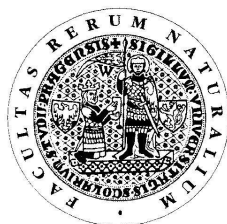


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Zuzana Krejčová

VOLTAMETRICKÉ STUDIUM INTERAKCE
GENOTOXICKÉHO 2-NITROFLUORENU S DNA
NA VISÍCÍ RTUŤOVÉ KAPKOVÉ ELEKTRODĚ

Voltammetric Study of the Interaction of Genotoxic
2-Nitrofluorene with DNA at a Hanging Mercury Drop Electrode

Diplomová práce

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

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035 a RP 14/63) a projektem SVV 2011-263204.

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 9. května 2011.

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi Ph.D., za pomoc při vyhledávání odborné literatury, za profesionální vedení, cenné připomínky k mé práci, vřelý a trpělivý přístup. Dále bych ráda vyjádřila dík všem členům Katedry analytické chemie PřF UK a studentům doktorského studia za pomoc v mnoha ohledech a vytvoření kolegiální atmosféry.

V neposlední řadě si poděkování zaslouží i mí rodiče, že mi umožnili studium na vysoké škole.

Abstrakt

V předkládané diplomové práci byla studována interakce genotoxického environmentálního polutantu 2-nitrofluorenu s dvouřetězcovou DNA z telecího brzlíku za použití visící rtuťové kapkové elektrody (HMDE) jako elektrochemického biosensoru. Dva typy poškození DNA byly zkoumány a elektrochemicky detekovány, konkrétně technikami cyklické a diferenční pulsní voltametrie. První typ poškození se týká přímé interakce DNA s 2-nitrofluorenem, druhý typ poškození byl způsoben radikály s krátkou dobou života, které se generují elektrochemickou redukcí nitro skupiny 2-nitrofluorenu.

Po inkubaci DNA s 2-nitrofluorenem byla studována jejich přímá interakce na povrchu HMDE modifikované vrstvou DNA (k modifikaci byla užitá adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika). Přímá interakce byla dále voltametricky studována titrační technikou, kdy byla DNA přidávána do roztoku 2-nitrofluorenu. Výsledky obou detekčních technik svědčí o tvorbě komplexu DNA – 2-nitrofluoren, vzájemná interakce byla interpretována jako interkalace mezi páry basí DNA, přestože podobný typ vazby nebyl potvrzen absorpční spektroskopii v ultrafialové a viditelné oblasti. Při nízkých koncentracích 2-nitrofluorenu docházelo částečně k elektrostatické vazbě na cukr-fosfátovou kostru DNA.

Při redukční aktivaci 2-nitrofluorenu se generují nitro radikál anionty s krátkou dobou života, které způsobují oxidativní poškození DNA. Na toto poškození bylo usuzováno ze změny katodického CA píku (odpovídající redukcí cytosinu a adeninu). Na základě obdržených výsledků se očekává tvorba 8-oxoguaninu (jedno z nejběžnějších poškození DNA), která vede k přerušení párování guaninu s cytosinem a k dvouřetězcovým zlomům DNA.

Abstract

In this Diploma Thesis, an interaction of genotoxic environmental pollutant 2-nitrofluorene with a double-stranded calf thymus DNA has been studied using a hanging mercury drop electrode (HMDE) as an electrochemical sensor. Two types of DNA damage were investigated and electrochemically detected (using cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry): (i) The DNA damage caused by the direct interaction with 2-nitrofluorene and (ii) the DNA damage caused by short-lived radicals generated by the electrochemical reduction of the nitro group in 2-nitrofluorene.

For the study of direct interaction, HMDE was modified by DNA and the interaction of DNA with 2-nitrofluorene was studied, after their incubation, right at the HMDE surface (adsorptive transfer stripping technique) or the DNA was preincubated with 2-nitrofluorene and, subsequently, the interaction was studied voltammetrically (DNA titration technique). Using both detection techniques, the formation of DNA – 2-nitrofluorene complex was observed and the mutual interaction was interpreted as an intercalation between the DNA base pairs, although such interaction was not clearly confirmed by UV-visible absorption spectroscopy. An electrostatic binding of 2-nitrofluorene on DNA sugar-phosphate backbone was partially formed at low concentrations of 2-nitrofluorene.

After reductive activation of 2-nitrofluorene giving short-lived nitro anion radicals, the oxidative DNA damage induced by these reactive species was evaluated from the height of cathodic peak CA (due to reduction of cytosine and adenine). On the basis of obtained results, we suppose that expected formation of 8-oxoguanine (one of the most common DNA lesions) leads to guanine–cytosine base pair interruption and DNA double-strand breaks.

Klíčová slova:

2-nitrofluoren, deoxyribonukleová kyselina, cyklická voltametrie, diferenční pulsní voltametrie, visící rtuťová kapková elektroda, UV-VIS absorpční spektroskopie, detekce poškození DNA.

Keywords:

2-Nitrofluorene, Deoxyribonucleic Acid, Cyclic Voltammetry, Differential Pulse Voltammetry, Hanging Mercury Drop Electrode, UV-VIS Absorption Spectroscopy, DNA Damage Detection.

Obsah

1. Úvod	9
1.1 Cíl práce	9
1.2 Studované látky.....	10
1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků	11
1.4 Elektrochemie nukleových kyselin	13
1.5 DNA-sensory	14
1.6 Asociace DNA s nízkomolekulárními látkami	15
2. Experimentální část	16
2.1 Reagencie	16
2.2 Aparatura.....	17
2.2.1 Visící rtuťová kapková elektroda	17
2.2.2 Modifikovaná visící rtuťová kapková elektroda	18
2.3 Pracovní postupy.....	19
2.3.1 Voltametrická měření na visící rtuťové kapkové elektrodě	19
2.3.2 Voltametrická měření na modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě	19
2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat	21
3. Voltametrická měření DNA a 2-nitrofluorenu	23
3.1 Cyklická voltametrie	23
3.1.1 Optimalizace prostředí pro studium interakce DNA a 2-nitrofluorenu.....	23
3.1.2 Přímá interakce DNA s 2-nitrofluorenem	24
3.1.3 Interakce DNA s redukčními produkty 2-nitrofluorenu.....	27
3.2 Diferenční pulsní voltametrie	32
3.2.1 Interakce DNA s kovy.....	32
3.2.2 Interakce 2-nitrofluorenu s DNA v roztoku	34
3.2.3 Interakce 2-nitrofluorenu s DNA na povrchu elektrody	41
4. UV-VIS absorpční spektroskopie	47
5. Závěr	50
6. Literatura	52

Seznam použitých zkratk a symbolů

AdTS	adsorptivní přenosová rozpouštěcí technika
CA	redukční pík cytosinu a adeninu
c	molární koncentrace [mol L^{-1}]
c_m	hmotnostní koncentrace [mg mL^{-1}]
c_m^*	výsledná hmotnostní koncentrace DNA v roztoku, ze kterého se DNA adsorbovala na povrch elektrody [mg mL^{-1}]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CV	cyklická voltametrie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulsní voltametrie
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
E_p	potenciál píku látky [mV]
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
G	oxidační pík redukčního produktu guaninu
I_p	elektrický proud píku látky [nA]
n	počet měření
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
M_r	relativní molekulová hmotnost
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	$0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pH*	pH směsného vodně-ethanolického roztoku
R	korelační koeficient
s	směrodatná odchylka
s_r	relativní směrodatná odchylka
ssDNA	jednovláknová DNA (single-stranded DNA)
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického záření

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem předložené diplomové práce je pomoci zavést výzkum elektrochemie nukleových kyselin na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a přispět k zaplnění neprobádaných míst výzkumem účinků genotoxického 2-nitrofluorenu, jako modelového zástupce nitroderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků, na strukturu DNA *in vitro*.

Cílem výzkumu je nalezení optimálních podmínek pro voltametrickou detekci poškození struktury DNA interakcí s 2-nitrofluorenem za přítomnosti DNA v roztoku či DNA adsorbované na povrchu pracovní elektrody (visící rtuťové kapkové elektrody) technikami cyklické voltametrie (CV) a diferenční pulsní voltametrie (DPV). Pomocí techniky CV určit, zda 2-nitrofluoren nebo jeho redukční produkty poškozují DNA. Technikou DPV prostudovat přímou interakci DNA s 2-nitrofluorenem a určit typ vznikající vzájemné vazby. Neméně důležitým cílem je porovnání výsledků voltametrických měření s výsledky poskytnutými UV-VIS absorpční spektroskopií.

Tato práce částečně navazuje na mou bakalářskou práci, která pojednává o voltametrickém stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu na leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrodě¹.

1.2 Studované látky

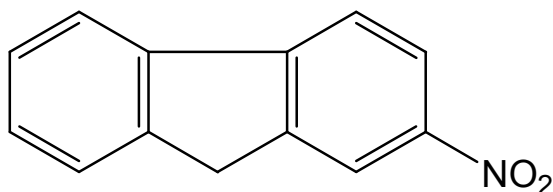
2-Nitrofluoren

C.A.S. Name: 9H-Fluorene, 2-nitro-

C.A.S. Registry Number: 607-57-8

Sumární vzorec: $C_{13}H_9NO_2$

$M_r = 211,22$



2-Nitrofluoren je za laboratorní teploty (25 °C) a atmosférického tlaku (101 kPa) krystalický světle žlutý prášek, omezeně rozpustný ve vodě. Dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech, např. v acetonu, methanolu, dimethylsulfoxidu^{2,3}. Dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) se řadí do kategorie: 2B (podezřelý karcinogen pro člověka)⁴.

Deoxyribonukleová kyselina

C.A.S. Registry Number: 73049-39-5

$M_r = 10 - 15$ milion daltonů

Deoxyribonukleová kyselina z telecího brzlíku je za laboratorní teploty (25 °C) a atmosférického tlaku (101 kPa) bílá pevná látka ve formě vláken připomínajících vlákna bavlnky (obr. 1). Obsahuje jak jednovláknovou DNA (ssDNA), tak i dvouvláknovou DNA (dsDNA), jejíž obsah jednoznačně převládá. Je rozpustná ve vodě (do koncentrace asi 1 mg mL⁻¹). Při nízkých koncentracích (jednotky až desítky µg mL⁻¹) se adsorbuje na povrch plastových nádob^{5,6}.

1.3 Výskyt, vlastnosti a biologické účinky nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou běžnou součástí životního prostředí, přírodní zdroje zahrnují hlavně vulkanickou činnost, lesní a stepní požáry. Narušení přirozené rovnováhy produkce a degradace PAH začalo v 19. století průmyslovou revolucí a pokračovalo celé 20. století především díky zvyšujícím se technickým nárokům civilizace⁷.

Stejně jako PAH jsou i jejich nitroderiváty v životním prostředí prakticky všudypřítomné. Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH) se začaly intenzivně zkoumat v 80. letech 20. století poté, co se prokázala souvislost mezi jejich existencí ve výfukových plynech a mutagenitou⁸. Ve srovnání s PAH jsou velmi silnými mutageny, a řada z nich má rovněž karcinogenní účinky⁹. Potenciální genotoxické účinky NPAH ve spojitosti s jejich ubikvitárním výskytem vzbuzují dodnes nemalou pozornost.

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky vznikají spalovacími procesy či atmosférickou reakcí mezi mateřskými PAH a oxidy dusíku přítomnými ve znečištěném ovzduší^{10,11}. Setrvávají v plynné fázi či se sorbují na respirabilní prachové částice⁷. Jejich přítomnost byla prokázána například v cigaretovém kouři, tonerech do tiskáren¹², dokonce i v některých potravinách¹³. V ovzduší se běžně vyskytují v koncentracích řádově pg až ng dané látky na 1 m³ vzduchu. S potřebou stanovit látky o velmi nízkých koncentracích, navíc ve složitých matricích, se rozvíjejí sofistikované a přesné analytické metody^{12,14-19}.

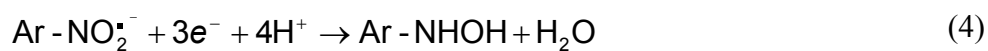
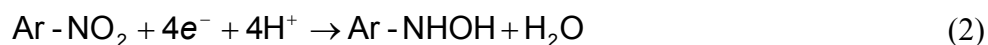
2-Nitrofluoren se používá jako modelový zástupce (marker) NPAH při mnoha vědeckých experimentech. Kromě dvou výše zmíněných způsobů vzniku se může utvářet fotochemicky (schéma 1) (cit.²).



Z forem výskytu 2-nitrofluorenu plynou i možné cesty vniknutí do lidského těla (inhalací či trávicí soustavou), kde je rozsáhle metabolizován²⁰. 2-Nitrofluoren je karcinogenní i mutagenní, na teratogenitu nebyl testován, přestože se tak některé jeho metabolity jeví²¹.

2-Nitrofluoren obsahuje nitro skupinu, která se poměrně snadno redukuje, a to jak chemicky, tak i elektrochemicky. Studium elektrochemické redukce NPAH může mít význam při objasňování mechanismu jejich genotoxického působení a vést k vysvětlení pochodů probíhajících při odbourávání těchto látek v organismu²². V mé bakalářské práci byl navržen

mechanismus elektrochemické redukce 2-nitrofluorenu (Ar-NO_2) na leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrodě v závislosti na pH. V kyselém, neutrálním a slabě alkalickém prostředí tato redukce probíhá v jednom kroku, kterého se účastní čtyři elektrony, koncovým produktem je 2-hydroxylaminofluoren (schéma 2). V silně alkalickém prostředí probíhá redukce v jednoelektronovém kroku (schéma 3) za vzniku relativně stabilního nitroanion radikálu, který je posléze redukován tříelektronovým krokem (schéma 4) na 2-hydroxylaminofluoren^{1,23,24}.



Obr. 1. Detailní fotografie studované DNA

1.4 Elektrochemie nukleových kyselin

Na počátku elektrochemie nukleových kyselin stál český vědec Emil Paleček. V roce 1958 byla publikována jeho práce, kterou vyvrátil teorie H. Berga o tom, že DNA není redukovatelná na rtuťové elektrodě²⁵.

Elektroaktivní složkou nukleových kyselin jsou dusíkaté base²⁶. Na povrchu rtuti dochází k ireverzibilní redukci cytosinu a adeninu (v DNA poskytují jediný pík CA) při potenciálech kolem $-1,5$ V (obr. 2, pík I) proti argentchloridové referenční elektrodě. Naproti tomu elektrochemicky ireverzibilní redukce guaninu²⁷ probíhá až ve značně negativních potenciálech ($E < -1,6$ V) a redukční pík guaninu není na elektrochemických záznamech pozorovatelný. Při těchto negativních potenciálech dochází k intenzivnímu vylučování vodíku na povrchu elektrody a proudové příspěvky spojené s touto reakcí jsou mnohonásobně vyšší než redukční proudy guaninu. Pozorovat lze až oxidaci vzniklého redukčního produktu guaninu (7,8-dihydrogenguaninu)²⁸, a to kolem potenciálu $-0,3$ V (pík II na obr. 2). Redukce thyminu (popřípadě uracilu v ribonukleové kyselině) na povrchu rtuti byla pozorována pouze v nevodném prostředí (dimethylsulfoxid) při velmi negativních potenciálech. Tento přístup ovšem nenašel širší uplatnění pro biochemické analýzy reálných vzorků DNA.

Kromě klasických polarografických měření a voltametrie s lineárně rostoucím napětím byly použity pulsní voltametrické techniky^{23,29}. DPV na HMDE byla s úspěchem využita pro analýzu denaturace DNA. Výšky redukčních DPV píků jednořetězcové DNA jsou výrazně vyšší než v případě dvouřetězcové DNA, jelikož u dsDNA jsou redukovatelné skupiny basi méně přístupné povrchu elektrody³⁰. Dále se osvědčila rozpouštěcí chronopotenciometrie s konstantním proudem³¹, během které se sleduje časový průběh změny potenciálu pracovní elektrody za konstantního proudu³².

Na povrchu uhlíkových elektrod probíhá oxidace guaninu kolem potenciálu $+1,0$ V a adeninu kolem potenciálu $+1,2$ V. Oxidace thyminu a cytosinu je detekovatelná při ještě pozitivnějších potenciálech okolo $+1,2$ až $+1,3$ V. Oxidační píky pyrimidinových basi v polynukleotidové řetězci nejsou obvykle pozorovatelné, z tohoto důvodu jsou analyticky využívané téměř výhradně oxidační píky purinů. Na rozdíl od redukčních píků na HMDE oxidační signály purinů na uhlíkových elektrodách se nehodí ke zjišťování strukturních změn dsDNA (v elektrochemických záznamech nedochází k výrazným změnám mezi kovalentně uzavřenou kružnicovou a lineární DNA)^{28,33}.

Značné množství prací publikovaných v posledních letech je zaměřeno na sledování změn intenzity oxidačního píku guaninu v DNA²³ po její interakci s léčivými nebo kovy a jejich komplexy. Obvykle dochází k poklesu výšky píku, to se přičítá vytváření aduktů s guaninem, uvolnění poškozeného guaninového zbytku z DNA nebo zablokování přístupu guaninových zbytků k povrchu elektrody³².

1.5 DNA-sensory

Poškození DNA může vést ke kritickému narušení života buňky a má vážné dopady na lidské zdraví. Chemická modifikace basí DNA často vede k mutacím v nukleotidové sekvenci. Akumulace mutací nebo jiné druhy poškození DNA představují karcinogenní či teratogenní riziko, a proto je v mnoha laboratořích předmětem výzkumu rozvoj a zlepšování analytických technik, které jsou schopné rychlé a citlivé detekce různých typů poškození DNA, a stejně tak látek, které tyto defekty způsobují. Jednou ze současných možností jsou elektrochemické biosensory³⁴.

Elektrochemický sensor je tvořen elektrodou, která je napojena na elektrický zdroj a vyhodnocovací zařízení. Pokud se jedná o biosensor, je součástí elektrody biologický materiál (DNA, enzym, vzorek rostlinného pletiva apod.). Elektrochemické biosensory nabízejí možnost rychlého screeningu toxických a karcinogenních látek ve vzorcích životního prostředí³⁵ a potravin, hodí se k detekci poškození DNA i ke kvantitativnímu stanovení látek³⁶, které tyto změny způsobují. Tato zařízení byla úspěšně použita k detekci polychlorovaných bifenyly, aflatoxinů, aromatických aminů²⁸, pesticidů²³ i protinádorových léčiv^{31,36}. V budoucnu se očekává aplikace biosensory v klinické praxi (detekce mutací lidských genů, preventivní opatření či včasná diagnostika vážných nemocí³⁴).

Elektrochemická analýza poškození nebo interakcí DNA s kovy, léčivými nebo jinými látkami může být provedena v zásadě dvěma způsoby. Interakce mezi DNA a danou látkou může probíhat přímo na povrchu pracovní elektrody (DNA modifikovaná elektroda) nebo může interakce proběhnout v roztoku a po jejím ukončení následuje elektrochemické měření.

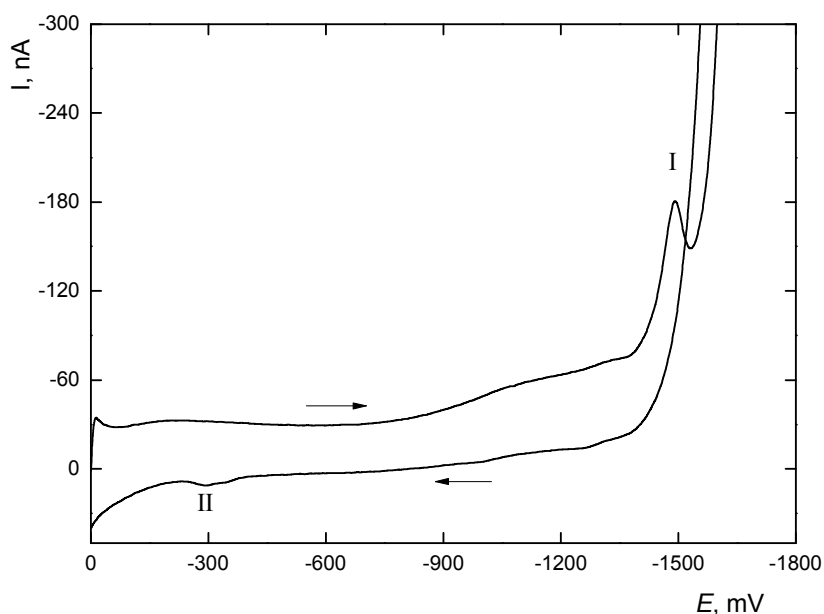
Kovová rtuť je ideálním elektrodovým materiálem, nicméně v současné době jsou pro účely konstrukce DNA sensorů upřednostňovány uhlíkové elektrody nebo elektrody tištěné³⁷. Zajímavou alternativou ke klasickým rtuťovým elektrodám jsou elektrody amalgamové, v některých případech modifikované rtuťovým meniskem, popřípadě rtuťové filmové elektrody^{32,38,39}.

1.6 Asociace DNA s nízkomolekulárními látkami

Asociační interakce DNA spočívají ve třech typech nekovalentních vazeb: interkalace planární aromatické molekuly mezi páry basí DNA, druhým typem je vazba dané látky do velkého a malého žlábků dvouvláknové struktury DNA. Poslední typ představují elektrostatické interakce kladně nabitých molekul se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA.

Tyto typy interakcí se mohou vzájemně kombinovat změnou reakčních podmínek. Např. při nízké hodnotě iontové síly je v případě interakce dsDNA s kladně nabitými kovovými komplexy obsahujícími aromatické ligandy dominantní elektrostatické vázání, zatímco při vysoké hodnotě iontové síly převládá interkalace.

Asociační interakce DNA s elektroaktivními molekulami vedou k analyticky významné změně signálu, konkrétně ke zvýšení proudového signálu v důsledku prekoncentrace analytu. Interakce s poškozující molekulou může vést i ke změně elektrodového procesu z difúzí řízeného na adsorpci řízený proces. Při sledování malých molekul vázících se na DNA a při hodnocení poškození DNA je možné využít elektrochemický signál samotné DNA⁴⁰.



Obr. 2. Cyklický voltamogram DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) s redukčním píkem cytosinu a adeninu (I) a oxidačním píkem (II) redukčního produktu guaninu naměřený na HMDE v prostředí PB.

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studované látky: 2-nitrofluoren (98%, Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Německo). Zásobní roztok 2-nitrofluorenu (100 mL roztoku o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) byl připraven rozpuštěním 0,02112 g této látky v methanolu či ethanolu za pomoci ultrazvuku (sonifikace po dobu 5 minut). Zásobní roztoky byly uchovávány za laboratorní teploty.

Sodná sůl DNA z telecího brzlíku (kat. č. D1501; Sigma – Aldrich Prague, ČR) byla uchovávána při 8 °C. Zásobní roztok této látky pro měření diferenční pulsní voltametrie byl připravován rozpuštěním 1,75 mg DNA ve 2 mL roztoku obsahujícím 10 mmol L^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethanu hydrochloridu (Tris-HCl) a 1 mmol L^{-1} ethylendiamin-tetraoctové kyseliny (EDTA) o pH 7,8. Pro měření cyklickou voltametrie byl zásobní roztok DNA připravován rozpuštěním 1,00 mg DNA v 1 mL roztoku obsahujícím 10 mmol L^{-1} Tris-HCl a 1 mmol L^{-1} EDTA o pH 7,8. Zásobní roztoky byly připravovány vždy minimálně 12 hodin před samotným měřením a byly uchovávány v plastových nádobkách typu Eppendorf při -4 °C. Molární koncentrace DNA může být zjištěna prostřednictvím UV-VIS absorpční spektroskopie za pomoci výrobcem udávané hodnoty molárního absorpčního koeficientu při vlnové délce 260 nm, který je roven $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Referenční látky: 2-aminofluoren (98%, Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Německo). Zásobní roztok 2-aminofluorenu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ v ethanolu byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v tomto rozpouštědle.

Roztoky o nižších koncentracích byly připravovány přesným ředěním těchto zásobních roztoků.

Ostatní použité chemikálie (čistota p.a.): Tris-HCl (Sigma – Aldrich, ČR), EDTA (Penta, ČR), dihydrogenfosforečnan sodný (98%, Aldrich chemical company, USA), ethanol (96%, Lach-Ner, ČR), methanol (Penta, ČR), síran zinečnatý (Lachema, ČR), dusičnan thalný (Lachema, ČR), dusičnan kademnatý (Lachema, ČR), dusičnan bismutitý (Lachema, ČR), hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR).

Fosfátový pufr o koncentraci $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0 (PB) byl připravený rozpuštěním 1,72 g dihydrogenfosforečnanu sodného ve 200 mL deionizované vody; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ hydroxidem sodným bylo upraveno pH na hodnotu 7,0 a roztok byl následně doplněn deionizovanou vodou na objem 250 mL. Hodnoty pH byly měřeny pH-metrem Jenway 3510 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou kalibrovaným standardními roztoky pufrů. Pro přípravu všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda (Milipore,

USA). Veškeré používané roztoky kromě zásobního roztoku DNA byly uchovávány ve skleněných nádobách.

2.2 Aparatura

Při všech voltametrických stanovení byla používána osobním počítačem řízená sestava Eco-Tribo Polarograf pracující se softwarem Polar Pro verze 5.1 (Eco-Trend Plus, Praha, ČR). Software pracoval v operačním systému Microsoft Windows XP (Microsoft Corporation, USA).

Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita elektroda argentschloridová ($3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$) typu ETP CZ/R0100X a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda typu ETP CZ P00906 (obě Eco-Trend Plus, ČR). Při metodě diferenční pulsní voltametrie byly na pracovní elektrodu vkládány pulsy o šířce 100 ms a výšce -50 mV . Rychlost nárůstu potenciálu činila 20 mV s^{-1} . Při metodě cyklické voltametrie činila rychlost polarizace 200 mV s^{-1} .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA), ovládaném programem UV-Visible ChemStation 9.01 (Agilent Technologies, USA), v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 cm (Hellma, Nizozemí).

2.2.1 Visící rtuťová kapková elektroda

Při všech voltametrických technikách byla používána visící rtuťová kapková minielektroda typu UM μ E (Polaro-Sensors, ČR) nebo tato elektroda modifikovaná naakumulovanou vrstvou dsDNA, její příprava je detailně popsána v kapitole 2.3.2. Při tvorbě kapky byl ventil otevřený po dobu 100 ms. Povrch rtuťové kapky se rovnal $0,453 \text{ mm}^2$ a byl vypočítán z experimentálně zjištěné hmotnosti 20 kapek rtuti odkápnutých v prostředí $3 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$ při nulovém vloženém napětí proti používané argentschloridové referentní elektrodě. Tato hmotnost byla určena z váhového rozdílu před a po přidání 20 kapek rtuti, přičemž základní elektrolyt byl slit a rtuť několikrát opláchnuta methanolem a osušena proudem vzduchu do konstantní hmotnosti. Pro výpočet povrchu rtuťové kapky byl předpokládán její kulový charakter.

2.2.2 Modifikovaná visící rtuťová kapková elektroda

Počátek vývoje elektrochemických DNA-senzorů je spojen s prvním používáním rtuťových elektrod modifikovaných molekulami DNA, kde byla DNA imobilizována na povrch rtuťové kapky prostou fyzikální adsorpcí. V případě fyzikální adsorpce dochází k tvorbě značně heterogenní vrstvy na povrchu elektrody, přesto se struktura adsorbované vrstvy DNA na HMDE jeví značně stabilní v rámci širokého potenciálového okna i stupnice pH (cit.²⁸).

Díky silné adsorpci DNA na rtuťový elektrodový povrch je možné přenést elektrodu s akumulovanou DNA z roztoku, ve kterém byla rozpuštěna, do roztoku, ve kterém probíhá elektrochemické měření²⁶. Elektrochemické odezvy DNA, RNA i syntetických polynukleotidů získané tímto postupem jsou prakticky identické s křivkami změřenými konvenční adsorptivní rozpouštěcí technikou (s DNA, respektive RNA v základním elektrolytu). Tato procedura se označuje jako adsorptivní přenosová rozpouštěcí (AdTS) technika, byla navržena koncem 80. let 20. století a nabízí zcela nové možnosti elektrochemické analýzy nukleových kyselin a jiných biopolymerů⁴¹.

Zaprvé umožňuje analýzu velmi malých objemů při použití standardního elektrochemického vybavení. Nukleové kyseliny mohou být snadno akumulovány na elektrodu z několika mikrolitrů roztoku. To je zásadní pro studie obsahující drahé či obtížně připravitelné vzorky, jako jsou přírodní či chemicky modifikované nukleové kyseliny, syntetické polynukleotidy apod. Zadruhé se složení roztoku vzorku může lišit od složení základního elektrolytu. Stejný vzorek nukleových kyselin může být měřen různými elektrochemickými metodami, které vyžadují různé základní elektrolyty. Dále může být mnoho elektroaktivních látek interferujících s analýzou nukleových kyselin odstraněno změnou prostředí za předpokladu, že tyto látky se neadsorbují na elektrodu. Látky, které se na DNA vážou kovalentně i nekovalentně mohou být snadno analyzovány AdTS procedurou. Zatřetí, jak již bylo zmíněno výše, může DNA modifikovaná elektroda sloužit jako jednoduchý biosensor⁴².

AdTS proceduru jsem zvolila i já pro vypracování této práce, je rychlá, jednoduchá a levná. Avšak v průběhu vypracování předkládané práce se ukázala manipulace s modifikovanou visící rtuťovou kapkovou elektrodou manuálně velice náročná.

Další možností imobilizace biosložky na povrch elektrody je chemická adsorpce, která je silnější než fyzikální. Nevýhodou této metody je krátká životnost a citlivost adsorbovaného materiálu na změny pH, teploty či iontové síly. Při enkapsulaci se využívá zachycení

biologické části v inertní membráně (kolagen, Teflon® apod.) na povrchu sensoru. Při zachycení v polymerních gelech se biosložka mísí s monomerem, který polymerizuje za vzniku gelu obohaceného o biosložku. Iniciace polymerizace γ zářením současně zabezpečuje sterilitu sensoru. V elektrochemických biosensorech se nejčastěji používá polypyrol. Nejdelší dobu životnosti vykazuje metoda využívající kovalentní vazby⁴⁰.

2.3 Pracovní postupy

2.3.1 Voltametrická měření na visící rtuťové kapkové elektrodě

Postup č. 1: Při záznamu cyklických voltamogramů DNA na HMDE byly do voltametrické mikronádobky odpipetovány 2 mL PB a 100 μ L nebo 200 μ L zásobního roztoku DNA ($c_m = 1 \text{ mg mL}^{-1}$). Po zbavení kyslíku takto připraveného roztoku minutovým probubláním dusíkem byla zaznamenána voltametrická křivka. Přičemž před vlastní nádobku byla zařazena promývačka obsahující vodu, roztok byl po dobu bublání míchán.

Postup č. 2: Při proměřování vlivu DNA v roztoku na voltametrické chování 2-nitrofluorenu technikou DPV byly měřené roztoky připraveny následujícím způsobem: do voltametrické mikronádobky byl odpipetován 1 mL PB, 1 mL ethanolu (základní elektrolyt) a potřebný objem zásobního roztoku 2-nitrofluorenu. Takto připravený roztok byl zbaven kyslíku minutovým probubláváním dusíkem, přičemž před vlastní nádobku byla zařazena promývačka obsahující ethanol a deionizovanou vodu v poměru 1:1. Roztok byl po dobu bublání míchán. Po provedení záznamu voltametrické křivky byl do stejného roztoku postupně přidáván potřebný objem zásobního roztoku DNA. Po každém přidavku byl roztok míchán a probubláván 30 s.

Postup č. 3: Při proměřování vlivu DNA v roztoku na voltametrické chování iontů kovů se postupovalo stejným způsobem jako v bodě 2 s jediným rozdílem – základním elektrolytem byly 2 mL PB.

2.3.2 Voltametrická měření na modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě

Postup č. 4: Při záznamu cyklických voltamogramů DNA na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol v objemovém poměru 1:1, směsné pH (pH*) 8,1; resp. v prostředí PB – methanol (1:1; pH* 8,0) se postupovalo následně: opláchnutá elektroda byla ponořena do roztoku připraveného smícháním 100 či 200 μ L zásobního roztoku DNA

($c_m = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), 1 mL PB a 1 mL ethanolu, resp. methanolu. V roztoku byla vytvořena nová rtuťová kapka, která byla za stálého míchání vystavena na půl minuty tomuto roztoku. Poté byla elektroda vyjmuta, opláchnuta ponořením do deionizované vody a následně ponořena do roztoku 2 mL PB, který byl míchán a probubláván dusíkem jednu minutu. Následoval voltametrický záznam.

Postup č. 5: Při proměřování vlivu 2-nitrofluorenu adsorbovaného spolu s DNA na HMDE na voltametrické chování DNA technikou CV se postupovalo následně: opláchnutá elektroda byla ponořena do roztoku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). V tomto roztoku byla vytvořena nová rtuťová kapka, která byla na půl minuty za stálého míchání vystavena modifikujícímu roztoku. Poté byla elektroda vyjmuta, opláchnuta ponořením do deionizované vody a ponořena do 2 mL PB. Roztok byl míchán a probubláván dusíkem jednu minutu. Následovaly tři CV skeny. Pro další křivky se celý postup musel opakovat.

Postup č. 6: Při proměřování vlivu DNA adsorbované na elektrodě na voltametrické chování 2-nitrofluorenu technikou DPV se postupovalo následujícím způsobem: nejprve bylo připraveno 60 mL roztoku 2-nitrofluorenu o potřebné koncentraci v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Poté se opláchnutá elektroda ponořila do roztoku DNA o potřebné koncentraci v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), kde byla vytvořena nová rtuťová kapka. Modifikátor byl aplikován po dobu půl, jedné či dvou minut za stálého míchání. Poté byla elektroda opatrně vyjmuta, opláchnuta ponořením do deionizované vody a ponořena do 2 mL již připraveného roztoku 2-nitrofluorenu. Roztok byl míchán a probubláván dusíkem jednu minutu. Následoval DPV záznam. Pro každou křivku se celý postup musel opakovat s nově odpipetovanými 2 mL připraveného roztoku 2-nitrofluorenu. Pro každou koncentraci DNA byl míchán nový roztok DNA.

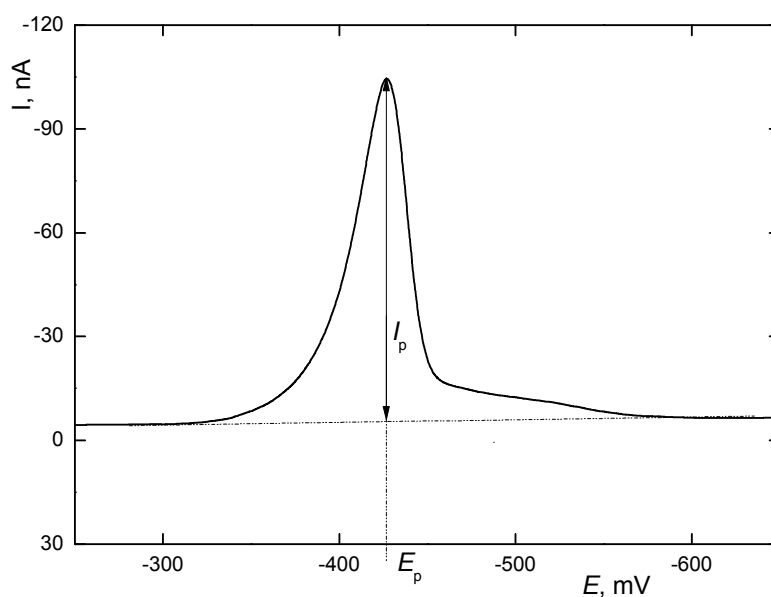
Postup č. 7: Elektroda byla ponořena do roztoku DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB, zde byla vytvořena rtuťová kapka, která byla vystavena roztoku za stálého míchání na půl minuty, poté následoval oplach elektrody ponořením do deionizované vody. Takto DNA modifikovaná elektroda byla ponořena do roztoku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), kde byla vystavena dvaceti cyklickým skenům v rozsahu potenciálu a) -300 až -800 mV nebo b) 0 až -800 mV při 50 mV s^{-1} s a bez míchání roztoku. Opláchnutá elektroda byla přenesena do roztoku PB. Roztok byl míchán a probubláván dusíkem jednu minutu. Následovaly tři skeny technikou CV při 200 mV s^{-1} v rozsahu potenciálu 0 až -1800 mV . Celý postup byl zopakován s absencí 2-nitrofluorenu, křivky sloužily jako slepé záznamy (blank).

Postup č. 8: Postup se téměř shoduje s postupem předchozím (č. 7). Modifikovaná elektroda DNA byla ponořena do roztoku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), kde byla vystavena konstantnímu potenciálu -800 mV po dobu deseti minut s a bez míchání roztoku během elektrolýzy. Opět následovalo opláchnutí a samotné měření technikou CV v PB při 200 mV s^{-1} v rozsahu potenciálu 0 až -1800 mV . I k tomuto postupu byly proměřeny blanky.

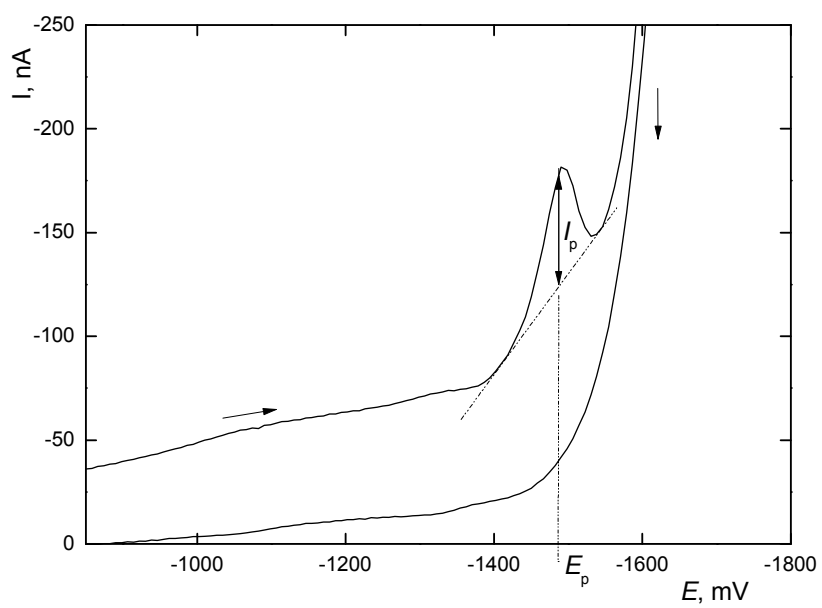
Všechny křivky, pokud není uvedeno jinak, byly měřeny čtyřikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

2.3.3 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

K potřebným výpočtům a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 8.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA). Získané DP voltamogramy a oxidační pík redukčního produktu guaninu u cyklické voltametrie byly vyhodnocovány způsobem zobrazeným na obr. 3. Způsob vyhodnocování redukčního píku cytosinu a adeninu je znázorněn na obr. 4. Vyhodnocením voltamogramů byly získány hodnoty potenciálu píku (E_p) a proudu píku (I_p). Výsledky zatížené hrubou chybou byly vyloučeny na základě Deanova a Dixonova testu pro odlehlé výsledky. Chybové úsečky byly sestrojovány ze směrodatných odchylek patřičných výsledků.



Obr. 3. Způsob vyhodnocování DP voltamogramů 2-nitrofluorenu a oxidačního píku redukčního produktu guaninu u cyklické voltametrie. DP voltamogram 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); I_p – proud píku, E_p – potenciál píku.



Obr. 4. Způsob vyhodnocování CA píku. Cyklický voltamogram DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) měřený na HMDE v PB; I_p – proud píku, E_p – potenciál píku.

3. Voltametrická měření DNA a 2-nitrofluorenu

3.1 Cyklická voltametrie

3.1.1 Optimalizace prostředí pro studium interakce DNA a 2-nitrofluorenu

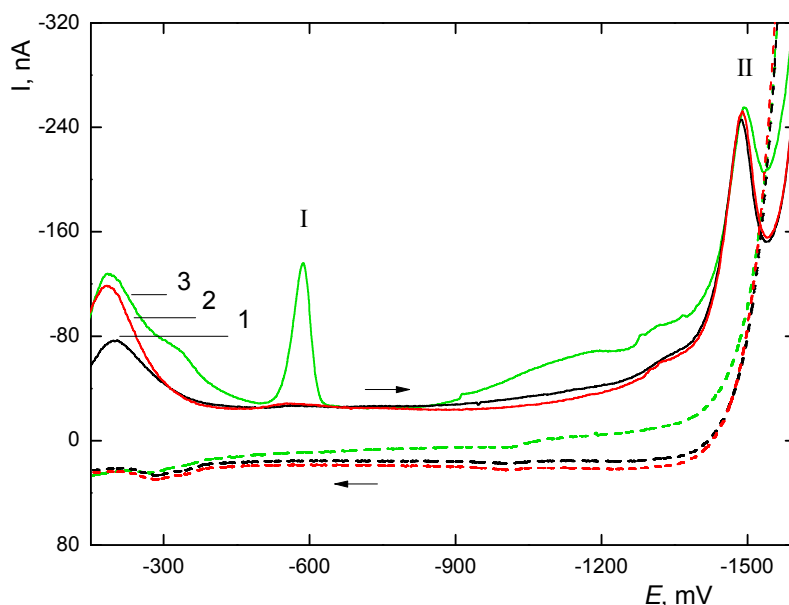
Závislost voltametrického chování DNA na složení základního elektrolytu byla studována za použití pufrovaných roztoků na HMDE (pracovní postup č. 1) a pufrovaných vodně-methanolicých, respektive ethanolicých roztoků v objemovém poměru 1 : 1 na modifikované HMDE připravené postupem č. 4. Pufrující složku vždy představoval 0,05 mol L⁻¹ fosfátový pufr o pH 7,0 (PB), ve kterém navíc probíhala veškerá měření. Výsledné pH roztoku PB – methanol se rovnalo 8,0 a roztoku PB – ethanol 8,1. Koncentrace DNA v těchto roztocích činila 0,1 mg mL⁻¹.

Při detekci DNA v PB cyklickou voltametrií na HMDE se při potenciálu okolo -1,5 V objevuje při prvních čtyřech skenech redukční pík adeninu a cytosinu (na obr. 5 pík označen II). Přičemž ve druhém skenu je výška píku největší a ve třetím nejmenší, ve čtvrtém skenu je pík již nevyhodnotitelný. V následujících skenech pík mizí zcela. Nárůst výšky píku ve druhém skenu může být způsoben částečnou degradací DNA, neboť jednovláknová DNA poskytuje výrazně vyšší signály než dvouvláknová DNA. Následný pokles výšky píku se v literatuře běžně vysvětluje blokací elektrody vznikajícími redukčními produkty²⁷. Okolo potenciálu -0,3 V je pozorovatelný oxidační signál redukčního produktu guaninu, výška píku se v závislosti na počtu skenů nemění.

Jelikož redukční pík adeninu a cytosinu se objevuje již na úniku voltametrické křivky, a tím dochází k nepřesnému vyhodnocení výšky píku, vyvstala snaha rozšířit potenciálové okno. Jednou z možností, jak toho docílit, je použití methanolu v základním elektrolytu; methanol či ethanol byl také použit jako rozpouštědlo pro 2-nitrofluoren, aby se zabránilo jeho vypadávání z používaných roztoků, poněvadž limitní rozpustnost 2-nitrofluorenu ve vodě při 25 °C je udávána hodnotou 8,6.10⁻⁶ mol L⁻¹ (cit.⁵). Dvouřetězcová DNA však v prostředí PB – methanol (1:1; pH* 8,0) neposkytuje žádný voltametrický signál. DNA musí být z tohoto prostředí naadsorbovaná technikou AdTS na povrch elektrody, která je přenesena do prostředí PB, ve kterém probíhá samotné měření. Avšak spolu s DNA se na elektrodu adsorbovala ještě jiná látka obsažená v methanolu, nečistota pravděpodobně ze skupiny thiolů, která poskytuje signál označený na obr. 5 jako pík I. Výška píku nečistoty lineárně stoupá s dobou akumulace na HMDE i se zvyšujícím se poměrem methanolu ku PB. Dalším důvodem nevhodnosti použití methanolu v analýze DNA je pokles výšky CA píku o 18 %

oproti výšce CA píku naměřeného prostředí v $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 7,0.

Odstranit popsané problémy lze použitím prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1)²³. Z obr. 5 je patrné, že se výška CA píku v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), měřená následně po přenesení HMDE do PB, shoduje s výškou CA píku v PB..



Obr. 5. Cyklické voltamogramy DNA ($c_m = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) na HMDE v prostředí PB (1), na modifikované HMDE pomocí DNA ($c_m = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), měřeno v prostředí PB (2) a na modifikované HMDE pomocí DNA ($c_m = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – methanol (1:1; pH* 8,0), měřeno v prostředí PB (3). Pík I odpovídá nečistotě v methanolu, pík II představuje redukční pík cytosinu a adeninu. Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou, zobrazeny jsou jen první skeny.

3.1.2 Přímá interakce DNA s 2-nitrofluorenem

Při studiu poškození DNA zapříčiněné 2-nitrofluorenem se postupovalo dle pracovních postupů č. 4 a 5. V druhém případě vznikla elektroda modifikovaná DNA a 2-nitrofluorenem zároveň. Struktura vrstvy DNA na HMDE, která byla adsorbovaná na povrch elektrody za přítomnosti 2-nitrofluorenu se může výrazně lišit od vrstvy DNA vytvořené bez 2-nitrofluorenu v modifikačním roztoku. Vazba 2-nitrofluorenu na visící rtuťovou kapku není tak silná jako vazba DNA. To je patrné z obr. 6 až 8, redukční signál 2-nitrofluorenu je pozorovatelný jen v 1. skenu při potenciálu cca -430 mV . Poškození DNA se vyvozovalo ze změny proudu píku adeninu a cytosinu změřeného cyklickou voltametrií na DNA modifikované elektrodě a elektrodě modifikované pomocí DNA a 2-nitrofluorenu³¹. Proud

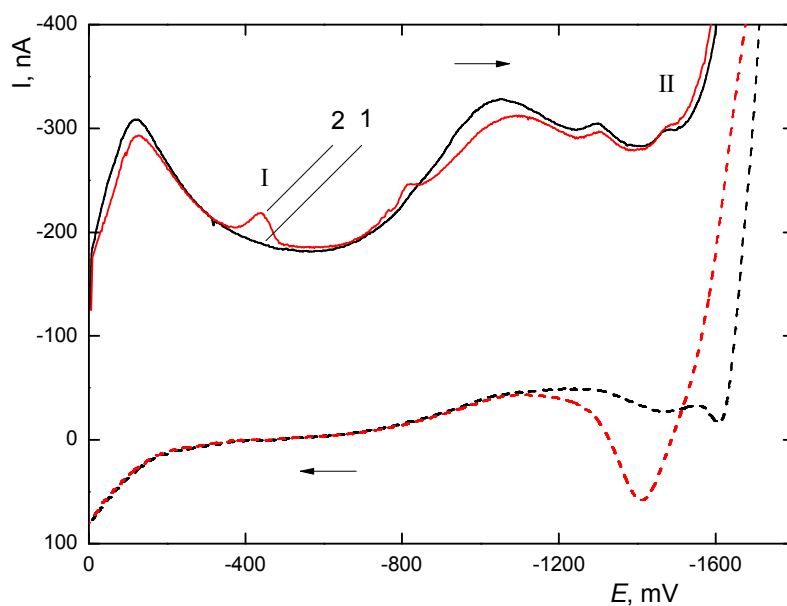
oxidačního píku 7,8-dihydrogenguaninu zdaleka nedosahují takových hodnot jako proudy CA píku, proto nebyl použit k hodnocení poškození DNA způsobené 2-nitrofluorenem. Z tabulky I je zřejmé, že statisticky významný pokles proudu v důsledku přítomnosti 2-nitrofluorenu se týká jen křivek druhého skenu, kde se proud CA píku snížil o 9 % (obr. 7). Pokles se dá vysvětlit částečnou degradací DNA (vlivem přítomnosti 2-nitrofluorenu) na malé kousky dsDNA, které se nedokážou imobilizovat na povrchu elektrody. Dalším možným vysvětlením je částečná depurinace DNA, protože volné base adeninu v roztoku neposkytují signál²⁶. Pokles voltametrické odezvy o 9 % však dostatečně nepotvrzuje hypotézu o poškození DNA způsobené 2-nitrofluorenem. Tomuto závěru nasvědčuje i fakt, že křivky se téměř překrývají ve všech třech CV skenech. Jistým vodítkem je nám zde však skutečnost, že snížení výšky anodických píků guaninu a adeninu v důsledku přímé interakce 2-nitrofluorenu s dsDNA bylo již dříve pozorováno v práci⁴³, kde je tento pokles připisován právě degradaci dsDNA na menší fragmenty neschopné nadále setrvat na povrchu pracovní elektrody.

Tabulka I

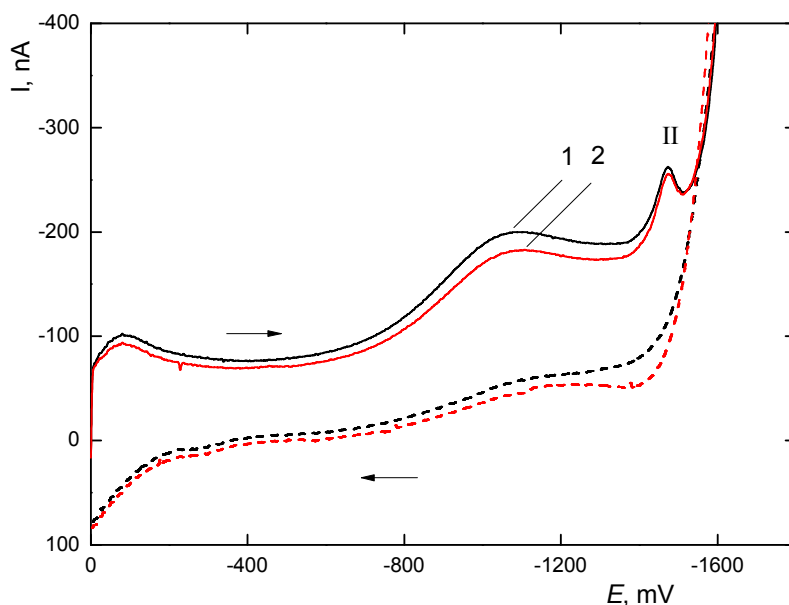
Vliv 2-nitrofluorenu na výšku redukčního píku cytosinu, adeninu a příslušné směrodatné (s) a relativní směrodatné odchylky (s_r) pro $n = 3$; měřeno cyklickou voltametrií na HMDE v prostředí PB.

Sken	$-I_p^I$ [nA]	s^I [nA]	s_r^I [%]	$-I_p^{II}$ [nA]	s^{II} [nA]	s_r^{II} [%]
1.	5,0	0,81	16	4,3	0,42	9,8
2.	37,5	0,68	1,8	34,0	0,38	1,1
3.	6,3	0,78	12	5,6	0,41	7,3

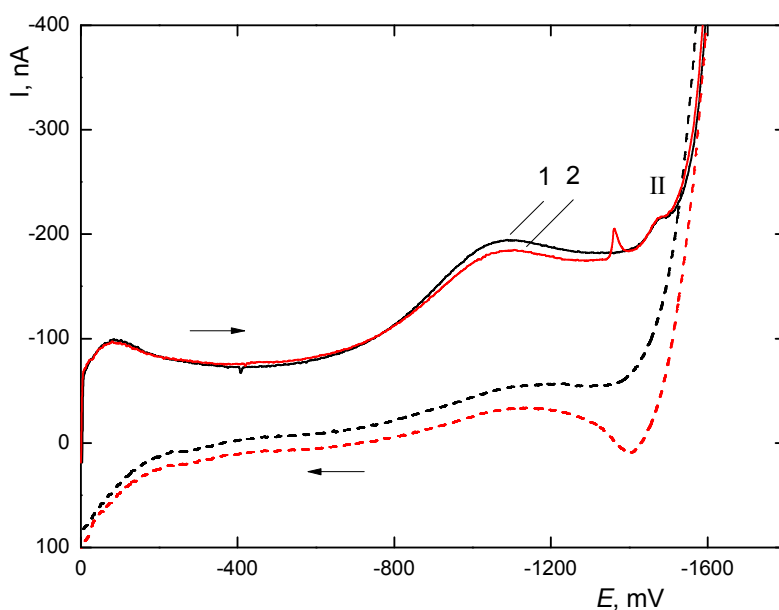
I_p^I – proud CA píku na modifikované HMDE nanosenou vrstvou DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); I_p^{II} – proud CA píku na modifikované HMDE pomocí 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1)



Obr. 6. Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$) (1). Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) obé v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$) (2). Měřeno v prostředí PB. Pík I představuje redukční signál 2-nitrofluorenu, pík II odpovídá redukci cytosinu a adeninu. Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou. Jedná se o první sken.



Obr. 7. Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$) (1). Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) obé v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$) (2). Měřeno v prostředí PB. Pík II odpovídá redukci cytosinu a adeninu. Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou. Jedná se o druhý sken.



Obr. 8. Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1) (1). Cyklické voltamogramy DNA na modifikované HMDE pomocí 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) a DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) obé v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1) (2). Měřeno v prostředí PB. Pík II odpovídá redukci cytosinu a adeninu. Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou. Jedná se o třetí sken.

3.1.3 Interakce DNA s redukčními produkty 2-nitrofluorenu

Dále bylo cyklickou voltametrií sledováno poškození DNA způsobené redukčními produkty 2-nitrofluorenu. Poškození DNA bylo vyvozováno ze změny proudu píku adeninu a cytosinu na DNA modifikované HMDE, proudy oxidačního píku 7,8-dihydrogenguaninu dosahují pouze jednotek nanoampér, proto se nehodí k analýze poškození DNA. Použity byly pracovní postupy č. 7 a 8.

Příslušné proudy byly porovnány s hodnotami blanku, který byl získán zopakováním pracovního postupu č. 7 nebo 8 s absencí 2-nitrofluorenu v modifikačním roztoku. Z tabulky II je patrný pokles proudu CA píku téměř ve všech případech, kdy byly roztoky míchány. Hodnoty proudu CA píku vzorku a blanku, které nebyly míchány během prostřední fáze pracovního postupu (redukční aktivace 2-nitrofluorenu), se statisticky neliší. Největší procentuální pokles nastal v případě cyklování v rozmezí -300 až -800 mV (obr. 9), v oblasti těchto potenciálů se redukuje 2-nitrofluoren na nitroanion radikál. Největší pokles odezvy CA píku právě v tomto rozmezí je v dobrém souladu s faktem, že v případě aplikace cyklování 0 až -800 mV se vytváří kromě nitroanion radikálu ještě nitroso skupina (ve zpětném

anodickém skenu), která již oxidativní poškození DNA nezpůsobuje⁴³, a jejíž vznik tedy hraje při působení nitroanion radikálů vůči dsDNA roli inhibičního prvku. Procentuální poklesy v případě cyklování v rozsahu potenciálů 0 až –800 mV (obr. 10) a u roztoků, kde proběhla elektrolýza (obr. 11), jsou srovnatelné. Během elektrolýzy při konstantním potenciálu –800 mV dochází k prekoncentraci radikálů redukovaného 2-nitrofluorenu²³.

Takto výrazný pokles jasně dokazuje poškození DNA, které může být způsobeno napadáním cukr-fosfátové kostry DNA (zejména deoxyribosy) vznikajícím nitroanion radikálem, z části i prostřednictvím vzniku volných peroxidových radikálů, které nitroanion radikál při styku s molekulou kyslíku generuje. Oxidativní degradace cukerné složky vede ke vzniku různých aduktů, toto poškození má za následek tvorbu zlomů v DNA. Primárním produktem poškození je jednořetězcový zlom^{44,45}. Po indukci velkého počtu jednořetězcových zlomů blízko sebe se tvoří zlom dvouřetězcový. Mohou vznikat krátké řetězce dsDNA, které se neudrží na povrchu elektrody, nebo abasická místa. Oxidace basí nastává převážně na pozici C8, nejčastějším produktem je 8-oxoguanin. 8-Oxoguanin je vysoce mutagenní, jeho mutagenní vlastnosti jsou spojeny se špatným párováním v průběhu replikace. 8-Oxoguanin se páruje s adeninem a pokud není chyba opravena, v následujícím replikačním procesu se adenin páruje s thyminem⁴⁶.

Pro úplnost byla provedena série měření, ve kterých byla DNA modifikovaná visící rtuťová kapková elektroda za stálého míchání ponořena do roztoku 0,05 mol L⁻¹ fosfátového pufru o pH 7,0 na deset minut s i bez 2-nitrofluorenu. Na elektrodu nebyl vložen žádný potenciál. Poté byla elektroda opláchnuta a po minutovém bublání dusíkem následoval voltametrický záznam. Příslušné hodnoty proudu redukčního píku adeninu a cytosinu (viz tabulka II) jsou v porovnání s hodnotami proudu téhož píku získané dle pracovního postupu č. 1 (v prvním skenu $I_p = -35,1$ nA, ve druhém $I_p = -52,8$ nA a ve třetím $I_p = -8,91$ nA) také značně nižší. Buď došlo k částečnému smytí DNA z povrchu rtuťové kapky, což se jeví značně nepravděpodobné, nebo roztok obsahuje chemickou látku, která mírně poškozuje DNA či znesnadňuje její detekci. Hodnoty proudu CA píku získané dle pracovního postupu č. 1 a 4 (v prostředí PB – ethanol v objemovém poměru 1:1 o pH* 8,1) jsou srovnatelné.

Porovná-li se hodnoty proudu CA píku získané pracovním postupem č. 7 a 8 s hodnotami ze série měření, ve kterém se DNA modifikovaná elektroda ponořila do roztoku PB na deset minut, je zřejmý nárůst v prvně jmenovaném případě. Ten by mohl být způsobený reaktivními formami kyslíku⁴⁷, který nebyl dokonale odstraněn z roztoku, ve kterém probíhalo měření, a nebo nebyl odstraněn vůbec z roztoku, ve kterém probíhalo

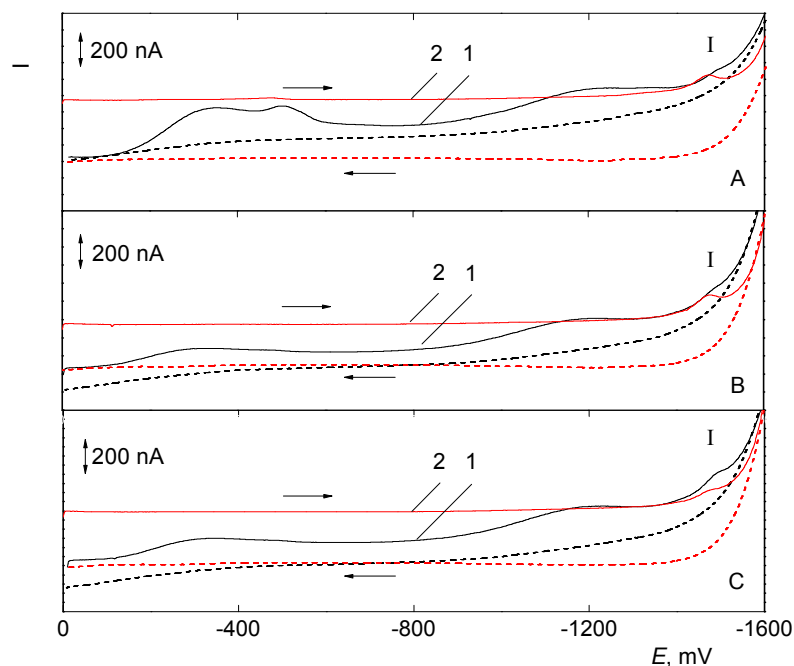
katodicko/anodické cyklování, respektive elektrolyza⁴⁸. Molekula kyslíku může přijmout elektron od nitroanion radikálu za vzniku superoxidového ionu⁴⁹.

Tabulka II

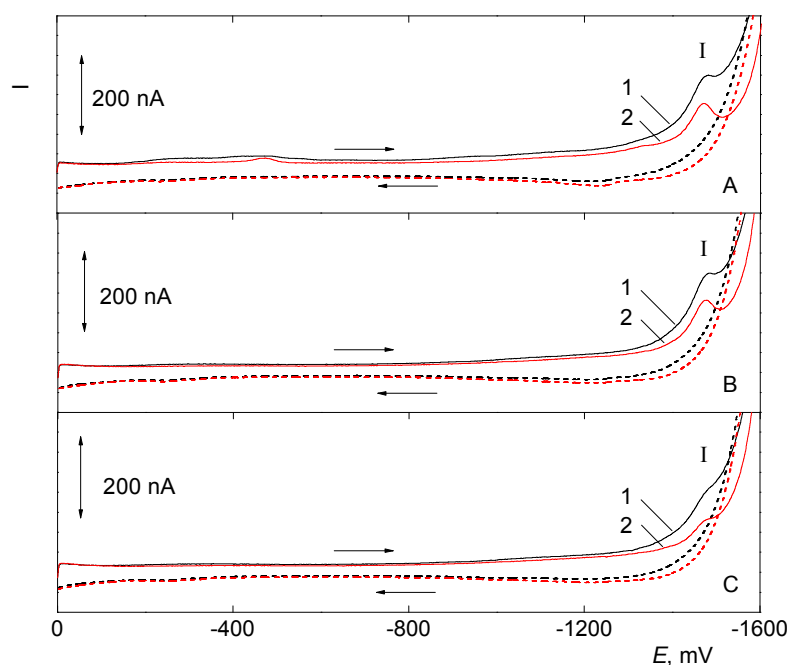
Proudy redukčního píku cytosinu a adeninu, který byl pořízený cyklickou voltametrií na DNA modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí PB. Před samotným měřením byla elektroda vystavena dvaceti cyklickým skenům v rozsahu potenciálů -300 až -800 či 0 až -800 mV, nebo konstantnímu potenciálu po dobu deseti minut v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). V případě, kdy na elektrodu nebyl vložen žádný potenciál, byla elektroda ponořena deset minut v PB. V průběhu všech redukčních aktivací byl roztok míchán. Statistické vyhodnocení (výpočet s a s_r) bylo provedeno pro $n = 3$.

Redukční aktivace 2-nitrofluorenu	Sken	$-I_p^I$ [nA]	s^I [nA]	s_r^I [%]	$-I_p^{II}$ [nA]	s^{II} [nA]	s_r^{II} [%]	Pokles $-I_p^I$ oproti $-I_p^{II}$ [%]
CV -300 až -800 mV	1.	7,4	0,87	12	40,5	0,18	0,44	82
	2.	9,6	1,4	15	38,0	1,5	4,0	75
	3.	– ^a	–	–	7,9	0,96	12	100
CV 0 až -800 mV	1.	34,5	1,6	4,6	54,0	2,7	5,0	36
	2.	34,0	3,2	9,4	48,0	2,1	4,4	29
	3.	5,6	1,2	21	11,0	0,79	7,2	49
Elektrolyza při -800 mV ^b	1.	10,5	3,1	30	22,0	1,4	6,4	52
	2.	16,0	2,7	17	21,0	1,5	7,1	24
	3.	8,7	2,9	33	9,8	2,1	21	– ^c
Bez vloženého potenciálu	1.	10,0	0,83	8,3	14,0	1,0	7,1	29
	2.	15,0	1,4	9,3	15,0	1,5	10	– ^c
	3.	– ^a	–	–	2,7	1,2	44	100

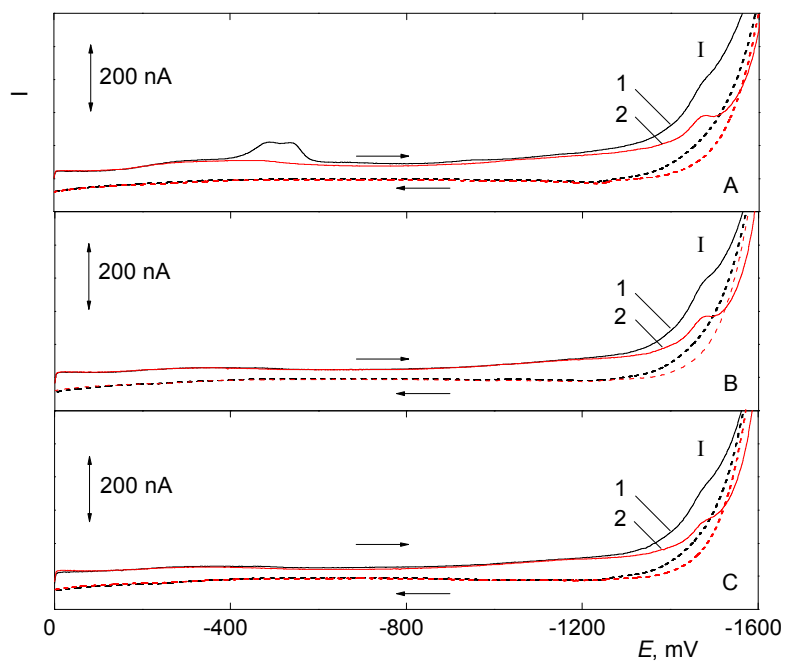
I_p^I – proud redukčního píku cytosinu a adeninu s 2-nitrofluorenem v roztoku během poškozovací fáze; I_p^{II} – proud redukčního píku cytosinu a adeninu bez 2-nitrofluorenu v roztoku během poškozovací fáze; ^a – pik nebyl pozorován či nelze vyhodnotit; ^b – vložen konstantní potenciál po dobu 10 minut; ^c – nedošlo ke statisticky významnému poklesu



Obr. 9. Cyklické voltamogramy DNA měřené v PB na HMDE, která byla modifikovaná pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Po modifikaci byla elektroda ponořena do roztoku s 2-nitrofluorenem ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (1) a bez 2-nitrofluorenu (2) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), za stálého míchání byla vystavena 20 cyklům v rozsahu -300 až -800 mV. Pík I odpovídá redukci cytosinu a adeninu. První sken (A), druhý sken (B), třetí sken (C). Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou.



Obr. 10. Cyklické voltamogramy DNA měřené v PB na HMDE, která byla modifikovaná pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Po modifikaci byla elektroda ponořena do roztoku s 2-nitrofluorenem ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (1) a bez 2-nitrofluorenu (2) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1), za stálého míchání byla vystavena 20 cyklům v rozsahu 0 až -800 mV. Pík I odpovídá redukci cytosinu a adeninu. První sken (A), druhý sken (B), třetí sken (C). Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou.



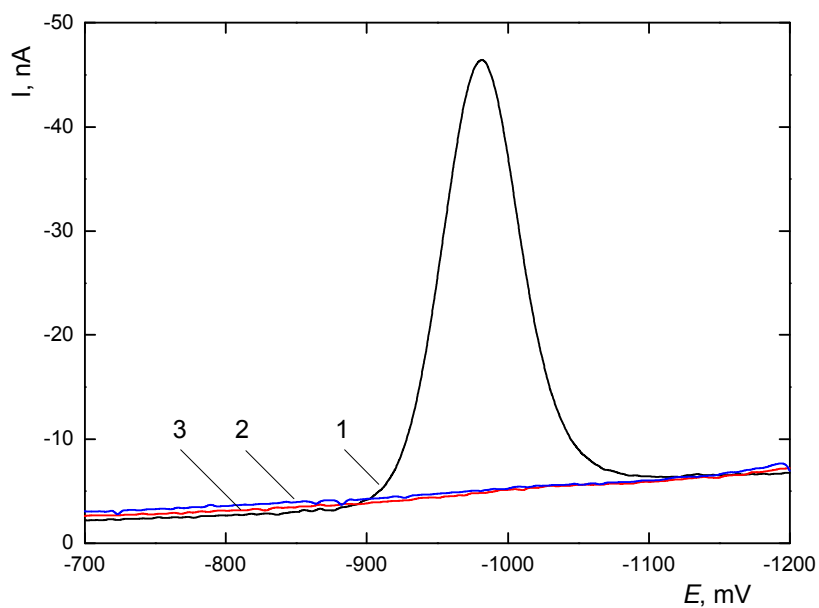
Obr. 11. Cyklické voltamogramy DNA měřené v PB na HMDE, která byla modifikovaná pomocí DNA ($c_m = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$). Po modifikaci byla elektroda ponořena do roztoku s 2-nitrofluorenem ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (1) a bez 2-nitrofluorenu (2) v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$), za stálého míchání byla vystavena po dobu deseti minut konstantnímu potenciálu -800 mV . Pík I odpovídá redukcí cytosinu a adeninu. První sken (A), druhý sken (B), třetí sken (C). Zpětné skeny jsou zobrazeny čárkovaně příslušnou barvou.

3.2 Diferenční pulsní voltametrie

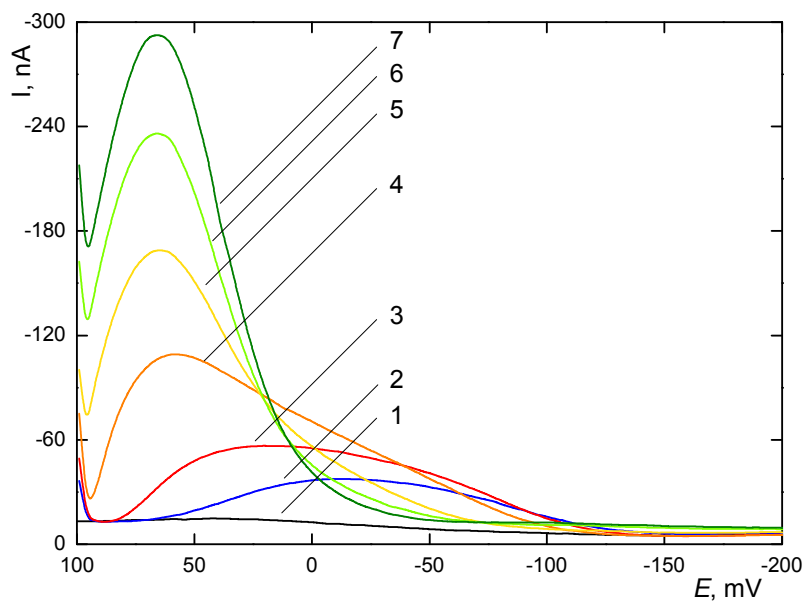
3.2.1 Interakce DNA s kovy

Ve snaze zjistit, jaký vliv má DNA přítomná v roztoku (popř. naadsorbovaná na povrchu HMDE) na přístup jiných látek k povrchu elektrody, byla provedena série měření kationtů různých kovů ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na visící rtuťové kapkové elektrodě v prostředí $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfátového pufru o pH 7,0 technikou DPV. Do roztoku bylo postupně přidáváno 50 až 500 μL zásobního roztoku DNA ($c_m = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$) v závislosti na druhu kationu. DP voltamogramy Tl^+ iontů se po přidavcích 100, 200, 300, 400 a 500 μL zásobního roztoku DNA prakticky nezměnily. To nasvědčuje faktu, že molekuly DNA neblokují přístup k povrchu elektrody, jako je popsáno v práci Muñiz Alvarez, J. L. *et al.*, kde nikelnaté ionty interagují s basemi uvnitř nativní DNA na plně pokryté DNA modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě⁵⁰. Právý opak nastal u kationtů Zn^{2+} (obr. 12) a Cd^{2+} , jejichž redukční signály zcela zmizely po přidavcích DNA. Reakce kadmnatých iontů s DNA způsobuje konformační změny, které destabilizují dvoušroubovici⁵¹. Velice pravděpodobným vysvětlením se jeví pokles v důsledku distorze DNA na povrchu elektrody způsobené interkalací do DNA. Odvinutí DNA v důsledku navázání interkalátoru v tomto případě neznamena formování ssDNA, ale odvinutí celé dvoušroubovice od povrchu elektrody. To určitým způsobem chrání DNA před denaturací a tvorbou oblastí s volně přístupnými basemi³⁷. Třetí variantu představují DP voltamogramy Bi^{3+} iontů, jejichž výška píku lineárně roste s každým přidavkem DNA (obr. 13). Možným vysvětlením se zdá být naadsorbování DNA na povrch elektrody za současné interkalace bismutitých kationtů do molekuly DNA. Tomu napovídá i značný posun potenciálu píku k méně negativním hodnotám.

Voltametrické chování kationtů thalia, niklu, bismutu a kadmia v přítomnosti DNA dokazuje různé typy vazeb s DNA a mechanismy adsorpce na elektrodu. Přesto se u thalných iontů podařila dokázat průchodnost malých částic přes DNA k povrchu elektrody⁵².



Obr. 12. DP voltamogramy Zn^{2+} iontů ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB bez přidavku DNA (1) a s přidavkem 100 μL (2) a 200 μL (3) zásobního roztoku DNA ($c_m = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$).



Obr. 13. DP voltamogramy Bi^{3+} iontů ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB bez přidavku DNA (1) a s přidavkem 50 μL (2), 100 μL (3), 200 μL (4), 300 μL (5), 400 μL (6) a 500 μL (7) zásobního roztoku DNA ($c_m = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$).

3.2.2 Interakce 2-nitrofluorenu s DNA v roztoku

Závislost voltametričkého chování 2-nitrofluorenu na obsahu DNA v roztoku byla studována za použití pufovaných vodně-ethanolických roztoků v objemovém poměru 1:1 na HMDE. Pufrující složku vždy představoval 0,05 mol L⁻¹ fosfátový pufr o pH 7, výsledné pH roztoku PB – ethanol se rovnalo 8,1. Koncentrace 2-nitrofluorenu v těchto roztocích činila 1.10⁻⁵, 1.10⁻⁶ a 1.10⁻⁷ mol L⁻¹. Při koncentraci nižší než 1.10⁻⁷ mol L⁻¹ již nebylo možné získaný voltamogram vyhodnotit. Koncentrace zásobního roztoku DNA byla 0,88 mg mL⁻¹. Pro lepší orientaci slouží tabulka III.

Zaznamenané voltametričké křivky 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5}$ mol L⁻¹) ukazují obr. 14. Voltametričké chování 2-nitrofluorenu bylo studováno v rozsahu přidavků DNA 0 až 1100 μL, vždy po 100 μL. Po prvním a druhém přidavku DNA do roztoku došlo ke zvýšení signálu 2-nitrofluorenu. Od třetího přidavku včetně signál klesal. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu na výsledné koncentraci DNA v roztoku je graficky znázorněna na obr. 15. V rozmezí výsledné koncentrace DNA v roztoku 163 až 391 μg mL⁻¹ vykazuje závislost lineární charakter definovaný rovnicí (5). S každým přidavkem DNA došlo i k posunu potenciálu k méně negativním hodnotám. Graficky je závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu na výsledné koncentraci DNA v roztoku znázorněna na obr. 16. Z něj je patrné, že k největšímu posunu došlo po prvním přidavku a se vzrůstající koncentrací DNA v roztoku se rozdíly v posunech zmenšují. V rozmezí výsledné koncentrace DNA v roztoku 44 až 391 μg mL⁻¹ závislost vykazuje lineární průběh vyjádřený rovnicí (6).

$$I_p [\text{nA}] = 0,194 c_m [\mu\text{g mL}^{-1}] - 127,6 \quad (R = 0,9964) \quad (5)$$

$$E_p [\text{mV}] = 0,111 c_m [\mu\text{g mL}^{-1}] - 454,1 \quad (R = 0,9977) \quad (6)$$

Malé planární sloučeniny s aromatickými kruhy, jakou je i 2-nitrofluoren, se často chovají jako interkalátory. Interkalace představuje komplikovaný pochod, jehož mechanismus i faktory, které ho ovlivňují, nejsou zatím zcela objasněny. Během interkalace dochází ke vmezeření planární části molekuly do mezibasového prostoru DNA za současného oddálení sousedních basí, to má automaticky za následek odvinutí celého řetězce. Dochází k prodloužení dvojité šroubovice, deformační účinek se tak rozloží podél celé molekuly. Uplatňuje se tzv. vylučovací pravidlo, molekula interkalátoru se vsouvá do prostoru mezi každý druhý pár basí. Současně platí, že navázání jedné molekuly interkalující látky usnadňuje vazbu dalších molekul. Aromatické systémy se pravděpodobně vsouvají mezi

hydrofóbní base z důvodu energeticky výhodnějšího umístění. Interkalace probíhá ve dvou krocích, samotnému vmezeření předchází difuze interkalátoru k povrchu DNA. Předpokládá se vznik intermediátu ve žlábcích alfa-helixu⁵³⁻⁵⁵.

V závislosti na podmínkách (iontová síla, pH apod.) se uplatňuje další typ interakce. Látky nesoucí kladný náboj nahrazují protiionty zbytků kyseliny fosforečné v hydrofilní kostře dvouvláknové DNA. Vzájemné repulse kladně nabitých látek se vyrovnávají vnějším „stackováním“.

Na základě získaných DP voltamogramů byl navržen mechanismus interakce DNA s 2-nitrofluorenem. Po prvních přídavicích DNA do roztoku 2-nitrofluorenu se pravděpodobně začíná utvářet komplex DNA – 2-nitrofluoren, přičemž 2-nitrofluoren se v této fázi nachází ve žlábcích DNA. Jak již bylo zmíněno, DNA se velice snadno a pevně váže na povrch rtuťové kapky. Vznikem komplexu DNA – 2-nitrofluoren se více molekul 2-nitrofluorenu přiblíží povrchu elektrody a tím vzroste voltametrický signál. S dalšími přídávky DNA se více molekul 2-nitrofluorenu inkorporuje mezi dusíkaté base a tím se snižuje počet volných molekul 2-nitrofluorenu v roztoku, voltametrický signál klesá³⁷. Posun potenciálu píku k méně negativním hodnotám se připisuje právě interkalaci, naproti tomu posun k více negativním hodnotám je způsoben elektrostatickým vázáním poškozující látky k DNA^{23,31,36,56}.

Voltametrické křivky 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na obr. 17 zobrazují voltametrické chování látky v přítomnosti DNA. Opět dochází ke zvýšení signálu 2-nitrofluorenu, ovšem výška píku 2-nitrofluorenu se nemění od třetího přídávku DNA, respektive od výsledné koncentrace DNA v roztoku rovné $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (obr. 18). Obr. 19 zobrazuje grafickou závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu na výsledné koncentraci DNA v roztoku matematicky vyjádřená:

$$E_p [\text{mV}] = 0,258 c_m [\mu\text{g mL}^{-1}] - 481,6 \quad (R = 0,9921) \quad (7)$$

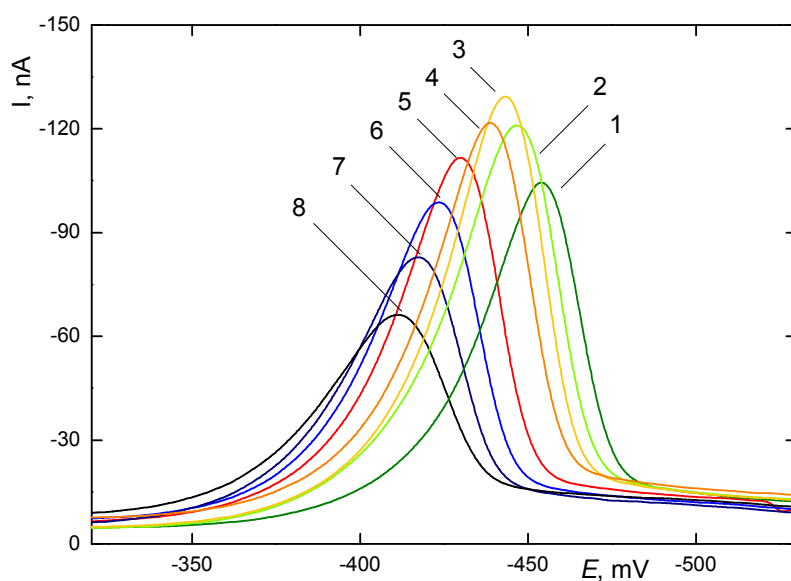
Potenciál píku se i po přídávku $500 \mu\text{L}$ DNA do roztoku posouvá k méně negativním hodnotám. To je jasným důkazem interkalace 2-nitrofluorenu do DNA. U koncentrace 2-nitrofluorenu o řád nižší se posun ustálil již po $400 \mu\text{L}$ DNA (přidaných do roztoku) (obr. 22). U koncentrace 2-nitrofluorenu rovné $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ se proud píku ustaluje mezi 44 a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA v roztoku, při $163 \mu\text{g mL}^{-1}$ proud píku začíná klesat (obr. 21). Možné vysvětlení plyne z obr. 20. U příslušných DP voltamogramů 2-nitrofluorenu se od $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA objevuje druhý pík, jehož výška roste a potenciál se výrazně posouvá

k negativním hodnotám se vzrůstající koncentrací DNA v roztoku. Za těchto podmínek pravděpodobně převažuje elektrostatické vázání 2-nitrofluorenu na povrch DNA

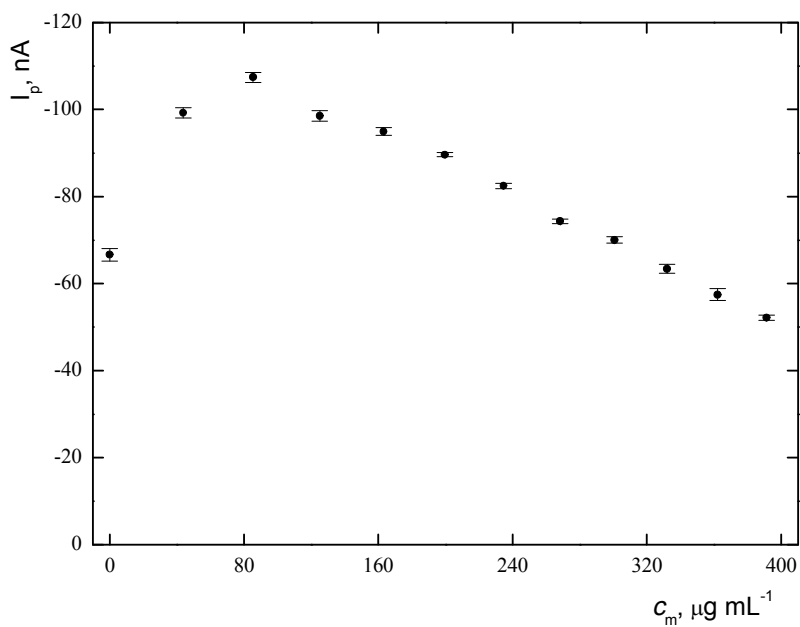
Tabulka III

Výsledná koncentrace DNA přidávána do 2 mL roztoku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Výsledná koncentrace DNA je korigovaná na konečný objem.

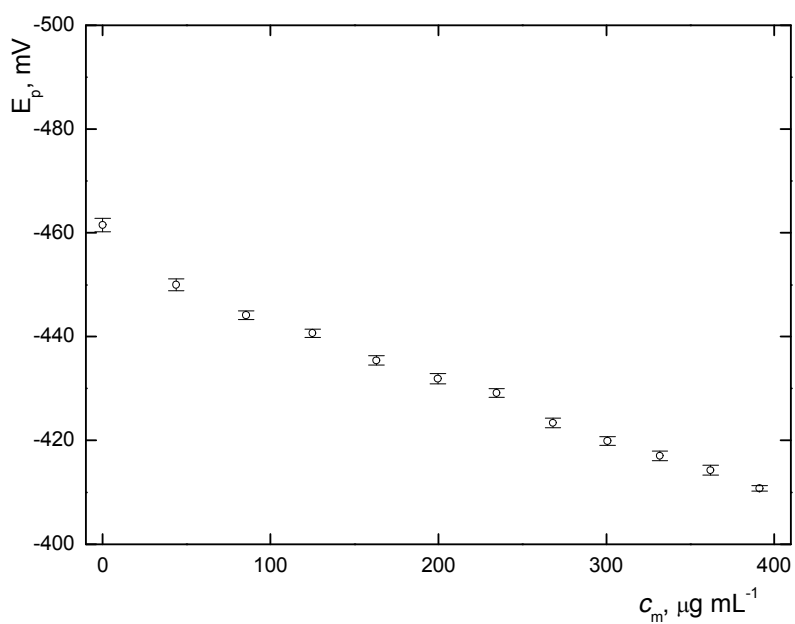
Přidavky DNA $c_m = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$ [μL]	Výsledná c_m DNA v roztoku [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Přidavky DNA $c_m = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$ [μL]	Výsledná c_m DNA v roztoku [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
10	4	300	125
20	9	400	163
30	13	500	199
40	17	600	235
50	22	700	268
100	44	800	301
150	64	900	331
200	85	1000	362
250	104	1100	391



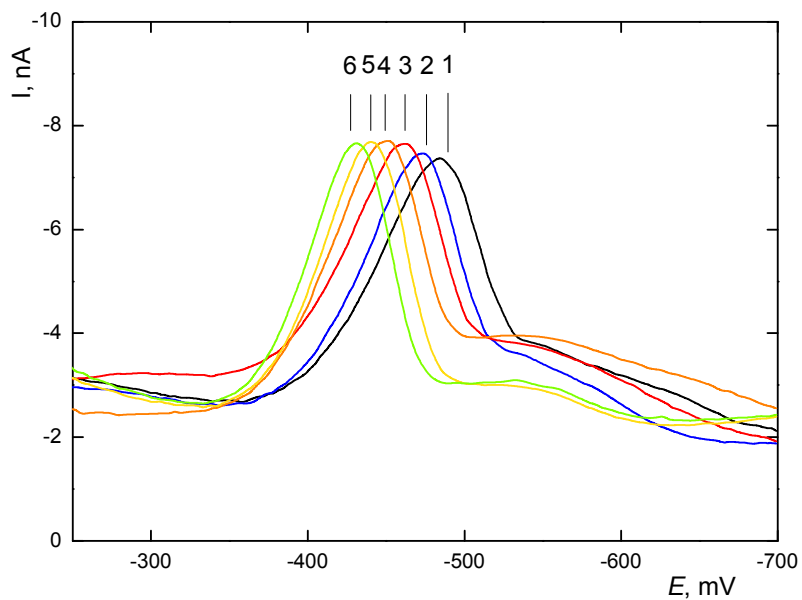
Obr. 14. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA přidané do roztoku: 0 (1); 44 (2); 85 (3); 125 (4); 199 (5); 268 (6); 331 (7) a $391 \mu\text{g mL}^{-1}$ (8).



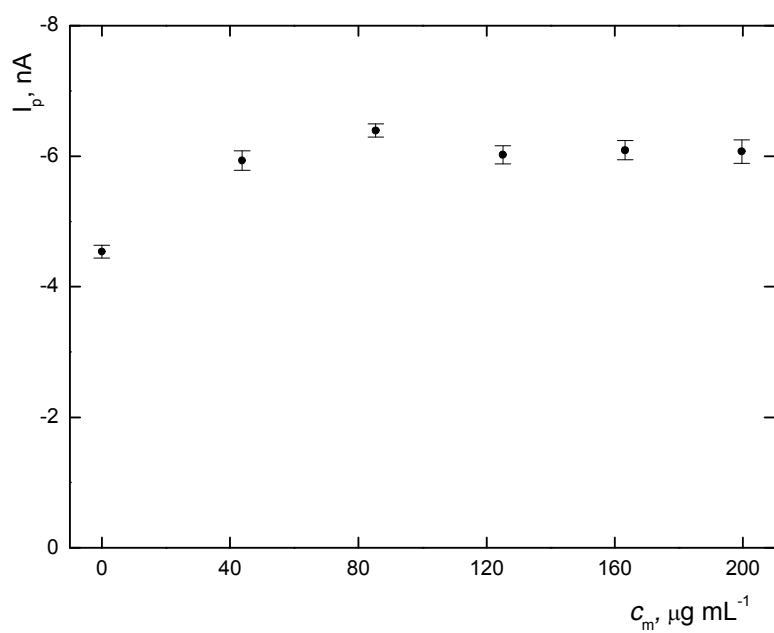
Obr. 15. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$); $n = 4$.



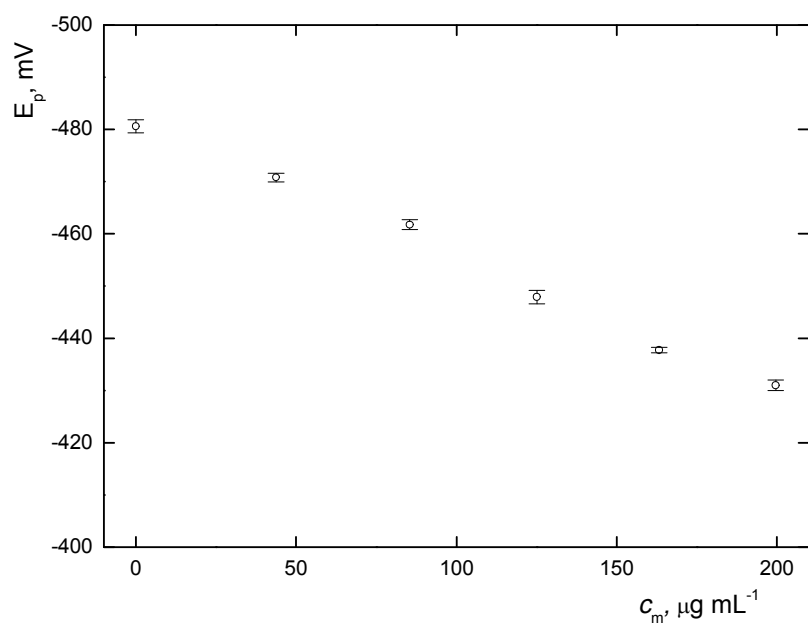
Obr. 16. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



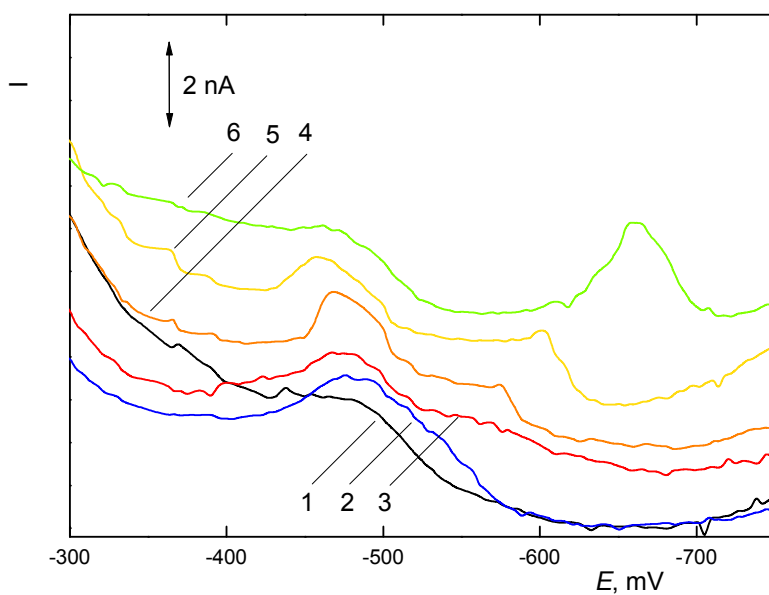
Obr. 17. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA přidané do roztoku: 0 (1); 44 (2); 85 (3); 125 (4); 163 (5) a 199 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (6).



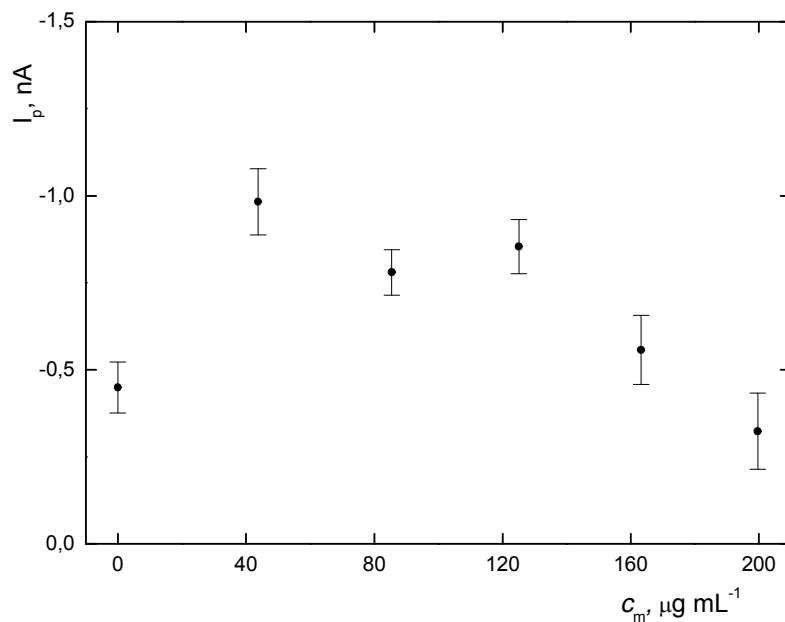
Obr. 18. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



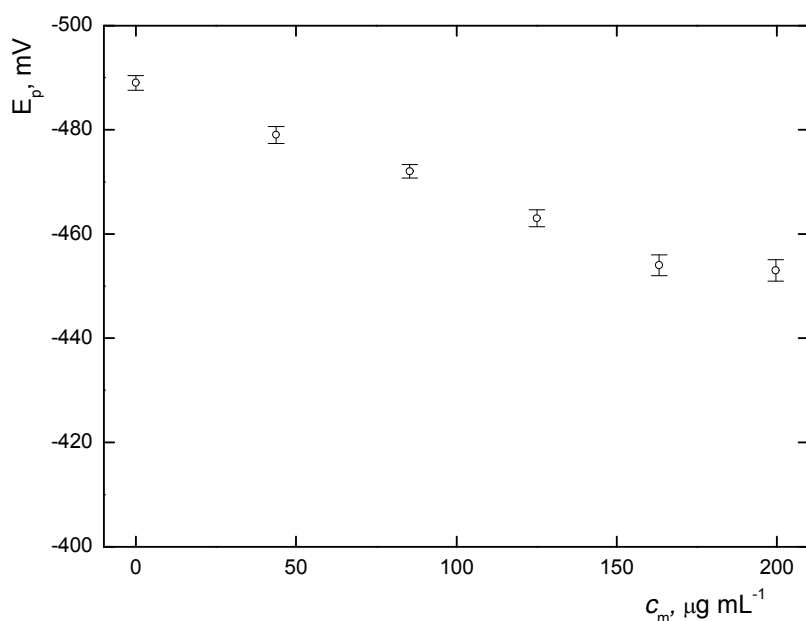
Obr. 19. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



Obr. 20. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA přidané do roztoku: 0 (1); 44 (2); 85 (3); 125 (4); 163 (5) a $199 \mu\text{g mL}^{-1}$ (6).



Obr. 21. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



Obr. 22. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA přidané do roztoku. Měřeno technikou DPV na HMDE v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.

3.2.3 Interakce 2-nitrofluorenu s DNA na povrchu elektrody

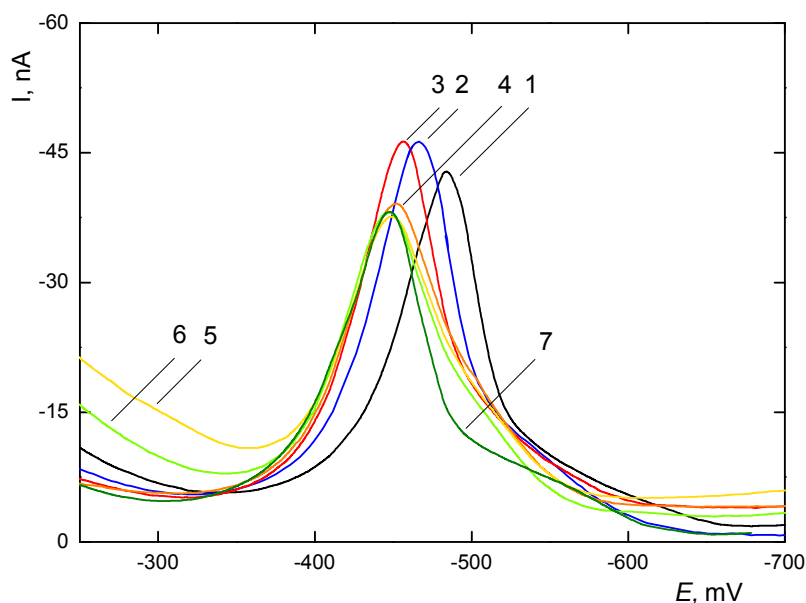
Pro srovnání bylo též provedeno měření 2-nitrofluorenu diferenční pulsní voltametrií na DNA modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě za použití roztoků 2-nitrofluorenu ve stejném prostředí i o stejných koncentrací jako v kapitole předchozí. Postupovalo se dle pracovního postupu č. 6.

U koncentrace 2-nitrofluorenu $1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ byla HMDE vystavena roztoku DNA po dobu půl, jedné a dvou minut. U posledních dvou použitých časů nedocházelo ke změně proudu ani posunu potenciálu píku již při koncentraci $44 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA (a vyšší) v modifikačním roztoku. DP voltamogramy jsou ukázány jen pro půlminutovou modifikaci (obr. 23). Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se DNA adsorbovala na povrch elektrody (c_m^*), vykazuje podobný trend jako závislost proudu píku 2-nitrofluorenu na výsledné koncentraci DNA v roztoku měřená na nemodifikované HMDE, ovšem dochází k ustálení signálu při c_m^* rovné $85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (obr. 24). K ustálení posunu potenciálu píku 2-nitrofluorenu se zvyšující se koncentrací DNA v modifikačním roztoku dochází již při $c_m^* = 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ (obr. 25).

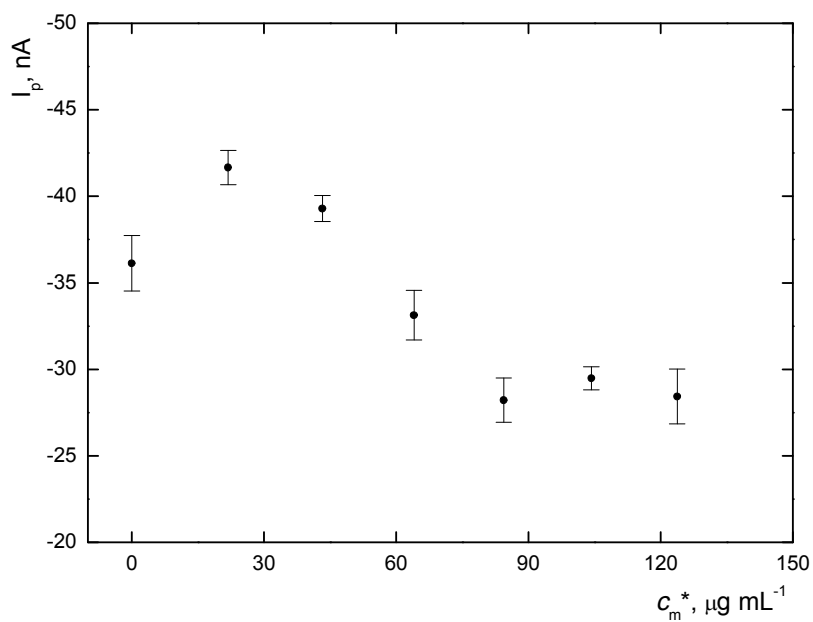
Při koncentraci 2-nitrofluorenu $1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ se nárůst proudu píku i posun potenciálu píku 2-nitrofluorenu ustálily při $44 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch HMDE. Příslušné DP voltamogramy (obr. 26) a odpovídající vyhodnocené závislosti

(obr. 27 a 28) jsou zobrazeny pro ilustraci.

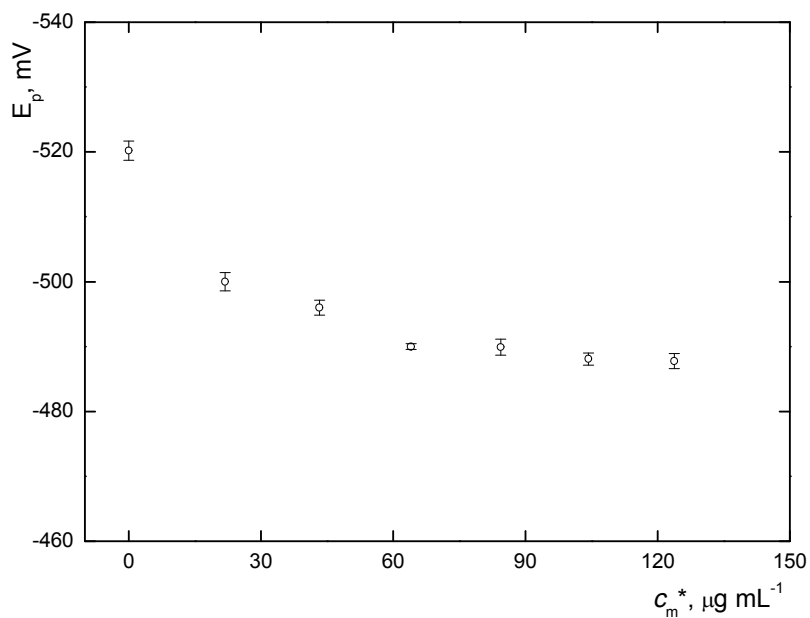
U koncentrace 2-nitrofluorenu $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ nárůst proudu píku ustal již při $c_m^* = 22 \mu\text{g mL}^{-1}$ (obr. 29 zobrazuje DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na DNA modifikované visící rtuťové kapkové elektrodě). Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu na c_m^* je graficky znázorněna na obr. 30. U závislosti potenciálu píku 2-nitrofluorenu na c_m^* nastala odlišná situace od všech předešlých. K výraznému posunu potenciálu píku došlo až u $85 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA v modifikačním roztoku, opět k méně negativním hodnotám (obr. 31). Tento jev může být vysvětlen delší dobou formování intermediátu DNA a 2-nitrofluorenu před samotným vsunutím 2-nitrofluorenu mezi páry basí DNA.



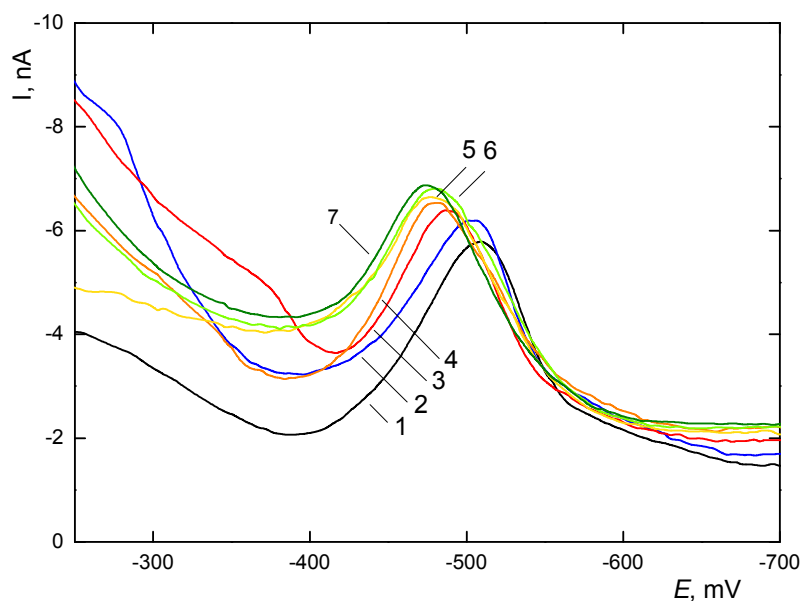
Obr. 23. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Měřeno v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody: 0 (1); 22 (2); 44 (3); 64 (4); 85 (5); 104 (6) a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (7).



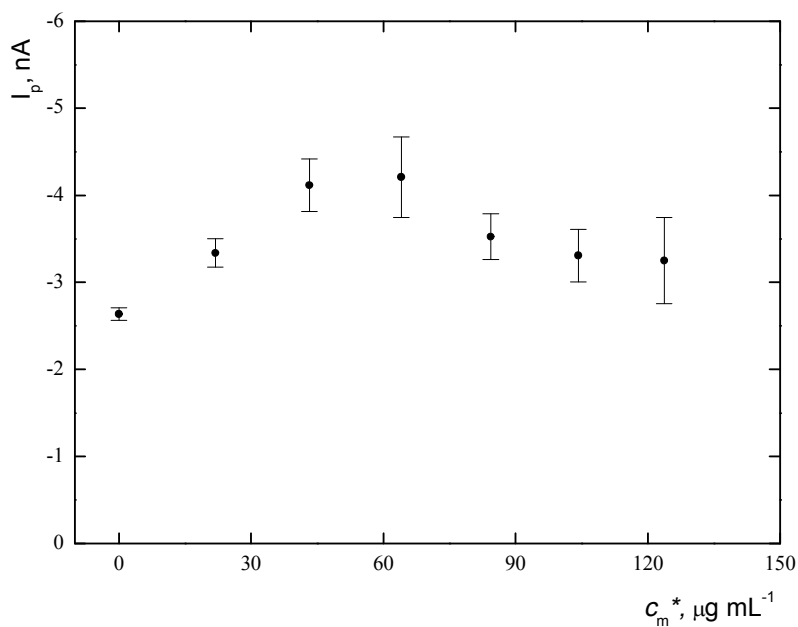
Obr. 24. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$); $n = 4$.



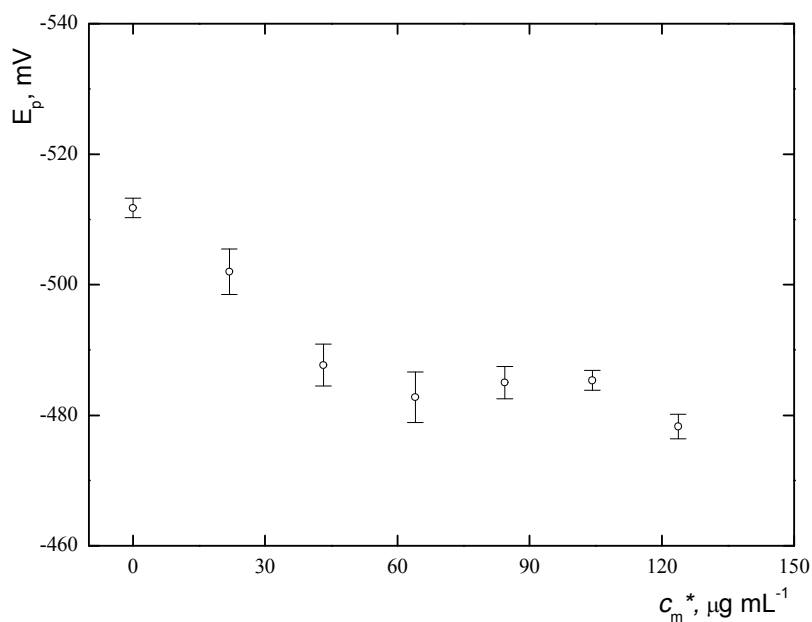
Obr. 25. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; $\text{pH}^* 8,1$); $n = 4$.



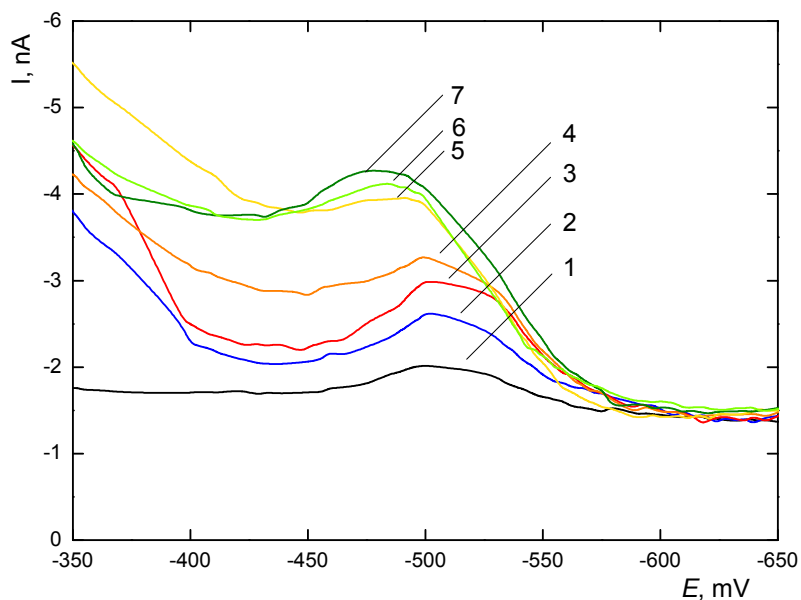
Obr. 26. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Měřeno v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody: 0 (1); 22 (2); 44 (3); 64 (4); 85 (5); 104 (6) a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (7).



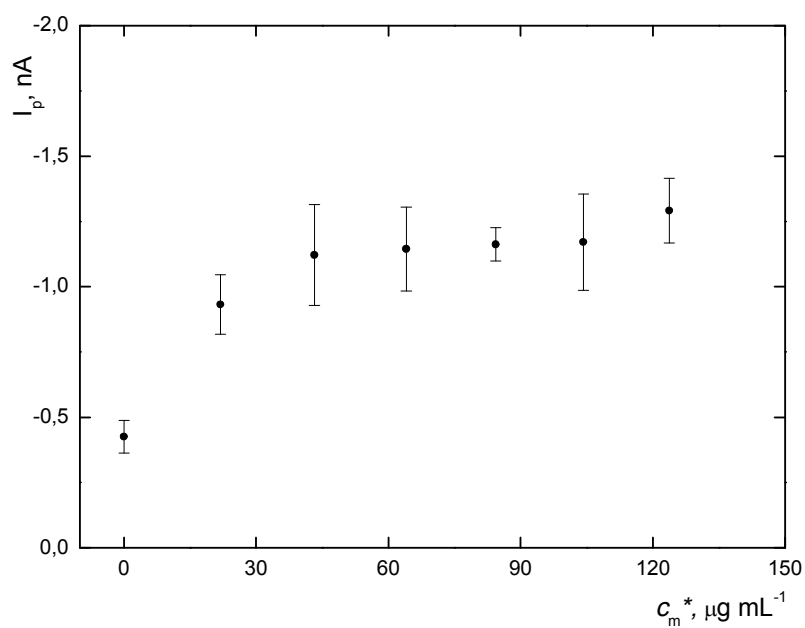
Obr. 27. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



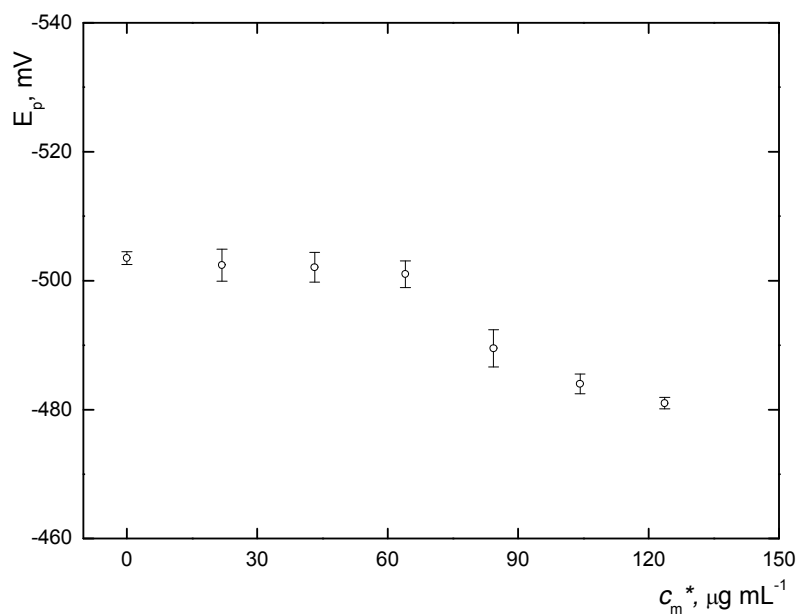
Obr. 28. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



Obr. 29. DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Měřeno v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody: 0 (1); 22 (2); 44 (3); 64 (4); 85 (5); 104 (6) a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (7).



Obr. 30. Závislost proudu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.



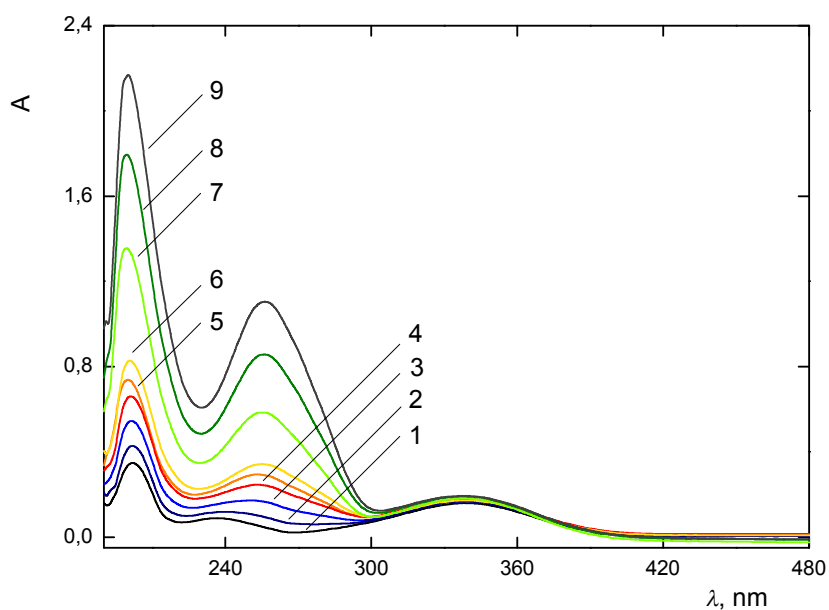
Obr. 31. Závislost potenciálu píku 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na výsledné koncentraci DNA v roztoku, ze kterého se adsorbovala na povrch elektrody. Měřeno technikou DPV na modifikované HMDE pomocí DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); $n = 4$.

4. UV-VIS absorpční spektroskopie

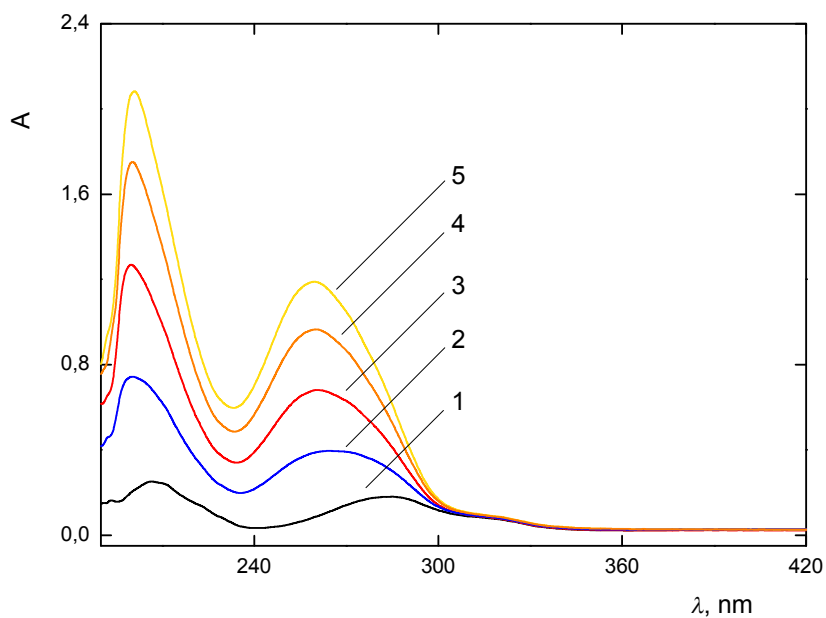
Interakce DNA s 2-nitrofluorenem byla sledována spektrofotometricky proti roztoku PB – ethanol (1:1; pH* 8,1) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm. Kromě 2-nitrofluorenu byl pro srovnání ještě použit 2-aminofluoren, jako modelový zástupce interkalátorů. Koncentrace roztoků vybraných látek v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1) činila $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹. Koncentrace roztoku DNA obsahujícího 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl a 1 mmol L⁻¹ EDTA o výsledném pH 7,8 činila 0,88 mg mL⁻¹. Absorbance všech roztoků byla měřena v rozsahu vlnových délek 190 až 1000 nm. Po provedení záznamu absorpčního spektra vybraných látek byl do stejného roztoku přidáván příslušný objem zásobního roztoku DNA. Pro lepší orientaci ve výsledných koncentracích DNA v roztoku slouží tabulka III. Po každém přidavku byl roztok krátce zamíchán.

UV-VIS spektroskopie je široce rozšířená efektivní metoda pro monitorování tvorby komplexu mezi DNA a poškozujícími molekulami. Léčiva, pesticidy, komplexy přechodných kovů atd. se mohou vázat na DNA nekovalentními interakcemi (interkalace, vazba ve žlábcích dvoušroubovice DNA či elektrostatické interakce) nebo kovalentně. Všechny typy interakcí způsobují odchylky ve struktuře DNA, které se mohou projevit na příslušných absorpčních spektrech⁵⁷. Absorpční spektrum 2-nitrofluorenu s přidavky DNA je zobrazeno na obr. 32, spektrum 2-aminofluorenu s přidavky DNA na obr. 33

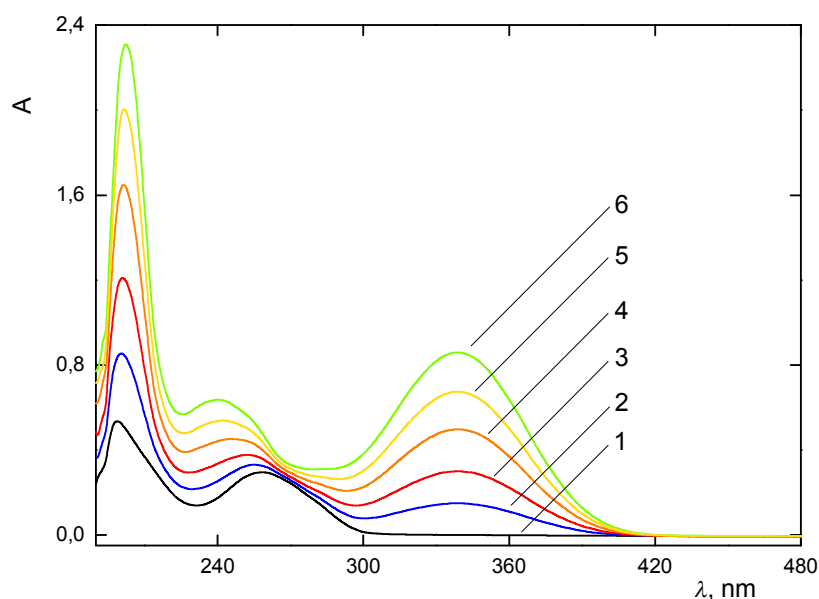
Na základě výsledků z diferenční pulsní voltametrie byl očekáván hypochromní efekt a červený posun, typické chování při vzniku komplexu DNA – interkalátor v UV-VIS spektroskopii^{29,58}. Z obr. 32 je zřejmý posun absorpčních maxim 2-nitrofluorenu směrem k větším vlnovým délkám, k posunu však došlo pouze v důsledku skládání křivek. 2-Nitrofluoren vykazuje UV-VIS absorpční maxima při vlnových délkách 202 a 236 nm, absorpční maxima DNA jsou při 200 a 260 nm. Tím se snadno vysvětluje modrý posun, ke kterému došlo na obr. 34. Do roztoku DNA v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1) se postupně přidával roztok 2-nitrofluorenu v tomtéž prostředí. Pro lepší orientaci výsledných koncentrací 2-nitrofluorenu slouží tabulka IV. Z absorpčních spekter je patrné, že absorpční maxima ani jedné vybrané látky se výrazně neliší od maxim DNA, proto se nehodí k určování typu vazby ve vznikajícím komplexu DNA – interkalátor.



Obr. 32. Absorpční UV-VIS spektrum roztoku 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA přidané do roztoku: 0 (1); 4 (2); 9 (3); 13 (4); 17 (5); 22 (6); 44 (7); 64 (8) a $85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (9).



Obr. 33. Absorpční UV-VIS spektrum roztoku 2-aminofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace DNA přidané do roztoku: 0 (1); 22 (2); 44 (3); 64 (4) a $85 \mu\text{g mL}^{-1}$ (5).



Obr. 34. Absorpční UV-VIS spektrum roztoku DNA ($c_m = 22 \mu\text{g mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1); zobrazeny odezvy odpovídající hodnotám výsledné koncentrace 2-nitrofluorenu přidávaného do roztoku: 0 (1); 99 (2); 190 (3); 280 (4); 360 (5) a 430 nmol L^{-1} (6).

Tabulka IV

Výsledná koncentrace 2-nitrofluorenu přidávaného do 2 mL roztoku DNA ($c_m = 22 \mu\text{g mL}^{-1}$) v prostředí PB – ethanol (1:1; pH* 8,1). Výsledná koncentrace 2-nitrofluorenu je korigovaná na konečný objem.

Přidávky 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) [μL]	Výsledná c 2-nitrofluorenu v roztoku [nmol L^{-1}]
20	99
40	190
60	280
80	360
100	430

5. Závěr

- 1) Byly nalezeny optimální podmínky pro voltametrickou detekci poškození struktury DNA interakcí s 2-nitrofluorenem za přítomnosti dvouvláknové DNA (dsDNA) v roztoku či DNA adsorbované na povrchu pracovní elektrody (visící rtuťové kapkové elektrody) technikami cyklické voltametrie a diferenční pulsní voltametrie. Jako optimální prostředí byla zvolena směs $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0 – ethanol (1:1; pH* 8,1).
- 2) Dále byl vyvinut elektrochemický biosensor založený na modifikaci visící rtuťové kapkové elektrody nanosenou vrstvou dsDNA z telecího brzlíku. Takto připravený DNA biosensor byl použit ke zkoumání přímé interakce DNA s 2-nitrofluorenem metodou cyklické voltametrie. Přestože pokles voltametrické odezvy indikující poškození struktury dsDNA činil pouze 9 %, jedná se o statisticky nezanedbatelné snížení odezvy interpretované jako degradace dsDNA vlivem interkalace 2-nitrofluorenu do struktury dsDNA.
- 3) Biosensor založený na modifikaci visící rtuťové kapkové elektrody vrstvou dsDNA byl použit při studiu interakce DNA s produkty elektrochemické redukce 2-nitrofluorenu. Během čtyřelektronového kroku redukce nitroskupiny na hydroxylaminoskupinu se generují radikály s krátkou dobou života, které interagují s DNA a způsobují její poškození. Tato interakce byla detekována cyklickou voltametrií sledováním poklesu redukčního píku adeninu a cytosinu. Tři způsoby redukce 2-nitrofluorenu byly testovány: a) následné katodicko/anodické cyklování od 0 do -800 mV (20 skenů), b) cyklování od -300 do -800 mV (20 skenů) a c) redukce při konstantním potenciálu -800 mV (probíhající 10 min). K největšímu poklesu CA píku, a tedy i k největšímu oxidativnímu poškození dsDNA, došlo v případě cyklování v kratším rozsahu potenciálů. Zbylé dva způsoby generování nitroanion radikálů jsou v míře poškození DNA srovnatelné.
- 4) Diferenční pulsní voltametrií na visící rtuťové kapkové elektrodě byla studována elektrochemická redukce 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) za přítomnosti DNA v roztoku. Při asociaci DNA s 2-nitrofluorenem vzniká komplex DNA – 2-nitrofluoren, typ vznikající vazby má interkalativní charakter. Při nejnižší

použité koncentraci 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$), a zároveň od výsledné koncentrace DNA v roztoku $163 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, začíná převládat elektrostatické vázání 2-nitrofluorenu na cukr-fosfátovou kostru DNA oproti interkalaci. Genotoxicita 2-nitrofluorenu je způsobena s vysokou pravděpodobností právě těmito typy vazeb.

- 5) Diferenční pulsní voltametrií bylo studováno elektrochemické chování 2-nitrofluorenu ($c = 1.10^{-5}$, 1.10^{-6} a $1.10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) za přítomnosti DNA imobilizované na povrchu visící rtuťové kapkové elektrody. Takto připravený DNA biosensor umožňuje průkaznou detekci poškození DNA způsobené 2-nitrofluorenem. Výsledky obdržené pomocí tohoto DNA biosensoru se výrazně neliší od výsledků voltametrického měření redukce 2-nitrofluorenu s DNA v roztoku, k ustálení změn proudu a potenciálu píku 2-nitrofluorenu však vždy docházelo při nižších koncentracích DNA.
- 6) V této práci bylo prokázáno, že voltametrické techniky za použití visící rtuťové kapkové elektrody poskytují při detekci poškození DNA vlivem interakce s 2-nitrofluorenem komplexnější výpověď o vzniku a vlastnostech této interakce, než je tomu u často používané UV-VIS absorpční spektroskopie.

6. Literatura

1. Krejčová, Z., Voltametrické stanovení genotoxického 2-nitrofluorenu pomocí leštěné stříbrné tuhé amalgamové kompozitní elektrody. *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.
2. Beije, B.; Moller, L., Correlation between induction of unscheduled DNA-synthesis in the liver and excretion of mutagenic metabolites in the urine of rats exposed to the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* 1988, 9 (8), 1465-1470.
3. Yaffe, D.; Cohen, Y.; Arey, J.; Grosovsky, A. J., Multimedia analysis of PAHs and nitro-PAH daughter products in the Los Angeles basin. *Risk Analysis* 2001, 21 (2), 275-294.
4. International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol46/volume46.pdf>, staženo 1.2.2011.
5. Sigma-Aldrich: Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus.
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d1501pis.Par.0001.File.tmp/d1501pis.pdf, staženo 1.2.2011.
6. Reichmann, M. E.; Rice, S. A.; Thomas, C. A.; Doty, P., A further examination of the molecular weight and size of desoxypentose nucleic acid. *Journal of American Chemical Society* 1954, 76 (11), 3047-3053.
7. Kocourek, V.; Hajšlová, J. Nitrované polycyklické uhlovodíky: environmentální karcinogeny. <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf>, staženo 1.2.2011.
8. World Health Organization: Selected nitro- and nitro-oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc229.htm>, staženo 1.2.2011.
9. Beiner, K.; Montero, L.; Winkler, U.; Bauer, C.; Popp, P., Determination of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in particulate matter. *Chromatographia* 2003, 57, S219-S223.
10. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J., Polarographic and voltammetric determination of carcinogenic nitro and amino derivatives of polycyclic

- aromatic hydrocarbons. *Electroanalysis* 2001, 13 (8-9), 799-803.
11. Sekyra, M.; Leníček, J.; Bednářková, K.; Beneš, I., GC-MS stanovení nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků v ovzduší. *Chemické listy* 2000, 94 (10), 924-930.
 12. Břicháč, J.; Zima, J.; Barek, J., HPLC determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons after their reduction to amino derivatives. *Analytical Letters* 2004, 37 (11), 2379-2392.
 13. Wua, P. F.; Chiangb, T. A.; Wangc, L. F.; Changc, C. S.; Kod, Y. C., Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon contents of fumes from heated cooking oils and prevention of mutagenicity by catechin. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1998, 403 (1-2), 29-34.
 14. Zielinska, B.; Samy, S., Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, 386 (4), 883-890.
 15. Barek, J.; Pumera, M.; Muck, A.; Kadeřábková, M.; Zima, J., Polarographic and voltammetric determination of selected nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta* 1999, 393 (1-3), 141-146.
 16. Scheepers, P. T. J.; Velders, D. D.; Martens, M. H. J.; Noordhoek, J.; Bos, R. P., Gas-chromatographic mass-spectrometric determination of nitro polycyclic aromatic-hydrocarbons in airborne particulate matter from workplace atmospheres contaminated with diesel exhaust. *Journal of Chromatography A* 1994, 677 (1), 107-121.
 17. Al-Kindy, S. M.; Miller, J. N., High-performance liquid chromatography determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by indirect fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 2009, 23 (2), 166-169.
 18. Moreira, J. C.; Barek, J., Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic-hydrocarbons – A review. *Quimica Nova* 1995, 18 (4), 362-367.
 19. Barek, J.; Pecková, K.; Vyskočil, V., Adsorptive stripping voltammetry of environmental carcinogens. *Current Analytical Chemistry* 2008, 4 (3), 242-249.
 20. Moller, L., *In vivo* metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic-hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* 1994, 102 (4), 139-146.
 21. Moller, L.; Corrie, M.; Midtvedt, T.; Rafter, J.; Gustafsson, J. A., The role of the

- intestinal microflora in the formation of mutagenic metabolites from the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* 1988, 9 (5), 823-830.
22. Vyskočil, V.; Barek, J., Electroanalysis of nitro and amino derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Organic Chemistry* 2011, 15, v tisku.
 23. Abreu, F. C.; Goulart, M. O. F.; Brett, O., Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2002, 17 (11-12), 913-919.
 24. Zuman, P., Polarografie při studiu chemických reakcí provázejících elektrodové děje. *Chemické listy* 1997, 91 (2), 91-99.
 25. Paleček, E., Fifty years of nucleic acid electrochemistry. *Electroanalysis* 2009, 21 (3-5), 239-251.
 26. Jelen, F.; Fojta, M.; Paleček, E., Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1996, 427 (1-2), 46-56.
 27. Jelen, F.; Paleček, E., Chemically reversible electroreduction of guanine in a polynucleotide chain. *Biophysical Chemistry* 1986, 24 (3), 285-290.
 28. Paleček, E.; Wang, J.; Scheller, F., *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins*. Elsevier, Amsterdam 2005.
 29. Yola, M. L.; Özaltın, N., Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2011, 653 (1-2), 56-60.
 30. Paleček, E., From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes. *Electroanalysis* 1996, 8 (1), 7-14.
 31. Wang, J.; Ozsoz, M.; Cai, X.; Rivas, G.; Shirishi, H.; Grant, D.; Chicharro, J.; Fernandes, J.; Paleček, E., Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998, 45 (1), 33-40.
 32. Vacek, J.; Havran, L.; Fojta, M., Elektrochemická analýza poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA. *Chemické listy* 2011, 105 (1), 15-26.
 33. Paleček, E.; Fojta, M.; Tomschik, M.; Wang, J., Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics* 1998, 13 (6), 621-628.
 34. Fojta, M., Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis*

- 2002, 14 (21), 1449-1463.
35. Lucarelli, F.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; Mascini, M., Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection toxicants in water and wastewater samples. *Talanta* 2001, 56 (5), 949-957.
 36. Rauf, S.; Gooding, J. J.; Akhtar, K.; Ghauri, M. A.; Rahman, M.; Anwar, M. A.; Khalid, A. M., Electrochemical approach of anticancer drugs – DNA interaction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, 37 (2), 205-217.
 37. Fojta, M.; Havran, L.; Fulnečková, J.; Kubičárová, T., Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators. *Electroanalysis* 2000, 12 (12), 926-934.
 38. Kuchaříková, K.; Novotný, L.; Yosypchuk, B.; Fojta, M., Detecting DNA damage with a silver solid amalgam electrode. *Electroanalysis* 2003, 16 (5), 410-414.
 39. Fadrná, R.; Cahová-Kuchaříková, K.; Havran, L.; Yosypchuk, B.; Fojta, M., Use of polished and mercury film-modified silver solid amalgam electrodes in electrochemical analysis of DNA. *Electroanalysis* 2004, 17 (5-6), 452-459.
 40. Barek, J.; Yosypchuk, B.; Opekar, F.; Švancara, I.; Labuda, J.; Ferancová, A.; Fojta, M.; Navrátil, T.; Nesměrák, K.; Novotný, L., *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Česká společnost chemická, Praha 2006.
 41. Paleček, E.; Jelen, F.; Teijeiro, C.; Fučík, V.; Jovin, T. M., Biopolymer-modified electrodes in the voltammetric determination of nucleic acids and proteins at the submicrogram level. *Analytica Chimica Acta* 1993, 273 (1-2), 175-186.
 42. Fojta, M., Mercury electrodes in nucleic acid electrochemistry: Sensitive analytical tools and probes of DNA structure. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 2004, 69 (4), 715-747.
 43. Vyskočil, V.; Labuda, J.; Barek, J., Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 397 (1), 233-241.
 44. Fojta, M.; Paleček, E., Supercoiled DNA-modified mercury electrode: A highly sensitive tool for the detection of DNA damage. *Analytica Chimica Acta* 1996, 342 (1), 1-12.

45. Fojta, M.; Staňková, V.; Paleček, E.; Koscielniak, P.; Mitáš, J., A supercoiled DNA-modified mercury electrode-based biosensor for the detection of DNA strand cleaving agents. *Talanta* 1998, 46 (1), 155-161.
46. Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J., Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, disease. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003, 17 (10), 1195-1214.
47. Fojta, M.; Kubičárová, T.; Paleček, E., Electrode potential-modulated cleavage of surface-confined DNA by hydroxyl radicals detected by an electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2000, 15 (3-4), 107-115.
48. Bartlett, P., *Bioelectrochemistry. Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. John Wiley & Sons, Chichester 2008.
49. Tocher, J., Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *General Pharmacology* 1997, 28 (4), 485-487.
50. Muñiz Alvarez, J. L.; García Calzón, J. A.; López Fonseca, L. M., Electrocatalytic effects of deoxyribonucleic acids, adenine and guanine on the reduction of Ni(II) at a mercury electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1998, 457 (1-2), 53-59.
51. Oliveira, S. C. B.; Corduneanu, O.; Oliveira-Brett, A. M., In situ evaluation of heavy metal–DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor. *Bioelectrochemistry* 2008, 72 (1), 53-58.
52. Chiorcea-Paquim, A.-M.; Corduneanu, O.; Oliveira, S. C. B.; Diculescu, V. C.; Oliveira-Brett, A. M., Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds–DNA interaction. *Electrochimica Acta* 2009, 54 (7), 1978-1985.
53. Hendry, L. B.; Mahesh, V. B.; Bransome, E.; Ewing, D. E., Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2007, 623 (1-2), 53-71.
54. Bhadra, K.; Maiti, M.; Kumar, G. S., Molecular recognition of DNA by small molecules: AT base pair specific intercalative binding of cytotoxic plant alkaloid palmatine. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects* 2007, 1770 (7), 1071-1080.

55. Kubař, T.; Hanus, M.; Ryjáček, F.; Hobza, P., Binding of cationic and neutral phenanthridine intercalators to a DNA oligomer is controlled by dispersion energy: Quantum chemical calculations and molecular mechanics simulations. *Chemistry – A European Journal* 2006, 12 (1), 280-290.
56. Minasyan, S. H.; Tavadyan, L. A.; Antonyan, A. P.; Davtyan, H. G.; Parsadanyan, M. A.; Vardevanyan, P. O., Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. *Bioelectrochemistry* 2005, 68 (1), 48-55.
57. Ahmadi, F.; Jafari, B., Voltammetry and spectroscopy study of in vitro interaction of fenitrothion with DNA. *Electroanalysis* 2010, 23 (3), 675-682.
58. Hajian, R.; Shams, N.; Parvin, A., DNA-binding studies of daunorubicin in the presence of methylene blue by spectroscopy and voltammetry techniques. *Chinese Journal of Chemistry* 2009, 27 (6), 1055-1060.