

UHLÍKOVÉ ELEKTRODY MODIFIKOVANÉ DEOXYRIBONUKLEOVOU KYSELINOU JAKO NÁSTROJE PRO ELEKTROCHEMICKOU DETEKCI JEJÍHO POŠKOZENÍ

VLASTIMIL VYSKOČIL* a ANDREA HÁJKOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 2030/8, 128 43 Praha 2
vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Došlo 22.11.15, přijato 25.1.16.

Klíčová slova: supramolekulární chemie, DNA biosenzory, uhlíkové elektrody, poškození DNA, chemické karcinogeny, léčiva, oxidační stres, referát

Obsah

1. Úvod
2. Elektrochemické DNA biosenzory pro detekci poškození DNA
 - 2.1. Konstrukce biosenzorů
 - 2.2. Detekční techniky
 - 2.3. Zkoumané cizorodé sloučeniny
3. Závěr

1. Úvod

Výzkum vzájemných interakcí malých molekul s nukleovými kyselinami se již před několika desítkami let dostal do popředí zájmu celosvětové vědy. Studium těchto supramolekulárních interakcí v módu *in vitro* je klíčové pro jejich detailní pochopení, především pak z hlediska možného poškození struktury deoxyribonukleové kyseliny (DNA) – nositelky základní genetické informace u většiny živých organismů – způsobeného různými cizorodými látkami¹. Je známo mnoho sloučenin schopných reverzibilní interakce s dvouvláknovou DNA (dsDNA) prostřednictvím následujících tří interakčních módů^{2–4}: sterické interakce molekuly v místě malého či velkého žlábků DNA, interkalace (vmezeření) molekuly mezi páry bází DNA nebo elektrostatické interakce kladně nabitě částí molekuly se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA.

Analýza vzájemných molekulárních interakcí mezi léčivými cílenými na DNA a samotnou DNA hraje důležitou roli při plánování vývoje nových chemoterapeutik a testování jejich účinků. Interakce protinádorových léčiv

s nukleovými kyselinami byly studovány řadou fyzikálních a biochemických technik. Při výzkumu těchto interakcí (vyšetřování vazebných módů, afinity a selektivity studovaného léčiva vůči nukleovým kyselinám) byly použity např. nukleární magnetická rezonance, spektrofotometrie, vibrační spektroskopie (infračervená a Ramanova spektroskopie), studium rozptylu světla, povrchová plazmonová rezonance, měření viskozity, lineární a cirkulární dichroismus či kapilární elektroforéza⁵. Tyto techniky lze úspěšně využít při výzkumu vazebných mechanismů a analýze nově vznikajících struktur po interakci léčiva s DNA⁶, avšak často se jedná o časově i finančně velmi náročné studie, což brání jejich použití pro rychlé testování velkého počtu nových potenciálních léčiv. Jedno z řešení tohoto problému představují elektrochemické DNA biosenzory využívající vrstvy nukleové kyseliny navázané na elektrochemickém převodníku elektrického signálu (pracovní elektrodě). Tento typ afinitních biosenzorů je schopen rychle rozpoznat a sledovat interakci studované molekuly s DNA (změna fyzikálních, chemických a strukturálních vlastností DNA se odráží v jejím redoxním chování)¹. Elektrochemické DNA biosenzory byly v minulosti použity např. při sledování poškození DNA, při studiu interakcí DNA s různými genotoxickými látkami (karcinogeny, mutageny, toxiny, léčiva apod.) a také při detekci specifických mutací v sekvencích DNA⁷. Proto také představují rychlou a finančně nenáročnou alternativu k výše uvedeným technikám^{8–10}.

Elektrochemické DNA biosenzory mohou být použity nejen k detekci poškození DNA, ale rovněž k jeho vyvolání a kontrole. Na povrchu biosenzoru lze elektrochemicky generovat poškozující (většinou radikálové) sloučeniny¹¹, které okamžitě interagují s okolní DNA. Takto bylo studováno poškození DNA sekundárně vyvolané některými chemickými karcinogeny a léčivy (nitroderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků¹², adriamycinem¹³, niklosamidem¹⁴ či nitrofurazonem¹⁵).

Problematika elektrochemických DNA biosenzorů je i dnes velmi aktuální téma, o čemž vypovídají nedávno zveřejněné přehledové referáty^{1,16–25}. Tento příspěvek si klade za cíl představit nové elektrochemické DNA biosenzory, jež využívají netradiční uhlíkové elektrodové materiály jako převodníky elektrického signálu a substráty pro navázání DNA, a shrnout výsledky, jichž bylo v posledních pěti letech dosaženo s těmito biosenzory v naší UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí.

* Vlastimil Vyskočil je laureátem Ceny Metrohm za nejlepší publikaci mladého elektroanalytického chemika do 35 let v roce 2014.

2. Elektrochemické DNA biosenzory pro detekci poškození DNA

DNA patří mezi důležité biologické makromolekuly, jimž hrozí vážné strukturální změny (oxidace nukleových bází a deoxyribosových zbytků, uvolňování nukleových bází či vznik zlomů na polynukleotidových vláknech) v důsledku interakce s radikálovými sloučeninami (např. reaktivními formami kyslíku (ROS), dusíku či síry)^{26,27} nebo jinými druhy genotoxických sloučenin (např. chemickými karcinogeny či protinádorovými léčivy)²⁸. Živočišná buňka je denně vystavována zhruba desítkám tisíc až milionům poškozujících útoků vůči DNA²⁸. Hromadění následků oxidativního poškození DNA je jednou z příčin stárnutí a vzniku různých onemocnění (např. nádorových či neurodegenerativních). Proto je detekce poškození DNA jednou z hlavních aplikací elektrochemických DNA biosenzorů.

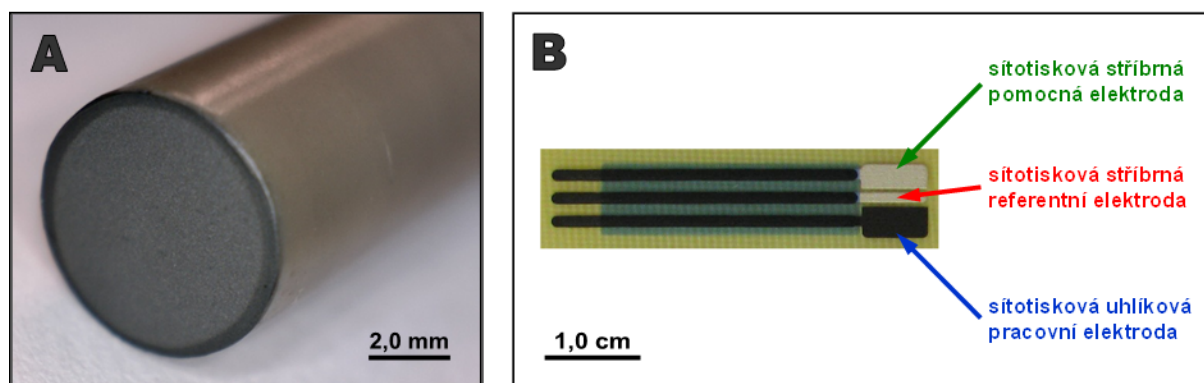
2.1. Konstrukce biosenzorů

DNA biosenzory jsou integrovaná zařízení tvořená rozhraním bioreceptor-převodník signálu (převodníky pracují většinou na bázi elektrického, teplotního či optického přenosu signálu), ve kterých figuruje DNA jako biomolekulární rozpoznávací prvek pro měření specifických vazebných procesů vůči DNA¹⁶. Ve srovnání s ostatními převodníky se ty elektrochemické těší značné oblibě, především díky skutečnosti, že umožňují rychlou detekci a vykazují vysokou citlivost^{29,30}. Mezi elektrochemickými převodníky pak zaujímají významnou pozici převodníky (pracovní elektrody) na bázi různých uhlíkových materiálů¹⁶ (např. elektrody ze skelného uhlíku (GCE), pyrolytického grafitu či psací tuhy, uhlíkové kompozitní, pastové či filmové elektrody, sítotiskové uhlíkové elektrody (SPCE), borem dopované diamantové elektrody^{31,32}, chemicky modifikované uhlíkové elektrody nebo uhlíkové elektrody modifikované různými nanočásticemi). Široké elektrochemické potenciálové okno, především pak v kladných hodnotách potenciálů, umožňuje citlivou elektrochemickou

detekci poškození DNA sledováním oxidačních signálů bází DNA³³.

V posledních pěti letech byla naše pozornost věnována vývoji nových elektrochemických DNA biosenzorů založených na uhlíkových převodnicích jako substrátech pro navázání DNA. Pro tyto účely se nám osvědčily především následující čtyři druhy pracovních elektrod: GCE (dodávána firmou Metrohm, Herisau, Švýcarsko), filmová elektroda tvořená kompozitem z mikrokrytalického přírodního grafitu a polystyrenu (CFE), SPCE (dodávána Výzkumným ústavem potravinářským, Bratislava, Slovenská republika) a SPCE modifikovaná jednostennými uhlíkovými nanotrubičkami (SWCNT).

Nově vyvinutá CFE³⁴ (obr. 1A), připravená pokrytím běžné pevné pracovní elektrody vodivým uhlíkovým filmem, představuje velmi slibnou alternativu k elektrodám modifikovaným různými uhlíkovými nanočásticemi s užitečnými elektrokatalytickými vlastnostmi (nanotrubičky, nanovlákná, grafen apod.)^{35–40}. Nejmenší částice mikromletého přírodního grafitu (typ CR 2 995, Graphite Týn, Týn nad Vltavou, Česká republika) dosahují velikosti okolo 1000 nm (cit.⁴¹), což jsou rozměry velmi blízké těm, které mají uhlíkové nanočástice běžně používané v moderních elektroanalytických aplikacích. Nicméně pořizovací cena tohoto elektrodového materiálu je nerosnatelně nižší (přibližně 1 euro cent za 1 g) než v případě komerčně dostupných uhlíkových nanočástic. Proto je také snadněji využitelný pro praktické aplikace. CFE navíc představuje velmi vhodnou alternativu k jednorázovému SPCE⁴². Jejimi hlavními výhodami jsou: snadná, rychlá a finančně nenáročná příprava (povrch běžné pracovní elektrody – kovové či uhlíkové – se pokryje uhlíkovým kompozitním inkoustem, který se nechá na vzduchu zaschnout), snadná mechanická obnova elektrodového povrchu (otřením použitého filmu o filtrační papír a vytvořením nového filmu), dobrá reprodukovatelnost přípravy filmu i vlastních měření, eliminace problémů spojených s „historií elektrody“ a snadná chemická modifikace elektrodového povrchu.



Obr. 1. Detailní fotografie filmové elektrody tvořené kompozitem z mikrokrytalického přírodního grafitu a polystyrenu (CFE) (A) a popisná fotografie souboru sítotiskových elektrod s uhlíkovou pracovní elektrodou (SPCE) (B)

Jednorázový soubor sítotiskových elektrod¹² (obr. 1B), jenž byl připraven pomocí běžné sítotiskové aparatury, je složen z uhlíkové pastové pracovní elektrody, stříbrné inkoustové pseudo-referenční elektrody a stříbrné inkoustové pomocné elektrody. SPCE modifikovaná karboxylovanými SWCNT (SWCNT/SPCE) byla připravena postupem popsaným v cit.⁴³.

Adsorpce je nejjednodušší technikou, jakou lze navázat DNA na povrch elektrody. Nevyžaduje žádné speciální chemikálie ani modifikace ve struktuře DNA. V literatuře jsou popsány postupy navázání DNA na povrch různých uhlíkových elektrod (např. GCE, uhlíkových pastových elektrod či SPCE) za pomoci kladného potenciálu vloženého na pracovní elektrodu^{1,44–46}. Vyleštěný povrch pracovní elektrody je většinou aktivován vložením vyššího kladného potenciálu (cca 1,5 až 1,8 V vůči argentchloridové referenční elektrodě (Ag|AgCl)) po určitou dobu. Tato předúprava uhlíkového povrchu zvýší jeho hrubost a hydrofilnost^{47,48}. Elektrochemická adsorpce DNA je poté prováděna v míchaném roztoku při vloženém potenciálu 0,5 V (vůči Ag|AgCl) po určitý čas, který se volí v závislosti na koncentraci DNA. Použití elektrochemické adsorpce (na rozdíl od samovolné adsorpce) zlepšuje stabilitu vrstvy navázané DNA prostřednictvím elektrostatické interakce mezi kladně nabitým uhlíkovým povrchem a záporně nabitou hydrofilní cukr-fosfátovou kostrou DNA¹¹.

My jsme použili tento druh navázání DNA při vývoji nového biosenzoru, jež využíval nízkomolekulární dsDNA izolovanou z lososích spermii jako biorozpoznávací vrstvu navázanou na povrch GCE⁴⁹. Takto připravený biosenzor byl použit pro rychlou detekci poškození dsDNA způsobeného různými cizorodými organickými látkami^{49–51}. Celková příprava biosenzoru (zahrnující odstranění použité vrstvy dsDNA, aktivaci očištěného povrchu a elektrochemickou adsorpci nové vrstvy dsDNA) trvala méně než pět minut, což představuje značné zkrácení doby přípravy ve srovnání s technikami, které využívají k navázání DNA schnutí jejího roztoku na povrch elektrody – po nakápnutí roztoku DNA na povrch elektrody shora⁵⁰ (tento přístup byl použit v našich pracích např. při modifikaci CFE³⁴, SPCE^{12,52} či SWCNT/SPCE⁴³) nebo po krátkém ponoření elektrody do roztoku DNA^{53,54}.

2.2. Detekční techniky

Při použití elektrochemických DNA biosenzorů se nejčastěji užívají voltametrické (především cyklická voltametrie (CV), diferenční pulzní voltametrie (DPV) a square-wave voltametrie (SWV)) a chronopotenciometrické detekční techniky³³. Spolu s nimi se v poslední době stala oblíbenou také elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)⁵⁵. Podle typu elektrochemicky aktivní entity, jejíž odezvy jsou vyhodnocovány při detekci poškození DNA, můžeme experimentální techniky rozdělit do následujících tří skupin¹⁶:

1) techniky nevyužívající žádných redoxních značek či speciálních chemických reagentů (redoxních indikátorů, mediátorů, enzymových substrátů apod.) pro

generování měřené odezvy,

- 2) techniky využívající redoxních indikátorů buďto nekovalentně vázaných (látek schopných se stericky vázat do žlábků DNA, interkalátorů, záporně či kladně nabitých látek interagujících s DNA elektrostaticky), nebo přítomných v roztoku (např. anionty hexakynoželeznanatové/hexakynoželezitanové ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$)),
- 3) techniky využívající elektrochemicky aktivní značky (nanomateriály, enzymy apod.) kovalentně vázané na DNA (tyto techniky však nejsou příliš běžně používané při základním výzkumu poškození DNA).

Kombinace výše uvedených principů může poskytnout komplexnější informaci o změnách ve struktuře DNA při probíhajících poškozujících interakcích^{43,56}.

První skupina technik využívá redoxní nebo povrchovou aktivitu samotné DNA⁵⁷. Její elektrochemická aktivita vychází z přítomnosti redoxně aktivních míst na nukleových bázích a deoxyribosových zbytcích. Pouze nukleové báze poskytují redoxní signály na elektrodách na bázi uhlíku a rtuti. Deoxyribosa a fosfátové skupiny zůstávají při těchto měřeních inaktivní. Bylo dokázáno^{58–60}, že všechny nukleové báze DNA (guanin, adenin, thymin i cytosin) jsou oxidovatelné na uhlíkových elektrodách, přičemž mechanismus elektrochemické přeměny je závislý na pH. Elektrochemická předúprava GCE umožnila lepší rozlišení píků všech čtyř bází a jejich zvýšení⁵⁹; fosfátový pufr o pH 7,4 (hodnota blízká pH cytosolu) byl použit jako základní elektrolyt.

Polarografický výzkum přírodních i biosyntetických nukleových kyselin ukázal, že adeninové a cytosinové zbytky jsou, stejně tak jako guaninové zbytky v polynukleotidovém řetězci, redukovatelné na kapající rtuťové elektrodě^{1,3,61}. Technikou CV na visící rtuťové kapkové elektrodě lze pozorovat katodický pík odpovídající ireverzibilní redukci cytosinových a adeninových zbytků. Redukce guaninového zbytku probíhá až při velmi negativních potenciálech, avšak ve zpětném CV skenu je možné pozorovat anodický pík odpovídající oxidaci produktu vzniklého redukcí guaninového zbytku, kterým je 7,8-dihydroguaninový zbytek³.

Jelikož jsou jak elektrochemická redukce, tak oxidace bází DNA procesy ireverzibilní, nemůžeme měření na jednom biosenzoru provádět opakovaně. Počáteční zvýšení anodického píku guaninového zbytku po krátkodobé inkubaci biosenzoru v poškozujícím činidle může indikovat rozevření původní struktury dsDNA, zatímco následný pokles tohoto píku je důkazem silné degradace DNA⁵⁶. Pokles výšky či plochy anodického píku guaninového zbytku, vztažený vůči hodnotám poskytnutým nepoškozenou DNA (tzv. relativní odezva biosenzoru), byl obecně přijat jako míra poškození DNA a hodnocení stupně poškození této nukleové báze bylo navrženo jako princip rychlého testování genotoxicity environmentálních polutantů přítomných ve vzorcích přírodních i odpadních vod⁹. Některé produkty poškození DNA vykazují charakteristické elektrochemické odezvy (např. anodické píky 8-oxo-7,8-dihydroguaninových^{12,62} a 2,8-dihydroxyadeninových⁶³ zbytků), jež mohou být vyhodnocovány s vyšší citlivostí než

změny ve výšce/ploše píku guaninového zbytku.

Druhá skupina technik využívá elektroaktivní sloučeniny přidané k měřenému systému a interagující s DNA nekovalentně jako její indikátory (látky interagujících s DNA elektrostaticky, interkalátory, látky schopné se stericky vázat do žlábků DNA). Pokles elektrochemické odezvy nekovalentně navázaného indikátoru poukazuje na vznik zlomů na vláknech DNA a destrukci struktury dvoušroubovice. Redoxní indikátory mohou mít také podobu sloučenin volně difundujících v roztoku. Např. změna elektrochemického chování aniontů $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ indikuje přítomnost vrstvy DNA na povrchu elektrody i její poškození (chování indikátoru je ovlivněné velikostí elektrostatických repulzí mezi záporně nabitým indikátorem a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA^{64,65}).

Zkoumaná cizorodá látka může navíc sama sloužit jako redoxní indikátor. Pokud se potenciál jejího píku posouvá po interakci s dsDNA ke kladnějším potenciálům,

jedná se pravděpodobně o známku interkalace analytu mezi páry bází dsDNA, zatímco pokud se potenciál jejího píku posouvá k zápornějším potenciálům, lze usuzovat na elektrostatickou interakci s cukr-fosfátovou kostrou DNA^{25,66}. Takovýto přístup byl použit i v naší nedávné studii⁴⁹, ve které byla interakce mezi genotoxickým 2-aminofluoren-9-onem a dsDNA vyšetřována pomocí DPV na nemodifikované GCE, přičemž jak studovaná látka, tak dsDNA byly přítomny v analyzovaném roztoku. Pozorovanou vzájemnou interakcí byla převážně interkalace 2-aminofluoren-9-onu mezi páry bází dsDNA.

2.3. Zkoumané cizorodé sloučeniny

Existuje mnoho anorganických i organických sloučenin, které mohou v živých organismech interagovat s DNA, a způsobit tak vážná onemocnění. Faktory, které určují afinitu a selektivitu dané molekuly při těchto inter-

Tabulka I

Přehled sloučenin zkoumaných v naší UNESCO laboratoři elektrochemie životního prostředí pomocí různých elektrochemických DNA biosenzorů v souvislosti s poškozením DNA

Sloučenina	Detekční technika	Převodník (elektroda)	Druh poškození DNA	Lit.
<i>CHEMICKÉ KARCINOGENY</i>				
2-Acetylaminofluoren	DPV, SWV	GCE	interkalace	79
2-Aminoanthracen	SWV, EIS	GCE	interkalace	50
2-Aminofluoren	DPV, SWV	GCE	interkalace	79
	CV, SWV	CFE	interkalace	34
	CV, EIS	CFE	interkalace	80
	SWV	SPCE	interkalace	81
	DPV, SWV	GCE	interkalace	49
Anthracen	SWV, EIS	GCE	interkalace	50
2,7-Diaminofluoren	DPV, SWV	GCE	interkalace	79
	SWV	SPCE	interkalace	81
2,7-Dinitrofluoren	CV, DPV, SWV	SPCE	interkalace	12
2-Nitrofluoren	CV, EIS	GCE	interkalace	51
	CV, DPV, SWV	SPCE	interkalace	12
Fluoren	CV, EIS	CFE	interkalace	80
Fluoren-9-on	SWV	SPCE	interkalace	81
<i>LÉČIVA</i>				
Elipticin	CV	CFE	interkalace	76
Flutamid	SWV, EIS	GCE	poškození nezjištěno	50
4-Nitro-3-(trifluormethyl)anilin	SWV, EIS	GCE	poškození nezjištěno	50
Thioridazin	CV, SWV, EIS	SWCNT/SPCE	interkalace	43
<i>REAKTIVNÍ RADIKÁLOVÉ SLOUČENINY</i>				
Hydroxylové radikály	CV, SWV, EIS	CFE	oxidativní poškození	82
	CV, SWV, EIS	SWCNT/SPCE	oxidativní poškození	43
Nitroaniontové radikály	SWV	SPCE	oxidativní poškození	12

akcích s DNA, je třeba pečlivě studovat, protože jejich objasnění může být užitečné např. při vývoji specificky účinkujících chemoterapeutik či při zkoumání mechanismu účinku různých genotoxických sloučenin³³.

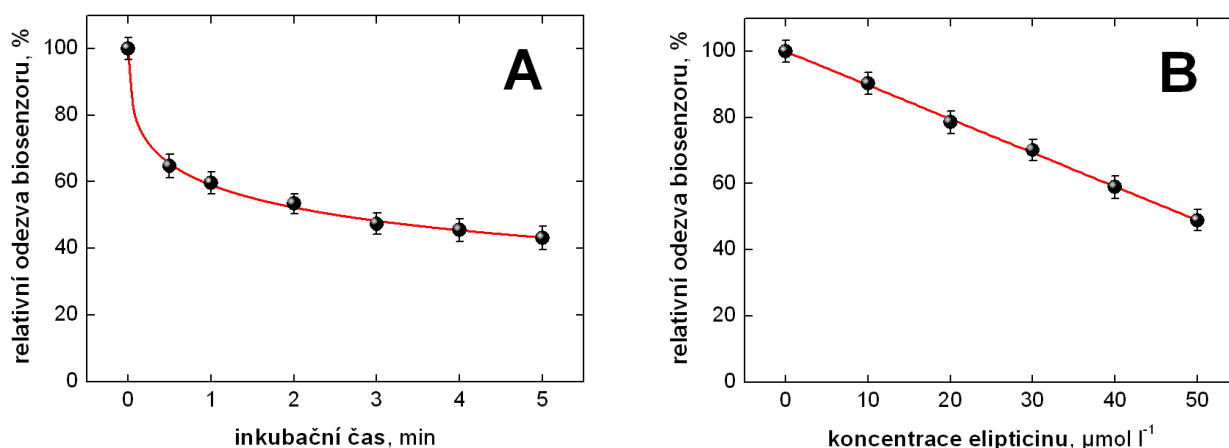
Poškození DNA způsobené environmentálními polutanty (mnoho z nich je klasifikováno jako chemické karcinogeny, viz tab. I) je hlavním projevem toxicity těchto látek v živých organismech⁶⁷. Většina organických polutantů nemůže přímo způsobit poškození DNA, ale produkty jejich metabolismu, vznikající prostřednictvím enzymatických reakcí, jsou genotoxické^{12,68}. Např. styren je jednou z nejčastěji používaných průmyslových chemikálií a sám o sobě vykazuje pouze nízkou míru genotoxicity⁶⁹. Pokud je však enzymaticky metabolizován prostřednictvím cytochromu P450, vzniká jeho oxidovaný metabolit (styren-7,8-oxid), který může s DNA tvořit adukty^{70–72}; styren-7,8-oxid je klasifikovaný Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka (skupina 2A)⁷³. Výše zmíněné genotoxické účinky environmentálních polutantů je možné sledovat i prostřednictvím elektrochemických DNA biosenzorů²⁵, které tak mohou sloužit jako základ pro *in vitro* testování genotoxicity nově připravených organických látek v rané fázi jejich zavádění pro komerční využití.

V naší studii¹² byl použit elektrochemický DNA biosenzor založený na SPCE s navázanou dsDNA (izolovanou z telecího brzlíku) pro zkoumání interakcí mezi genotoxickými nitroderiváty fluorenu (2-nitrofluorenem a 2,7-dinitrofluorenem) a DNA. Při výzkumu byly detegovány dva druhy poškození DNA: poškození způsobené přímou interakcí nitrofluorenů (interkalace studovaných analytů byla potvrzena pomocí studia konkurenční interakce známých DNA interkalátorů, komplexních kationtů $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ a $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$; phen představuje 1,10-fenanthrolin) a oxidativní poškození způsobené

radikálovými sloučeninami s krátkou dobou života (nitroaniontové radikály), generovanými při elektrochemické redukci nitroskupiny.

Podobný výzkum byl uskutečněn i v naší další studii³⁴, ve které byl použit voltametrický DNA biosenzor na bázi CFE v roli převodníku elektrického signálu (DNA/CFE) pro vyšetřování interakce mezi modelovou karcinogenní sloučeninou 2-aminofluorenem (jedním z nejrozšířenější studovaných zástupců chemických karcinogenů ze skupiny aromatických aminů) a dsDNA z telecího brzlíku. Poškození DNA přímou interakcí s 2-aminofluorenem bylo sledováno technikou SWV (prostřednictvím odezev guaninových a adeninových zbytků přítomných ve struktuře dsDNA na povrchu CFE) a technikou CV (prostřednictvím odezev redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ přítomného v roztoku). Získané výsledky ukázaly, že interakce 2-aminofluorenu s dsDNA způsobila její poškození, což vedlo ke vzniku zlomů vláken DNA a částečné desorpci fragmentů DNA z elektrodového povrchu.

Interakce DNA s léčivými (tab. I) patří mezi důležitá hlediska při biologických studiích vedených v rámci výzkumu a vývoje nových léčiv⁷⁴. Existuje několik typů interakcí, jimiž může léčivo pozměnit nativní strukturu dsDNA: nekovalentní vázání do žlábků, interkalace, kovalentní vázání (vznik DNA aduktů), rozpojení vláken DNA, štěpení DNA či začlenění molekuly strukturně podobné nukleosidům. Následkem těchto interakcí (vzniká jistý druh komplexu DNA-léčivo) bývají fyzikálně-chemické změny, a to jak v molekule DNA, tak v molekule daného léčiva⁷⁵. Jako příklad může sloužit naše studie⁷⁶, ve které byl zkoumán poškozující účinek (pravděpodobně interkalace následovaná vznikem zlomů vláken DNA) protinádorového léčiva elipticinu na dsDNA z lososích spermií. Pomocí techniky CV (poškození bylo detegováno na DNA/CFE prostřednictvím redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) bylo pozorová-



Obr. 2. Relativní odezva biosenzoru na poškození DNA způsobené interakcí s elipticinem; vyhodnocováno ze změny výšky anodického CV píku redoxního indikátoru ($1 \text{ mmol l}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) po inkubaci DNA/CFE v roztoku 50 μmol l^{-1} elipticinu po různé inkubační časy (A) a po inkubaci DNA/CFE po dobu 5 min v roztoku elipticinu o různých koncentracích (B); základním elektrolytem byl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,2; chybové úsečky jsou sestaveny pro tři sériová měření (cit. ⁷⁶)

no, že míra poškození dsDNA vzrůstá (klesá relativní odezva biosenzoru na poškození dsDNA) nejen s časem inkubace biosenzoru v roztoku obsahujícím elipticin (obr. 2A), ale také s rostoucí koncentrací elipticinu v inkubačním roztoku (obr. 2B).

Jako redoxní indikátor při detekci poškození DNA může sloužit také samotné studované léčivo. V našem případě se jednalo o využití thioridazinu⁴³ – antipsychotika ze skupiny fenothiazinových léčiv. Jednoduchý elektrochemický DNA biosenzor byl připravený ze SPCE a nízkomolekulární dsDNA z lososích spermií a byl použit pro detekci poškození DNA ultrafialovým zářením typu C o vlnové délce 240 nm a hydroxylovými radikály vznikajícími při reakci Fentonova typu. Celkové hodnocení odezvy biosenzoru bylo založeno na sledování změn SWV piků jak guaninového zbytku, tak interkalátoru thioridazinu, na sledování změn CV piků redoxního indikátoru $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a na sledování změn EIS spekter získaných za použití stejného redoxního indikátoru. Pro dva posledně zmíněné druhy měření (CV a EIS) byl navíc použit biosenzor s nanostrukturovaným rozhraním (kompozitní směs karboxylovaných SWCNT a chitosanu) umístěným mezi povrch SPCE a vrstvu dsDNA. Toto rozhraní bylo použito pro úspěšné zvýšení vodivosti elektrického převodníku. Při hodnocení poškození dsDNA výše uvedenými činidly byla pozorována její značná degradace, jejíž míra závisela na době trvání poškozující události.

Elektrochemické DNA biosenzory mohou být úspěšně použity nejen při výzkumu vzájemných interakcí mezi cizorodými látkami a DNA, ale rovněž při vývoji vysoce citlivých analytických metod využívajících spontánní akumulaci analytu do struktury DNA (většinou interkalaci mezi páry bází dsDNA) za účelem zvýšení citlivosti stanovení⁷⁷. Takováto metodika byla použita také v naší laboratoři při stanovení genotoxického anthracenu technikou DPV na GCE⁷⁸: mez stanovitelnosti anthracenu na nemodifikované GCE činila $2,2 \mu\text{mol l}^{-1}$, zatímco na GCE modifikované vrstvou dsDNA z lososích spermií bylo dosaženo meze stanovitelnosti přibližně o jeden koncentrační řád nižší ($0,15 \mu\text{mol l}^{-1}$). Vyvinutá metoda byla následně použita pro stanovení anthracenu v modelových vzorcích štetku (s výtěžností 98 %) a písku (s výtěžností 96 %).

3. Závěr

Cílem tohoto příspěvku bylo ukázat, že elektrody modifikované DNA (elektrochemické DNA biosenzory) představují velmi efektivní a zároveň jednoduchá, rychlá, levná, miniaturizovatelná a sériově vyrobitelná analytická zařízení pro výzkum a hodnocení genotoxického působení rozmanitých cizorodých sloučenin (např. chemických karcinogenů, léčiv či reaktivních radikálových sloučenin). Tím se stávají rovněž vhodnými nástroji pro předběžné testování nových léčiv nebo nově připravených chemických sloučenin a umožňují např. také hodnotit kapacitu přírodních či syntetických antioxidantů ochránit DNA vůči oxidačnímu stresu.

Do budoucna lze očekávat, že míra uplatnění elektrochemických DNA biosenzorů (a to i v praktických aplikacích) bude nadále vzrůstat, především na poli detekce poškození DNA. Zde se pravděpodobně budou nejvíce uplatňovat nové komplexní biorozpoznávací vrstvy vázané na povrch elektrody, využívající rozmanitých supramolekulárních interakcí. Pokročilá lékařská diagnostika je do značné míry závislá na úspěšném vývoji a využití nových materiálů a technologií, proto jsou atraktivní vlastnosti elektrochemických zařízení velmi slibné i pro vylepšení postupů používaných v současné léčebné praxi.

Jedním z důležitých směrů ve vývoji elektrochemických DNA biosenzorů použitelných v praxi je např. výzkum ochranných membrán, které chrání biosenzor před nechtěným znečištěním a před interferujícími látkami přítomnými ve vzorku. Možnosti využití takovýchto ochranných membrán jsou nastíněny např. v naší nedávné studii⁵², ve které byly elektrochemické DNA biosenzory s venkovní nafionovou či chitosanovou ochrannou membránou použity při hodnocení antioxidačních vlastností nápojů (piva, kávy a černého čaje) proti oxidačním účinkům hydroxylových radikálů.

Tento příspěvek vznikl v rámci Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV), za finanční podpory Grantové agentury České republiky (V. Vyskočil děkuje za podporu z projektu GP13-23337P) a Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (A. Hájková děkuje za podporu z projektu GAUK 430214/2014/B-CH/PrF).

LITERATURA

1. Paleček E., Bartošík M.: *Chem. Rev.* 112, 3427 (2012).
2. Paleček E., Fojta M.: *Anal. Chem.* 73, 74A (2001).
3. Fojta M.: *Electroanalysis* 14, 1449 (2002).
4. Erdem A.: *Talanta* 74, 318 (2007).
5. Rauf S., Gooding J. J., Akhtar K., Ghauri M. A., Rahman M., Anwar M. A., Khalid A. M.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 205 (2005).
6. Erdem A., Muti M., Papakonstantinou P., Canavar E., Karadeniz H., Congur G., Sharma S.: *Analyst* 137, 2129 (2012).
7. Fojta M., v knize: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins – Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J., ed.), str. 385. Elsevier, Amsterdam 2005.
8. Wang J., Rivas G., Cai X., Paleček E., Nielsen P., Shiraishi H., Dontha N., Luo D., Parrado C., Chicharro M., Farias P. A. M., Valera F. S., Grant D. H., Ozsoz M., Flair M. N.: *Anal. Chim. Acta* 347, 1 (1997).
9. Mascini M., Palchetti I., Marrazza G.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 369, 15 (2001).
10. Gooding J. J.: *Electroanalysis* 14, 1149 (2002).
11. Paleček E., Fojta M., Tomschik M., Wang J.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 621 (1998).
12. Vyskočil V., Labuda J., Berek J.: *Anal. Bioanal.*

- Chem. 397, 233 (2010).
13. Oliveira-Brett A. M., Vivian M., Fernandes I. R., Piedade J. A. P.: *Talanta* 56, 959 (2002).
 14. Abreu F. C., Goulart M. O. F., Oliveira-Brett A. M.: *Biosens. Bioelectron.* 17, 913 (2002).
 15. Ni Y. N., Wang P., Kokot S.: *Biosens. Bioelectron.* 38, 245 (2012).
 16. Labuda J., Oliveira-Brett A. M., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: *Pure Appl. Chem.* 82, 1161 (2010).
 17. Šimková D., Labuda J.: *Curr. Anal. Chem.* 7, 2 (2011).
 18. Chang H. X., Wang Y., Li J. H.: *Curr. Org. Chem.* 15, 506 (2011).
 19. Vacek J., Havran L., Fojta M.: *Chem. Listy* 105, 15 (2011).
 20. Kimmel D. W., LeBlanc G., Meschievitz M. E., Cliffel D. E.: *Anal. Chem.* 84, 685 (2012).
 21. Ozsoz M.: *Electrochemical DNA Biosensors*. Pan Stanford Publishing, Singapore 2012.
 22. Vyskočil V., Blašková M., Hájková A., Horáková E., Krejčová Z., Stávková K., Wang J., v knize: *Sensing in Electroanalysis* (Kalcher K., Metelka R., Švancara I., Vytrás K., ed.), sv. 7, str. 141. University Press Centre, Pardubice 2012.
 23. Labuda J., Vyskočil V., v knize: *Encyclopedia of Applied Electrochemistry* (Kreysa G., Ota K., Savinell R. F., ed.), str. 346. Springer Science+Business Media, New York 2014.
 24. Abu-Salah K. M., Zourob M. M., Mouffouk F., Alrokayan S. A., Alaamery M. A., Ansari A. A.: *Sensors* 15, 14539 (2015).
 25. Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.: *Trends Anal. Chem.*, publikováno elektronicky [DOI: 10.1016/j.trac.2015.11.018] (2015).
 26. Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M., Lunec J.: *FASEB J.* 17, 1195 (2003).
 27. Barzilai A., Yamamoto K. I.: *DNA Repair* 3, 1109 (2004).
 28. Friedberg E. C.: *Nature* 421, 436 (2003).
 29. Barek J., Pecková K., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 103, 889 (2009).
 30. Vyskočil V., Daňhel A., Fischer J., Novotný V., Deýlová D., Musilová-Karaová J., Maixnerová L., Pecková K., Barek J.: *Chem. Listy* 104, 1181 (2010).
 31. Weng J., Zhang J., Li H., Sun L., Lin C., Zhang Q.: *Anal. Chem.* 80, 7075 (2008).
 32. Švorc L., Jambrec D., Vojs M., Barwe S., Clausmeyer J., Michniak P., Marton M., Schuhmann W.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 18949 (2015).
 33. Diculescu V. C., Paquim A. M. C., Oliveira-Brett A. M.: *Sensors* 5, 377 (2005).
 34. Vyskočil V., Barek J.: *Procedia Chem.* 6, 52 (2012).
 35. Trojanowicz M.: *Trends Anal. Chem.* 25, 480 (2006).
 36. Balasubramanian K., Burghard M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 452 (2006).
 37. Kim S. N., Rusling J. F., Papadimitrakopoulos F.: *Adv. Mater.* 19, 3214 (2007).
 38. Shao Y. Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I. A., Lin Y. H.: *Electroanalysis* 22, 1027 (2010).
 39. Kuila T., Bose S., Khanra P., Mishra A. K., Kim N. H., Lee J. H.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 4637 (2011).
 40. Pumera M.: *Mater. Today* 14, 308 (2011).
 41. Šmejkalová H., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, 264 (2014).
 42. Yosypchuk B., Barek J., Fojta M.: *Electroanalysis* 18, 1126 (2006).
 43. Hlavata L., Benikova K., Vyskočil V., Labuda J.: *Electrochim. Acta* 71, 134 (2012).
 44. Lucarelli F., Marrazza G., Turner A. P. F., Mascini M.: *Biosens. Bioelectron.* 19, 515 (2004).
 45. Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E.: *Meas. Sci. Technol.* 15, R1 (2004).
 46. Zima J., Švancara I., Barek J., Vytrás K.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39, 204 (2009).
 47. Wang J., Cai X. H., Jonsson C., Balakrishnan M.: *Electroanalysis* 8, 20 (1996).
 48. Wang J., Cai X. H., Rivas G., Shiraishi H., Dontha N.: *Biosens. Bioelectron.* 12, 587 (1997).
 49. Hájková A., Barek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 27, 101 (2015).
 50. Blašková M., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, S211 (2014).
 51. Stávková K., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, S262 (2014).
 52. Hlavatá L., Vyskočil V., Beníková K., Borbélyová M., Labuda J.: *Cent. Eur. J. Chem.* 12, 604 (2014).
 53. Oliveira-Brett A. M., Serrano S. H. P., Gutz I., LaScalea M. A., Cruz M. L.: *Electroanalysis* 9, 1132 (1997).
 54. Oliveira-Brett A. M., Macedo T. R. A., Raimundo D., Marques M. H., Serrano S. H. P.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 861 (1998).
 55. Guan J. G., Miao Y. Q., Zhang Q. J.: *J. Biosci. Bioeng.* 97, 219 (2004).
 56. Ziyatdinova G., Labuda J.: *Anal. Methods* 3, 2777 (2011).
 57. Paleček E., Jelen F., v knize: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins – Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Paleček E., Scheller F., Wang J., ed.), str. 74. Elsevier, Amsterdam 2005.
 58. Oliveira-Brett A. M., Matysik F. M.: *J. Electroanal. Chem.* 429, 95 (1997).
 59. Oliveira-Brett A. M., Piedade J. A. P., Silva L. A., Diculescu V. C.: *Anal. Biochem.* 332, 321 (2004).
 60. Švorc L., Kalcher K.: *Sens. Actuators, B* 194, 332 (2014).
 61. Paleček E.: *Talanta* 56, 809 (2002).
 62. Oliveira-Brett A. M., Piedade J. A. P., Serrano S. H. P.: *Electroanalysis* 12, 969 (2000).
 63. Oliveira S. C. B., Corduneanu O., Oliveira-Brett A. M.: *Bioelectrochemistry* 72, 53 (2008).
 64. Galandová J., Ovádek R., Ferancová A., Labuda J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 855 (2009).
 65. Labuda J., Ovádek R., Galandová J.: *Microchim.*

- Acta 164, 371 (2009).
66. Carter M. T., Rodriguez M., Bard A. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8901 (1989).
 67. Schärer O. D.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 42, 2946 (2003).
 68. Turesky R. J.: *Drug Metab. Rev.* 34, 625 (2002).
 69. Speit G., Henderson L.: *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 589, 67 (2005).
 70. Zhang Y., Hu N. F.: *Electrochem. Commun.* 9, 35 (2007).
 71. Liao T. L., Wang Y. F., Zhou X. B., Zhang Y., Liu X. H., Du J., Li X. J., Lu X. Q.: *Colloids Surf., B* 76, 334 (2010).
 72. Zu Y., Hu N. F.: *Electrochem. Commun.* 11, 2068 (2009).
 73. Vodicka P., Koskinen M., Arand M., Oesch F., Hemminki K.: *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 511, 239 (2002).
 74. Erdem A., Ozsoz M.: *Electroanalysis* 14, 965 (2002).
 75. Graves D. E., Velea L. M.: *Curr. Org. Chem.* 4, 915 (2000).
 76. Hrochová Z.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.
 77. Ferancová A., Bucková M., Korgová E., Korbut O., Gründler P., Wärmarm I., Štěpán R., Berek J., Zima J., Labuda J.: *Bioelectrochemistry* 67, 191 (2005).
 78. Blašková M., Hájková A., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 109, 235 (2015).
 79. Hájková A., Vyskočil V.: *Analytická chemia v praxi 2014, Bratislava, 1.-4. června 2014*, Sborník příspěvků (Hrouzková S., Májek P., ed.), str. 75. Nakladatelství STU, Bratislava 2014.
 80. Jurečková Z.: *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2013.
 81. Vyskočil V., Labuda J., Berek J.: *Prague–Dresden Electrochemical Seminar, Červený Hrádek, Jirkov, 23.-25. listopadu 2009*, Sborník příspěvků (Hudská V., ed.), str. 32. Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Praha 2009.
 82. Jurečková Z.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2015.

V. Vyskočil and A. Hájková (*Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague*): **DNA-Modified Carbon Electrodes as Tools for Electrochemical Detection of DNA Damage**

Interactions of various xenobiotic compounds with deoxyribonucleic acid (DNA) represent the most important aspects of biological studies in clinical and toxicological analyses, drug discovery, and pharmaceutical development processes. In recent years, a growing interest in electrochemical investigation of such supramolecular interactions has arisen. Monitoring the changes in electrochemical signals of DNA and/or observing the mutual interactions of DNA with examined analytes provide good evidence for the interaction mechanism to be elucidated. Moreover, the DNA–analyte interactions can also be used for sensitive determination of the analyte itself. This short review summarizes our results obtained during the last five years in the field of novel electrochemical DNA biosensors utilizing carbon-based transducers as substrates for immobilization of DNA. Its aim is to provide evidence that the electrochemical approach (employing simple, fast, sensitive, and inexpensive DNA biosensors as tools for investigation and detection of DNA damage) brings a new insight into human health protection and leads to better understanding of the interaction mechanism between xenobiotic compounds and DNA.