vyskytují v rostlinách z čeledi *Apocyanaceae* - toješťovitě. Poprvé byl izolován v roce 1959 z listů stálezeleného stromu *Ochrosia elliptica*, který roste v severozápadní Austrálii [15,16,20,27]. Spolu s Elipticinem byly izolovány také jeho deriváty 9-hydroxyelipticin (obr. 1.1), 9-hydroxy-2N-methyl-elipticin a další, které jsou lépe rozpustné ve vodném prostředí než samotný elipticin. [23,24,25].

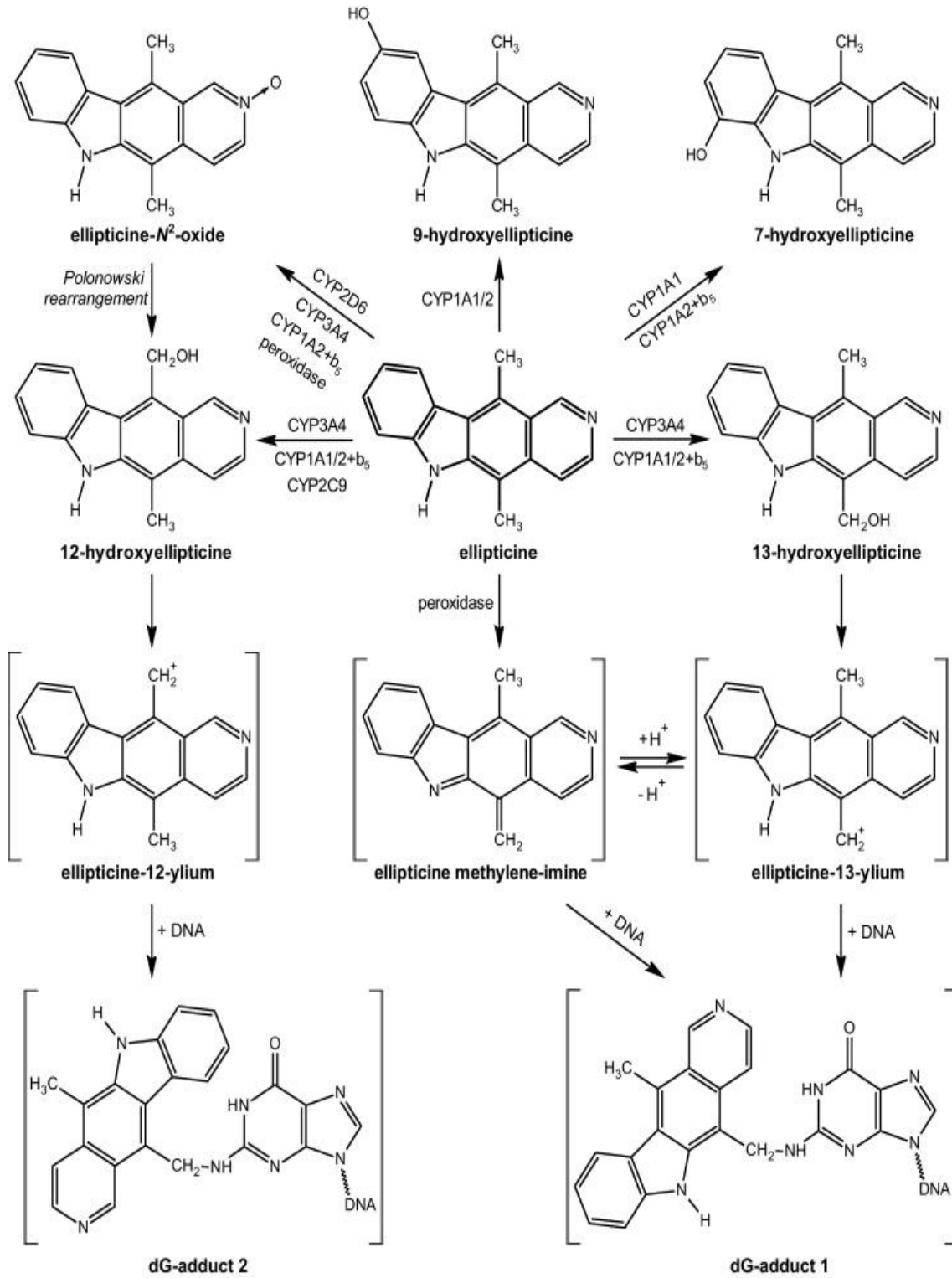


Obr. 1.1 Strukturní vzorec Elipticinu a 9-hydroxyelipticinu

Elipticin a jeho deriváty mají cytotoxický a mutagenní potenciál. Díky cytotoxickým účinkům je Elipticin používán jako lék při léčbě mnoha druhů rakoviny, např. neuroblastomu, leukémie či rakoviny jater a plic [19,21,23]. Výhodou Elipticinu je, že má malé vedlejší účinky a nepatrný vliv na krevetvorbu [18,23,25]. V některých případech je také používán při léčbě HIV či malárie [15,17,23]. Má dva hlavní mechanismy účinku na buňku, a to začlenění do DNA a inhibice Topoisomerasy II [17,18,21,26,27]. Dalším mechanismem účinku je vznik kovalentní vazby mezi Elipticinem a DNA, ale až po enzymatické aktivaci cytochromem P450 nebo peroxidasou [19,22,27]. Planární aromatické struktury se začleňují do struktury DNA a vedou ke stabilizaci, prodloužení a konformačním změnám řetězce. Všechny tyto změny mají vliv na řadu enzymatických procesů a vedou k ireverzibilním změnám na DNA, které způsobí apoptózu rakovinových buněk. Elipticin a 9-hydroxyelipticin dále působí selektivní inhibici fosforylace proteinu p53 a dále naruší oxidativní fosforylaci v buňkách, čímž jim také navodí apoptózu [20,23,24].

1.4.1 Metabolismus

Elipticin je v lidském těle metabolizován především pomocí cytochromů a peroxidas (viz obr. 1.2). Cytochromy oxidují Elipticin a zbudovávají do jeho struktury atom kyslíku [23,25]. Takto vznikají hlavní metabolity 13-hydroxyelipticin, 12-hydroxyelipticin, N2-oxid elipticin, 7-hydroxyelipticin a 9-hydroxyelipticin [24,25]. Hlavním metabolitem při reakci Elipticinu s peroxidasou je dimer Elipticinu a v menší míře vzniká N2-oxid, který není totožný s produktem cytochromu [25]. Protonizované formy 13-hydroxy- a 12-hydroxyelipticinu reagují s nukleofilním centrem deoxyguanosinu, a tak se začleňují do struktury DNA [24,25].



Obr. 1.2 Metabolismus Ellipticinu

2. Experimentální část

2.1 Přístroje a zařízení

Veškerá měření prováděná v rámci této bakalářské práce, jako byly CV, aktivace elektrody a akumulace DNA na povrch pracovní elektrody, byly prováděny se sestavou Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR) s využitím softwaru Polar, verze 5.1 PRO. K měření bylo využito tříelektrodového uspořádání. Jako referentní elektroda byla použita elektroda argentschloridová (typ RAE 113, 1 mol/l KCl, Monokrystaly, ČR). Pracovní elektroda byla zlatá elektroda (typ 6.1204.140, Metrohm, Švýcarsko), která byla pokryta uhlíkovým filmem, a tím byla vytvořena velkoplošná uhlíková elektroda (ls-CFE). Pomocnou elektrodou byla elektroda platinová (typ PPE, Monokrystaly, ČR). Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Agilent 8453 s využitím softwaru UV-Visible CHemStation verze 9,01. Získaná data a následné grafy byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

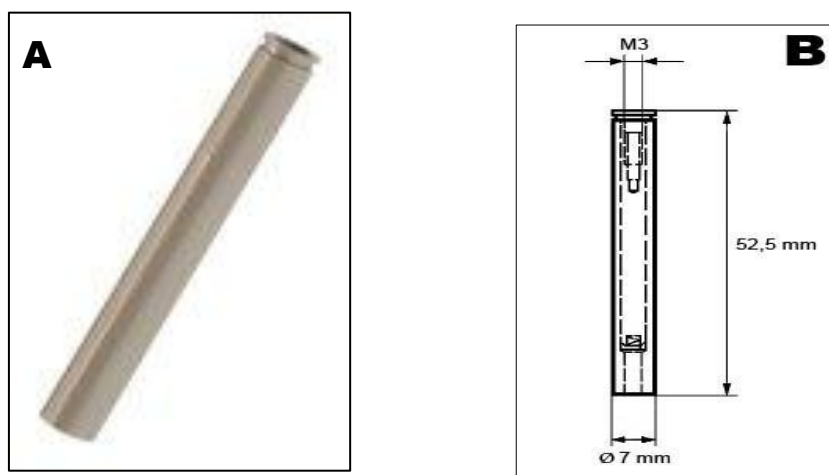
2.2 Chemikálie a roztoky

- mikrokrytalický grafit CR-2 (99,5%, zrnitost 3,5-5,5 μm , Graphite Týn, ČR)
- 1,2-dichlorethan (čistota p.a., Merck, Německo)
- pěnový obalový polystyren
- Elipticin (5 mg, Sigma-Aldrich, ČR)
- ethanol (96 %, Lach-Ner, ČR)
- nízkomolekulární DNA z lososích spermii (Sigma-Aldrich, 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 7,15
- ekvimolární směs $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ v PBS, koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- roztok DNA v PBS, koncentrace 10 mg/ml
- deionizovaná voda, připravená systémem Millipore Q-plus (Millipore, USA)

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Příprava velkoplošné uhlíkové filmové elektrody

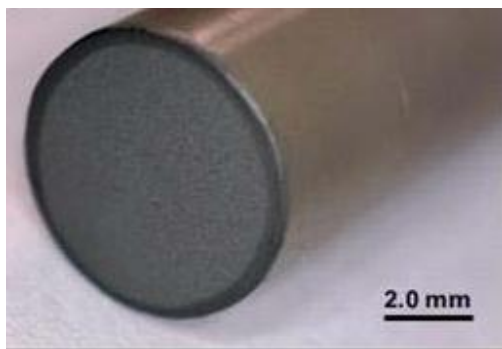
Pracovní elektrodou byla zvolena pevná zlatá elektroda, která byla tvořena zlatým diskem o rozměrech $2,0 \pm 0,1$ mm a plastovým tělem, jehož průměr byl 0,7 mm. (obr. 2.1). Tělo elektrody bylo tvořeno polyether ether ketonem (PEEK). Na povrch pracovní elektrody byl nanesen uhlíkový film.



Obr. 2.1 Pevná zlatá elektroda; (A) fotografii poskytuje výrobce [32], technický náčrt elektrody (B)

Uhlíkový film tvořil uhlíkový inkoust, který byl připraven smícháním 0,01 g polystyrenu, 0,09 g uhlíku (mikrokrystalický grafit CR-2) a 0,5 ml 1,2-dichlorethanu. Takto vzniklý inkoust se míchal 2 min na laboratorní míchačce Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, USA) a na povrch elektrody bylo nanášeno 10 μ l inkoustu pomocí automatické pipety. Film se nechal schnout přibližně 2 min.

Po zaschnutí se na povrchu elektrody vytvořil kompaktní film (obr. 2.2) a elektrodu bylo možné použít k měření. Mechanicky poškozené či již použité filmy byly z povrchu elektrody jednoduše odstraněny setřením o filtrační papír. Pokud na povrchu elektrody zůstaly ještě nějaké nečistoty, byly odstraněny filtračním papírem navlhčeným ethanolem. Před nanášením nového filmu se inkoust znova asi 2 min promíchal.



Obr. 2.2 Povrch elektrody po nanesení uhlíkového filmu [28]

2.3.2 Příprava DNA biosenzoru

Před aplikací DNA na povrch uhlíkové filmové elektrody (Is-CFE) byl její povrch aktivován z důvodu odstranění naadsorbovaných a zoxidovaných látek. Elektroda byla aktivována při vloženém potenciálu 1500 mV po dobu 180 s za stálého míchání v roztoku PBS.

Na takto aktivovanou elektrodu byla akumulována DNA, čímž byla připravena DNA modifikovaná elektroda (DNA/Is-CFE). Zaktivovaná elektroda byla ponořena do roztoku DNA, který byl připraven rozpuštěním 100 mg DNA v 10 ml PBS, a za stálého míchání na ni byl vložen potenciál 500 mV po dobu 1 min.

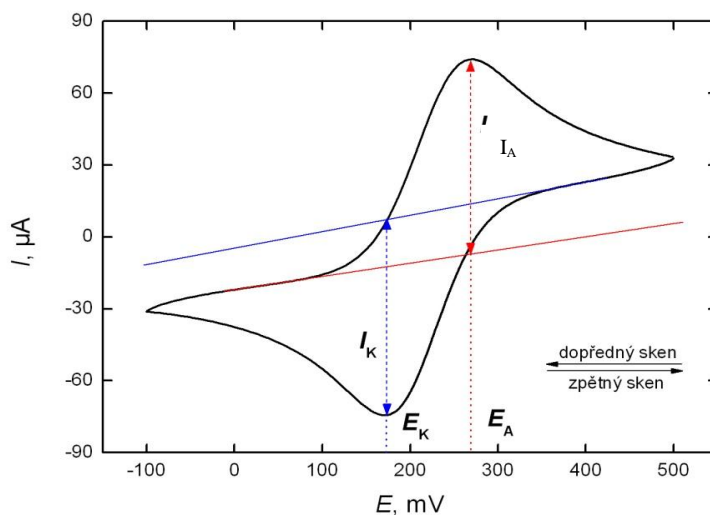
2.3.3 Elektrochemické měření cyklické voltametrie

Měření byla prováděna v ekvimolární směsi $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l za laboratorní teploty. Rychlost polarizace byla 50 mV/s a potenciálový rozsah měření byl od 500 mV do -100 mV. Vždy byly provedeny 3 skeny. Vyhodnocen byl až třetí voltamogram, který přesně přepisoval voltamogram druhý. Získané výsledky tedy reprezentovaly již ustálený stav.

2.3.4 Vyhodnocování výsledků

Při vyhodnocování voltamogramů získaných CV byly zjišťovány dva parametry (obr. 2.3) a to:

- velikost redukčního (katodického) proudu (I_K) a oxidačního (anodického) proudu (I_A)
- rozdíl mezi potenciálem katodického píku (E_K) a anodického píku (E_A)



Obr. 2.3

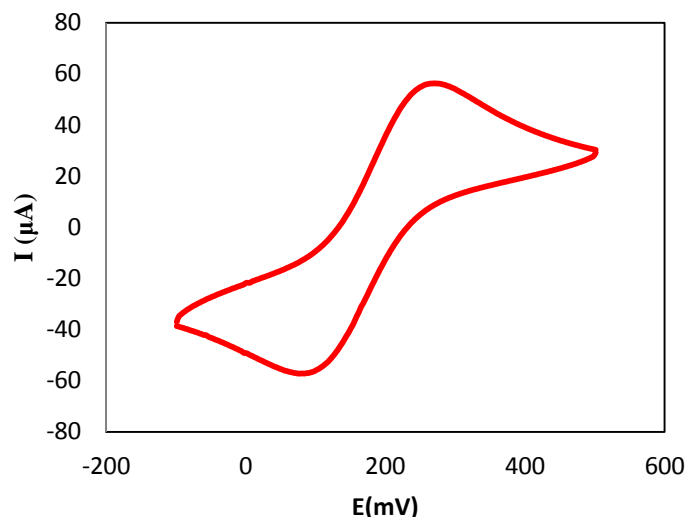
Grafické znázornění vyhodnocení voltamogramů CV; I_A – výška anodického píku, I_K – výška katodického píku, E_A – potenciál anodického píku, E_K – potenciál katodického píku.

3. Výsledky a diskuze

3.1 Charakterizace elektrochemického chování velkoplošné uhlíkové elektrody (Is-CFE)

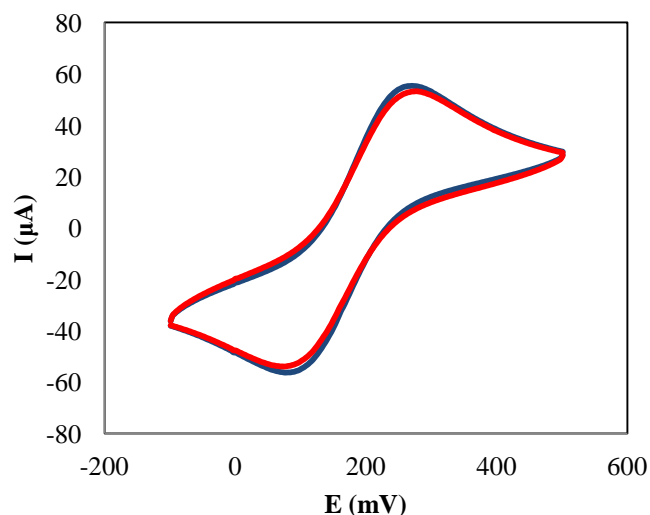
Velkoplošná uhlíková elektroda (Is-CFE) byla připravena nanesením uhlíkového filmu na povrch pracovní elektrody. Uhlíkový film tvořil uhlíkový inkoust připravený z 0,01 g polystyrenu, 0,09 g uhlíku (mikrokrytalický uhlík CR2) a 500 μ l 1,2-dichlorethanu. Chování uhlíkového filmu bylo sledováno pomocí indikátorového systému $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, pH = 7,15). Jako metoda měření byla použita cyklická voltametrie (CV) s potenciálovým rozsahem -100 až 500 mV. Vždy byly provedeny tři skeny s tím, že k vyhodnocení byl použit až třetí ustálený sken.

V první fázi měření bylo sledováno chování elektrodového povrchu v závislosti na množství etanolu v reakčním prostředí. K měření se použila aktivovaná a ustálená elektroda. Elektroda se nechala vždy za stálého míchání 5 minut inkubovat v daném roztoku a následně bylo provedeno měření. Před inkubací v koncentrovanějším roztoku byl povrch elektrody očištěn pomocí filtračního papíru či ethanolem navlhčeného filtračního papíru a následně byl nanesen nový inkoustový film. Bylo provedeno měření pro procentuální obsah etanolu od 1 do 50 % (1, 3, 5, 10, 20, 30 a 50% ethanolu v PBS). Jak je vidět na obr. 3.1 povrch elektrody se v rozsahu 1 až 5 % etanolu v PBS chová naprosto stejně a nedochází na něm k žádným funkčním ani mechanickým změnám.



Obr. 3.1

Cyklický voltamogram pro redoxní systém $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, $\text{pH} = 7,15$) po inkubaci v 1%, 3% a 5% roztoku ethanolu v PBS při rychlosti polarizace 50 mV/s. Inkubace trvala vždy 5 minut za stálého míchání.

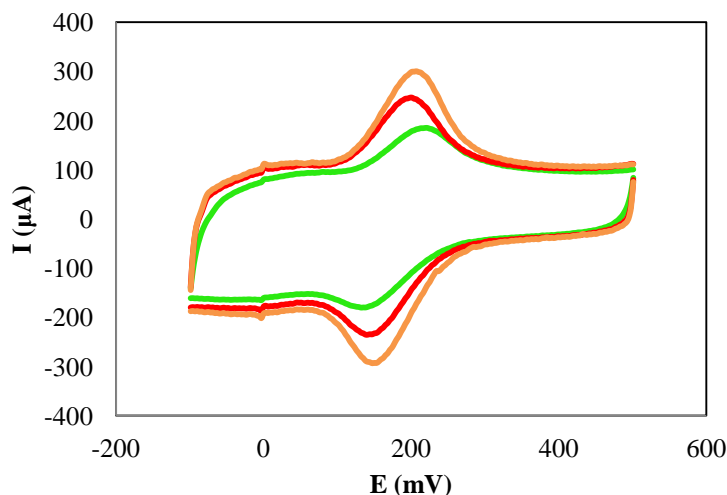


Obr. 3.2

Cyklický voltamogram pro redoxní systém $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, $\text{pH} = 7,15$) po 5 minutové inkubaci v 5% ethanolickém roztoku (červená čára) a 10% ethanolickém roztoku (modrá čára).

Při proměření závislosti pro 10% ethanolický roztok v PBS se ukázalo, že již dochází ke změně povrchu pracovní elektrody (obr. 3.2). Tato změna byla reprezentována změnou hodnoty poměru katodického (I_K) a anodického proudu (I_A), viz tab. 3.1. Stejným způsobem byla proměřena závislost pro 20%, 30% a 50% ethanolický roztok. Jak je vidět na obr. 3.3, chování elektrody ve více koncentrovanějším roztoku ethanolu

je značně odlišné ve srovnání s chováním elektrody z obr. 3.1. Vlivem vysoké koncentrace ethanolu dochází k chemickému narušování povrchu elektrody, což vede ke zvětšení reakční plochy a následně ke zvýšené odezvě elektrody.



Obr. 3.3

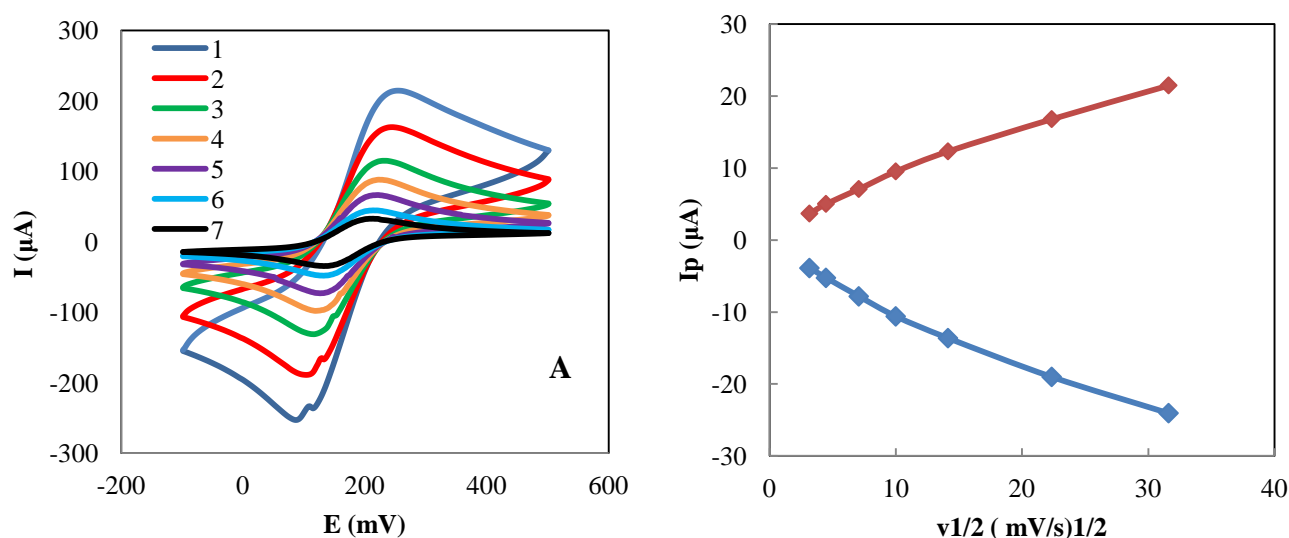
Cyklický voltamogram pro redoxní systém $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v ($c = 0,1$ mol/l, $\text{pH} = 7,15$) po 5 minutové inkubaci v 20% ethanolickém roztoku (zelená čára), 30% ethanolickém roztoku (červená čára) a 50% ethanolickém roztoku (oranžová čára).

Nejvyšší oxidační a redukční proudy píků byly získány pro 5% a 10% ethanolický roztok, jejich poměr se nejvíce blížil ideálnímu chování reverzibilního systému. Koncentrovanější roztoky již vykazovaly značný odklon od ideálního chování, kdy se poměr jejich katodických a anodických proudů píků pohyboval kolem hodnoty 0,6 (viz tab. 3.1), ale rozdíl jejich katodických a anodických potenciálů píků se pohyboval kolem hodnoty 48 mV. Jako ideální roztok pro práci s elektrochemicky aktivovanou ls-CFE byl zvolen roztok o obsahu 5% etanolu v PBS, kdy povrch elektrody jevil nejmenší odklon od ideálního chování.

Tab. 3.1 Vyhodnocení výsledků CV pro různé koncentrace etanolu v PBS

roztok ethanolu	poměr I_K/I_A	$ E_A - E_K $ (mV)
5%	0,92	130
10%	0,88	129
20%	0,63	48
30%	0,62	49
50%	0,63	48

Následně byly proměřeny cyklické voltamogramy redoxního systému $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, $\text{pH} = 7,15$) při různých rychlostech polarizace (obr. 3.5 A). Vždy byly naměřeny tři skeny. Rychlost polarizace byla postupně snižována, byly proměřeny rychlosti 1000, 500, 200, 100, 50, 20 a 10 mV/s. Na obr. 3.5 jsou znázorněny cyklické voltamogramy pro čerstvě připravenou neaktivovanou ls-CFE při různých rychlostech a závislost I_p na $v^{1/2}$ (obr.3.5 B).

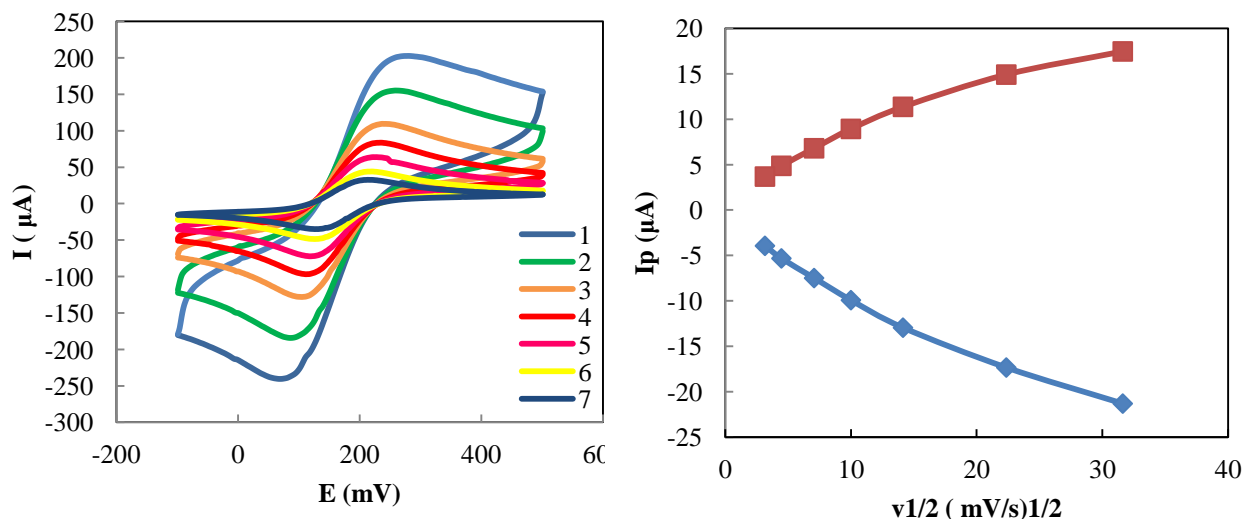


Obr. 3.4

(A) Cyklické voltamogramy měřené na čerstvě připravené ls-CFE s využitím redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, $\text{pH} = 7,15$) pro rychlost polarizace 1000 (1), 500 (2), 200 (3), 100 (4), 50 (5), 20 (6) a 10 (7) mV/s. Zobrazen byl vždy třetí sken. (B) Závislost I_p na $v^{1/2}$ pro redoxní systém $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS na čerstvě připravené ls-CFE pro katodický proud (modrá křivka) a anodický proud (červená křivka).

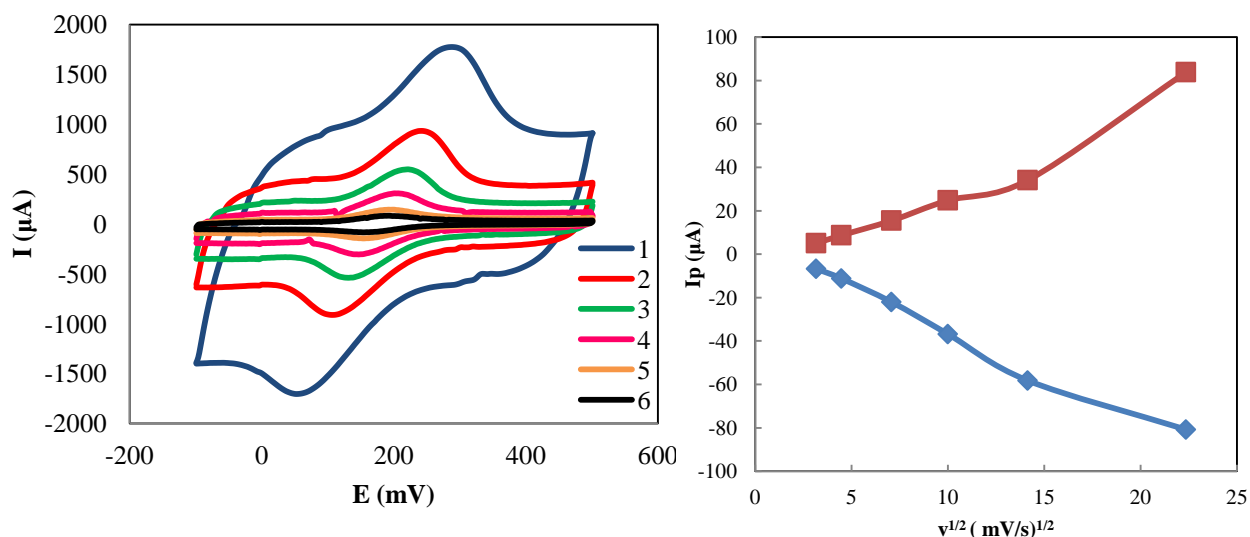
Závislost velikosti voltametričeského píku I_p na odmocnině rychlosti polarizace $v^{1/2}$ je důležitá při určování dějů probíhajících na elektrodovém povrchu. Konkrétně se z této závislosti určuje, probíhají-li na elektrodě děje řízené difúzí. Difúzí je děj řízen pouze v případě, že je tato závislost lineární. Dále je možné využít závislosti $\log |I_p|$ na $\log v$. Z hodnoty směrnice této závislosti můžeme opět usuzovat, je-li děj řízen difúzí či nikoli. Hodnoty směrnice pro ideální systém je 0,5.

Stejným způsobem byly proměřeny různé rychlosti polarizace pro aktivovanou ls-CFE (obr. 3.5) a pro ls-CFE inkubovanou 5 min za stálého míchání v 50% ethanolickém roztoku (obr. 3.6). Vždy byly provedeny tři skeny. ls-CFE byla aktivována 3 min za stálého míchání při vloženém konstantním potenciálu 1500 mV.



Obr. 3.5

Cyklické voltamogramy měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE s využitím redoxního indikátoru Fe^{II}/Fe^{III} ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS ($c = 0,1$ mol/l, $pH = 7,15$) pro rychlost polarizace 1000 (1), 500 (2), 200 (3), 100 (4), 50 (5), 20 (6) a 10 (7) mV/s. Elektroda byla aktivována 3 min při vloženém potenciálu 1500 mV. Závislost I_p na $v^{1/2}$ pro redoxní systém Fe^{II}/Fe^{III} ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS na elektrochemicky aktivované ls-CFE pro katodický proud (modrá křivka) a anodický proud (červená křivka).



Obr. 3.6

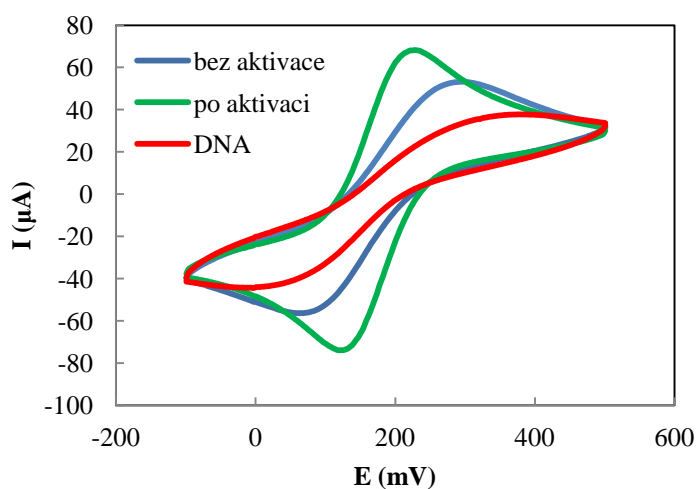
Cyklické voltamogramy měřené na elektrochemicky aktivované ls-CFE a inkubované 5 min v 50% ethanolicím roztoku s využitím redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c=1 \cdot 10^{-3}$ mol/l,) v PBS ($c=0,1$ mol/l, $\text{pH}=7,15$) pro rychlost polarizace 500 (1), 200 (2), 100 (3), 50 (4), 20 (5) a 10 (6) mV/s . Závislost I_p na $v^{1/2}$ pro redoxní systém $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c=1 \cdot 10^{-3}$ M) v PBS na elektrochemicky aktivované (ls-CFE) a inkubované 5 min v 50% ethanolicím roztoku pro katodický proud (modrá křivka) a anodický proud (červená křivka).

Pro elektrochemicky aktivovanou ls-CFE inkubovanou v 50% ethanolicím roztoku bylo provedeno také měření rychlosti polarizace 1000 mV/s , ale výsledný cyklický voltamogram ležel mimo zobrazitelné meze, a proto nebyl do prezentace výsledků zařazen. Pro čerstvě připravenou ls-CFE, elektrochemicky aktivovanou ls-CFE a elektrochemicky aktivovanou ls-CFE inkubovanou 5 min v 50% roztoku ethanolu v PBS byla určena také směrnice závislosti $\log |I_p|$ na $\log v$ (tab. 3.2). Ani jedna ze směrnic nedosáhla teoretické hodnoty 0,5, je tedy pravděpodobné, že děje probíhající na povrchu elektrody nejsou řízeny difúzí, ale spíše částečně ovlivněny kinetikou přenosu náboje a částečně řízeny přenosem hmoty.

Tab. 3.2 Vyhodnocení veličin získaných CV při rychlosti polarizace 50 mV/s

typ elektrody	I_K/I_A	E_A-E_K (mV)	směrnice $\log I_K $ vs $\log v$	směrnice $\log I_A $ vs $\log v$
Čerstvě připravená ls-CFE	0,9	88	0,40	0,38
Aktivovaná ls-CFE	0,9	96	0,37	0,34
Aktivovaná ls-CFE inkubovaná v 50% ethanolu v PBS	0,7	56	0,66	0,69

Na elektrochemicky aktivovanou ls-CFE byla naakumulována nízkomolekulární DNA získaná z lososích spermií. Akumulace probíhala 1 min při vložení potenciálu 500 mV. Tímto způsobem vznikl DNA biosenzor, který je založený na ls-CFE (DNA/ls-CFE). Pro tento biosenzor bylo provedeno měření CV (obr. 3.7). CV byla měřena za přítomnosti redoxního indikátoru Fe^{II}/Fe^{III} ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS. Proměřeny byly vždy tři skeny. Jak je vidět na obr. 3.7, při naakumulování DNA dochází ke změně tvaru křivky a je jednoznačně možno určit, jestli na elektrodě DNA přítomna je či nikoli.

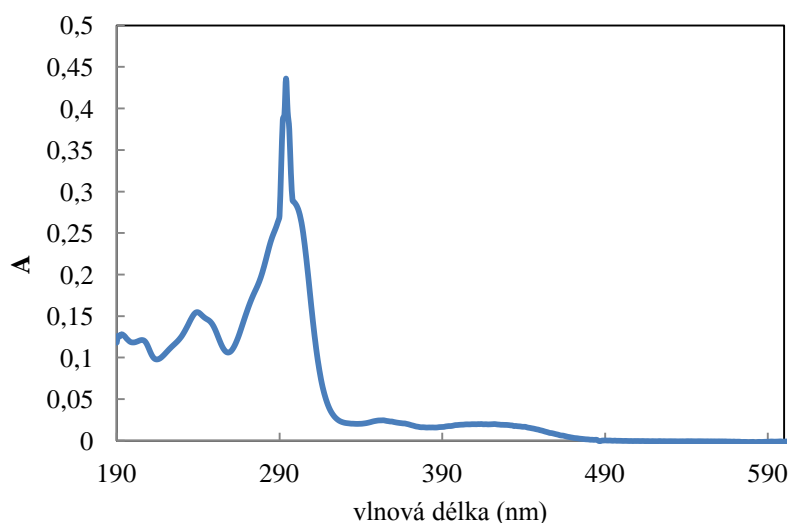
**Obr. 3.7**

Cyklické voltamogramy redoxního indikátoru Fe^{II}/Fe^{III} ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS měřené na elektrochemicky neaktivované ls-CFE (modrá křivka), elektrochemicky aktivované ls-CFE (zelená křivka) vloženým potenciálem 1500 mV po dobu 180 sekund a na DNA/ls-CFE (červená křivka) připravené 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.

3.2 Detekce poškození DNA cytostatikem

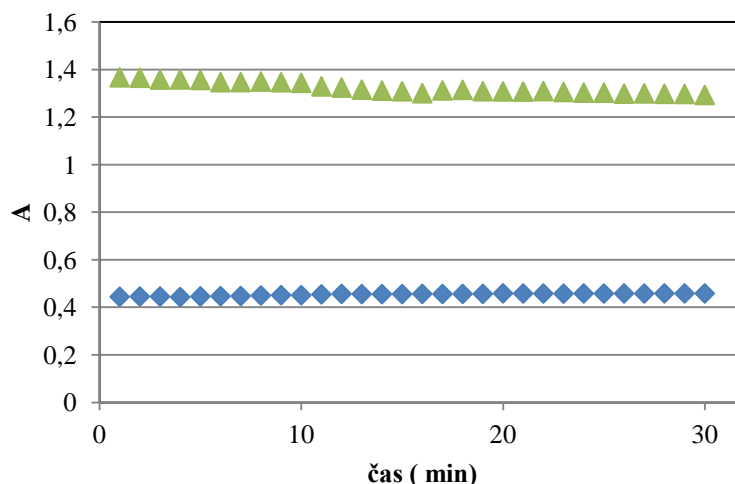
Jako modelové cytostatikum byl vybrán Elipticin, chemickým názvem 5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karbazol. Byl připraven jeho zásobní roztok o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v 96% ethanolu. Míra poškození DNA Elipticinem byla stanovována na základě přímé interakce Elipticinu se strukturou DNA.

Před začátkem měření vlastního poškození bylo potřeba určit koncentraci, při které se Elipticin nesráží z vodně-ethanolickeho roztoku. Z počátečního zásobního roztoku o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v 96% ethanolu byly připraveny roztoky o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS a $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS. U roztoku o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS bylo proměřeno absorpční spektrum pomocí UV/VIS spektrofotometru (obr. 3.8). Měření bylo provedeno v 1cm křemenné kyvetě v rozsahu vlnových délek 190–1000 nm. Následně bylo proměřeno při stejných podmínkách měření spektrum roztoku o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS a bylo sledováno, jak jsou oba roztoky stabilní (obr. 3.9). Ukázalo se, že obě koncentrace jsou relativně stále a minimální doba, po kterou se látka v roztoku udrží, v přijatelném množství, je 10 min. Pro následná měření byla vybrána koncentrace $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS.



Obr. 3.8

Absorpční spektrum roztoku Elipticinu o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS měřené v jednomilimetrové křemenné kyvetě v UV/VIS oblasti v rozsahu 190–1000 nm



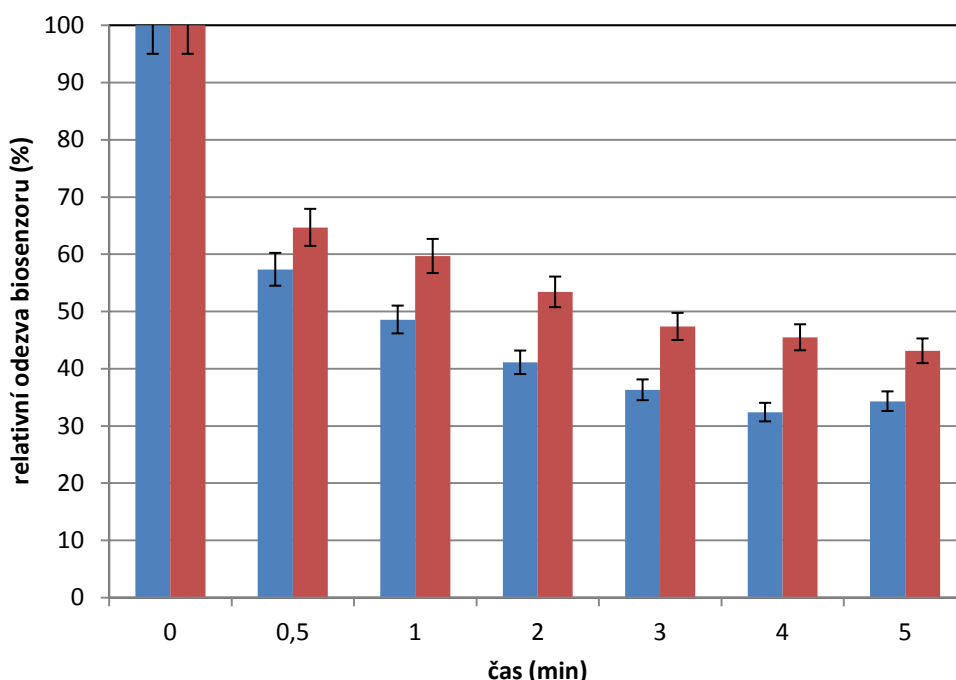
Obr. 3.9

Porovnání časové stálosti pro roztoky Elipticinu o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS (zelená) měřeno v 1 cm kyvetě a $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS (modrá) měřeno v jednomilimetrové kyvetě v UV/VIS oblasti v rozsahu 190–1000 nm

Se zvolenou koncentrací Elipticinu byla proměřena časová závislost poškození DNA. DNA modifikovaná Is-CFE (DNA/Is-CFE) byla inkubována vždy 1 min v roztoku PBS ($c = 0,1$ mol/l) za stálého míchání a následně bylo provedeno měření pomocí CV v přítomnosti redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS. Časová závislost byla měřena až do celkového času $t = 15$ min. Ukázalo se, že po inkubaci DNA/Is-CFE v roztoku PBS (bez přítomného Elipticinu) nedochází ke změně CV signálu po celou dobu měření. Hodnoty pro I_K a I_A byly dále zpracovány a převedeny na závislost odezvy biosenzoru na čase. Hodnoty pro časovou závislost po inkubaci v PBS byly zvoleny jako 100% odezva biosenzoru.

Následně byla DNA modifikovaná Is-CFE (DNA/Is-CFE) inkubována vždy 1 min v roztoku Elipticinu o $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS za stálého míchání. Byly proměřovány časové závislosti až do celkového času 15 min, ale ukázalo se, že po uplynutí 5 min dochází k vytvoření rovnovážného stavu. Z tohoto důvodu byl jako ideální čas pro sledování závislosti poškození DNA Elipticinem zvolen čas 5 min.

Následně byla míra poškození změřena pomocí CV v přítomnosti redoxního indikátorového systému, který obsahuje indikátor $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS a byly vyhodnoceny hodnoty pro I_K a I_A . Získané hodnoty byly dále zpracovány a převedeny na závislost odezvy biosenzoru na čase inkubace (obr. 3.10). Ze získané závislosti je jasně vidět, že k největšímu poškození DNA, a tím pádem k nižší odezvě biosenzoru, dochází bezprostředně po styku DNA s Elipticinem. S rostoucím časem inkubace již k tak velkým změnám nedochází a v soustavě se utvoří rovnováha, která je pravděpodobně dána zaplněním všech vazebných míst na DNA a další molekuly Elipticinu se již nemají kam začlenit.

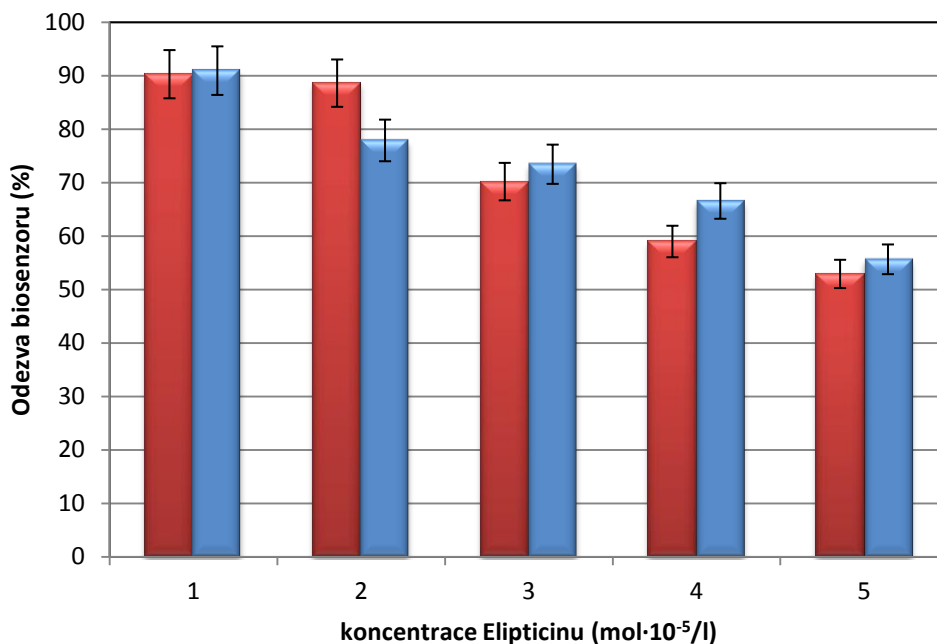


Obr. 3.10

Závislost relativní odezvy biosenzoru v procentech na čase inkubace v roztoku Elipticinu o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS po katodickou oblast (modré sloupce) a po anodickou oblast (červené sloupce).

Dále byla sledována koncentrační závislost poškození DNA různě koncentrovanými roztoky Elipticinu. Ze zásobního roztoku o $c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol/l v 96% ethanolu byly připraveny roztoky o koncentraci 1, 2, 3, 4 a $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS. Měření bylo prováděno vždy na novém biosenzoru.

DNA/Is-CFE byla inkubována 5 min za stálého míchání a následně bylo provedeno měření metodou CV v přítomnosti redoxního indikátoru $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol/l) v PBS. Získané hodnoty pro I_K , I_A a pro potenciálový rozdíl ($E_A - E_K$) byly dále zpracovány a vyhodnoceny jako relativní odezva biosenzoru v % (obr. 3.11). Jak se ukázalo, nejvíce DNA poškozuje roztok Elipticinu o koncentraci $c = 5 \cdot 10^{-5}$ mol/l v PBS.



Obr. 3.11

Závislost relativní odezvy biosenzoru v procentech na různých koncentracích roztoku Elipticinu po katodickou oblast (modré sloupce) a pro anodickou oblast (červené sloupce)

4 Závěr

V předložené bakalářské práci bylo charakterizováno elektrochemické chování velkoplošné uhlíkové filmové elektrody (Is-CFE) v různě koncentrovaném roztoku ethanolu. Další část této práce se zabírala možností využití DNA biosenzoru založeného na velkoplošné uhlíkové elektrodě a nízkomolekulární DNA pro komplexní detekci poškození DNA cytostickými léčivými a možností využití cyklické voltametrie (CV) jako detekční metody poškození.

Is-CFE byla připravena nanesením 10 μ l uhlíkového inkoustu, složeného z 0,01 g polystyrenu, 0,09 g uhlíku (mikrokrystalický uhlík CR-2) a 500 μ l 1,2-dichlorethanu, na povrch pracovní zlaté elektrody. Is-CFE byla elektrochemicky aktivována 3 min při vloženém potenciálu 1500 mV.

Takto připravená velkoplošná uhlíková filmová elektroda (Is-CFE) byla testována v různých koncentracích ethanolu v PBS a byl sledován vliv ethanolu na její povrch. Za optimální podmínky měření byla zvolena koncentrace 5% roztoku ethanolu, protože při této koncentraci nedocházelo k mechanickým ani chemickým změnám povrchu elektrody. Při koncentraci vyšší jak 10% ethanolu již docházelo k chemickým změnám povrchu elektrody. Možnost využití takto pozměněného povrchu pro přípravu DNA biosenzoru by mohla být další alternativou při přípravě biosenzorů.

Na velkoplošné uhlíkové elektrodě byla naakumulována nízkomolekulární DNA, získaná z lososích spermií, při vloženém potenciálu 500 mV po dobu 1 min. Tímto způsobem byla připraven DNA biosenzor, který se následně použil pro měření poškození DNA.

Jako modelová látka byl zvolen Elipticin. Během měření se ukázalo, že Elipticin se začleňuje do struktury DNA, a vytváří tak zlomy vláken její dvouřetězcové struktury. Cílem této práce bylo prokázat, jestli je CV dostatečně citlivá metoda, která by mohla být využita pro detekci poškození DNA cytostatiky. Jak ukázalo měření, CV se jeví jako jednoduchá, levná a rychlá metoda vhodná k prokázání poškození DNA modelovým cytostickým léčivem. Zlepšení podmínek pro vazbu DNA na povrch elektrody a zlepšení citlivosti měření jsou podmínky pro další práci do budoucna.

5 Literatura

- [1] YOSYPCHUK B., BAREK J., FOJTAC M.; Carbon Powder Based Films on Traditional Solid Electrodes as an Alternative to Disposable Electrodes. *Electroanalysis* 18, 2006, vol. 11, p. 1126–1130.

- [2] Dejmková, H.; Zima, J.; Barek, J.; Jan Míka, J. Behavior of Glassy Carbon Paste Electrode in Flowing Methanolic Solutions. *Electroanalysis* 2012, 8, 1766–1170.

- [3] NAVRATIL, T., BAREK, J. Analytical Applications of Composite Solid Electrodes. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2009, vol. 39, p. 131–147.

- [4] WANG, J. *Analytical electrochemistry*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 2001. kap.4, p. 113–115.

- [5] BRETT, Ch. M. A., BRETT, A. M. O. *ELECTROCHEMISTRY Principles, Methods, and Applications*. Oxford: Oxford University press, 1994. kap.7, p. 130–133.

- [6] DICULESCU, V. C., BRETT, A. M. O., PAQUIM, A. Ch. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. *Sensors*, 2005, vol. 5, p. 37739.

- [7] SIRAJUDDIN, M., ALI, S., BADSHAH, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J. Photochem. Photobiol., B*, 2013, vol. 124, p. 1–19.

- [8] LABUDA, J., et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2010, vol. 82, no. 5, p. 1161–1187.

- [9] GUETENS, G., et al. Oxidative DNA Damage: Biological Significance and Methods of Analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2002, vol. 39, no. 4, 5, p. 331–457.
- [10] LIU, A., WANG, K., et al. Development of electrochemical DNA biosensors. *Trends Anal. Chem.*, 2012, vol. 37, p. 101–111.
- [11] VLASTIMIL, V., LABUDA, J., BAREK, J. Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. *Anal Bioanal Chem*, 2010, vol. 397, p. 233–241.
- [12] VACEK, J., HAVRAN, L., FOJTA, M. Elektrochemická analýza, poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA. *Chem. Listy*, 2011, vol. 105, p. 15–26.
- [13] VYSKOČIL, V., BAREK, J. Voltammetric DNA biosensor based on a microcrystalline natural graphite–polystyrene composite transducer. *Procedia Chemistry* 6, 2012, p. 52–59.
- [14] HLAVATA, L., VYSKOCIL, V., LABUDA, J., BENIKOVA, K. 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. *Electrochim. Acta*, 2012, vol. 71, p. 134–139.
- [15] TRNKKOVA, L., STIBOROVA, M., et al. Electrochemical biosensor for investigation of anticancer drugs interactions (doxorubicin and ellipticine) with DNA. *IEEE SENSORS 2009 Conference*, 2009, p. 1200–1204.
- [16] SAILER, B. L., VALDEZ, J. G., et al. Monitoring Uptake of Ellipticine and Its Fluorescence Lifetime in Relation to the Cell Cycle Phase by Flow Cytometry. *Exp. Cell Res.*, vol. 236, p. 259–267.
- [17] POHLIT, A., et al. Antimalarial activity of ellipticine. *Phytomedicine*, 2012, vol. 19, p. 1049.

- [18] RYVOLOVA, M., ADAM, V., , STIBOROVA, M., et al. Study of DNA–ellipticine interaction by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 2012, vol. 33, p. 1545–1549.
- [19] STIBOROVA, M., POLJAKOVA, J., MARTÍNKOVA, E., et al. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines – a comparative study. *Interdisciplinary toxikology*, 2011, vol. 4, no. 2, p. 98–105.
- [20] KUO, Y., KUO, P., et al. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Life Sci.*, 2006, vol. 78, p. 2550–2557.
- [21] CANALS, A., et al. The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2005, vol. D61, p. 1009–1012.
- [22] HUSKA, D., ADAM, V., KRIZKOVA, S. An electrochemical study of interaction of an anticancer alkaloid ellipticine with DNA. *chimica Oggi / CHEMISTRY today*, 2010, vol. 28, no. 5, p. 15–17.
- [23] KIZEK, R., ADAM, V., HRABETA, J., et al. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: Recent advances. *Pharmacol. Ther.*, 2012, vol. 133, p. 26–39.
- [24] POLJAKOVA, J., ECKSCHLAGER, T., STIBOROVA, M., et al. The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, vol. 77, p. 1466–1479.
- [25] POLJAKOVA, J., FREI JACOBO E., E., GOMEZ, J. E., et al. DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human leukemia HL-60 and CCRF-CEM cells. *Cancer Lett.*, 2007, vol. 252, p. 270–279.

- [26] FANGA, K., CHEN, S., et al. Ellipticine-induced apoptosis depends on Akt translocation and signaling in lung epithelial cancer cells. *Lung Cancer*, 2009, vol. 63, p. 227–234.
- [27] MILLER, Ch. M., McCARTHY, F. O. Isolation, biological activity and synthesis of the natural product ellipticine and related pyridocarbazoles. *RSC Advances*, 2012, vol. 2, p. 8883–8918.
- [28] JUREČKOVÁ, Z. *Nový elektrochemický biosenzor pro detekci poškození DNA založený na velkoplošné uhlíkové filmové elektrodě: bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, 2013.
- [29] SKOOG, D. A., WEST, D. M., et al. *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th ed. United Kingdom: Brooks/Cole Cengage learning, 2013. 23, p. 635–639.
- [30] VRBA, P. *Elektrochemické studium cyklického hydrazidu kyseliny ftalové: bakalářská práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2010.
- [31] Sigma-Aldrich: *Bezpečnostní list*, Praha (2012).
- [32] www.metrohm.com/com/Produkte2/Electrodes/VASolidStateWorking.html?identifier=61204140&language=en&name=61204140, staženo 15.7.2013.