



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM INTERAKCE DNA A DOXORUBICINU ELEKTROCHEMICKÝMI METODAMI NA NANOSTRUKTUROVANÝCH ELEKTRODÁCH

STUDY OF DNA-DOXORUBICINE INTERACTION BY ELECTROCHEMICAL METHODS ON
NANOSTRUCTURED ELECTRODES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

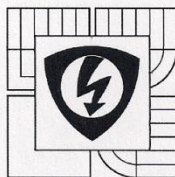
JAKUB PŘIBYL

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. HANA KYNCLOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Jakub Příbyl

Ročník: 3

ID: 137257

Akademický rok: 2012/13

NÁZEV TÉMATU:

Studium interakce DNA a doxorubicinu elektrochemickými metodami na nanostrukturovaných elektrodách

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti DNA, doxorubicinu, DNA-doxorubicin interakce, elektrochemické impedanční spektroskopie a voltametrie. 2) Charakterizujte nanostrukturované elektrody pomocí impedanční spektroskopie. 3) Proveďte experimentální impedanční měření DNA bez navázaného doxorubicinu a DNA s navázaným doxorubicinem na nanostrukturovaných elektrodách. 4) Proveďte voltametrická měření na DNA s navázaným a nenavázaným doxorubicinem. 5) Zhodnoťte dosažené výsledky.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] SUNI, Ian I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. TrAC Trends in Analytical Chemistry: TrAC. 2008, roč. 27, č. 7, s. 604-611.

[2] KATZ, Eugenii a Itamar WILLNER. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors. Electroanalysis. 2003, roč. 15, č. 11, s. 913-947.

[3] HUSKA, Dalibor, Vojtech ADAM, Petr BABULA, Jan HRABETA, Marie STIBOROVA, Tomas ECKSCHLAGER, Libuse TRNKOVA a Rene KIZEK. Square-Wave Voltammetry as a Tool for Investigation of Doxorubicin Interactions with DNA Isolated from Neuroblastoma Cells. Electroanalysis. 2009, roč. 21, 3-5, s. 487-494.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 31.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Hana Kynclová

Konzultanti bakalářské práce: doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D.


prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Studium interakce DNA a doxorubicinu elektrochemickými metodami na nanostrukturovaných elektrodách jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 31. května 2013

.....
podpis autora

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Haně Kynclové za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Také bych rád poděkoval mé rodině a blízkým za podporu ve studiu.

V Brně dne 31. května 2013

.....
podpis autora

Abstrakt:

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtnosti po celém světě, z tohoto důvodu, je věnována velká pozornost protinádorovým léčivům. Doxorubicin spadá do kategorie nejpoužívanějších nádorových léčiv. Metodou elektrochemické impedanční spektroskopie byly zkoumány vlastnosti zlatých elektrod bez nanosených nanočástic a elektrod s nanosenými zlatými nanočásticemi. Pomocí voltametrických měření jsme detekovali doxorubicin a zkoumali interakce doxorubicinu s oligonukleotidy na zlatých elektrodách bez nanočástic a elektrodách modifikovaných zlatými nanočásticemi.

Abstract:

Cancer diseases are one of the leading causes of mortality worldwide, for this reason, great attention anticancer drugs. Doxorubicin falls into the category of the most widely used cancer drugs. The method of electrochemical impedance spectroscopy were investigated properties of golds electrodes without deposit nanoparticles and electrodes with deposit gold nanoparticles. Using voltammetric measurements we detected doxorubicin and investigated the interaction of doxorubicin with oligonucleotides on gold electrodes without nanoparticles and electrodes modified with gold nanoparticles.

Klíčová slova:

Deoxyribonukleová kyselina, Doxorubicin, Impedance, Impedanční spektroskopie, Voltametrie

Keywords:

Deoxyribonucleic acid, Doxorubicin, Impedance, Impedance Spectroscopy, Voltammetry

Bibliografická citace práce

PŘIBYL, J. Studium interakce DNA a doxorubicinu elektrochemickými metodami na nanostrukturovaných elektrodách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Hana Kynclová.

Obsah

I.	Úvod.....	9
II.	Cíle práce.....	9
III.	Teoretická část.....	10
1.	Deoxyribonukleová kyselina – DNA	10
	Párování bází.....	11
	Primární struktura DNA.....	12
	Sekundární struktura DNA	12
	Replikace DNA.....	13
	Denaturace DNA.....	14
2.	Doxorubicin.....	14
	Interkalace.....	15
	Nepříznivé účinky doxorubicinu.....	16
	Měření s doxorubicinem	16
	Nejčastěji používané pracovní elektrody	17
	Rtuťové elektrody	17
	Uhlíkové elektrody.....	18
3.	Impedanční spektroskopie.....	19
	Impedance	19
	Elektrochemická impedanční spektroskopie – EIS.....	20
	Elektrodová dvouvrstva	21
4.	Voltametrie.....	23
	Cyklická voltametrie.....	24
	Voltamogram	24
	Diferenčně pulzní voltametrie.....	26
	Square-wave voltametrie	27
5.	Výroba nanostrukturovaných elektrod	28
	Zlaté nanotyčinky.....	28
	Výroba zlatých nanotyčinek	29
IV.	Materiál a metody.....	30

1. Elektrody	30
2. Impedanční spektroskopie	32
3. Voltametrické metody	33
V. Výsledky	34
1. Charakterizace zlatých elektrod pomocí EIS	34
2. Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pomocí EIS	36
3. Impedanční měření interakce ODN a doxorubicinu	38
4. Voltametrická měření	41
Voltametrická detekce doxorubicinu	41
Voltametrická měření interakce ODN a doxorubicinu	45
VI. Závěr	47
VII. Literatura	48

Seznam obrázků

Obr. 1: Purinové báze [19]	10
Obr. 2: Pyrimidinové báze [19].....	11
Obr. 3: Cukerná složka [19]	11
Obr. 4: Párování bází v molekule DNA [19]	12
Obr. 5: Pravotočivá šroubovice molekuly DNA [19]	13
Obr. 6: Replikační vidlice [19].....	14
Obr. 7: Protinádorová léčiva: Daunorubicin (vlevo) a Doxorubicin (vpravo) [25]	15
Obr. 8: Interkalace Doxorubicinu do dsDNA (vlevo) [14] a interakce Doxorubicinu s ssDNA [13] (vpravo)	16
Obr. 9: Voltamogram ODN s redukčním píkem cytosinu a adeninu (CA) a oxidačním píkem guaninu (G) [23].....	18
Obr. 10: Voltamogram ODN s oxidačním píkem guaninu (Gox) a adeninu (Aox) [23]	18
Obr. 11: Komplexní rovina impedance	19
Obr. 12: Náhradní elektrický model impedance	20
Obr. 13: Nyquistův diagram [5]	21
Obr. 14: Elektrodová dvouvrstva [11].....	22
Obr. 15: Průběh potenciálu na dvouvrstvě [11]	23
Obr. 16: Průběh přikládáního napětí pro cyklickou voltametrii	24
Obr. 17: Voltamogram [11].....	25
Obr. 18: Excitační signál pro DPV [11]	26
Obr. 19: Charakteristický průběh DPV [11]	27
Obr. 20: Potenciálový průběh vkládaný na pracovní elektrodu	27
Obr. 21: Zlaté nanotyčinky [12]	28
Obr. 22: Výroba zlatých nanotyčinek [6].....	29
Obr. 23: Maska Al_2O_3 (vlevo) a zlaté nanostruktury (vpravo).....	30
Obr. 24: Holá zlatá elektroda a elektroda se zlatými nanočásticemi	31
Obr. 25: Povrchy se zlatými nanotyčinkami	31
Obr. 26: Nastavení přístroje $\mu\text{AUTOLABIII}$ pro impedanční měření.....	32
Obr. 27: $\mu\text{AUTOLABIII}$ [21]	33
Obr. 28: Frekvenční charakteristiky v celém rozsahu koncentrací	34
Obr. 29: Výřez frekvenčních charakteristik	35
Obr. 30: Závislost reálné části impedance na koncentraci	35
Obr. 31: Frekvenční charakteristiky v celém rozsahu koncentrací	36
Obr. 32: Výřez frekvenčních charakteristik	37
Obr. 33: Závislost reálné složky impedance na koncentraci	37
Obr. 34: Závislost reálné složky impedance na koncentraci	38

Obr. 35: Frekvenční charakteristiky holé zlaté elektrody s ODN a doxorubicinem	39
Obr. 36: Výřez frekvenčních charakteristik holé zlaté elektrody s ODN a doxorubicinem	39
Obr. 37: Frekvenční charakteristiky nanostrukturované elektrody s ODN a doxorubicinem..	40
Obr. 38: Výřez frekvenčních charakteristik nanostrukturované elektrody s ODN a doxorubicinem.....	40
Obr. 39: SWV na holé zlaté elektrodě s doxorubicinem.....	41
Obr. 40: DPV na holé zlaté elektrodě s doxorubicinem.....	42
Obr. 41: SWV na nanostrukturované elektrodě s doxorubicinem	42
Obr. 42: DPV na nanostrukturované elektrodě s doxorubicinem	43
Obr. 43: Závislost koncentrace doxorubicinu na výšce píků SWV	44
Obr. 44: Závislost koncentrace doxorubicinu na výšce píků DPV	44
Obr. 45: SWV na zlaté elektrodě s ODN a doxorubicinem	45
Obr. 46: DPV na zlaté elektrodě s ODN a doxorubicinem	46
Obr. 47: Zvětšený pík ODN	46

I. Úvod

S rostoucím počtem nádorových onemocnění je věnována velká pozornost protirakovinným léčivům. Jedním z nejvíce využívaných léčiv je antracyklinové antibiotikum doxorubicin. Doxorubicin se řadí mezi nejrozšířenější protinádorová antibiotika interagující s DNA a je běžně používán k léčbě leukémií, Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu, stejně jako rakoviny močového měchýře, prsu, žaludku, plic, vaječníků, štítné žlázy, měkkých tkání a zhoubných nádorů kostí, mnohočetného myelomu a dalších. Doxorubicin se pomocí interkalace naváže do molekuly DNA, kde inhibuje její syntézu a tak zastavuje rakovinné bujení.

V posledních letech se elektrochemické metody spolu s nanotechnologiemi staly nepostradatelnou součástí analýzy molekuly DNA. Elektrochemická impedanční spektroskopie nám umožňuje studovat jevy na povrchově upravených elektrodách. V této práci byly použity elektrody modifikované zlatými nanotyčinkami a zlaté elektrody bez nanočástic. Voltametrické techniky byly vyvinuté na základě objevu polarografie v roce 1922 učiněným českým chemikem Jaroslavem Heyrovským, jemuž byla za tento objev roku 1959 udělena Nobelova cena za chemii. Voltametrické metody nám umožňují kvantitativní stanovení anorganických i organických látek v roztoku, studium redoxních dějů nebo studium adsorpčních procesů. Tyto elektrochemické metody nám poskytují specifické a velmi citlivé informace o sekvencích DNA.

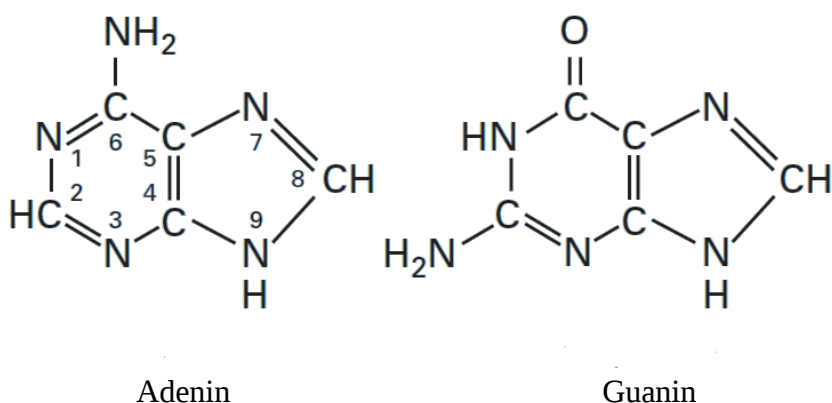
II. Cíle práce

- 1) Sumarizovat literární data o DNA, doxorubicinu, impedanční spektroskopii a voltametii
- 2) Charakterizovat nanostrukturované elektrody pomocí impedanční spektroskopie
- 3) Impedanční měření DNA bez navázaného doxorubicinu a s navázaným doxorubicinem na nanostrukturovaných elektrodách
- 4) Voltametrická měření s navázaným a nenavázaným doxorubicinem na nanostrukturovaných elektrodách

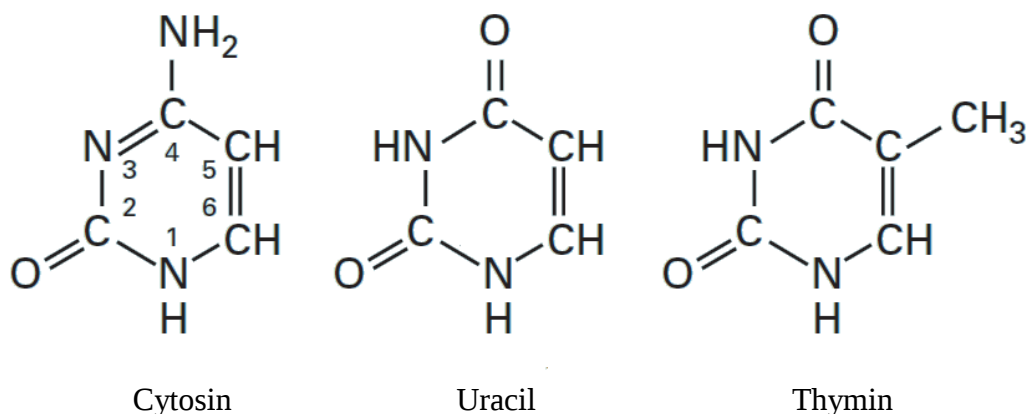
III. Teoretická část

1. Deoxyribonukleová kyselina – DNA

V roce 1953 byla objevena charakteristická struktura DNA. Za tímto objevem stál James Watson a Francis Crick, kteří za ni roku 1962 obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. DNA patří mezi nukleové kyseliny a na rozdíl od ribonukleové kyseliny je charakteristická přítomností thyminu, v RNA je thymin nahrazen uracilem. Poznání struktury DNA představovalo zásadní průlom v mnoha oblastech biologických věd a medicíny, zejména z toho důvodu, že nám umožnilo pochopit mechanismus uchování genetické informace. DNA nese informace o syntéze všech proteinů v buňce. Úseky DNA nesoucí informaci o syntéze bílkovin se nazývají strukturní geny. DNA je makromolekula, která je zpravidla tvořena dvěma komplementárními polynukleotidovými řetězci opačné polarity. V těchto řetězcích jsou jednotlivé nukleotidy navzájem vázány fosfodiesterovou vazbou, a to mezi třetím uhlíkem molekuly pentosy jednoho nukleotidu a pátým uhlíkem molekuly pentosy následujícího nukleotidu. Rozlišujeme pět základních dusíkatých bází nukleových kyselin, které se dělí na purinové a pyrimidinové. Mezi purinové patří adenin a guanin a mezi pyrimidinové, cytosin a thymin a uracil. Oba druhy bází jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 1) a (Obr. 2). [1]



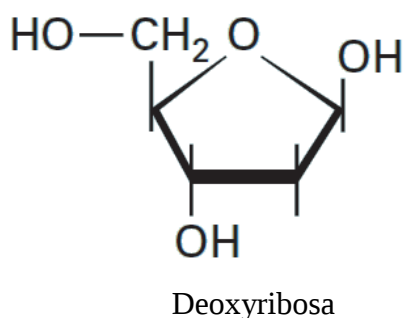
Obr. 1: Purinové báze [19]



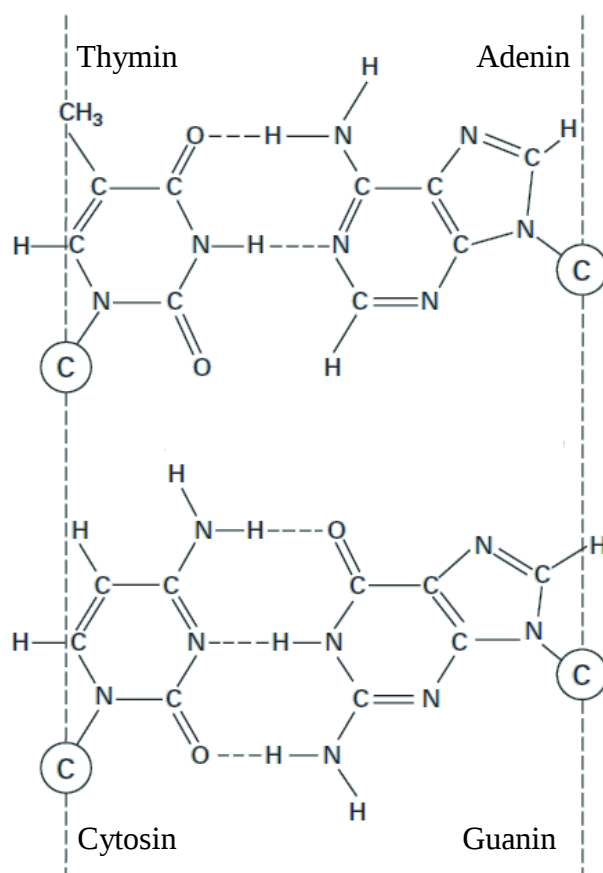
Obr. 2: Pyrimidinové báze [19]

Párování bází

Při párování bází se vždy váže jedna purinová báze s jednou bází pyrimidinovou. Adenin se váže s thyminem prostřednictvím dvou vodíkových můstků a cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových můstků, jak znázorňuje (Obr. 4). Poměr počtu adeninu k thyminu a guaninu k cytosinu je vždy stejný, z čehož vyplývá, že v molekule DNA je stejný počet purinových a pyrimidinových bází. Spojením dusíkaté báze a cukerné složky N-glykosidovou vazbou, vzniká sloučenina, která se nazývá nukleosid. Nukleotid vzniká po navázání kyseliny fosforečné pomocí esterové vazby na deoxyribózu nejčastěji v pozici 3' nebo 5'. Cukerná složka je zobrazena na (Obr. 3).



Obr. 3: Cukerná složka [19]



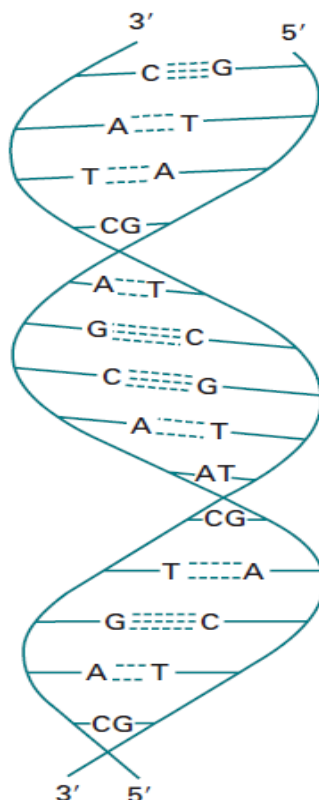
Obr. 4: Párování bází v molekule DNA [19]

Primární struktura DNA

Primární struktura DNA je dána pořadím nukleotidů v polynukleotidovém řetězci. Molekula DNA se nejčastěji vyskytuje ve formě dvouvláknové molekuly, ve formě jednovláknové molekuly se vyskytuje v menší míře. Dále rozlišujeme druhy DNA, které vykazují kruhovou molekulovou strukturu. Vyskytuje se například u plazmidů, kde nese informaci o rezistenci k některým antibiotikům.

Sekundární struktura DNA

Polynukleotidový řetězec zaujímá v prostoru charakteristickou strukturu. Řetězce DNA jsou nejčastěji stočené do pravotočivé šroubovice, které mohou zaujímat B-formu nebo častější A-formu. Obr. 5 zobrazuje pravotočivou šroubovici DNA. Dále rozlišujeme Z-formu, u níž řetězce zaujímají levotočivou strukturu šroubovice. Vždy je využita konformace, která je energeticky nejvýhodnější. Nejvýznamnější roli při stabilizaci DNA hrají vodíkové můstky a hydrofobní interakce. [1]

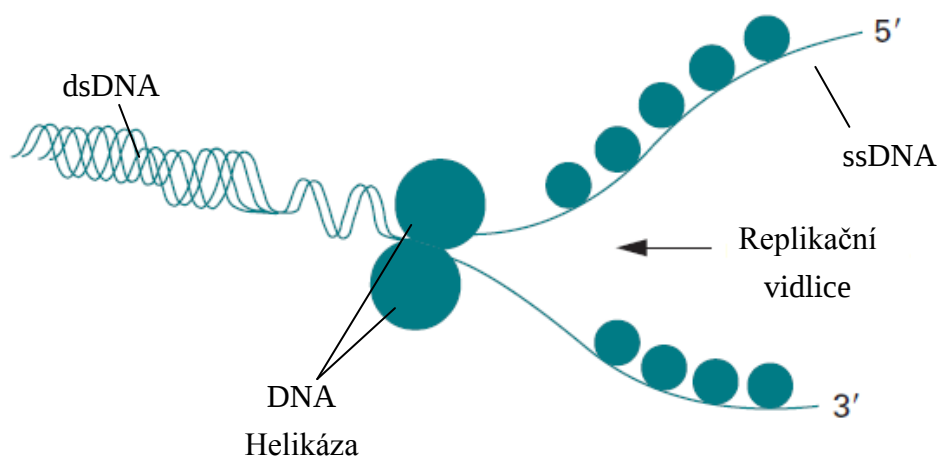


Obr. 5: Pravotočivá šroubovice molekuly DNA [19]

Replikace DNA

Replikace DNA je proces, při kterém dochází k rozpojení dvoušroubovice DNA a následnému připojení volných nukleotidů na rozvinuté úseky podle pravidla komplementarity bází. Je-li v prvním řetězci adenin, pak ve druhém naproti adeninu leží thymin a proti cytosinu leží guanin. Tímto způsobem vznikají z původní dvojité spirály DNA dvě stejné kopie s totožnou genetickou informací. U eukaryontních buněk probíhá replikace DNA v jádře během S-fáze buněčného cyklu za spoluúčasti mnoha enzymů. Místo ve, kterém dochází k počátku replikace, se nazývá iniciační místo (ori). Rozpojení dvoušroubovice na samostatná vlákna navozuje protein helikáza navázaný na iniciační místo. Replikace DNA je zpravidla obousměrná, to znamená, že se od místa ori rozšiřují replikační vidlice na obě strany diskontinuálně ve směru $5' \rightarrow 3'$. Dále pak DNA polymeráza připojuje k jednotlivým deoxyribonukleotidům jejich komplementární protějšky. Jednotlivá vlákna jsou v replikační vidlici (Obr. 6) opačně orientována. Opačnou orientací dochází k tomu, že jeden řetězec je syntetizován kontinuálně a druhý, se za ním opožděje, musí být syntetizován přes Okazakiho fragmenty. Okazakiho fragmenty jsou krátké úseky DNA, které jsou při replikaci připojovány ke zpožděnému vlákně DNA, protože DNA-polymeráza je nukleotidy schopna spojovat pouze ve směru $5' \rightarrow 3'$.

Syntéza obou řetězců vyžaduje přítomnost RNA primeru, který se váže na stejném místě jako helikáza. V posledním stádiu jsou všechny RNA primery odstraněny a úseky DNA jsou spojeny do řetězce. [2]



Obr. 6: Replikační vidlice [19]

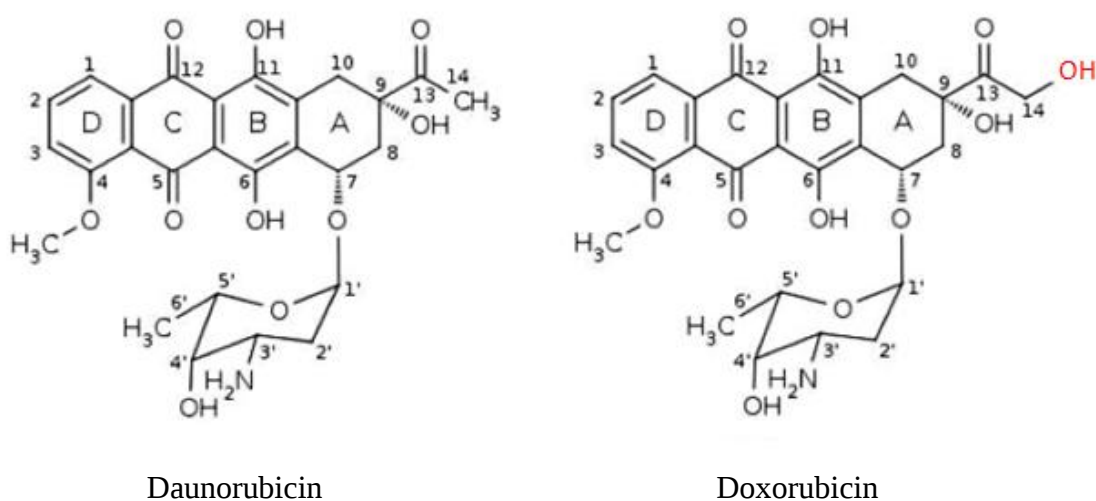
Denaturace DNA

K denaturaci dochází při zahřátí molekuly DNA na určitou teplotu, která roste s počtem guaninových a cytosinových bází v DNA. Nejčastěji se používá postup, kdy se molekula DNA zahřeje na teplotu 95 °C. Při této teplotě dochází k rozpojení dvoušroubovice DNA na samostatné polynukleotidové řetězce. Denaturace DNA se využívá například při polymerázové řetězové reakci, s její pomocí můžeme namnožit potřebný úsek polynukleotidového řetězce. [2]

2. Doxorubicin

Doxorubicin se řadí mezi známá a hojně užívaná antracyklinová antibiotika. Jedná se o protinádorová léčiva s širokým spektrem účinnosti, vyvíjená už od roku 1950. Základem všech antracyklinových antibiotik je tetracyklický antrachinonový skelet, na který je vázán aminocukr daunosamin. Antracyklinová cytostatika mají výrazné červené zabarvení díky zmíněnému antrachinonovému jádru. [3] Doxorubicin je antibiotikum produkované bakterií *Streptomyces peucetius*. Byl syntetizován o 10 let později než jeho předchůdce daunorubicin, který měl výrazně užší pole působnosti. Strukturu obou léčiv si můžeme prohlédnout na (Obr. 7). Doxorubicin se řadí mezi nejrozšířenější protinádorová antibiotika interagující s DNA a je běžně používán k léčbě leukémií, Hodgkinova a non-Hodgkinova lymfomu, stejně jako rakoviny močového měchýře, prsu, žaludku, plic, vaječníků, štítné žlázy, měkkých tkání

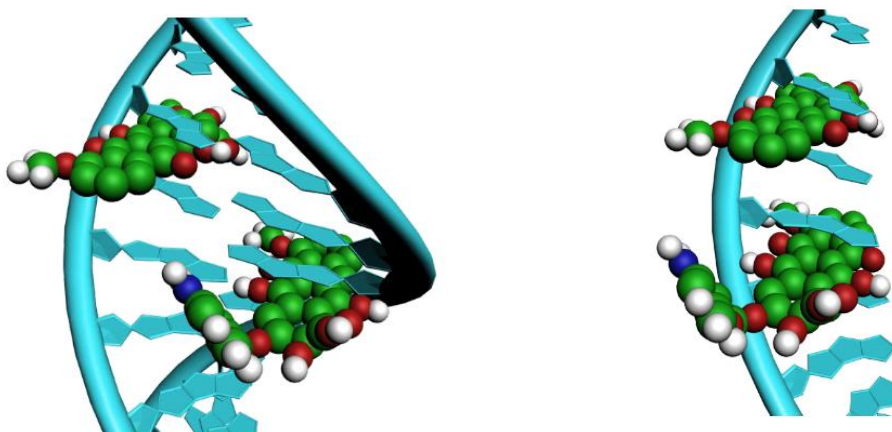
a zhoubných nádorů kostí, mnohočetného myelomu a dalších. Doxorubicin interkaluje do DNA, což vede k inhibici replikace a transkripce a generuje volné radikály, čímž dochází k poškození DNA nebo peroxidaci lipidů. [14] Nejdůležitější účinek doxorubicinu představuje inhibice topoizomerázy II, jejíž funkce spočívá v navázání se na dvoušroubovici DNA, v jejím přerušení a opětovném spojení, čímž umožní separaci chromozomů při mitóze. V důsledku útlumu topoizomerázy II nedochází k opětovnému spojení řetězců a vzniklé zlomy v DNA mají pro buňku letální účinky. I přes tyto účinky není zcela zřejmé, jaký je přesný mechanismus účinků doxorubicinu na nádor. A proto stále probíhá výzkum této problematiky. [4]



Obr. 7: Protinádorová léčiva: Daunorubicin (vlevo) a Doxorubicin (vpravo) [25]

Interkalace

Pojem interkalace vyjadřuje vmezeření nízkomolekulární látky do molekuly DNA. Jedná se o nekovalentní vazbu protirakovinného léčiva do DNA, což vede k zastavení syntézy makromolekuly. Proces interkalace doxorubicinu do dvouřetězcové DNA a interakci doxorubicinu a jednořetězcové DNA zobrazuje (Obr. 8). Doxorubicin interaguje s DNA tvorbou vodíkových vazeb přes antrachinonový kruh. [13]



Obr. 8: Interkalace Doxorubicinu do dsDNA (vlevo) [14] a interakce Doxorubicinu s ssDNA [13] (vpravo)

Nepříznivé účinky doxorubicinu

Nejzávažnějším nepříznivým účinkem doxorubicinu je kardiotoxicita, která se může projevit v několika stádiích. Rozlišujeme akutní, subakutní, chronickou a pozdní kardiotoxicitu. Akutní se projevuje v průběhu léčby, a objevuje se velmi zřídka, subakutní bezprostředně po ukončení léčby, chronická v řádech měsíců po ukončení léčby a pozdní až několik let po ukončení léčby. Kardiotoxicita způsobuje závažné poškození srdečního svalu. [3]

Měření s doxorubicinem

Studium interakcí doxorubicinu intenzivně probíhá jak s ssDNA (jednořetězcová), tak i s dsDNA (dvouřetězcová). Mechanismus interakce doxorubicinu s ssDNA zatím není zcela jasný, přitažlivé síly jsou především elektrostatické. Interakce doxorubicinu s dsDNA se projeví interkalací do struktury dsDNA, přičemž hlavními cíli doxorubicinu jsou báze cytosinu a guaninu. Analýzou nukleových kyselin s pomocí voltametrických metod a visící rtuťové kapky získáme dva signály. Prvním je redukční signál adeninu a cytosinu (CA pík) a druhým je oxidační signál guaninu. Interkalující doxorubicin se váže mezi guaninové a cytosinové báze a tím můžeme pozorovat klesající pík guaninu po navázání protirakovinného léčiva. [14]

Z měření provedených pomocí square-wave voltametrie (SWV) na jednořetězcových oligonukleotidech (ssODN) vyplývá, že interakce s ssODN se projeví přibližně lineárním poklesem CA píku v závislosti na době interakce a mírným nárůstem DOXO signálu (redukční pík doxorubicinu). Jako pracovní elektroda byla použita rtuťová kapková elektroda, kde plocha kapky měla 0.4mm². Pokles CA signálu indikuje navázání doxorubicinu. Bylo vypořádováno, že otevřená struktura ssODN usnadňuje doxorubicinu interakci s jednotlivými

bázemi. Toto tvrzení potvrzují i výšky píků, které jsou u ssODN vyšší než u dsODN, což signalizuje snadnější detekci jednotlivých bází. [20]

Doxorubicin může být na elektrodu přichycen několika způsoby. Buďto může být potřebné množství pipetou nanese na povrch pracovní elektrody a nechá se určitou dobu kumulovat, nebo lze stejným způsobem nanesený doxorubicin deponovat elektrochemicky. Kumulace doxorubicinu probíhá většinou v rozmezí 10 – 300 min, ale nejsou výjimkou i delší časové intervaly. Doxorubicin lze také rozpustit v roztoku elektrolytu, do kterého následně ponoříme elektrody.

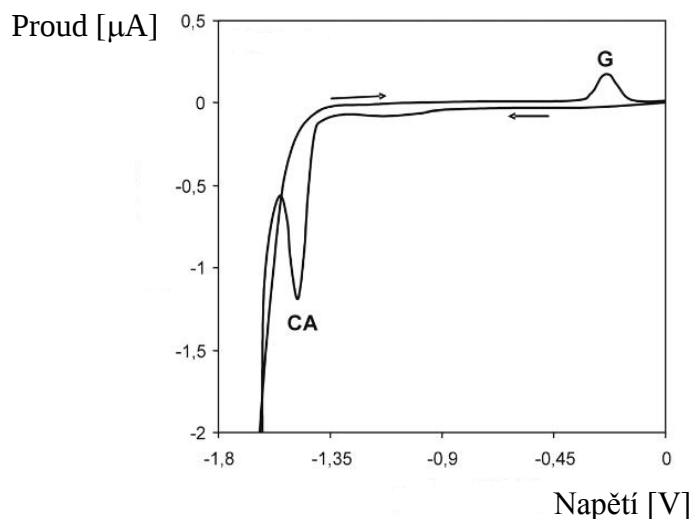
Abychom docílili stabilní vrstvy dsDNA a ssDNA na povrchu zlaté elektrody, je nutné ji modifikovat thiolovými skupinami nebo dalšími molekulami (biotin), které zvýší afinitu ke zlatému povrchu elektrody. Na rtuťových a uhlíkových elektrodách vytváří oligonukleotidy stabilní vrstvu i bez thiolových skupin. [22]

Nejčastěji používané pracovní elektrody

Mezi nejčastěji používané elektrody užívané při analýze DNA a doxorubicinu patří rtuťová elektroda, glassy carbon (skelný uhlík), modifikované zlaté elektrody a různé typy uhlíkových elektrod. Vysoce citlivou metodu pro elektrochemickou detekci doxorubicinu poskytují uhlíkové elektrody modifikované uhlíkovými nanotrubicemi.

Rtuťové elektrody

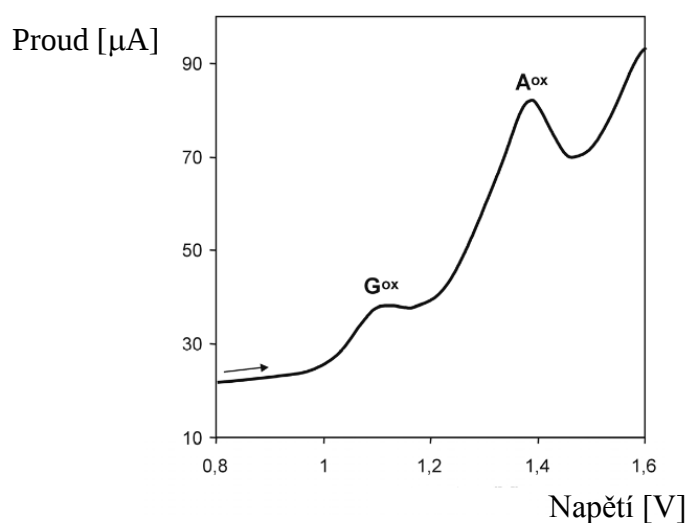
Emil Paleček v roce 1958 prokázal elektroaktivitu nukleových kyselin a o tři roky později byla publikována první práce zahrnující informace o adsorpci nukleových kyselin na povrch rtuťové elektrody. Rtuť se uplatňuje při měření v negativních rozsazích potenciálů, kde lze pozorovat redukční píky bází nukleových kyselin. Redukční pík cytosinu a adeninu pozorujeme v okolí potenciálu -1,45 V. Redukční signál guaninu detekujeme ve velmi negativních hodnotách potenciálu, kde je zkreslen vylučováním vodíku na povrchu elektrody. Z tohoto důvodu pozorujeme pouze oxidační signál guaninu na potenciálu -0,3 V. Uvedené informace jsou vyobrazeny na (Obr. 9), který byl pořízen pomocí cyklické voltametrie. Výhodou rtuťové elektrody je lehce obnovitelný a vysoce reprodukovatelný povrch. Nevýhodou je vysoká toxicita rtuti. Nevhodnost měřit v pozitivních potenciálech vyplývá z toho, že již s hodnotou potenciálu 0,1 V dochází k elektrochemickému rozkladu rtuti. [23]



Obr. 9: Voltamogram ODN s redukčním píkem cytosinu a adeninu (CA) a oxidačním píkem guaninu (G) [23]

Uhlíkové elektrody

Pro pozorování oxidačních dějů, které probíhají při pozitivních potenciálech, využíváme uhlíkové elektrody. K oxidaci bází nukleových kyselin dochází při značně pozitivních potenciálech. Oxidace purinových bází probíhá kolem potenciálu +1 V pro guanin a oxidace adeninu kolem potenciálu +1,2 V. Oxidaci purinových bází znázorňuje (Obr. 10). Thymin a cytosin oxidují ještě při vyšších potenciálech, přibližně +1,3 V. Mezi uhlíkové elektrody se řadí například skelný uhlík (glassy carbon) nebo pastová uhlíková elektroda (carbon paste electrode) a v neposlední řadě také již zmiňované uhlíkové elektrody s uhlíkovými nanotrubicemi. Nanočástice na povrchu elektrody zvyšují její elektroaktivní plochu a tím i výrazně zvýší citlivost. [23]



Obr. 10: Voltamogram ODN s oxidačním píkem guaninu (Gox) a adeninu (Aox) [23]

3. Impedanční spektroskopie

Impedance

Impedance je veličina reprezentující zdánlivý odpor součástky a fázový posuv napětí oproti proudu při průchodu harmonického střídavého proudu. Je základní vlastností, kterou potřebujeme znát pro analýzu střídavých elektrických obvodů. Vzhledem k tomu, že se impedance odvozuje z fázorů, které jsou komplexními čísly, i impedance je komplexní číslo. Protože je impedance komplexní veličinou můžeme ji vyjádřit součtem reálné a imaginární složky. Impedance je frekvenčně závislá a její jednotkou je ohm (Ω). Komplexní rovinu impedance zobrazuje (Obr. 11).

$$Z = \text{Re} + j \text{Im}, \quad (1)$$

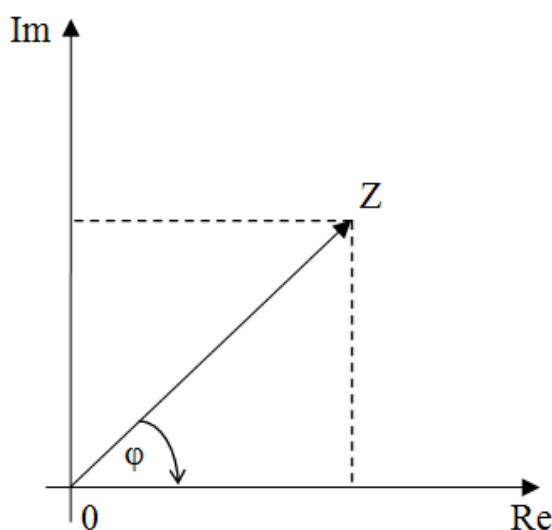
$$|Z| = \sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2}, \quad (2)$$

$$\cos \varphi = \frac{\text{Re}}{\sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2}}, \quad (3)$$

$$\sin \varphi = \frac{\text{Im}}{\sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2}}, \quad (4)$$

$$Z = |Z|e^{j\varphi}, \quad (5)$$

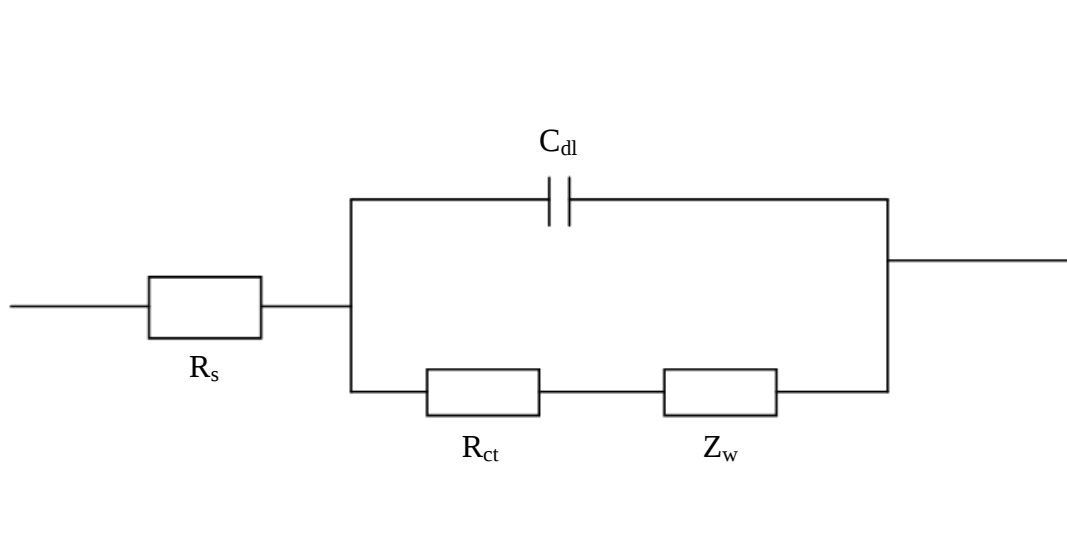
kde Z je označení impedance, Re je reálná složka impedance, Im je imaginární složka impedance a poslední výraz vyjadřuje Eulerův tvar komplexního čísla, kde φ je úhel mezi kladnou částí osy x a přímkou spojující bod Z s počátkem.



Obr. 11: Komplexní rovina impedance

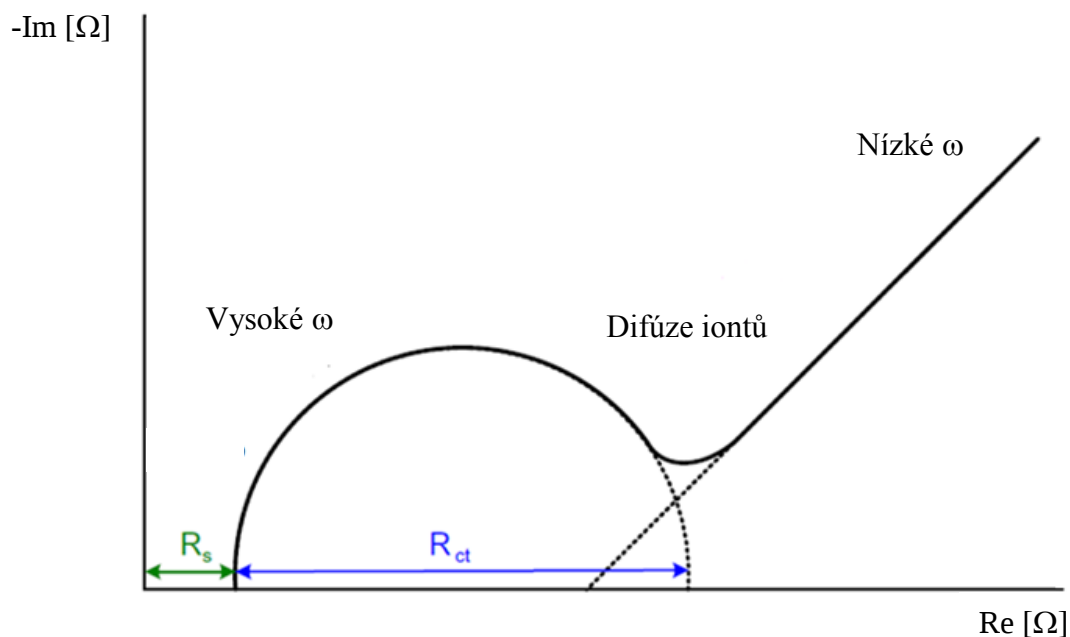
Elektrochemická impedanční spektroskopie – EIS

EIS je používána pro studium elektrochemických systémů. V našem případě se jedná o studium dějů na povrchově upravených elektrodách. Dále lze tuto metodu využít pro měření rychlosti chemických reakcí, koroze nebo přenosu částic. Princip měření spočívá v přivedení sinusového napětí s malou amplitudou na systém elektrod ponořených do elektrolytu a poté měříme proudovou odezvu. [5]



Obr. 12: Náhradní elektrický model impedance

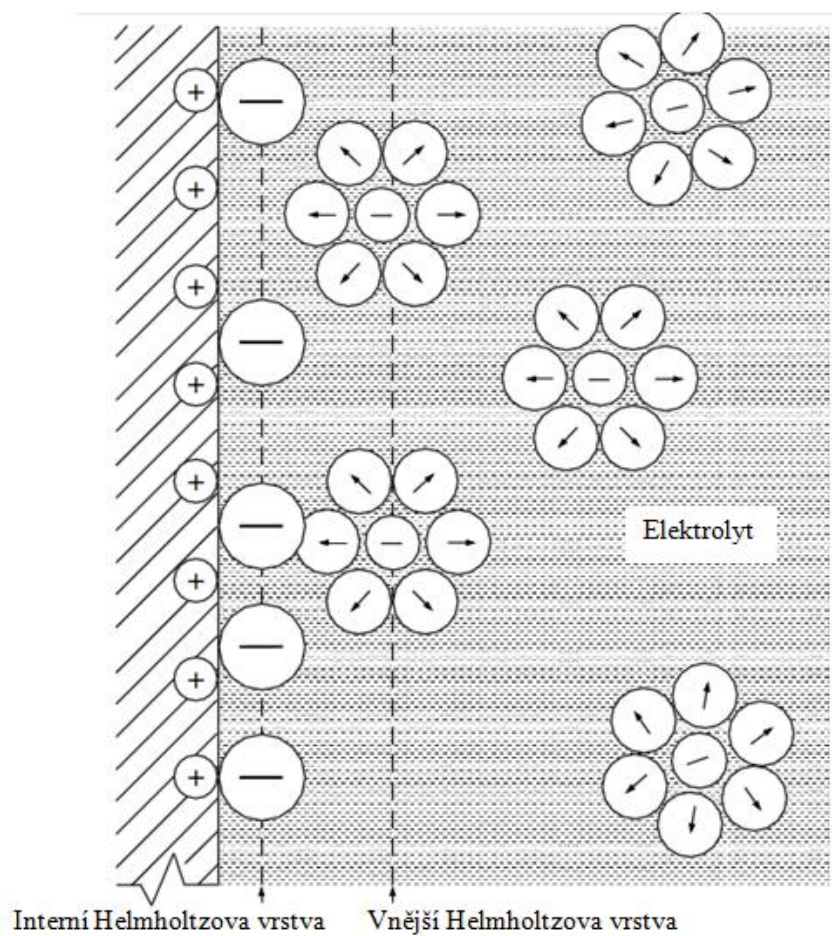
Náhradní elektrický obvod impedance na (Obr. 12) zahrnuje odpor R_s , který představuje odpor elektrolytu, kapacitu elektrické dvouvrstvy C_{dl} , odpor přenosu náboje R_{ct} a Warburgovu impedanci Z_w , která reprezentuje transport iontů z roztoku k povrchu elektrody. Na (Obr. 13) je zobrazen Nyquistův diagram, jenž je tvořen polokruhovitou částí, kterou pozorujeme při vysokých frekvencích a lineární částí, kterou pozorujeme při frekvencích nízkých. Polokruhovitá část já závislá na přenosu náboje přes elektrodovou dvouvrstvu vznikající na rozhraní elektroda-elektrolyt. Jestliže je přenos náboje rychlý, pak je polokruhovitá část velmi malá, s klesající rychlostí přenosu náboje se polokruhovitá část zvětšuje. Polokruhovitá část Nyquistova diagramu je tedy závislá na odporu R_{ct} . Lineární část odpovídá Warburgově impedanci, která charakterizuje rychlost difúze iontů k elektrodě. V ideálním případě svírá lineární část průběhu s reálnou osou úhel 45° . [11]



Obr. 13: Nyquistův diagram [5]

Elektrodová dvouvrstva

Elektrodovou dvouvrstvu tvoří vrstva elektricky nabitých částic nebo dipólů vznikající na rozhraní elektroda-elektrolyt. Elektrodová dvouvrstva je složena ze dvou rozhraní, kovové elektrody nebo elektrody z jiného vodivého materiálu a elektrolytu. Četnost elektronů a adsorbované ionty na povrchu elektrody určují její náboj. Části elektrodové dvouvrstvy můžeme ještě rozdělit na několik dílčích struktur. První je vnitřní Helmholtzova vrstva, která je tvořena molekulami rozpouštědla a adsorbovanými ionty. Na ni navazuje vnější Helmholtzova vrstva, která reflektuje imaginární rovinu procházející středem solvatovaných iontů. Poslední část obsahuje oblast rozptýlených iontů, je tedy tvořena elektrolytem a nazývá se difúzní vrstva. Obr. 14 zobrazuje rozhraní mezi elektrodou a difúzní vrstvou.



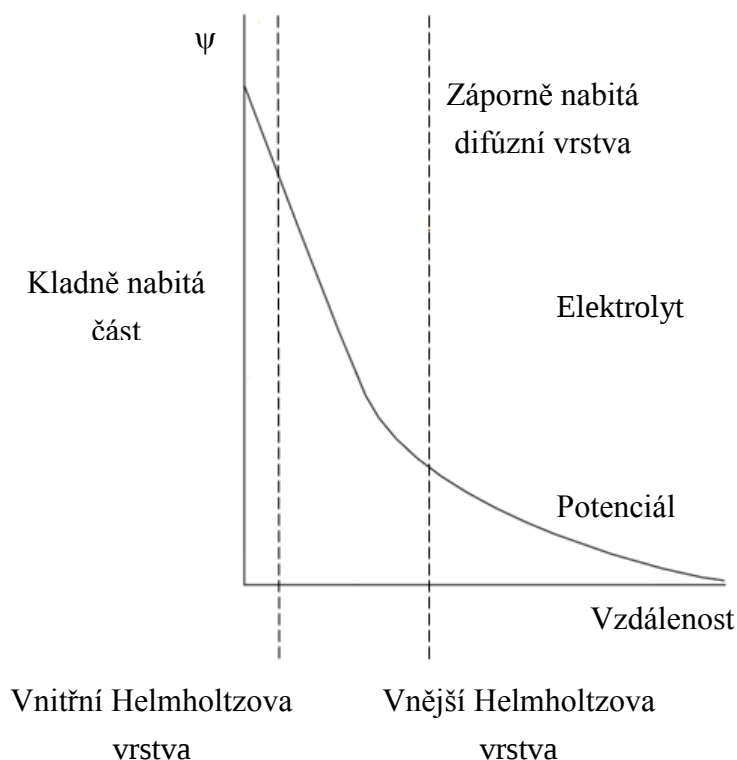
Obr. 14: Elektroková dvouvrstva [11]

Elektroková dvouvrstva má kapacitní charakter. Celková kapacita dvouvrstvy C_{dl} je dána sériovým spojením kapacity Helmholtzovy vrstvy C_H a kapacity vrstvy difúzní C_{Dif} .

$$\frac{1}{C_{dl}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{Dif}}, \quad (6)$$

$$C_{dl} = \frac{C_H \cdot C_{Dif}}{C_H + C_{Dif}}, \quad (7)$$

V difúzní vrstvě klesá potenciál s rostoucí vzdáleností od elektrody až k nule, což znázorňuje (Obr. 15).



Obr. 15: Průběh potenciálu na dvouvrstvě [11]

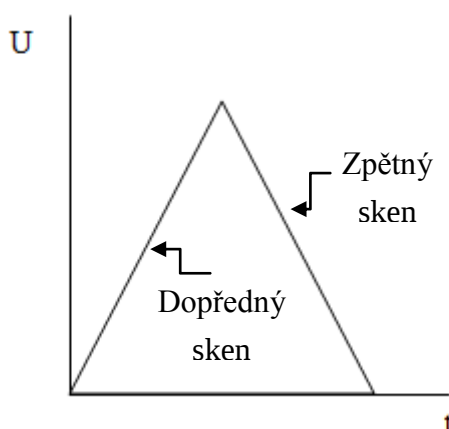
4. Voltametrie

Voltametrie je elektrochemická analytická metoda vyvinutá na základě objevu polarografie. Princip voltametrie spočívá v měření závislosti proudu na napětí, které je přiváděno na elektrody ponořené v roztoku. [9] Používáme tříelektroodový systém, jenž je tvořen referenční, pomocnou a pracovní elektrodou a v současné době je využíván mnohem více než systém dvouelektroodový. Jako referenční elektrody používáme téměř výhradně kalomelové a argentchloridové elektrody, dále pak vodíkové elektrody. Referenční elektroda má mít ideálně konstantní hodnotu napětí, aby se pomocí ní mohla nastavovat hodnota napětí na pracovní elektrodě. Platinová elektroda se velmi často užívá jako pomocná elektroda, přes tuto elektrodu prochází proud. Pracovní elektrody mohou být rtuťové, platinové, zlaté, uhlíkové, glassy karbonové (skelný uhlík). Povrch pracovní elektrody vyžaduje pečlivou údržbu, také musíme používat takový rozsah pracovního potenciálu, aby nedocházelo k elektrochemickému rozkladu materiálu elektrody. Potřebný potenciostat zajišťuje, aby mezi pracovní a pomocnou elektrodou protékal takový proud, aby mezi pracovní a referenční elektrodou byl dodržen požadovaný napěťový průběh. Voltametrické metody vynikají svou

přesností a citlivostí. Dále pak svou rychlou analýzou. V analytické chemii je voltametrie využívána pro kvantitativní stanovení anorganických i organických látek v roztoku, pro studium oxidačních a redukčních procesů, reakčních mechanismů a adsorpčních procesů. [9]

Cyklická voltametrie

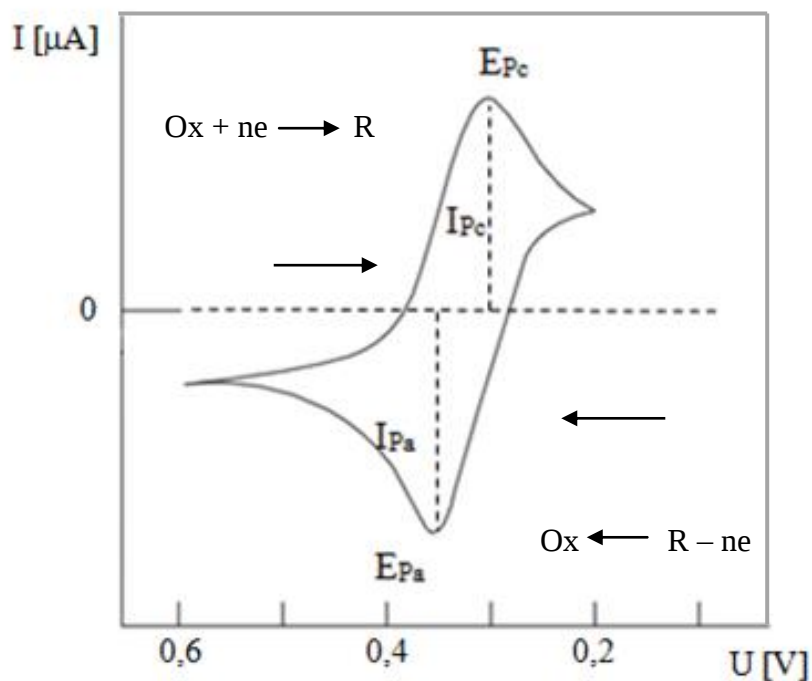
Cyklická voltametrie se stala důležitou a široce používanou elektroanalytickou technikou v mnoha oblastech chemie. Velice často se používá pro studium redoxních procesů nebo pro analýzu vlastností roztoků. Je založena na změnách použitého potenciálu na pracovní elektrodě při zaznamenávání proudu. Počáteční hodnotu napětí s časem lineárně zvyšujeme až k limitní hodnotě napětí, po dosažení této hodnoty se sken obrátí a začne se vracet k počáteční hodnotě napětí, dosažením původní hodnoty napětí je cyklus ukončen. Trojúhelníkový cyklus na (Obr. 16) znázorňuje jeden cyklus voltametrie. Jednotlivé cykly mohou probíhat různou rychlostí. Čím rychleji daný cyklus probíhá, tím větší chybou je zatížen. [9]



Obr. 16: Průběh přikládaného napětí pro cyklickou voltametrii

Voltamogram

Záznam získaný měřením pomocí voltametrie se nazývá voltamogram, vyjadřuje závislost proudu na napětí. Pomocí tohoto záznamu jsme schopni určit například koncentraci nebo složení vzorku z výšky (velikosti proudu) a polohy naměřených píků (velikost napětí v místě vrcholu píků). Obr. 17 zobrazuje typický průběh cyklické voltametrie s vyznačenými píky.



Obr. 17: Voltamogram [11]

Mezi důležité parametry cyklického voltamogramu patří pík anodického proudu I_{pa} a katodického proudu I_{pc} a velikost anodického napětí E_{pa} a katodického napětí E_{pc} v polohách příslušných píků. [15]

Při dopředném skenu se oxidovaná forma Ox redukuje, což je zobrazeno v rovnici (8), (vzniká katodický pík) a naopak při zpětném skenu se redukováná forma R oxiduje (vzniká anodický pík). Při těchto dějích dochází ke spotřebě částic v okolí pracovní elektrody. Další částice se k elektrodě dostávají difúzí nebo migrací. [11]



Standardní klidové napětí můžeme získat pomocí vzorce (9).

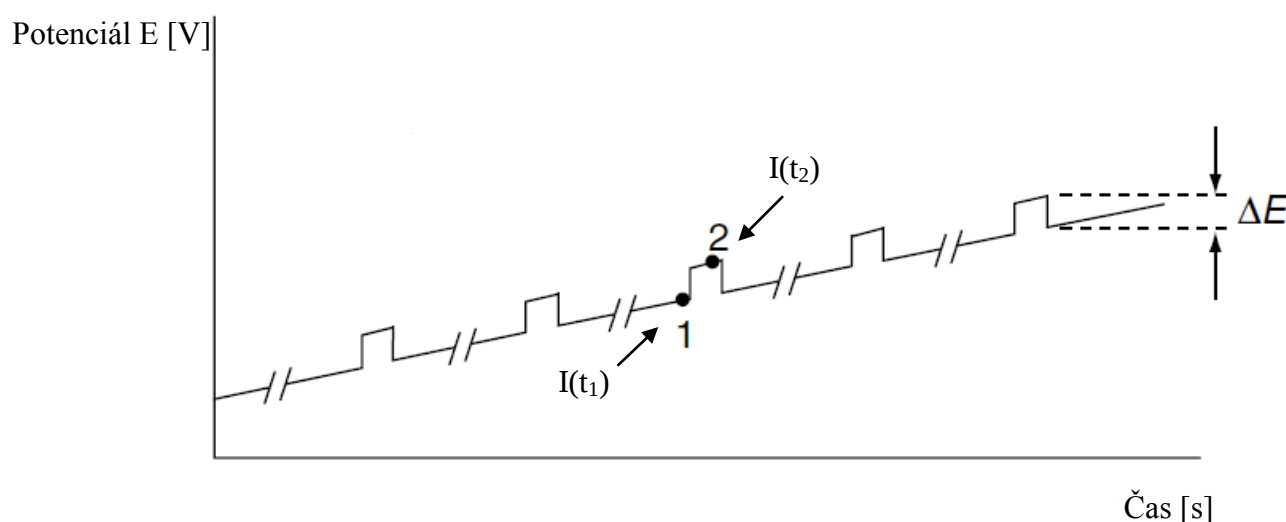
$$E_0 = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}, \quad (9)$$

Tento potenciál nám udává schopnost redoxního systému převést jednoho z redoxních partnerů do oxidované formy.

Diferenčně pulzní voltametrie

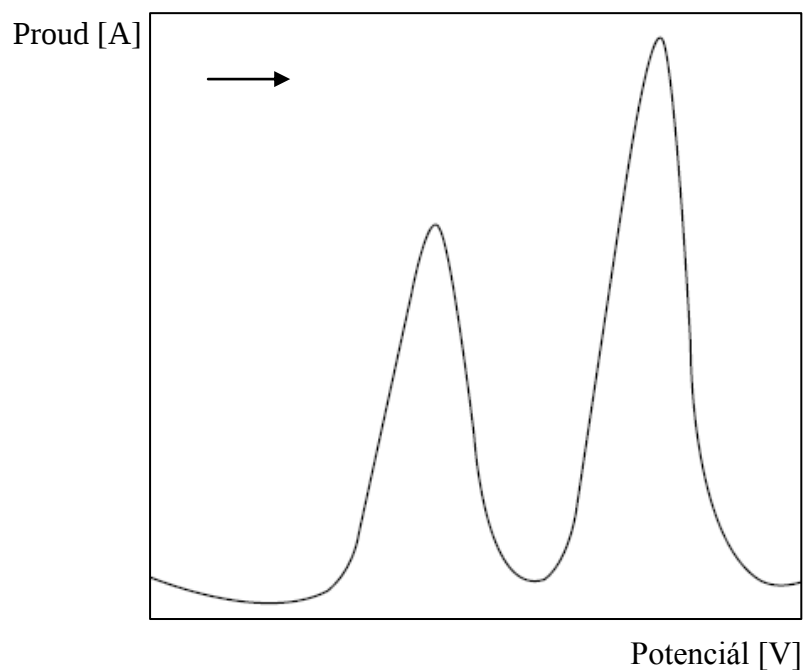
Diferenčně pulzní voltametrie je velmi užitečná technika pro stanovení stopového množství organických i anorganických látek. Impulzy pevné velikosti položené na lineární potenciálovou rampu jsou aplikovány na pracovní elektrodu. Obr. 18 zobrazuje excitační signál používaný pro diferenčně pulzní voltametrii. Každý potenciálový impuls je nastaven v rozsahu 10 – 100 mV. Pro každý impuls je ve dvou bodech měřen proud. Nejprve je registrován proud těsně před vysláním pulzu a dále pak proud těsně před ukončením pulzu. Výsledný proud Δi je určen rozdílem zmíněných proudů, jak je uvedeno v rovnici (10). ΔE udává velikost pulzu. [11]

$$\Delta i = i(t_2) - i(t_1), \quad (10)$$



Obr. 18: Excitační signál pro DPV [11]

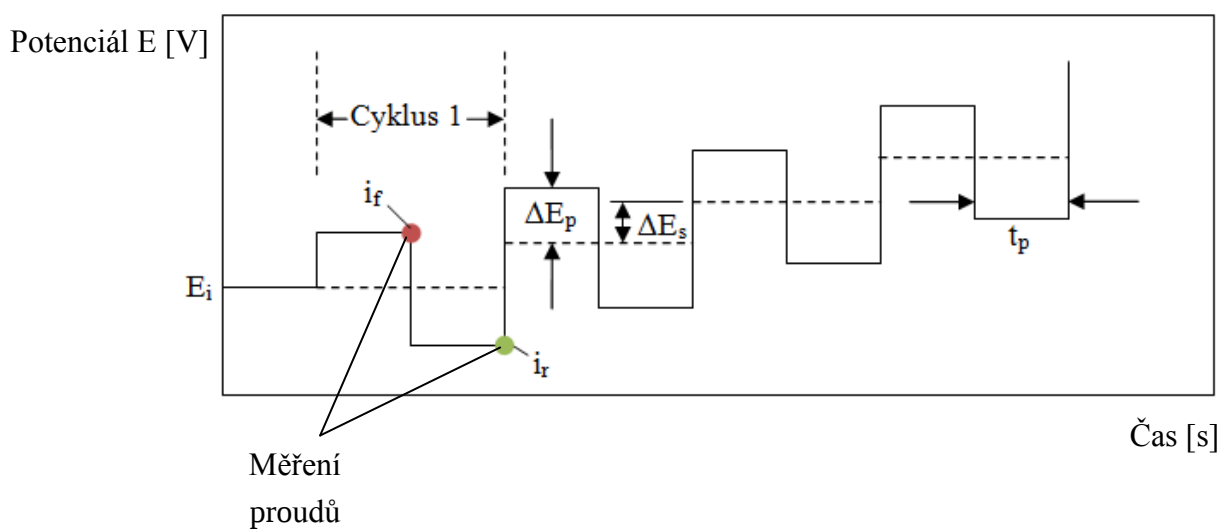
Výsledný voltamogram se skládá z proudových píků, jejichž výšky jsou přímo úměrné koncentraci analytu. Charakteristický záznam získaný pomocí diferenčně pulzní voltametrie je zobrazen na (Obr. 19). Poloha píku poskytuje kvalitativní informaci, výška píku udává kvantitativní informaci. [11]



Obr. 19: Charakteristický průběh DPV [11]

Square-wave voltametrie

Voltametrie s pravoúhlým budícím signálem (square-wave voltmetry) je typem pulzní voltametrie, která nabízí výhody vysoké citlivosti a rychlosti. Principem metody je přivedení potenciálu, který je modulovaný napěťovými pulzy pozitivními a negativními proti potenciálové rampě. Tento lineárně měnící se potenciál je zobrazen na (Obr. 20). [17]



Obr. 20: Potenciálový průběh vkládaný na pracovní elektrodu

Během jednoho cyklu je dvakrát zaznamenáván proud na konci každého pulzu. Takto získáme hodnoty propustného proudu i_f a reverzního proudu i_r , z jejichž rozdílu je počítán výsledný proud, jak je vidět v rovnici (11). Veličina ΔE_p udává výšku impulzu a ΔE_s popisuje posun impulzu na začátku každého pulzu. [17]

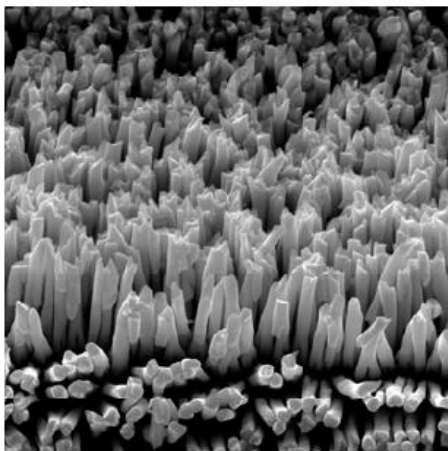
$$\Delta i = i_f - i_r, \quad (11)$$

Měření pomocí square-wave voltametrie je ve srovnání s diferenčně pulzní voltametrií citlivější. Nevýhodou této metody je velká citlivost na jakékoliv nečistoty, které mohou výrazně ovlivnit naměřené hodnoty.

5. Výroba nanostrukturovaných elektrod

Zlaté nanotyčinky

Zlaté nanotyčinky (Obr. 21) jsou z hlediska biomedicíny velmi rozšířeným a užitečným nástrojem pro sledování analytů. Jejich výhoda spočívá ve schopnosti absorbovat blízké infračervené záření (Near-infrared, NIR). Toto elektromagnetické záření se pohybuje v rozmezí vlnových délek 700 – 1000 nm. Na rozdíl od viditelné oblasti elektromagnetického záření vykazuje NIR dvě žádoucí výhody. První z výhod je nízká auto-luminiscence nanotyčinek a druhá je malý rozptyl záření na nanotyčinkách. Díky těmto vlastnostem jsou nanotyčinky vysoce citlivé. Hluboké pronikání NIR záření poskytuje podrobné informace o struktuře zkoumaných látek. [6]

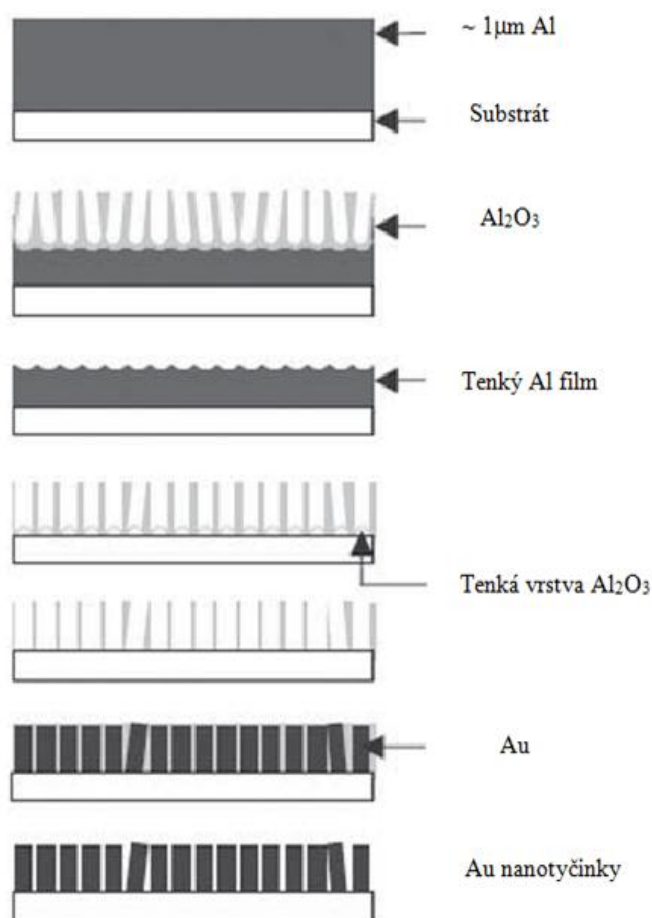


Obr. 21: Zlaté nanotyčinky [12]

Výroba zlatých nanotyčinek

Zlaté nanotyčinky získáváme elektrochemickou syntézou, s jejíž pomocí se na povrchu katody redukují zlaté ionty. Produktem z redukce je elementární zlato. Zlato může být formováno do požadovaného tvaru pomocí vhodné šablony. Tyto šablony klasifikujeme na měkké a tvrdé. Tvrdé šablony se nanosou na povrch elektrody a vytvoří porézní válcové prostředí, ve kterém pak zlato roste. Klasickou a často užívanou šablonu (masku) tvoří porézní oxid hlinitý, který byl vytvořen elektrochemickým oxidováním hliníkové vrstvy nanesené na vodivém povrchu. Při anodizaci hliníku dochází ke vzniku uspořádaných pórů. Do takto vzniklých pórů je elektrochemicky redukováno zlato z elektrolytu. Po depozici zlata je maska odstraněna a získáme tak povrch pokrytý zlatými nanotyčinkami. Celý proces je zobrazen na (Obr. 22). [6]

Elektrochemická syntéza pomocí měkkých šablon byla poprvé popsána v roce 1997. Měkké masky jsou tvořeny micelami, jako jsou například hexadecyltrimethylamonium bromid. Funkce měkkých šablon je stejná jako tvrdých. [6]

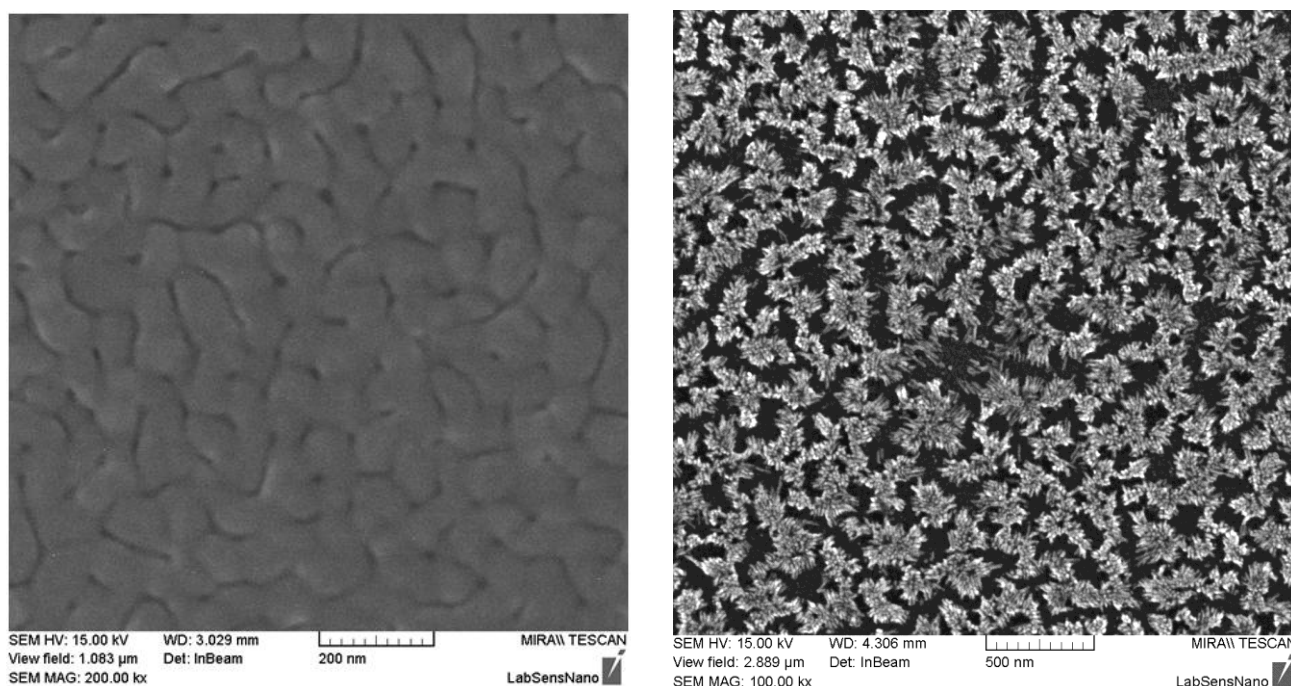


Obr. 22: Výroba zlatých nanotyčinek [6]

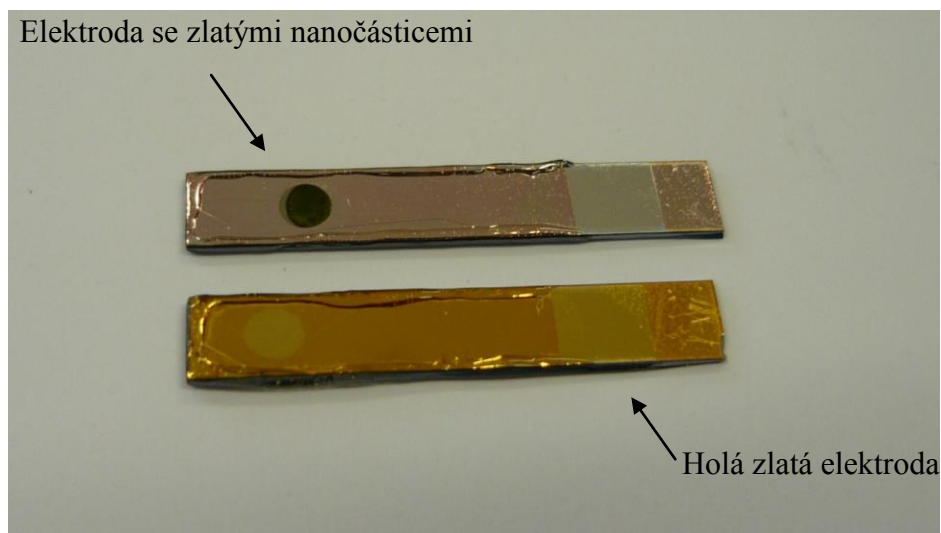
IV. Materiál a metody

1. Elektrody

Měření probíhala na zlatých elektrodách bez nanočástic a elektrodách pokrytých zlatými nanočásticemi. Při výrobě zlatých nanostruktur byla na křemíkovou vrstvu nanесena vrstva titanu a hliníku, který byl následně oxidován na porézní aluminiovou masku. Do takto vzniklé masky bylo následně deponováno zlato. Po odleptání masky byl získán povrch modifikovaný zlatými nanočásticemi. Na (Obr. 23) je zobrazena maska oxidu hlinitého a získané zlaté nanostruktury. Na (Obr. 24) je zobrazena holá zlatá elektroda a elektroda se zlatými nanočásticemi. Elektrody bez nanočástic byly vyrobeny napařením vrstvy titanu a vrstvy zlata. Litograficky pak byla vymezena elektroaktivní plocha elektrod.

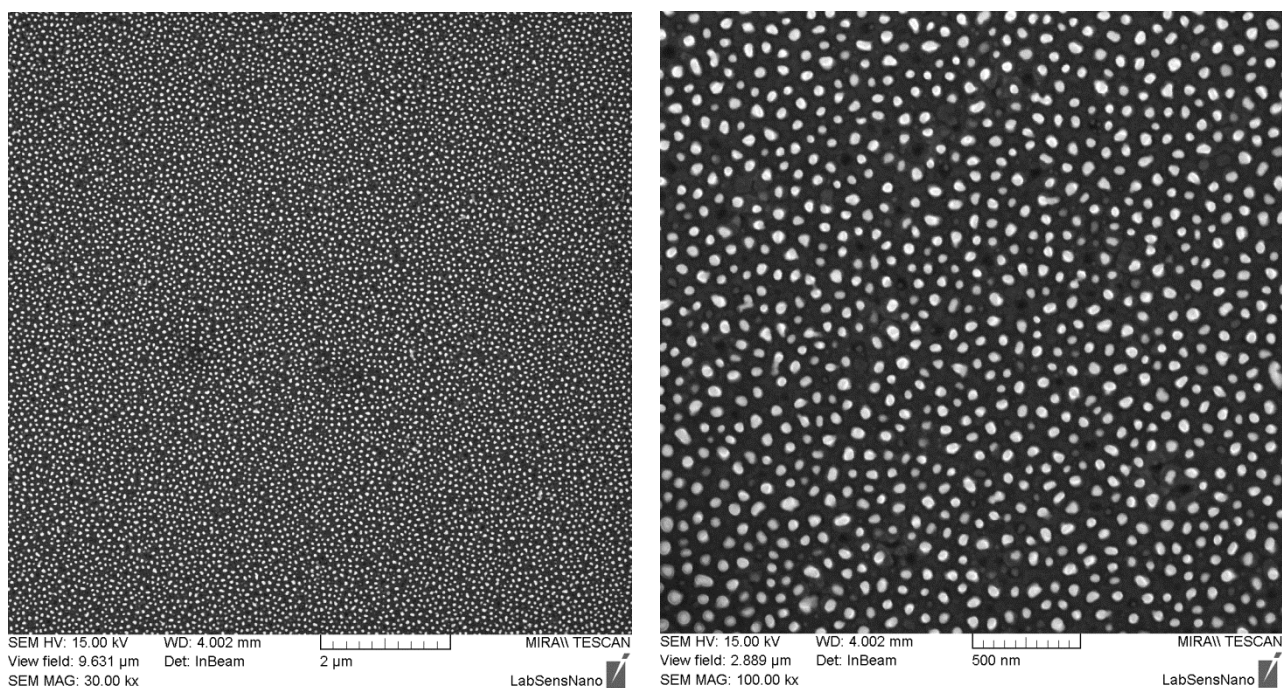


Obr. 23: Maska Al_2O_3 (vlevo) a zlaté nanostruktury (vpravo)



Obr. 24: Holá zlatá elektroda a elektroda se zlatými nanočásticemi

Na (Obr. 25) jsou zobrazeny povrchy nanostrukturovaných elektrod. Obrazy jsou pořízeny pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.



Obr. 25: Povrchy se zlatými nanotyčinkami

2. Impedanční spektroskopie

Impedanční spektroskopie byla měřena pomocí přístroje μ AUTOLABIII/FRA2 v rozsahu frekvencí 500 kHz – 0,1 Hz s amplitudou 20 mV. K charakterizaci elektrod byly použity roztoky K_2SO_4 (Lachema Neratovice) naředěné do požadovaných koncentrací (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM a 10 mM). K měření byla používána pracovní cela s tříelektrodovým zapojením. Jako referentní elektroda byla použita elektroda argentchloridová Ag/AgCl/3M KCl a jako pomocná elektroda platinová. Před zahájením měření byla měřící cela čištěna v ultrazvuku v 0,1 M kyselině sírové po dobu deseti minut. Elektrody byly elektrochemicky zbaveny nečistot pomocí cyklické voltametrie (scan rate 100 mV/s), při které byly ponořeny v roztoku 0,1 M kyseliny sírové. Demineralizovaná voda byla připravena přístrojem Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a následně purifikována za použití Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18M Ω).

Na (Obr. 26) je znázorněno nastavení přístroje μ AUTOLABIII pro měření impedanční spektroskopie.

The screenshot shows the software interface for setting up an impedance measurement. The top section contains several input fields and checkboxes:

- Frequency range:** First applied frequency (500000 Hz), Last applied frequency (0.1 Hz), Number of frequencies (50), Significant digits (5).
- Amplitude:** Amplitude (0.08 V), ☒ RMS.
- Integration time calculation:** Integration time (maximum) (0.125 s), Integration cycles (minimum) (1).
- Frequency step:** ☐ Linear, ☒ Logarithmic, ☐ Square root.
- Wave type:** ☒ Single sine, ☐ 5 sines, ☐ 15 sines.

Below these fields are three buttons: Replace, Add, and Clear. At the bottom of the interface is a table with the following columns: Frequency (Hz), Amplitude (V), Wave type, Integration time, and Minimum number of cycles to integrate. The table contains 7 rows of data, all with an amplitude of 0.08 V and an integration time of 0.125 s. The first row is highlighted in blue.

	Frequency (Hz)	Amplitude (V)	Wave type	Integration time	Minimum number of cycles to integrate
1	500000	0.08	Single sine	0.125	1
2	364970	0.08	Single sine	0.125	1
3	266410	0.08	Single sine	0.125	1
4	194460	0.08	Single sine	0.125	1
5	141940	0.08	Single sine	0.125	1
6	103610	0.08	Single sine	0.125	1
7	75629	0.08	Single sine	0.125	1

At the bottom right of the table are two buttons: OK and Cancel.

Obr. 26: Nastavení přístroje μ AUTOLABIII pro impedanční měření

Dále byla měřena impedance pro zlaté a nanostrukturované elektrody s navázaným a nenavázaným doxorubicinem. Impedanční měření probíhala ve fosfátovém pufru o koncentraci 100 μ M. Na elektrody bylo po dobu deseti minut akumulováno 10 μ l doxorubicinu o různých koncentracích. Koncentrace doxorubicinu (3,125 μ g/ml, 6,25 μ g/ml, 12,5 μ g/ml, 25 μ g/ml,

50 µg/ml a 100 µg/ml). Po akumulaci byla elektroda opláchnuta v demineralizované vodě a změřena. Každé měření bylo dvakrát opakováno. Na (Obr. 27) je zobrazen přístroj µAUTOLABIII s jehož pomocí byla všechna měření prováděna.



Obr. 27: µAUTOLABIII [21]

3. Voltametrické metody

Pomocí voltametrických metod jsme charakterizovali vlastnosti zlatých elektrod a vlastnosti elektrod se zlatými nanotyčinkami bez navázaného a s navázaným doxorubicinem. Měření probíhala ve fosfátovém pufru o koncentraci 0,1 M. Na oba typy elektrod jsme akumulovali různé koncentrace doxorubicinu (3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml a 100 µg/ml). Voltametrická měření byla provedena pomocí přístroje µAUTOLABIII. K měření byla používána měřící cela s tříelektrodovým zapojením. Referentní elektroda byla argentchloridová Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla platinová.

Fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M a pH = 7: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Obě sloučeniny byly získány od společnosti Sigma-Aldrich.

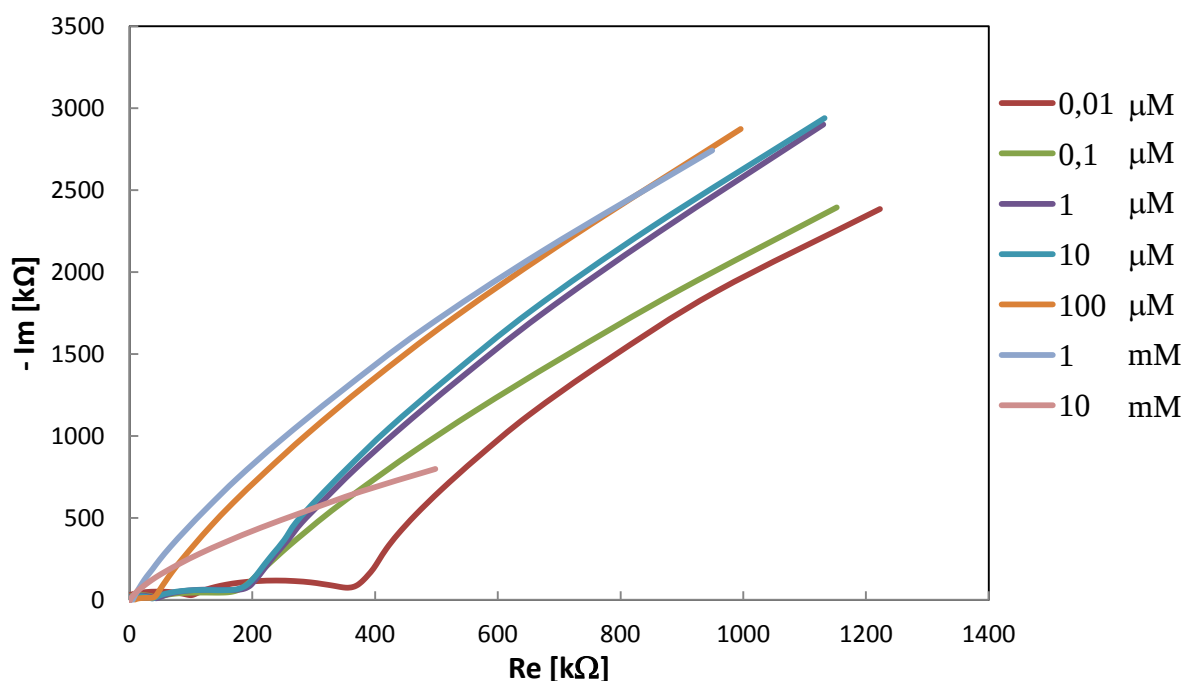
Oligonukleotidy byly získány od firmy Sigma-Aldrich. Koncentrace oligonukleotidů byla 40 ng/ml.

Doxorubicin byl zakoupen od firmy (Sigma-Aldrich).

V. Výsledky

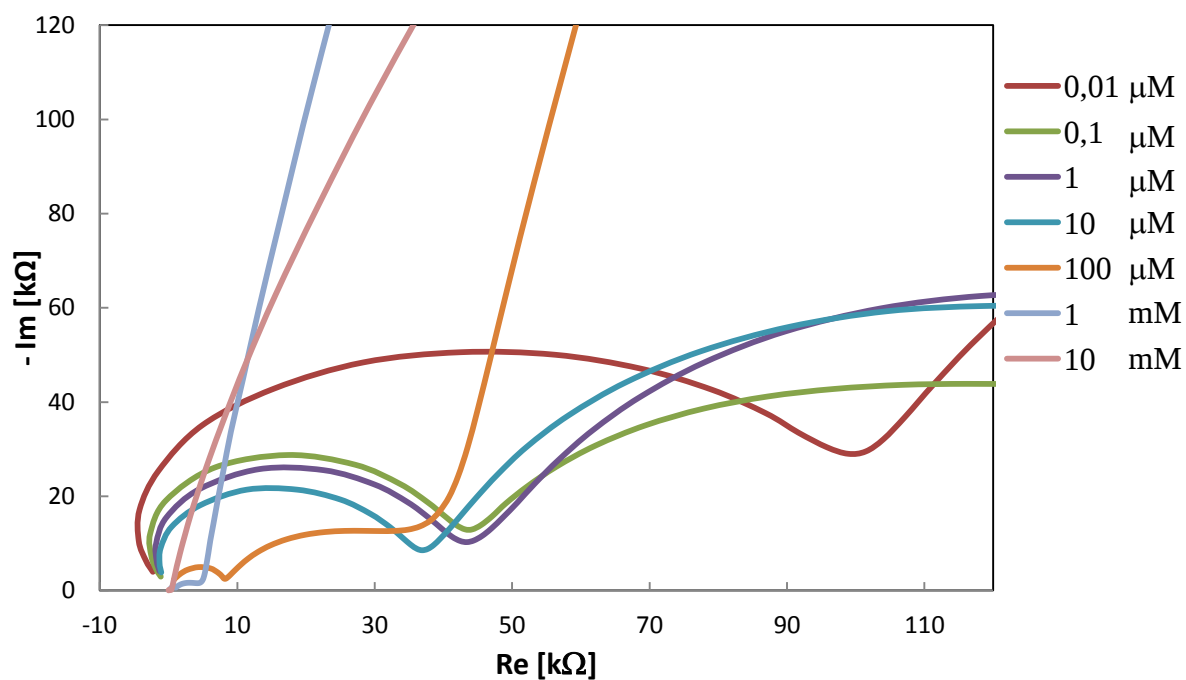
1. Charakterizace zlatých elektrod pomocí EIS

Pomocí impedanční spektroskopie jsme stanovili impedanční charakteristiky zlatých elektrod v celém rozsahu frekvencí pro různě koncentrované roztoky síranu draselného. Postupně byly proměřeny průběhy v celém rozsahu koncentrací na čtyřech zlatých elektrodách. Každé měření bylo třikrát opakováno z důvodu ustálení systému. Pro prezentaci výsledků bylo vždy použito třetí měření jednotlivých koncentrací na jednotlivých elektrodách. Před každým měřením byl roztok probubláván dusíkem pro odstranění sorbovaného kyslíku. Obr. 28 zobrazuje frekvenční charakteristiky v celém rozsahu koncentrací síranu draselného.



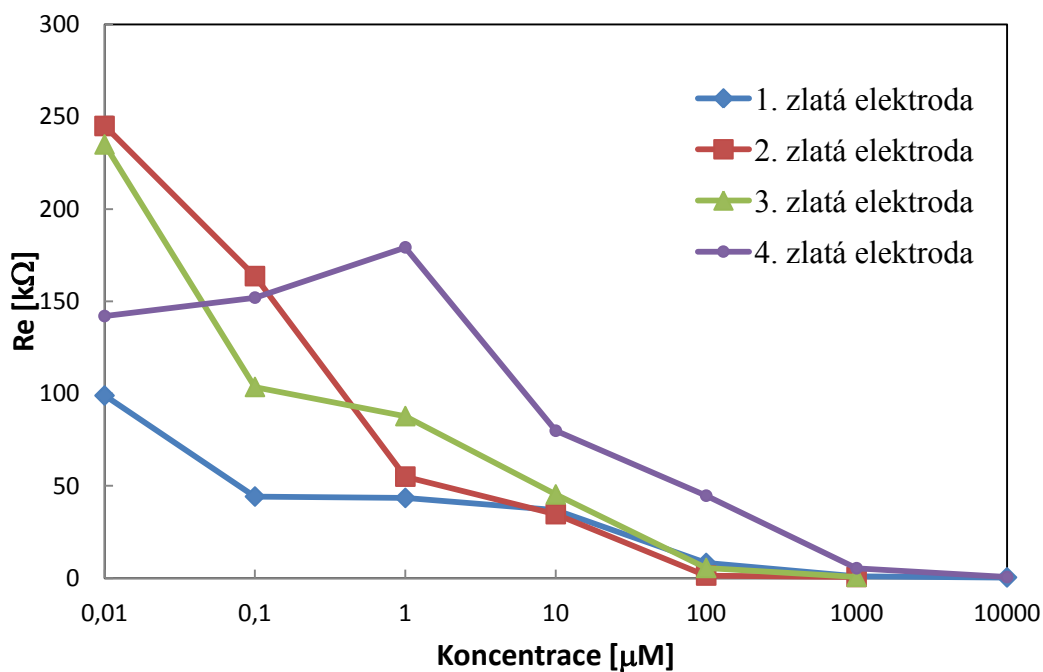
Obr. 28: Frekvenční charakteristiky v celém rozsahu koncentrací

Na (Obr. 29) je zobrazen výřez průběhů impedancí pro jednotlivé koncentrace síranu draselného. Z naměřených hodnot je vidět, že s rostoucí koncentrací roztoku se zmenšovala polokruhovitá část impedance a rostla část lineární. V koncentrovanějším roztoku je více iontů, a čím je jejich množství vyšší, tím je rychlejší i jejich přenos, což má vliv na polokruhovitou část impedance, která se s rostoucí rychlostí přenosu iontů rychle zmenšuje. Na impedančních průbězích můžeme pozorovat dvě polokruhovité části, což může být způsobeno rozhraním titanu a zlatého povrchu. Tento jev se projevuje více u průběhů pro méně koncentrované roztoky.



Obr. 29: Výřez frekvenčních charakteristik

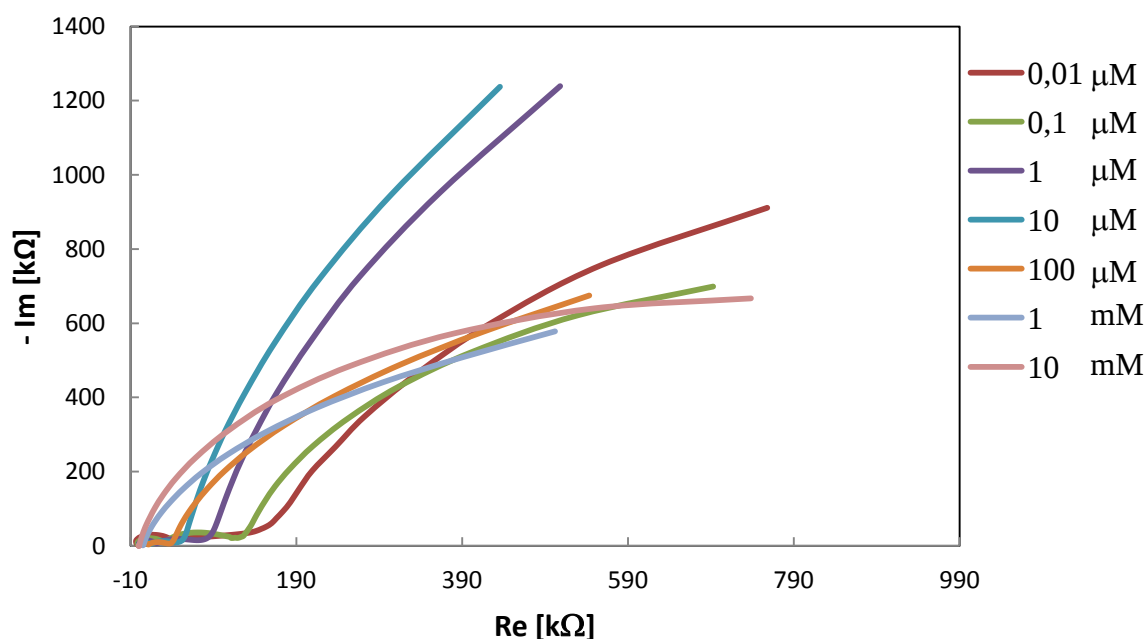
Obr. 30 popisuje závislost reálné složky impedance v bodech lokálního maxima imedančního průběhu na koncentraci. Porovnáním jednotlivých průběhů získáme představu o tom, jak jsou si jednotlivé elektrody podobné z hlediska svých vlastností.



Obr. 30: Závislost reálné části impedance na koncentraci

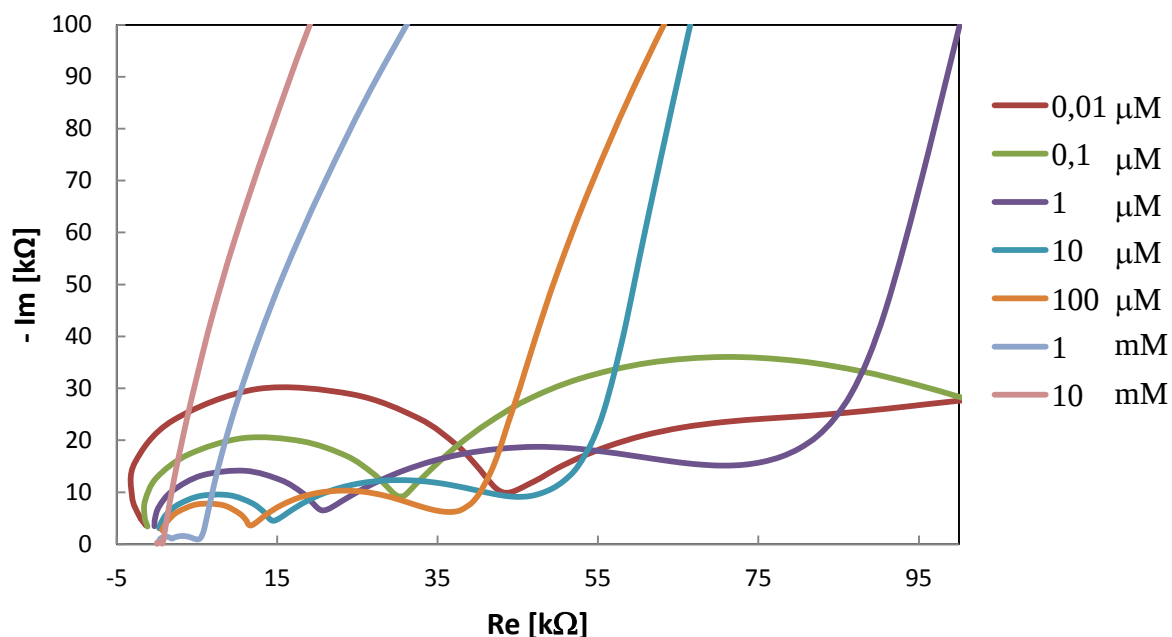
2. Charakterizace nanostrukturovaných elektrod pomocí EIS

U elektrod s nanesenými zlatými nanočásticemi jsme provedli pomocí EIS stejnou charakterizaci jako u holých zlatých elektrod, shrnutí výsledků zobrazuje (Obr. 31, 32, 33). Postupně jsme proměřili čtyři nanostrukturované elektrody v celém rozsahu koncentrací. Měření probíhala za stejných podmínek jako u holých zlatých elektrod.



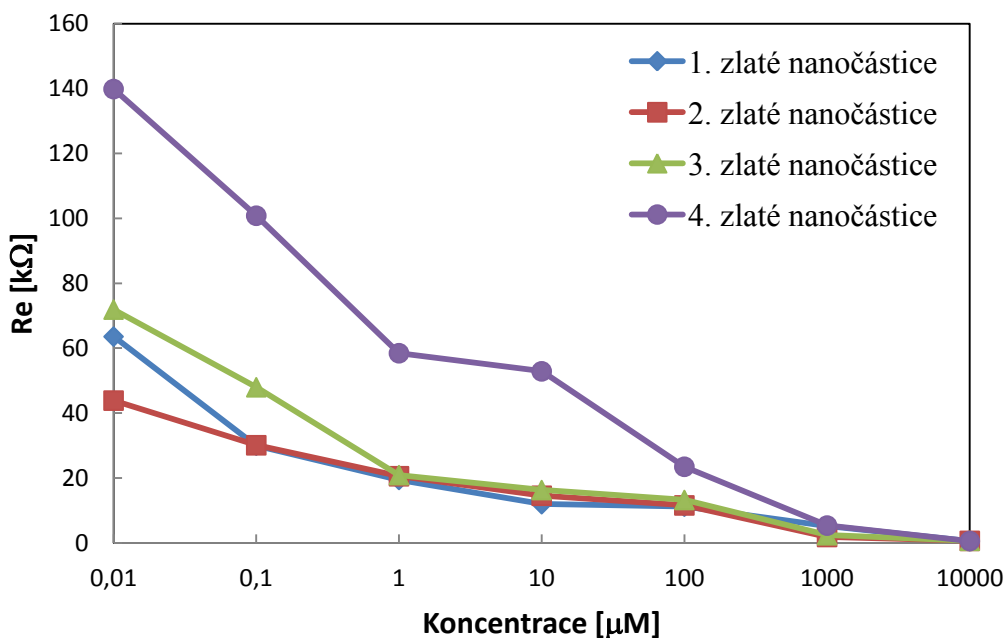
Obr. 31: Frekvenční charakteristiky v celém rozsahu koncentrací

Obr. 32 zobrazuje zvětšený výřez z celého spektra, které je zobrazeno na (Obr. 31) tak, abychom si mohli prohlédnout polokruhovitou část impedance. S rostoucí koncentrací síranu draselného se polokruhovitá část impedance snižuje.



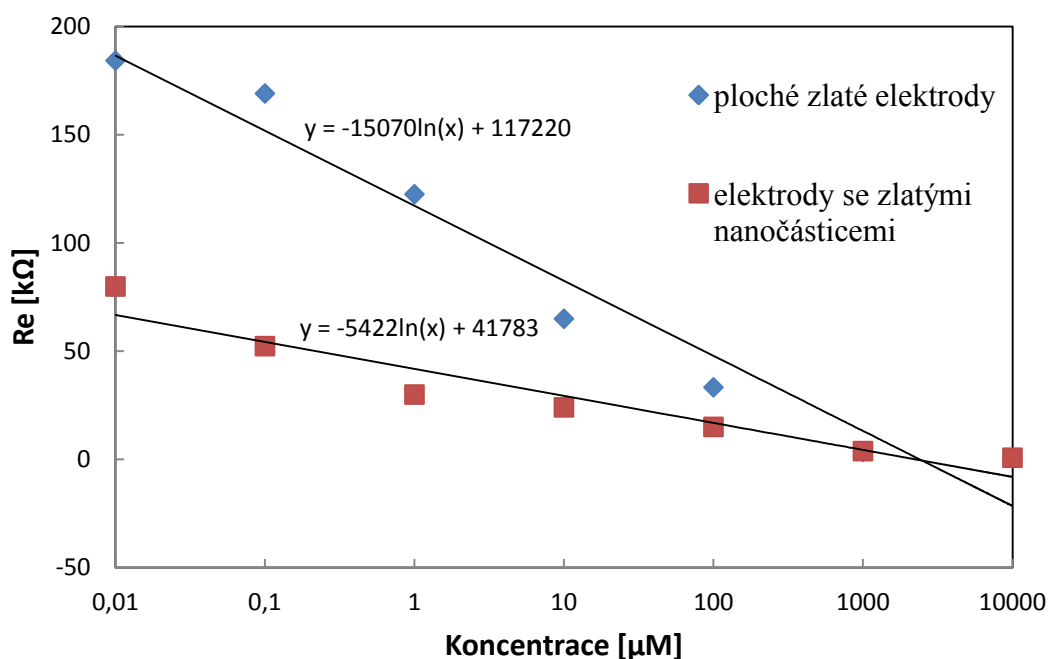
Obr. 32: Výřez frekvenčních charakteristik

Obr. 33 vyjadřuje závislost reálné složky impedance na koncentraci. Porovnáním jednotlivých průběhů zjistíme, které elektrody vykazují podobné vlastnosti. Nejvíce podobné elektrody poté použijeme pro následující měření, tak abychom mezi nimi mohli porovnávat naměřené výsledky s navázanými oligonukleotidy a doxorubicinem.



Obr. 33: Závislost reálné složky impedance na koncentraci

Na (Obr. 34) jsou zobrazeny závislosti reálných složek impedance na koncentraci. Závislost je logaritmická v logaritmických souřadnicích. Reálné složky impedance byly odečteny v bodech lokálních maxim v průbězích impedance. Výsledný graf na (Obr. 34) je průměrem předchozích čtyř měření na (Obr. 30, 33) a vyjadřuje, že elektrody se zlatými nanočásticemi vykazují nižší impedanci oproti holým zlatým elektrodám. Nižší impedance elektrod se zlatými nanočásticemi je způsobena jejich větší elektroaktivní plochou v porovnání s holými zlatými elektrodami. Z tohoto důvodu jsou elektrody se zlatými nanočásticemi citlivější.

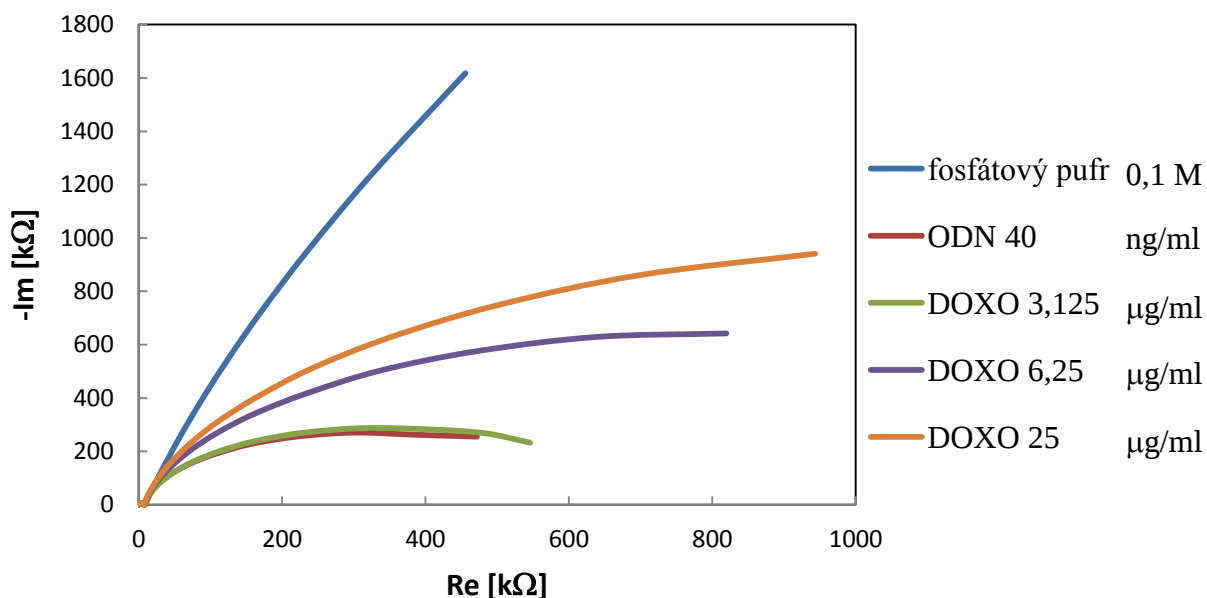


Obr. 34: Závislost reálné složky impedance na koncentraci

3. Impedanční měření interakce ODN a doxorubicinu

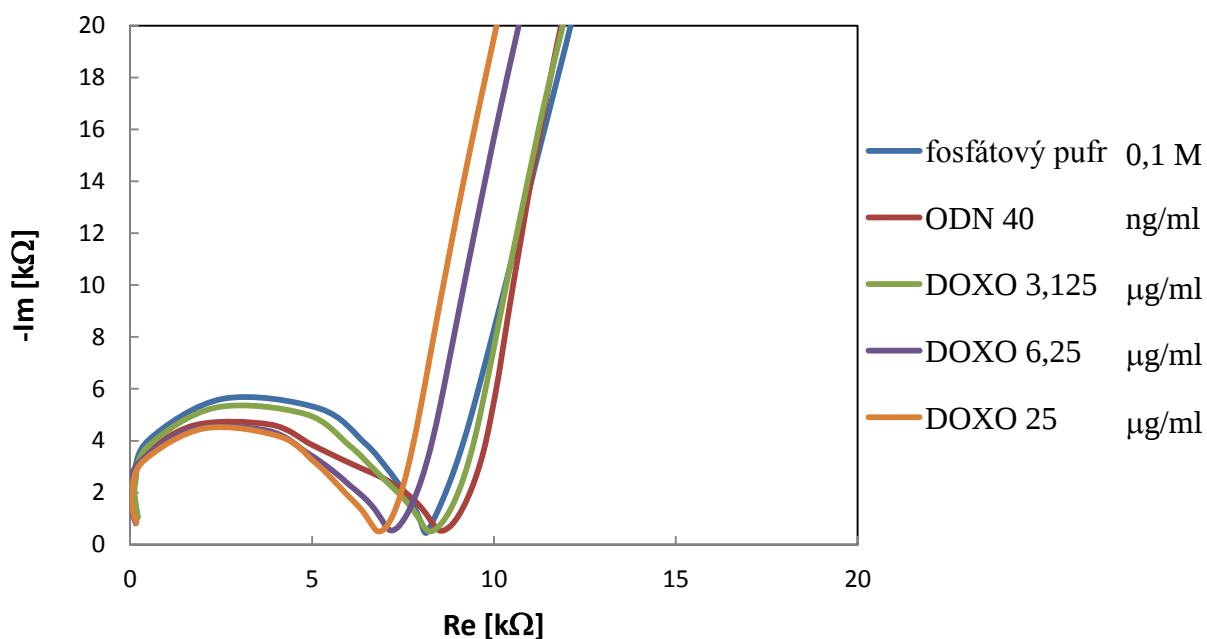
Měření impedančních průběhů na (Obr. 35, 36, 37, 38) probíhalo ve fosfátovém pufru o koncentraci 100 μM . Před akumulací oligonukleotidů jsme proměřili samotné elektrody ve fosfátovém pufru, abychom věděli, jak se elektroda v daném pufru chová. Na holé zlaté elektrody a elektrody se zlatými nanočásticemi jsme nechali 20 hodin akumulovat oligonukleotidy. Po akumulaci oligonukleotidů jsme elektrody opláchli destilovanou vodou a znovu je proměřili, získané průběhy jsou v následujících grafech označeny zkratkou ODN. Nakonec jsme na elektrodu nanášeli doxorubicin od nejnižší po nejvyšší koncentraci.

Doxorubicin jsme nechali deset minut akumulovat, potom jsme elektrodu opláchli destilovanou vodou a proměřili ji, takto jsme postupovali pro každou koncentraci doxorubicinu. Každé měření bylo dvakrát opakováno pro ustálení systému. Vzniklé průběhy pro různé koncentrace doxorubicinu jsou popsány na (Obr. 35, 36, 37, 38).

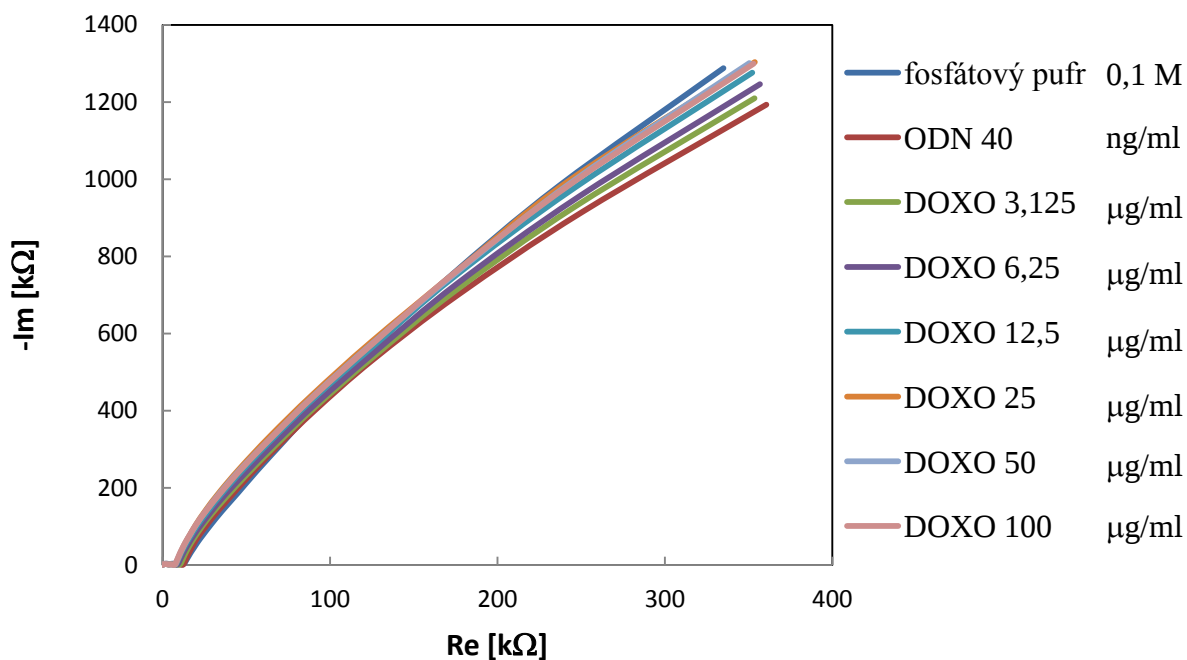


Obr. 35: Frekvenční charakteristiky holé zlaté elektrody s ODN a doxorubicinem

S vyšší koncentrací doxorubicinu se polokruhovitá část impedance zmenšuje stále více, jak zobrazuje (Obr. 36).

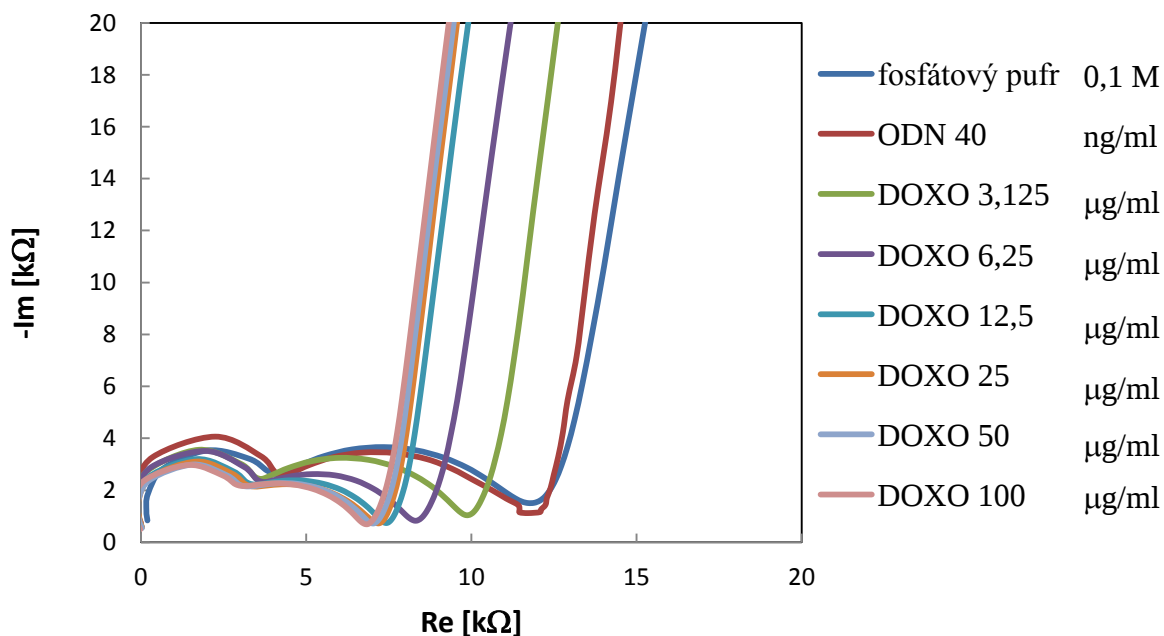


Obr. 36: Výřez frekvenčních charakteristik holé zlaté elektrody s ODN a doxorubicinem



Obr. 37: Frekvenční charakteristiky nanostrukturované elektrody s ODN a doxorubicinem

Obr. 38 popisuje, jak se polokruhovitá část impedance po akumulaci oligonukleotidů mírně zvýšila, což odpovídá teorii.

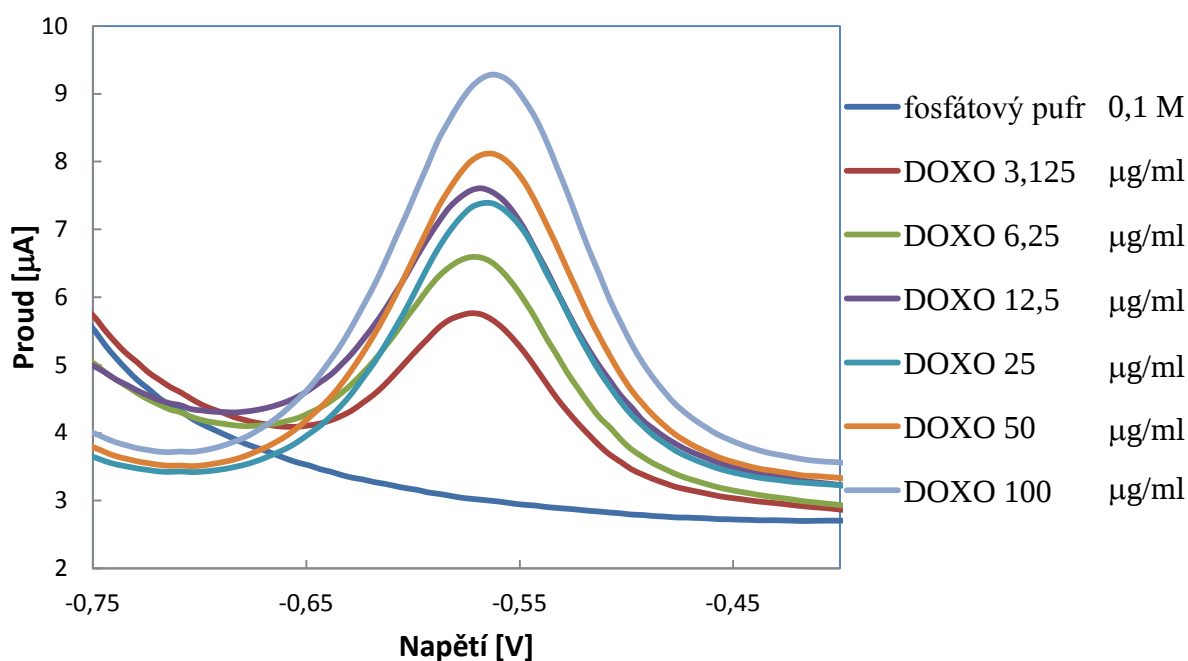


Obr. 38: Výřez frekvenčních charakteristik nanostrukturované elektrody s ODN a doxorubicinem

4. Voltametrická měření

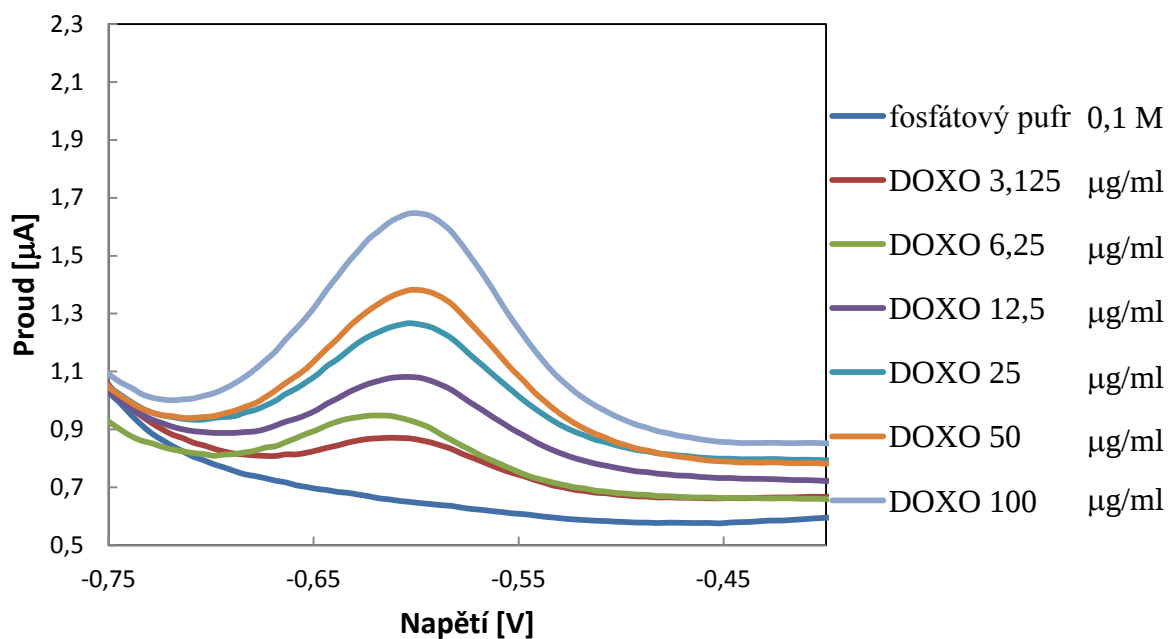
Voltametrická detekce doxorubicinu

Postupně byly proměřeny metody square-wave voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie. Před měřením byly elektrody elektrochemicky očištěny pomocí cyklické voltametrie. Všechna měření probíhala za pokojové teploty. Na oba typy elektrod jsme nechali akumulovat 10 μl roztoku doxorubicinu o různých koncentracích. Kumulace probíhala po dobu 10 minut. Použité oligonukleotidy modifikované thiolovou skupinou, která je důležitá pro vytvoření stabilní vrstvy na povrchu zlaté elektrody a zlatých nanotyčinek, jsme nechali akumulovat 20 hodin na površích elektrod. Rozsah použitého potenciálu byl $-0,75 - (-0,4)$ V. Na (Obr. 39, 40) jsou zobrazeny průběhy popisující navázání doxorubicinu na holé zlaté elektrody pomocí square-wave voltametrie (SWV) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV).



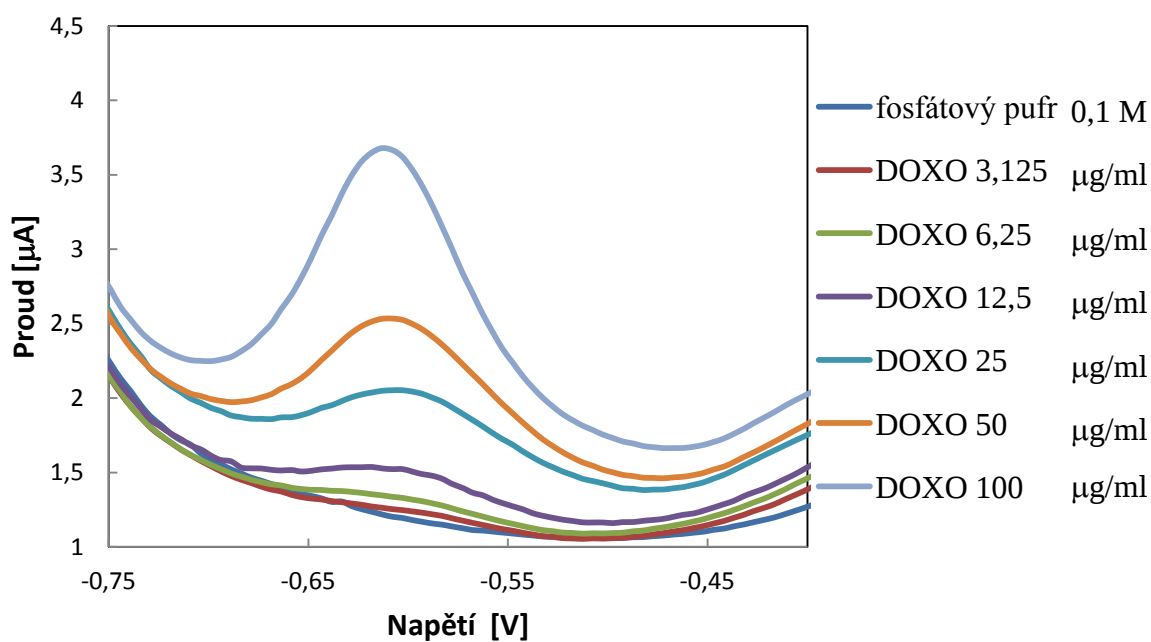
Obr. 39: SWV na holé zlaté elektrodě s doxorubicinem

U obou metod pozorujeme v závislosti na koncentraci postupně se zvyšující pík doxorubicinu kolem potenciálu $-0,6$ V.

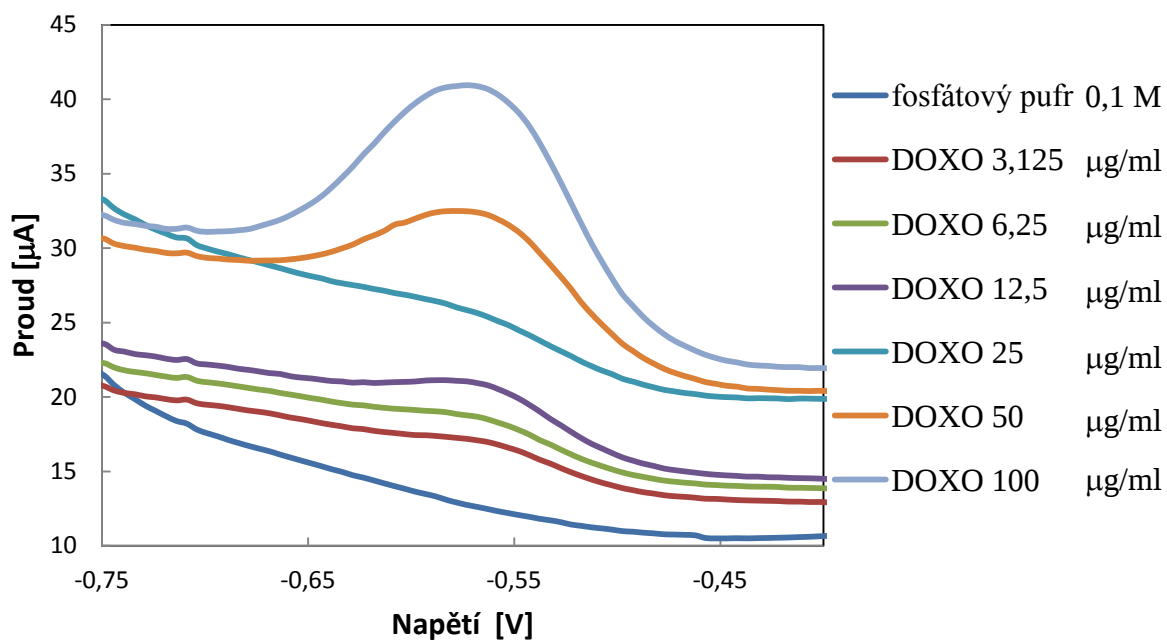


Obr. 40: DPV na holé zlaté elektrodě s doxorubicinem

Elektrody s nanesenými zlatými nanočásticemi poskytují v závislosti na koncentraci doxorubicinu ve srovnání se zlatými elektrodami vyšší píky, což je způsobeno jejich větší elektroaktivní plochou. Na (Obr. 41, 42) jsou zobrazeny průběhy získané pomocí square-wave voltametrie (SWV) a diferenčně pulzní voltametrie (DPV).

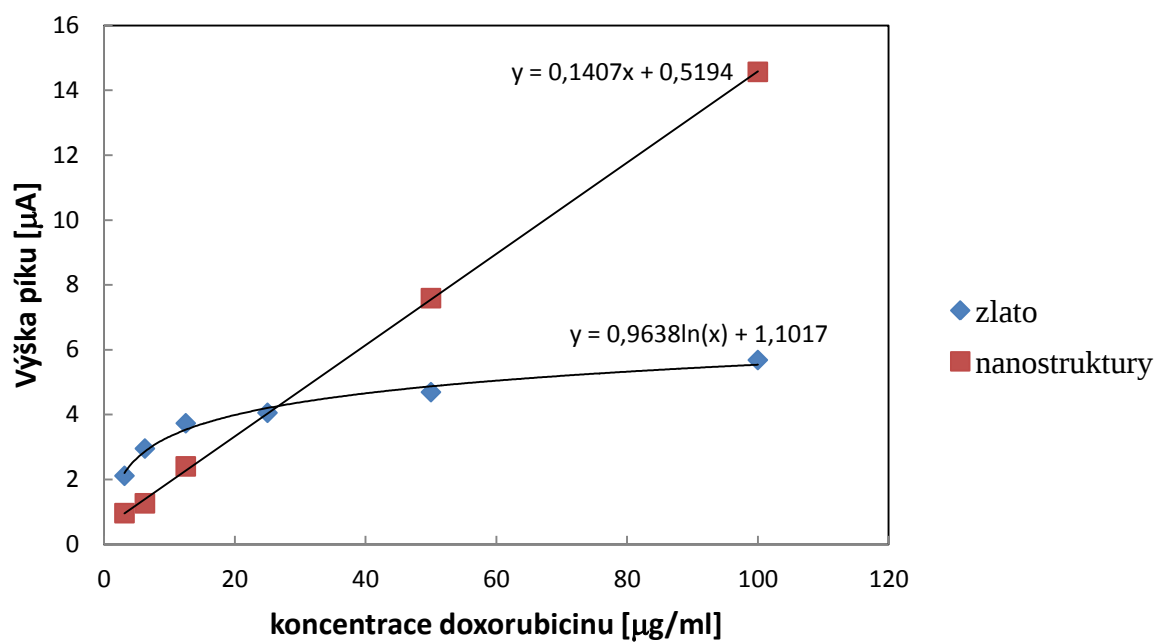


Obr. 41: SWV na nanostrukturované elektrodě s doxorubicinem

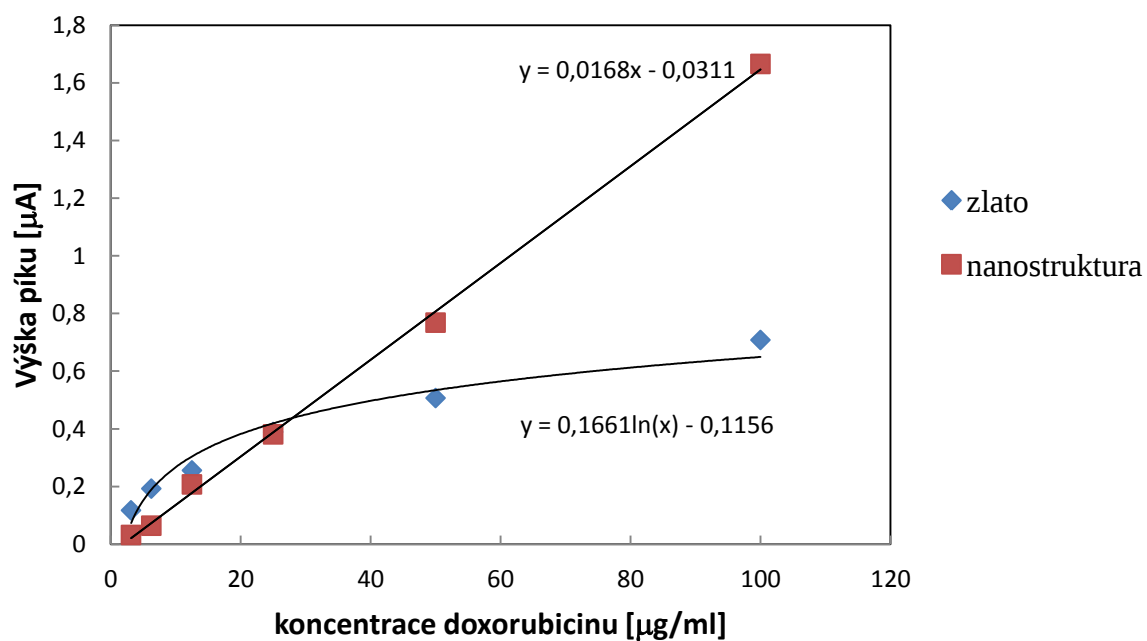


Obr. 42: DPV na nanostrukturované elektrodě s doxorubicinem

V následujících grafech (Obr. 43, 44) je zobrazena závislost koncentrace doxorubicinu na výšce píku u obou typů elektrod. Oba grafy jsme sestrojili pomocí hodnot získaných z předchozích měření, které jsou zobrazeny na (Obr. 39, 40, 41, 42). Z grafů je patrné, že holé zlaté elektrody jsou při vyšších koncentracích doxorubicinem již nasyceny, a proto se píky se zvyšující se koncentrací doxorubicinu dále nezvyšují. U elektrod s nanosenými zlatými nanočásticemi je závislost lineární, což nám udává, že píky stále rostou i při vyšších koncentracích doxorubicinu. Tento jev je způsoben tím, že nanostrukturované elektrody mají díky svému modifikovanému povrchu zlatými nanotyčinkami větší elektroaktivní plochu.



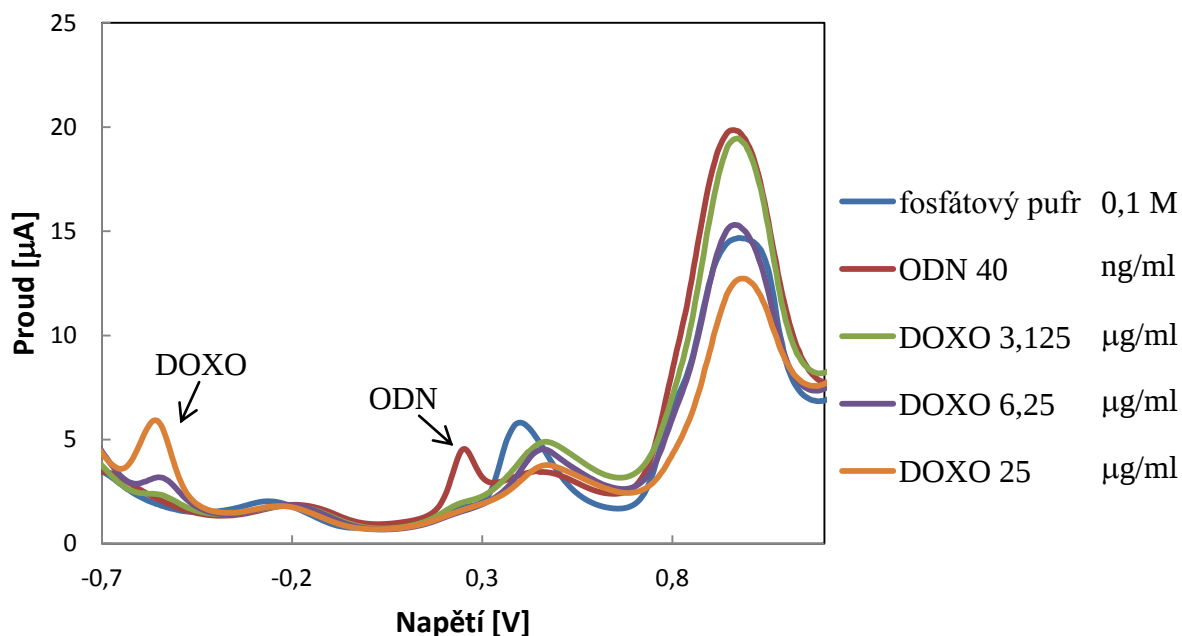
Obr. 43: Závislost koncentrace doxorubicinu na výšce píků SWV



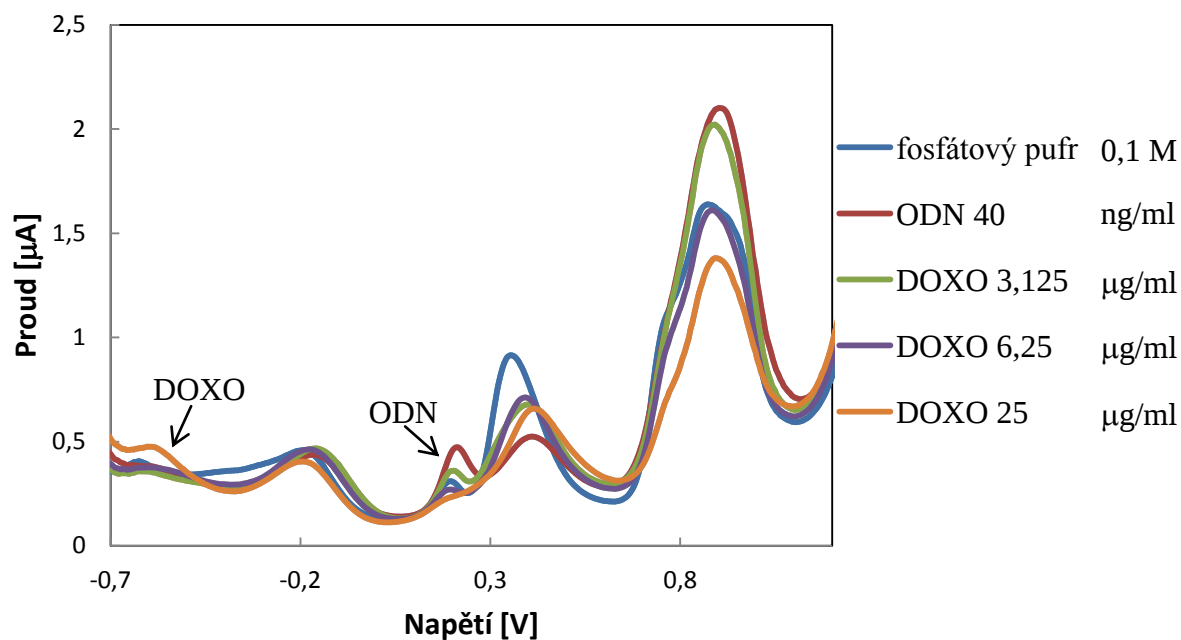
Obr. 44: Závislost koncentrace doxorubicinu na výšce píků DPV

Voltametrická měření interakce ODN a doxorubicinu

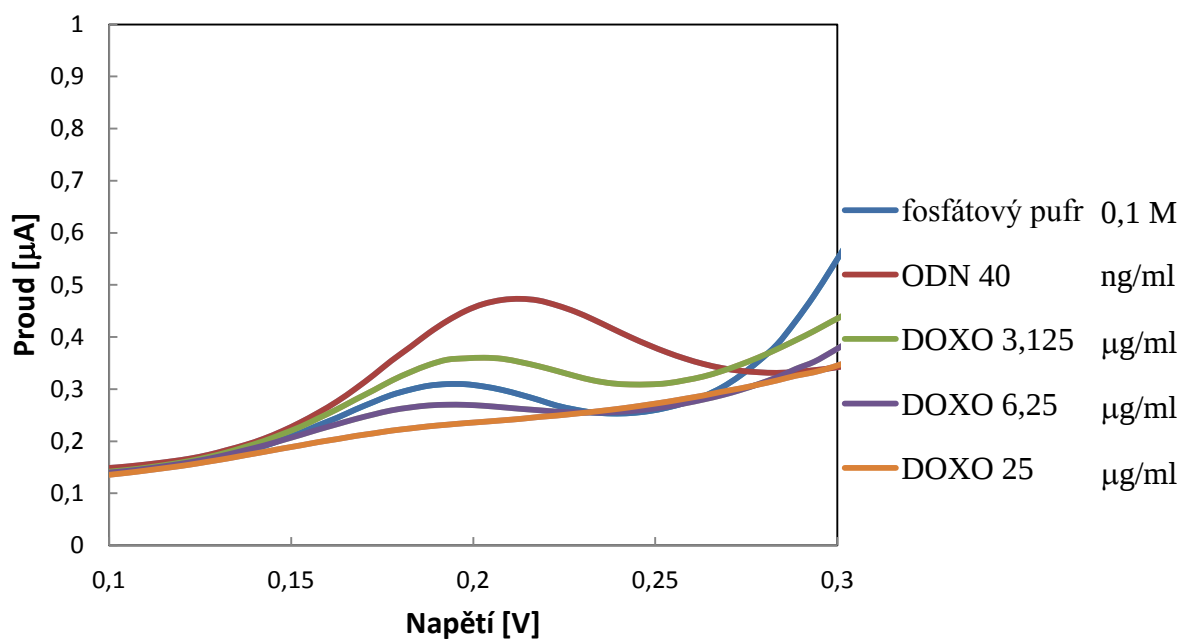
Charakteristickou vlastností při měření ve fosfátovém pufru s holými zlatými elektrodami je pík kolem potenciálu +1 V. Tento pík se po akumulaci oligonukleotidy zvýší. Po aplikaci doxorubicinu se jeho výška sníží, což značí navázání oligonukleotidů na povrch elektrody a následnou interakci doxorubicinu s ODN. Velikost snížení píku je závislá na koncentraci doxorubicinu, s vyšší koncentrací dochází k většímu poklesu. Tento jev zobrazují (Obr. 45, 46), které byly pořízeny pomocí SWV a DPV. Rozsah použitého potenciálu byl -0,7 – 1,2 V. Vycházeli jsme z práce, ve které byl stejným způsobem detekován cytochrom c. [24] Dále je na těchto obrázcích vidět pík kolem +0,2 V, který signalizuje detekci ODN (s postupnými přidávkami doxorubicinu klesá v důsledku interakce oligonukleotidů a léčiva) a pík znázorňující přidavek doxorubicinu se projevuje kolem napětí -0,6 V a postupně roste.



Obr. 45: SWV na zlaté elektrodě s ODN a doxorubicinem



Obr. 46: DPV na zlaté elektrodě s ODN a doxorubicinem



Obr. 47: Zvětšený pík ODN

Obr. 47 znázorňuje postupně klesající ODN pík v závislosti na rostoucí koncentraci doxorubicinu. Na nanostrukturovaných elektrodách jsme nedokázali žádné výsledky naměřit, protože docházelo k jejich poškození způsobené širokým rozsahem potenciálu, který byl nezbytný pro detekci doxorubicinu a ODN.

VI. Závěr

Před zahájením impedančních měření s oligonukleotidy a doxorubicinem byla provedena charakterizace zlatých elektrod bez nanočástic a elektrod s nanesenými zlatými nanočásticemi pro různě koncentrované roztoky síranu draselného. Z charakteristik impedanční spektroskopie zjišťujeme, že s rostoucí koncentrací roztoku se zmenšovala polokruhovitá část impedance a rostla část lineární. Z naměřených hodnot jsme sestrojili grafy, které znázorňují závislost reálné složky impedance v bodě lokálního maxima na koncentraci. Podobnost jednotlivých průběhů nám udává, jak podobné jsou si vlastnosti zkoumaných elektrod. Podobné elektrody se pak mohou použít tak, abychom mezi nimi mohli porovnávat naměřené výsledky. Z naměřených výsledků vyplývá, že nanostrukturované elektrody vykazují obecně nižší impedanci, což značí jejich větší elektroaktivní plochu a tím citlivější elektrodu. Další měření probíhala ve fosfátovém pufru o koncentraci 100 μM . Na oba typy elektrod jsme nechali 20 hodin akumulovat oligonukleotidy. Z měření bylo vypořováváno, že naakumulované oligonukleotidy zvýší impedanci elektrody, což je v souladu s teorií. Po akumulaci ODN jsme na elektrody postupně nanášeli zvyšující se koncentrace doxorubicinu a pozorovali zmenšování polokruhovité části impedance.

Pomocí voltametrických metod jsme charakterizovali vlastnosti zlatých elektrod a vlastnosti elektrod se zlatými nanočásticemi bez navázaného a s navázaným doxorubicinem. Na voltamogramech změřených pomocí square-wave voltametrie a diferenčně pulzní voltametrie pozorujeme pík kolem -0,6 V, který signalizuje přítomnost doxorubicinu. Na zlatých elektrodách jsme detekovali oligonukleotidy kolem +0,2 V. Fosfátový pufr vykazoval charakteristický pík kolem +1 V. Tento pík se zvýšil po navázání ODN a poté se postupně snižoval s každou aplikovanou dávkou doxorubicinu. Pokles značí navázání doxorubicinu a jeho interakci s ODN. Detekce ODN na elektrodách s nanesenými zlatými nanočásticemi nebyla uskutečněna z důvodu rozpouštění elektrod ve zvoleném potenciálovém okně. V rozsazích -0,7 V – 1,2 V bylo možné detekovat ODN pouze na zlatých elektrodách bez nanostruktur.

VII. Literatura

- [1] KOLEKTIV, Oldřich Nečas a. Obecná biologie pro lékařské fakulty. 3., přeprac. vyd., V nakl. H. H, 2000. ISBN 80-860-2246-3.
- [2] ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie: Díl první. (Informační makromolekuly-Molekulární biologie prokaryot). 3. vyd. Stanislav Rosypal, 1999, 300 s. ISBN 80-902-5620-1.
- [3] ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. Obecná onkologie. 1. vyd. Praha: Galén, 394 s. ISBN 978-807-2627-158.
- [4] KLENER, Pavel a Pavel KLENER. Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, vii, 209 s. ISBN 978-802-4728-087.
- [5] SUNI, Ian I. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. TrAC Trends in Analytical Chemistry: TrAC. 2008, roč. 27, č. 7, s. 604-611.
- [6] PIERCE, David T a Julia Xiaojun ZHAO. Trace analysis with nanomaterials. Weinheim, 2010, xxi, 396 p. ISBN 35-273-2350-3.
- [7] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s. ISBN 80-902-8961-4.
- [8] DOSTÁL, Jiří, Hana PAULOVÁ, Jiří SLANINA a Eva TÁBORSKÁ. Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 158 s. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [9] SETTLE, Frank A. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR, c1997, xxi, 995 p. ISBN 01-317-7338-0.
- [10] PACÁK, Josef. Jak porozumět organické chemii. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2007, 305 s. ISBN 978-80-246-1354-3.
- [11] WANG, Joseph. Analytical electrochemistry. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH, c2006, xvi, 250 p. ISBN 978-047-1678-793.
- [12] VOROZHTSOVA, M.; HRDÝ, R.; HUBÁLEK, J. Vertically Aligned Nanostructures for Electrochemical Sensors. In Conference proceedings NANOCN 2009. Ostrava: 2009. s. 1-6. ISBN: 978-80-87294-12- 3.
- [13] HYNEK, D, KREJCOVA, L a ZITKA, O. Electrochemical Study of Doxorubicin Interaction with Different Sequences of Single Stranded Oligonucleotides, Part I.

International Journal of Electrochemical Science. 2012, roč. 7, č. 1, s. 13-33. ISSN 1452-3981.

[14] HYNEK, D, KREJCOVA, L a ZITKA, O. Electrochemical Study of Doxorubicin Interaction with Different Sequences of Double Stranded Oligonucleotides, Part II. International Journal of Electrochemical Science. 2012, roč. 7, č. 1, s. 34-49. ISSN 1452-3981.

[15] RILEY, Tom, Arthur WATSON a A JAMES. Polarography and other voltammetric methods. New York: Published on behalf of ACOL Thames Polytechnic, London, by Wiley, c1987, xxii, 283 p. Analytical Chemistry by Open Learning (Series). ISBN 04-719-1394-4.

[16] BLAHOVEC, Antonín. Elektrotechnika II. 4., nezměn. vyd. Praha: Informatorium, 2003, 154 s. ISBN 80-733-3013-X.

[17] BARD, Allen J. Electrochemical methods: fundamentals and applications. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2001, 833 s. ISBN 04-710-4372-9.

[18] Biosensors and Bioelectronics. Hong Kong: Elsevier Science B.V., 2003. ISSN 0956-5663.

[19] WILSON, Keith a John M WALKER. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2009, xvi, 744 p. ISBN 05-217-3167-4.

[20] Huska D., Adam V., Babula P., Stibrova M., Eckschlanger T., Trnkova L., Kizek R., Square-Wave Voltammetry as a Tool for Investigation of Doxorubicin Interaction with DNA Isolated from Neuroblastoma Cells, Elektroanalysis 2009, 21, No.3-5, 487-494.

[21] Překresleno dle URL:

<<http://www.ecochemie.nl/Products/Echem/CompactNonModular/uAUTIII.html>>,

[cit.18.5.2013]

[22] YAU, Hellas C.M., Hing Leung CHAN a Mengsu YANG. Electrochemical properties of DNA-intercalating doxorubicin and methylene blue on n-hexadecyl mercaptan-doped 5'-thiol-labeled DNA-modified gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, vol. 18, issue 7. DOI: 10.1016/S0956-5663(02)00161-6.

[23] VACEK, Jan, Luděk HAVRAN a Miroslav FOJTA. ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA POŠKOZENÍ, HYBRIDIZACE A DALŠÍCH INTERAKCÍ DNA. 2011, s. 15-26. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2011_01_15-26.pdf

[24] IRANPOUR, Bahar. Gold Electrode Electrochemistry in Protein Based Solar Cells. Vancouver, 2009. Dostupné z:
https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/42218/ubc_2012_spring_iranpour_bahar.pdf?sequence=1. Disertační práce. University of British Columbia.

[25] ŠTĚPÁNKOVÁ, Jana. Mechanistické studie biologických účinků vybraných cytostatik. Brno, 2011. 81 l., [78] l. příl. Disertační práce. Masarykova univerzita.