

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Monika Příbylová

NOVÉ STRATEGIE V ELEKTROCHEMICKÉ DETEKCI  
POŠKOZENÍ DNA VLIVEM INTERAKCE S UV ZÁŘENÍM

New Strategies in Electrochemical Detection of DNA Damage  
Induced by Interaction with UV Radiation

Bakalářská práce

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

Praha 2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. srpna 2019.

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, ochotu a cenné rady. Dále děkuji za trpělivost a vstřícnost při konzultacích.

## **Abstrakt**

V této bakalářské práci byl zkoumán netradiční redoxní indikátor 5-nitro-1,10-fenantrolin jako možný ukazatel poškození DNA. Měření probíhalo elektrochemicky technikou diferenční pulzní voltametrie v tříelektrodevém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita elektroda z ultračistého grafitu, která byla modifikována nízkomolekulární DNA z lososích spermií. Poškození DNA probíhalo pomocí UVC záření o vlnové délce 254 nm. Byl studován rozdíl výšky voltametrických signálů 5-nitro-1,10-fenantrolinu mezi nepoškozenou a poškozenou DNA. Nově vyvinuté metody se ukázaly jako slibné pro detekci míry poškození DNA v závislosti na čase ozařování a v závislosti na vzdálenosti od zdroje ozařování. Poškození DNA bylo rozsáhlejší u obou studovaných faktorů v závislosti na jejich rostoucích hodnotách.

## **Klíčová slova**

Elektrochemie

DNA biosenzory

Netradiční elektrodové materiály

Poškození DNA

Biologicky aktivní látky

Záření

## Seznam použitých zkratek

A	adenin
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
C	cytosin
CFE	filmová uhlíková elektroda
Cu-phen	komplex iontů mědi s 1,10-fenantrolinem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA/UTGE	elektroda z ultračistého grafitu modifikovaná DNA
DPV	diferenční pulzní voltametrie
G	guanin
NO <sub>2</sub> phen	5-nitro-1,10-fenantrolin
phen	1,10-fenantrolin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SWV	square-wave voltametrie
T	thymin
UTGE	elektroda z ultračistého grafitu
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelné záření

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část .....	9
2.1 Vlastnosti a struktura 5-nitro-1,10-fenantrolinu.....	9
2.2 DNA.....	10
2.3 Možnosti poškození DNA.....	11
2.3.1 Interkalace do DNA.....	13
2.3.2 Interakce phen s DNA.....	14
2.3.3 Interakce UV záření s DNA.....	15
2.4 Elektrochemické DNA biosenzory .....	16
2.5 Pracovní elektroda .....	18
3. Experimentální část.....	20
3.1 Použité chemikálie.....	20
3.2 Přístroje a zařízení .....	20
3.3 Pracovní postupy .....	21
4. Výsledky a diskuze .....	23
4.1 Stálost vzorku 5-nitro-1,10-phenanthrolinu .....	23
4.2 Stanovení optimálního pH.....	23
4.3 Opakovatelnost měření .....	27
4.4 Kalibrační závislost.....	30
4.5 Optimalizace vhodných koncentrací NO <sub>2</sub> phen a DNA .....	32

4.6	Závislost na čase ozařování.....	35
4.7	Závislost na vzdálenosti od zdroje ozařování.....	38
5.	Závěr.....	42
6.	Literatura .....	43

## 1. Úvod

V dnešní době se klade čím dál větší důraz na jednodušší, rychlejší a levnější možnosti zkoumání poškození DNA. Tyto výzkumy jsou velice důležité z hlediska vývoje látek poškozujících (ať již cíleně, nebo nechtěně jako jejich nežádoucí vedlejší účinek) genetický materiál a je nutné zkoumat jejich účinky co nevhodnější metodou, ať už se jedná o cizorodé prospěšné látky jako léčiva, průmyslové chemikálie, pesticidy, nebo jedy. Poškození DNA často končí rakovinou, což je v poslední době téma mnoha výzkumů cílených na boj proti ní.

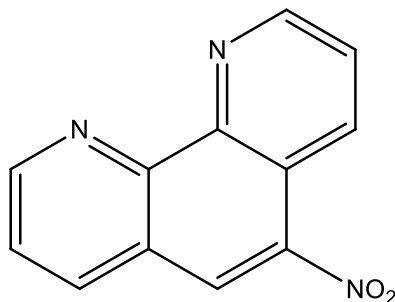
Předložená práce se zabývá možností detekce poškozené DNA, a to pomocí netradičního redoxního indikátoru 5-nitro-1,10-fenantrolinu. K poškození genetického materiálu bylo užito UVC záření vlnové délky 254 nm. K následné detekci byla využita elektrochemická metoda diferenční pulzní voltametrie s pracovní elektrodou z ultračistého grafitu, která nese výhody finančně dostupného a snadno obnovitelného materiálu. Práce si ukládá za cíl přijít s alternativní metodou pro zjištění míry poškození DNA.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Vlastnosti a struktura 5-nitro-1,10-fenantrolinu

5-Nitro-1,10-fenantrolin (NO<sub>2</sub>phen) je heterocyklická látka, jejímž základem je planární organická sloučenina 1,10-fenantrolin (phen), kterou tvoří tři aromatické kruhy, jež obsahují dva atomy dusíku. V páté pozici je díky vyšší elektronové hustotě na phen nitrací navázaná nitroskupina, a tím vzniká substituovaný phen – NO<sub>2</sub>phen. Jeho struktura je znázorněna na obr. 1. NO<sub>2</sub>phen je ve vodě téměř nerozpustný. Lépe se rozpouští v mírně kyselém prostředí a ethanolu, případně methanolu. Jedná se o krystalickou žlutou až žlutooranžovou látku s bodem tání 202°C. Z dřívějších výzkumů vyplývá, že má větší oxidační potenciál než samotný phen. Vzhledem k přítomnosti dvou dusíkových atomů ochotně tvoří komplexy s přechodnými kovy [1–3].



Obrázek 1: Struktura 5-nitro-1,10-fenantrolinu

Absorpční píky NO<sub>2</sub>phen v ultrafialové (UV) oblasti objevující se při 232 a 265 nm jsou přiřazeny pásnu  $\pi$ – $\pi^*$  přechodů aromatického kruhu, které patří do pásma K. Výzkumy ukazují, že píky komplexů NO<sub>2</sub>phen se vlnovou délkou neliší. Maximální fosforescence byla stanovena při 498 nm [4].

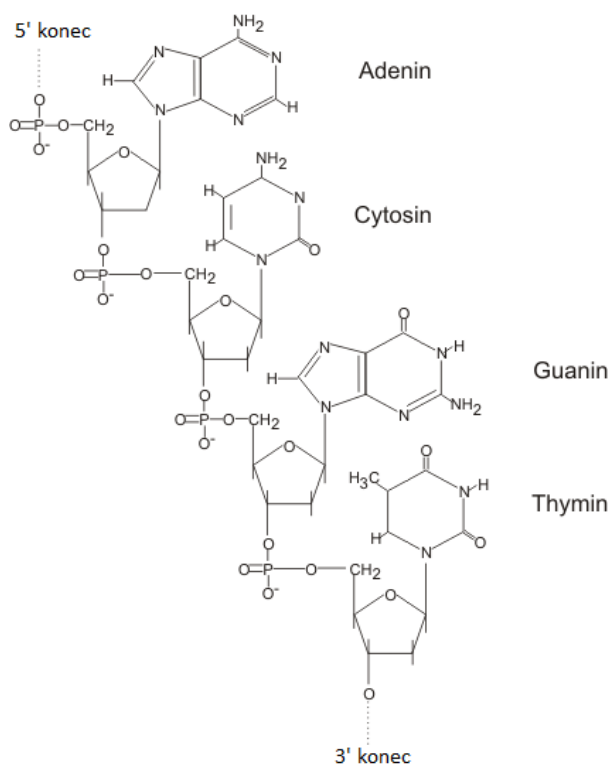
Spektrometrické vlastnosti derivátů a komplexů phen byly charakterizovány a zkoumány mnohokrát. V roce 2010 proběhla studie, která zkoumala možnost použít některé phen deriváty, jako například NO<sub>2</sub>phen, při vývoji biosenzorů a biopalivových článků. Deriváty zde byly zkoumány elektrochemicky s cílem ověřit jejich schopnost působit jako mediátory přenosu elektronů pro enzymy, konkrétně oxidasy. Výzkum ukázal, že NO<sub>2</sub>phen by mohl být vhodný jako základ pro elektrody biosenzorů a je vhodným mediátorem oxidas. NO<sub>2</sub>phen má schopnost generovat efektivní potenciál a dostatečnou proudovou hustotu [5].

NO<sub>2</sub>phen byly prokázány bakteriocidní účinky, a to konkrétně ve výzkumu grampozitivní *Clostridium difficile*, která způsobuje průjemová onemocnění. Proti této bakterii existuje velmi málo antibiotik, a proto je důležité hledat jiné možnosti léčby [6]. Další výzkum se týkal *Mycobacterium tuberculosis*. Na tuto bakterii se časem vytvořila rezistence na léčiva, a je tedy nutné zkoumat jiné účinné látky. Jako hlavní sloučenina byl celkovým screeningem identifikován právě NO<sub>2</sub>phen. Studie dále prokázaly, že NO<sub>2</sub>phen formuje hostitelský mechanismus k zabíjení intracelulárních patogenů [7].

Důležitou schopností NO<sub>2</sub>phen, která byla zkoumána a využívána v této bakalářské práci, je jeho schopnost interkalace a sterické asociace do žlábků DNA [8].

## 2.2 DNA

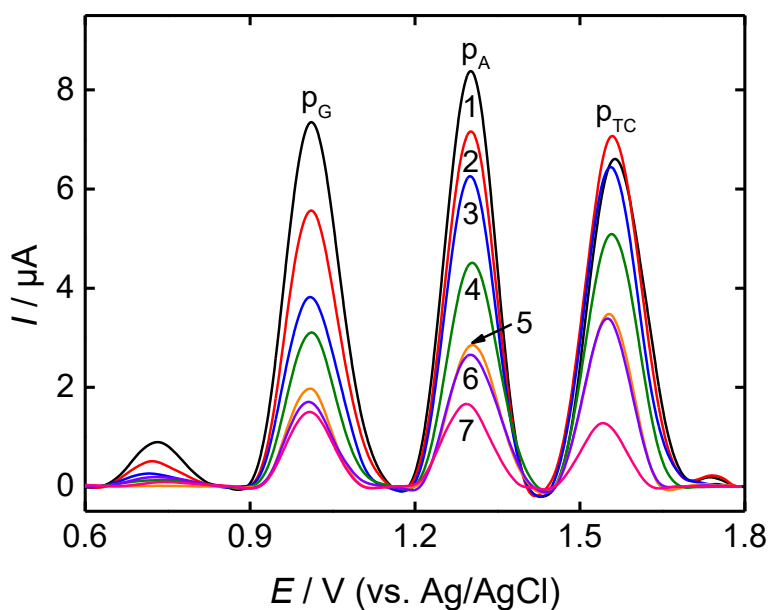
Deoxyribonukleová kyselina, neboli DNA, je makromolekula, která nese genetickou informaci. Je složena z řetězce nukleotidů, které se skládají z deoxyribosy, fosfátové skupiny a jedné ze čtyř bází. Část krátkého úseku DNA je zobrazena na obr. 2. Je zřejmé, že báze je k deoxyribóze připojena *N*-glykosidovou vazbou a fosfát dále fosfoesterovou vazbou. DNA tvoří dvoušroubovici a báze se v ní párují prostřednictvím vodíkových můstků. Tři vodíkové můstky jsou mezi guaninem (G) a cytosinem (C) a dva mezi adeninem (A) a thyminem (T) [9–11].



Obrázek 2: Část úseku DNA; převzato z [12]

Primární struktura DNA udává sekvenci nukleotidů, sekundární strukturu definují formy této struktury. Jedná se o formy A-DNA, B-DNA a Z-DNA. B-DNA je pravotočivá dvoušroubovice, je nejčastější a vyskytuje se v organismech za fyziologických podmínek. Obsahuje malý a velký žlábek. A forma je taktéž pravotočivá, ale má plošší tvar. Z forma je levotočivá [9–11].

Pomocí voltametrických metod, např. diferenční pulzní voltametrie (DPV) nebo square-wave voltametrie (SWV), je možné detekovat píky bází DNA. Voltamogramy zachycující oxidaci DNA běžně vykazují dva píky – G a A, Píky T a C se na voltamgramech spojují v jeden, jak je patrné na obr. 3. V minulosti bylo zkoumáno chování dvouvláknové i jednovláknové DNA. Bylo zjištěno, že přenos elektronů zevnitř dvouvláknové DNA je náročnější, a píky jsou tak menší oproti jednovláknové DNA, u které je dosažena vyšší proudová odezva díky většímu kontaktu bází s povrchem elektrody [13,14].



Obrázek 3: Voltamogram bází DNA. Použita metod SWV na GCE. Zobrazen pík guanosinu ( $p_G$ ), adenosinu ( $p_A$ ) a společný pík tymidinu a cytidinu ( $p_{TC}$ ); převzato z [14]

### 2.3 Možnosti poškození DNA

Poškození DNA je stav, kdy dochází ke změně struktury DNA. V dnešní době se klade důraz na možnosti zjištění těchto změn ve struktuře, protože mají vliv na lidské organismy a jejich zdravotní stav. Poškození může být kovalentní nebo nekovalentní povahy [15].

Do kovalentních modifikací (způsobených např. UV zářením nebo oxidačním stresem)

můžeme zahrnout jedno- nebo dvouřetězcové zlomy ve fosfodiesterové vazbě, dále poškození *N*-glykosidové vazby a chemickou modifikaci zbytků bází [15].

Nekovalentní modifikace se týkají především malého a velkého žlábků a prostoru mezi jednotlivými páry bází. Můžeme k nim zařadit sterické interakce molekul v těchto místech (asociace do žlábků DNA a inzerce), interkalaci, neboli vmezeření molekul, a elektrostatické interakce molekul, které mají kladně nabitě části, a tudíž interagují se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA [16].

V souvislosti s poškozením DNA a nutností zkoumání látek interagujících s DNA (a případnou detekcí míry poškození) je třeba zmínit nemoc, kterou je rakovina. Mnoho sloučenin může interagovat s DNA nebo se na ni vázat. Dochází poté ke změnám sekvence bází, nebo látky mění strukturu DNA, následují poruchy replikace a problém vrcholí vznikem rakovinového onemocnění [13,17]. Zvýšená možnost vzniku rakoviny je především ve stáří. Stárnutí samotné je taktéž spojeno se zvýšeným výskytem poškozeného nebo mutovaného genu. Pokud mluvíme o mutaci DNA, je třeba zmínit, že za takovou situaci považujeme stav, kdy poškozená DNA unikla opravným mechanismům. Tyto mechanismy dokážou za normálních podmínek poškozenou DNA opravit. Jedná se o korekci během replikace, ihned po replikaci nebo v průběhu buněčného cyklu. Příkladem je korekce párování bází ihned po ukončení replikace nebo rekombinační opravy mimo období replikace [18].

Problémem stárnutí, a s tím spojeným větším výskytem mutovaného genu, se zabýval výzkum zaměřený na reaktivní formy kyslíku (ROS). ROS jsou produkovány endogenně, ale i z exogenních zdrojů, jako je ionizující záření, poté útočí na DNA a mohou způsobit léze, oxidované báze nebo zlomky vláken DNA. Pokud tyto léze nejsou správně odstraněny, mohou způsobovat mutace [19,17]. Další výzkumy zabývající se studiem poškození DNA a následným vznikem rakoviny (a také např. snížené plodnosti) narážejí na nebezpečí rozmáhajících se nanotechnologií. Jejich genotoxicita byla dlouhou dobu přehlížena, později byla ale dokázána jejich schopnost poškodit DNA a pravděpodobná je i ekogenotoxicita nanomateriálů [20].

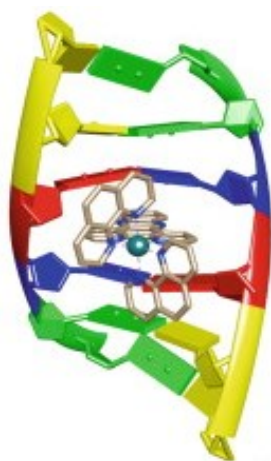
Narůstající nutnost zkoumání interakcí látek, popř. léků s DNA je tedy zřejmá. Potřeba robustních, levných a snadno přizpůsobitelných analytických nástrojů pro detekci poškození DNA byla hnací silou vývoje technologie DNA biosenzorů (kap. 2.4) [13].

### 2.3.1 Interkalace do DNA

Interkalace je popsána jako vmezeření mezi páry bází DNA. Jedná se o nekovalentní interakci, při které je sloučenina začleněna doprostřed dvouvláknové struktury DNA. Sloučeninou, které se interkalace týká, bývá zpravidla planární molekula nebo její část s kondenzovanými aromatickými kruhy. Dalším předpokladem bývá kladný náboj způsobený buď dusíkatým heterocyklem, nebo kladně nabitým postranním řetězcem. Existují dva hlavní způsoby interkalace. Za klasickou interkalaci považujeme úplné vmezeření planární molekuly. Dalším typem je vložení (inzerce) do žlábků DNA pro ne zcela planární molekuly [21].

Byly zkoumány interkalátory, u kterých byla prokázána protinádorová aktivita, a tedy využitelnost při léčbě rakoviny. Právě interkalace může způsobit zastavení biologických funkcí DNA [22,23].

Výzkumy dále popisují, že tvorba komplexů interkalativních ligandů s přechodnými kovy není nutná k interkalaci do DNA. Avšak většina výzkumů je založena právě na těchto komplexech přechodných kovů. Phen, jak vidíme na obr. 4, je dokáže tvořit taktéž. Příkladem je studie s komplexem tvořeným ionty mědi a phen (Cu-phen), která ukazuje, že se komplex asociuje s DNA na konkrétním interkalačním místě specifickém pro lézi [24]. Kovové komplexy s phen umožňují vědcům najít specifická místa v DNA a následně přizpůsobit tvar, symetrii a funkčnost nově navrženého kovového komplexu cílovému místu v DNA. Metalinterkalátory můžeme rozdělit podle způsobu interkalace na ty, jejichž mechanismem interakce je vmezeření, a na ty, jejichž mechanismem je vložení (inzerce). Kovové komplexy phen patří mezi interkalátory vmezeřené, kdy se neporuší dva páry bází, mezi které se interkalátor dostane. Druhý typ interkalátorů vypuzuje jeden pár bází a ligand slouží jako náhrada  $\pi$  vazeb [21].

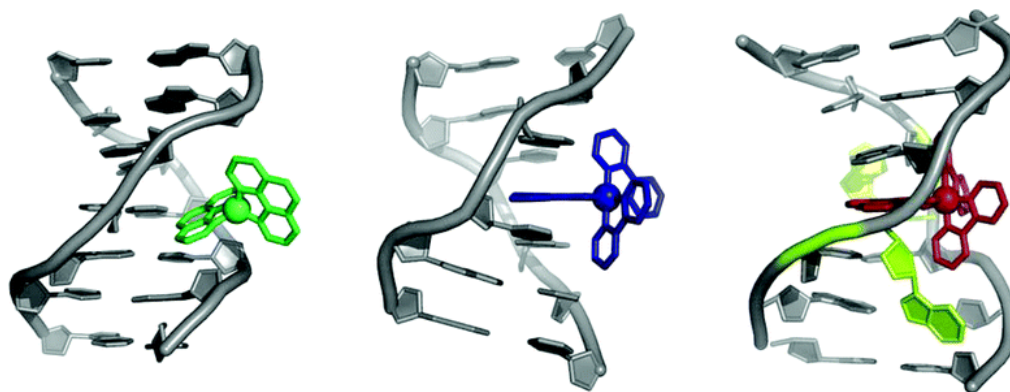


Obrázek 4: Příklad interkalace phen komplexu do DNA; převzato z [23]

### 2.3.2 Interakce phen s DNA

Phen je základem molekuly zkoumané v této práci, proto je zde zmínka o jeho interakci, případně interakci jeho komplexů, s DNA důležitá. Phen má dva dusíkové atomy strukturně situované tak, že předurčují silnou vazbu iontů kovů. Je schopný kovy stabilizovat v nižších oxidačních stavech díky nedostatku elektronů, kvůli kterým je výborný elektronový akceptor. Je planární, rigidní a hydrofobní, což napomáhá interkalaci do DNA. Již zmíněný Cu-phen dokáže štěpit kostru DNA. Phen je v poslední době hojně zkoumán, protože je jako sloučenina víceúčelový – má luminiscenční vlastnosti, využitelné v materiálové chemii, dále se využívá při vývoji účinných receptorů, chemosenzorů, interkalačních činidel atd. Jelikož zájem o deriváty phen stále roste, vyvíjí se stále nové sloučeniny od něj odvozené. Nejvýhodnější strategií se ukázala substituce v polohách 2 a 9. V poloze 5 a 6 probíhají především elektrofilní substituce [8].

Komplexy phen s ionty kovů interagují s DNA, přičemž možnosti těchto interakcí jsou zobrazeny na obr. 5. Způsob interakce také závisí na formě DNA. Phen komplexy interagují s A a B formou DNA. Interkalace do Z-DNA je vzácná a nepravděpodobná kvůli jinému uspořádání velkého a malého žlábků a páru bází. Vložení přímo do malého nebo velkého žlábků je stabilizováno hydrofobními účinky mezi phen a DNA a interakcemi mezi uhlíkem a  $\pi$  vazbou [8,25].



Obrázek 5: Modely interakcí kovových komplexů phen s DNA; zleva: vložení do žlábků DNA, interkalace, inzerce; převzato z [25]

Po těchto interakcích často následuje štěpení řetězců, které zapříčiňuje buď štěpení fosfoesterové vazby, interakci kovu s fosfátovou skupinou, nebo oxidativní štěpení. Přičemž mechanismus, který je upřednostněn, značně závisí na druhu kovu. Například Fe nebo Cu preferují oxidativní poškození, oproti tomu Zn funguje jako hydrolytické činidlo pro štěpení fosfoesterové vazby. Některé prvky dokáží indukovat laserové štěpení DNA [8,25].

Phen je vhodný pro asociaci s DNA sám o sobě, kov pak navíc poskytuje zvláštní vazebné nebo reaktivní vlastnosti. Ovšem phen je studován i ve formě nekovových sloučenin, které jsou schopny interagovat s DNA a poškozovat, případně i stabilizovat strukturu DNA. Příkladem je využití těchto sloučenin pro tvorbu G-kvadruplexů, ve kterých se inhibuje aktivita telomerasy, což je důležité pro apoptózu rakovinných buněk. Tyto látky by mohly mít využití při vývoji protinádorových léčiv [8,26].

### 2.3.3 Interakce UV záření s DNA

S UV zářením se setkáváme každý den. Z výzkumného hlediska se jedná o jeden z nejvýznamnějších a nejsledovanějších typů záření. Je obecně známé, že UV záření poškozují DNA. UV záření můžeme rozdělit na tři typy: UVA, UVB a UVC. Sluneční záření, které dopadá na zemský povrch a kterému jsme vystaveni, je UVA a UVB. Přestože UVB záření produkuje vitamín D a endorfiny, což je pro nás prospěšné, většina jeho účinků je spíše negativní, jako především vyvolávání buněčné smrti, mutageneze, předčasného stárnutí kůže a rakoviny. Fotony těchto druhů záření neabsorbují pouze DNA, ale také chromofory v kožních buňkách. To dále způsobí produkci ROS a ty opět poškozují DNA. Lidské buňky jsou opatřeny mechanismy na obranu vůči těmto účinkům, případně opravu těchto účinků. Patří sem například využívání antioxidantů [27]. Nejdůležitějším opravným

mechanismem je fotoreaktivace pomocí enzymu fotolyasy. Další možností je oprava pomocí excize, kterou lze rozdělit na bazickou a nukleotidovou [28].

UV záření produkuje dvě mutagenní a cytotoxické léze DNA: cyklobutanové-pyrimidinové dimery a 6-4 fotoprodukty. Nejdiskutovanějším důsledkem, se kterým se UV záření spojuje, je rakovina kůže, konkrétně tři její typy – karcinom bazálních buněk, spinocelulární karcinom a maligní melanom [28, 29].

UVC záření má cytotoxické účinky a poškozuje DNA. V normálním životě na nás sice nepůsobí, protože je kompletně absorbováno atmosférou, ale používá se v UVC lampách vyráběných k různým účelům. Využívají se např. v ekologii ke kontrole vody.

V experimentální části této bakalářské práce byla DNA uměle poškozována právě tímto zářením. Pomocí UVC záření byly v jiných pracích poškozovány i buňky melanomu ve studii účinků různého množství melaninu na ozářené thyminové léze. Bylo zjištěno oxidativní poškození DNA závislé na ozařování i množství melaninu [30]. Další výzkum se týkal bakterií, u kterých byly pozorovány opravné mechanismy po poškození. Byla zaznamenána kaskáda signálů, které transportují informaci do jádra buňky a aktivují transkripční faktory [31].

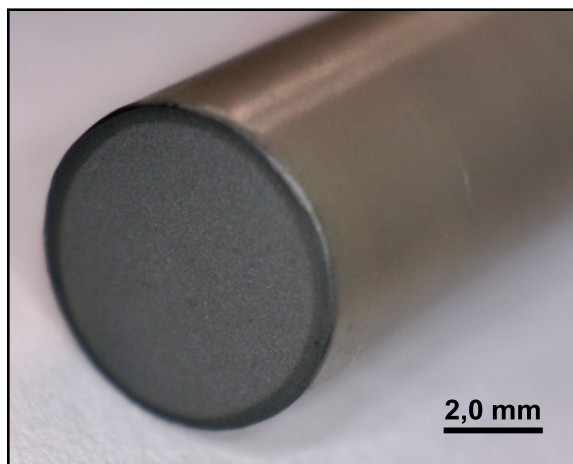
## **2.4 Elektrochemické DNA biosenzory**

Biosenzory jsou velmi citlivé aparáty s fyzikálně-chemickým detektorem, jež začleňují také složku biologického materiálu, který představují např. tkáně, mikroorganismy, buňky, enzymy, protilátky nebo nukleové kyseliny. Tyto látky plní úkol interakce, vazby nebo rozpoznání analytu. Stejně jako biologický materiál i detekce může být různé povahy, např. elektrochemická, optická nebo elektrochemiluminiscenční. Takovému zařízení (detektoru) se říká převodník.

Elektrochemický DNA biosenzor tvoří pracovní elektroda, na které je navázána vrstva DNA. Takovýto biosenzor dále pomocí elektrochemických dějů sleduje interakci dané molekuly (analytu) s DNA a je patrné, že se jedná o rychlou a poměrně levnou variantu vyšetřování. Pracovní elektroda představuje převodník elektrického signálu. Oxidace bází DNA je následně elektrochemicky detekována. Vysokou citlivost mají elektrody na bázi uhlíku, kterých existuje velké množství druhů. V současné době se mnoho výzkumů zabývá vývojem nových biosenzorů a řada z nich je právě na bázi grafitu. Populární jsou elektrody modifikované nanočásticemi, ale v poslední době se vědci přiklání k použití elektrod z mnohem



méně finančně náročných materiálů – příkladem může být filmová uhlíková elektroda (CFE). CFE je tvořena klasickou pevnou elektrodou (většinou kovovou), která je pokryta vodivým uhlíkovým filmem z přírodního grafitu a polystyrenu. Povrch CFE je snadno obnovitelný setřením starého a opětovným nanesením nového filmu [16].



Obrázek 6: Detail CFE; převzato z [16]

Elektricky zahřívané uhlíkové elektrody mohou zkoumat teplotní účinky na poškození DNA, případně mohou být použity při vyšetřování ochrany proti působení ROS [15].

Navázání DNA na povrch elektrody může probíhat různými způsoby, přičemž nejjednodušším je samovolná adsorpce. Jinou možností používanou v mnoha výzkumech je vložení kladného potenciálu na pracovní elektrodu (tzv. potenciostatická akumulace), mnohdy tomuto procesu předchází aktivace elektrody. Povrch elektrod je tak nabit kladně, tudíž s ním záporně nabitá kostra DNA snadno interaguje [16].

Detekčními technikami využívanými v přístupech užívajících elektrochemické biosenzory jsou především voltametrie, chronopotenciometrie a elektrochemická impedanční spektroskopie. Techniky mohou nebo nemusí využívat určitých aktivních značek, jako jsou např. enzymy, nebo indikátorů, jako jsou např. interkalátory. Případnou kombinací více detekčních technik můžeme získat komplexnější informace [16].

Jiné typy elektrochemických DNA biosenzorů jsou určeny např. ke sledování poškození pomocí hybridizace s redoxně značenou DNA nebo hodnotí účinnost přenosu náboje mezi redoxním indikátorem a biosenzorem [15].

Elektrochemické DNA biosenzory jsou poměrně citlivé, ale určitými kroky můžeme jejich citlivost ještě zvýšit. Příkladem je použití redoxních indikátorů, případně značení

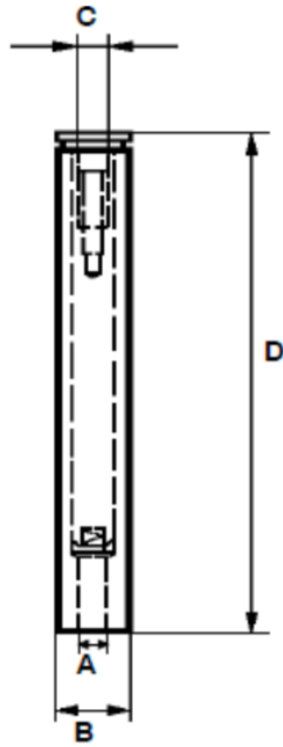
DNA. Další možností zvýšení jejich citlivosti je použití nanomateriálů s elektrokatalytickými účinky nebo enzymů pro opravu poškozené DNA [15].

## 2.5 Pracovní elektroda

Pro měření byla v této bakalářské práci použita pracovní elektroda z ultračistého grafitu (UTGE; kat. č. 6.1204.100, Metrohm, Švýcarsko). Elektroda je zobrazena na obr. 7. Obr. 8 ukazuje schéma poskytované výrobcem. Elektroda má tvar dutého válce (vyroben z PVC) s vnitřním průměrem 2 mm, který je naplněný kompozitem tvořeným ultračistým grafitem a epoxidovou pryskyřicí. UTGE lze oleštit o aluminu a to je značná výhoda, protože elektroda má obměnitelný, ale stále stabilní jednotný povrch [32, 33]. Stejně jako jiné uhlíkové materiály lze i tuto elektrodu modifikovat vrstvou DNA, jak bylo dříve popsáno v diplomové práci [34].



Obrázek 7: UTGE; převzato z [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)



Obrázek 8: Schéma UTGE, A – vnitřní průměr 2 mm, B – vnější průměr 7 mm, C – elektrický kontakt o velikosti M3 (3 mm), D – celková délka elektrody 52,5 mm; převzato z [www.metrohm.com](http://www.metrohm.com)

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Použité chemikálie

Nejdříve byl připraven dvousložkový Brittonův-Robinsonův pufr (BR pufr) pro proměření pH závislosti a optimalizaci metody detekce analytu. Kyselá složka pufru o koncentraci  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  byla připravena smícháním 2,71 ml 85% kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice), 2,31 ml 99% kyseliny octové (p.a., Penta, Praha), rozpuštěním 2,47 g pevné kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno) a nakonec doplněním na celkový objem 1000 ml deionizovanou vodou, kterou poskytuje systém Millipore Q-Plus systém (Millipore, USA) a je dále použita pro případné další přípravy vodných roztoků. Bazická složka pufru o koncentraci  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  byla připravena rozpuštěním 8,0 g pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a doplněním na celkový objem 1000 ml.

Dále bylo připraveno 200 ml  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chlorovodíkové, zředěním stejné kyseliny o koncentraci  $1 \text{ mol l}^{-1}$ , pro rozpuštění analytu.

Byl připraven zásobní roztok analytu – 5-nitro-1,10-fenantrolinu ( $\text{NO}_2\text{phen}$ ;  $\geq 97\%$ , Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ . Pro přípravu bylo rozpuštěno 0,0225 g ve 100 ml  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  kyseliny chlorovodíkové. Pro rozpuštění bylo nutné vzorek ponechat 5 min v ultrazvukové lázni.

Po zjištění optimálního pH bylo nutné připravit  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátový pufr o pH 6,0. Bylo připraveno 1000 ml pufru rozpouštěním 4,906 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) a 11,911 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema, ČR) v deionizované vodě.

Nakonec byl připraven zásobní roztok nízkomolekulární dvouvláknové DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich, Praha) o koncentraci  $10 \text{ mg ml}^{-1}$  navážením 0,1000 g a rozpuštěním v 10 ml připraveného fosfátového pufru. Roztok DNA byl skladován v mrazničce a před prací byl nechán volně roztát při laboratorní teplotě.

#### 3.2 Přístroje a zařízení

Stálost vzorku  $\text{NO}_2\text{phen}$  byla sledována na spektrofotometru Agilent 8453 v programu UV-Visible ChemStation 9.01 (obojí Agilent, USA). Vzorek byl při měření umístěn v křemenné kyvetě o šířce 1,0 cm.

Diferenční pulzní voltametrie byla měřená na analyzátoru Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, Praha) a řízeném programem Polar 5.1 (Polaro-Sensors, Praha). Tříelektrodové uspořádání bylo tvořeno pracovní elektrodou UTGE (průměr disku 2 mm, Metrohm, Švýcarsko) bez modifikace nebo modifikovanou vrstvou DNA (DNA/UTGE), referenční argentochloridovou elektrodou (3 mol l<sup>-1</sup> KCl, Monokrystaly, Turnov) a pomocnou platinovou elektrodou (Monokrystaly, Turnov).

pH používaných pufrů bylo upravováno pomocí pH-metru Jenway 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK). pH metr byl kalibrován standardními pufrů o pH 4,0; 7,0 a 9,0.

UVC záření o vlnové délce 254 nm pro poškození DNA bylo produkováno UV lampou (model IV, výkon 15 W) od společnosti P-LAB, Praha.

### 3.3 Pracovní postupy

Průběžně během vypracování bakalářské práce byla prověřována stálost zásobního roztoku NO<sub>2</sub>phen proměřováním jeho UV/VIS spekter v rozmezí vlnových délek 190–1000 nm a vhodným zředěním vzorku na koncentraci 3·10<sup>-5</sup> mol l<sup>-1</sup>. Sledovaná vlnová délka absorpčního maxima NO<sub>2</sub>phen byla 276 nm.

Elektrochemická analýza probíhala v tříelektrodovém zapojení s pracovní elektrodou z ultračistého grafitu (UTGE či DNA/UTGE), referenční argentochloridovou elektrodou (3 mol l<sup>-1</sup> KCl) a pomocnou platinovou elektrodou. UTGE byla mezi každou sérií měření, případně před každým navázáním DNA leštěna aluminou (velikost částic 0,5 μm). V uzavřené voltametrické cele bylo vždy 10 ml roztoku a bylo připojeno míchátko a přívod dusíku (uložený v tlakové láhvi), kterým byl z roztoků odstraňován interferující vzdušný kyslík (probublávání před každou analýzou trvalo 3 min). Parametry při analýzách DPV byly nastaveny takto: výška pulzu -50 mV, šířka pulzu 100 ms, vzorkovací čas 20 ms, potenciálový krok 3 mV, polarizační rychlost 20 mV s<sup>-1</sup> a celková délka pulzu 150 ms. Počáteční a konečný potenciál byl nastavován různě podle vzniklé potřeby.

Při hledání optimálních podmínek detekce NO<sub>2</sub>phen ( $c = 1 \cdot 10^{-4}$  mol l<sup>-1</sup>) byla proměřena celá škála pH (vzorek analytu byl připraven smícháním 1,0 ml zásobního roztoku o koncentraci 1·10<sup>-3</sup> mol l<sup>-1</sup> a 9,0 ml BR pufru), nejdříve bylo změřeno pH kyselá složky BR pufru (pH = 1,88), následně od pH = 2,0 až po pH = 13,0; zásaditá složka BR pufru měla pH = 13,30. Po zjištění optimálního pH již každé další měření probíhalo ve fosfátovém pufru,

který byl použit vzhledem k jeho rozšířenému použití při elektrochemických analýzách DNA (fosforečnanové skupiny přítomné v pufru pufru vhodně interagují s fosforečnanovými skupinami v DNA). Dále byla proměřována opakovatelnost stanovení NO<sub>2</sub>phen a jeho kalibrační závislost v hodnotách koncentrací od 0,1 μmol l<sup>-1</sup> do 100 μmol l<sup>-1</sup>.

Další provedené optimalizační kroky (týkající se především optimalizace přípravy DNA/UTGE) jsou pro zjednodušení uváděny přímo v kap. 4.

Výsledná měření s UTGE či DNA/UTGE probíhala ve dvou módech (mód I a mód II).

- Mód I zahrnoval analýzy s roztokem NO<sub>2</sub>phen přímo ve voltametrické cele. Roztok o příslušné koncentraci analytu byl vždy doplněn fosfátovým pufrem do 10 ml. UTGE (či DNA/UTGE) byla tedy vnořena přímo do roztoku NO<sub>2</sub>phen s pufrem a probíhala série DPV měření.
- Mód II zahrnoval počáteční inkubaci pracovní elektrody v 10 ml roztoku NO<sub>2</sub>phen s fosfátovým pufrem, což spočívalo v ponechání UTGE (či DNA/UTGE) 5 min ve stále míchaném roztoku bez vloženého potenciálu (docházelo k akumulaci NO<sub>2</sub>phen na povrch pracovní elektrody). Po těchto 5 min byla UTGE (či DNA/UTGE) vyjmuta, opláchnuta deionizovanou vodou a vložena do měřicí cely s 10 ml pouze fosfátového pufru. Následně proběhlo jedno DPV měření.

Módy I a II se dále kombinovaly s navázáním DNA (výše zmíněná DNA/UTGE) a jejího poškozování UVC zářením (postup uveden v kap. 4.5). Konečná měření detekovala míru poškození DNA v závislosti na vzdálenosti od zdroje záření a v závislosti na čase ozařování v obou módech.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Stálost vzorku 5-nitro-1,10-phenantrholinu

V průběhu elektrochemického měření byla celkem šestkrát prověřována stálost zásobního roztoku NO<sub>2</sub>phen pomocí UV/VIS spektrometrie. Zásobní roztok se prokázal jako stálý po dobu minimálně 5 měsíců, jak je patrné z vyhodnocené relativní směrodatné odchylky měření. Vlnová délka v maximu stanovovaného píku činila 276 nm a absorbance se pohybovala kolem průměrné hodnoty 0,7999. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Naměřené průměrné hodnoty (vždy měřeno třikrát) absorbance vzorku NO<sub>2</sub>phen ( $c = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ) a určená relativní směrodatná odchylka měření

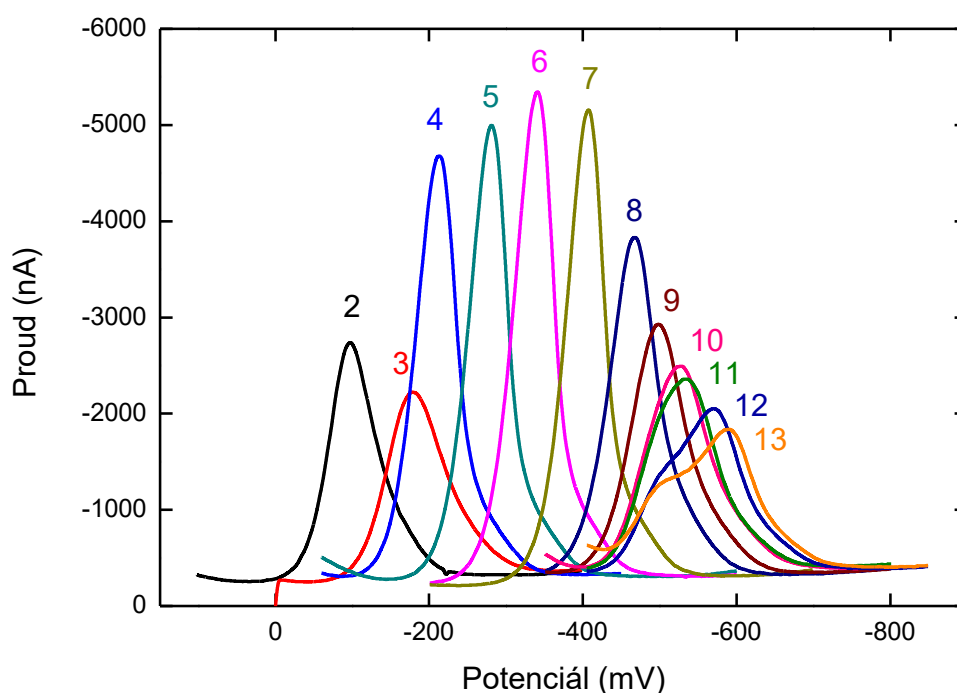
Měření	Absorbance při 276 nm
1 (ihned po přípravě)	0,7896
2 (1. den po přípravě)	0,7905
3 (1. týden po přípravě)	0,8103
4 (1. měsíc po přípravě)	0,8094
5 (3. měsíc po přípravě)	0,7895
6 (5. měsíc po přípravě)	0,8010
Relativní směrodatná odchylka	1,37 %

### 4.2 Stanovení optimálního pH

Nejdříve bylo zjištěno pH kyselé složky BR pufru jako pH = 1,88. Dále pak byla ke kyselé složce postupně přidávána zásaditá, a tím upravováno pH a jeho výsledná hodnota měřena pomocí pH-metru. Po připravení prostředí BR pufru o pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0 a 13,0 bylo připraveno 10 ml roztoku NO<sub>2</sub>phen o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v BR pufru o požadovaném pH (v následujícím textu jsou hodnoty pH pro přehlednost udávány zaokrouhlené na jednotky, přestože vždy reprezentují přesnou hodnotu s nulou na místě desetin). Pomocí DPV na UTGE byla postupně proměřena všechna prostředí a zaznamenané voltametrické píky vyhodnoceny. Příklady píků (NO<sub>2</sub>phen poskytuje v závislosti na pH až čtyři znatelných píků) jsou zobrazeny na obr. 9 (vždy zobrazen jen

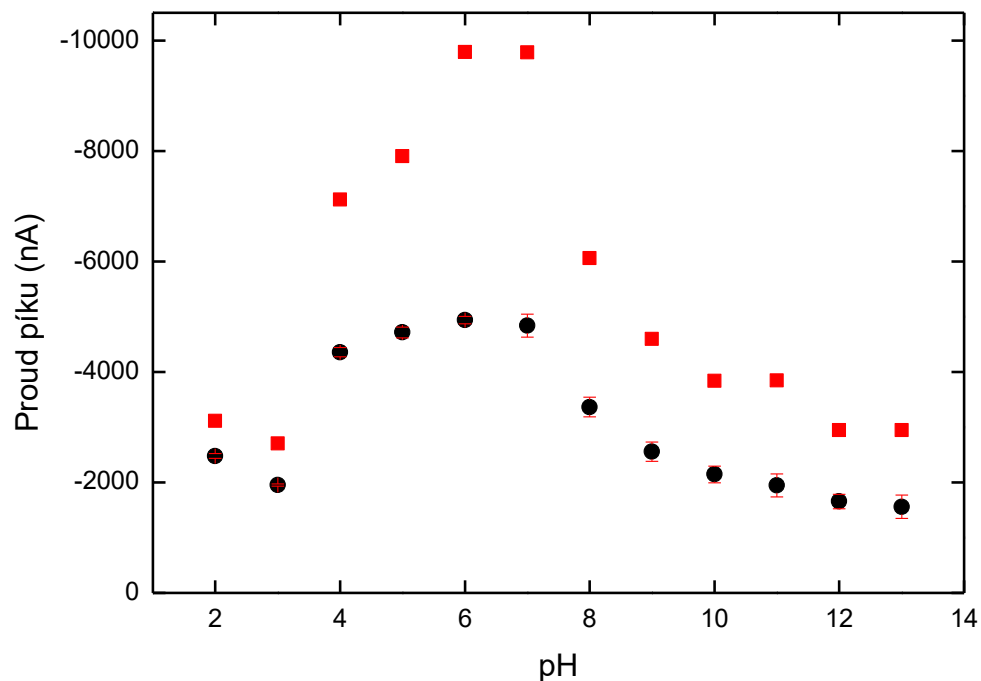
hlavní pík, kterému byla v rámci bakalářské práce věnována pozornost a který odpovídá čtyřelektronové elektrochemické redukci nitroskupiny přítomné v NO<sub>2</sub>phen).

Z obr. 9 (voltamogramy při pH 2 – pH 13) a 10 (zobrazující závislost proudu píku na pH) je patrné optimum při pH 6, případně pH 7, kde má pík nejvyšší výšku. Současně vidíme rozdělení elektrochemického chování NO<sub>2</sub>phen v závislosti na pH prostředí do tří oblastí. První oblastí je pH 2–3, při kterých dochází k mírnému poklesu výšky píku. Následuje oblast o pH 4–7, ve které se výška píků pohybuje v maximální oblasti, a tudíž kolem optima. Třetí oblast se týká pH 8–13, při pH 8 dochází k rapidnímu poklesu výšky píku. Obr. 9 se skládá z výřezu jednoho charakteristického píku používaného pro vyhodnocení v celé bakalářské práci. Pík byl vybrán z důvodu nejvyšší výšky píku při všech měřeních a také díky jeho přítomnosti v každém pH. Rozsah měření potenciálů byl upraven podle potřeby, protože, jak je patrné z obr. 9 a 11, se zvyšujícím se pH se poloha píku z hlediska potenciálů stále posouvá k negativnějším potenciálům. Obr. 12a dále ukazuje, že zkoumaná látka poskytuje při pH 10 celkem čtyři píky odpovídající postupné redukci NO<sub>2</sub>phen. Obr. 12b ukazuje vyhodnocení závislosti potenciálu píku na pH čtyř pozorovatelných popsanych píků.

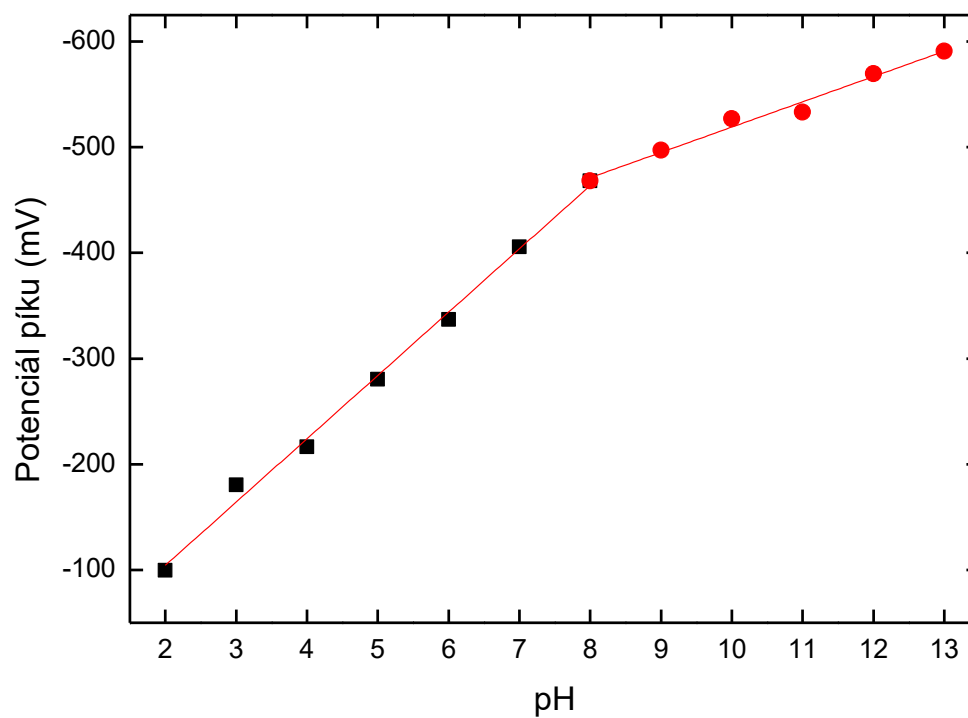


Obrázek 9: Voltamogramy s výřezy píků. Měření vzorek NO<sub>2</sub>phen ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 2–13; příslušná hodnota pH je uvedena nad jednotlivými voltamogramy





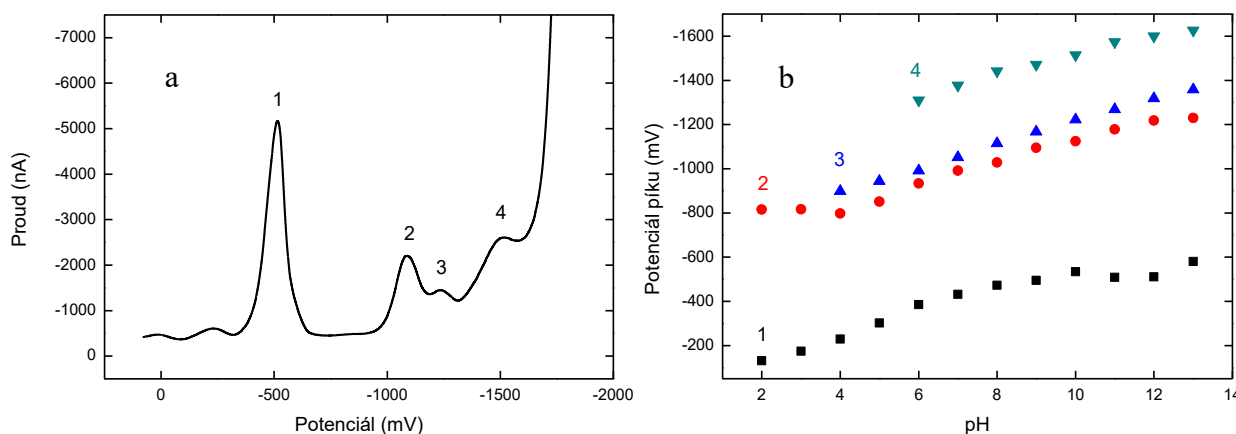
Obrázek 10: Graf závislosti proudu píku na pH. Červeně zobrazené 1. měření ze série pěti měření, černě je znázorněn průměr následujících čtyř měření s odpovídajícími chybovými úsečkami reprezentující směrodatné odchylky ( $n = 4$ ). Měřen vzorek  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o daném pH



Obrázek 11: Graf závislosti potenciálu píku na pH. Měřen vzorek  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o daném pH. V grafu jsou vytvořeny dvě lineární regrese (v rozmezí pH 2–8 a 8–13)

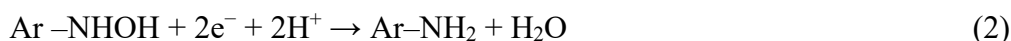
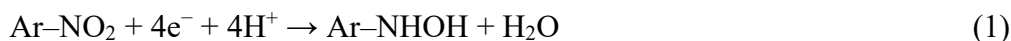
Tabulka 2: Parametry lineárních regresí grafů na obr. 11, závislosti potenciálu na pH. Měření vzorek  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o daném pH

Interval pH	Směrnice ( $\text{mV}/\{\text{pH}\}$ )	Úsek (nA)	Korelační koeficient
2–8	-59,9	15,6	-0,9974
8–13	-23,9	-280	-0,9888



Obrázek 12: (a) Příklad celkového voltamogramu  $\text{NO}_2\text{phen}$  při  $\text{pH}=10$ ,  $\text{NO}_2\text{phen}$  poskytuje 4 píky, označené 1, 2, 3, 4. (b) Vyhodnocení potenciálů všech píků v závislosti na pH. Číslo značí píky v (a). Měření vzorek  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o daném pH

V případě elektrochemické přeměny  $\text{NO}_2\text{phen}$  se jedná o katodickou redukci a píky se nacházejí v oblasti záporných potenciálů. K určení důvodu poklesů proudů píky viditelných na obr. 10 je nutné znát mechanismus redukce nitroskupiny vázané na aromatický systém. Takovouto nitroskupinu lze elektrochemicky redukovat až na odpovídající amin. Celkový mechanismus elektrochemické redukce nitroskupiny vázané na aromatické jádro (Ar) je popsán následujícími rovnicemi [35]:



Z Nernstovy rovnice vyplývá (ve vztahu k počtu vyměňovaných elektronů a  $\text{H}^+$  iontů při elektrodové reakci), že směrnice lineární závislosti na obr. 11 (černé body) by měla odpovídat teoretické hodnotě  $-59,2 \text{ mV}/\{\text{pH}\}$ . Zde určená hodnota uvedená v tabulce 2 je velmi podobná, činí  $-59,9 \text{ mV}/\{\text{pH}\}$ , což naznačuje elektrodový děj, při kterém dochází

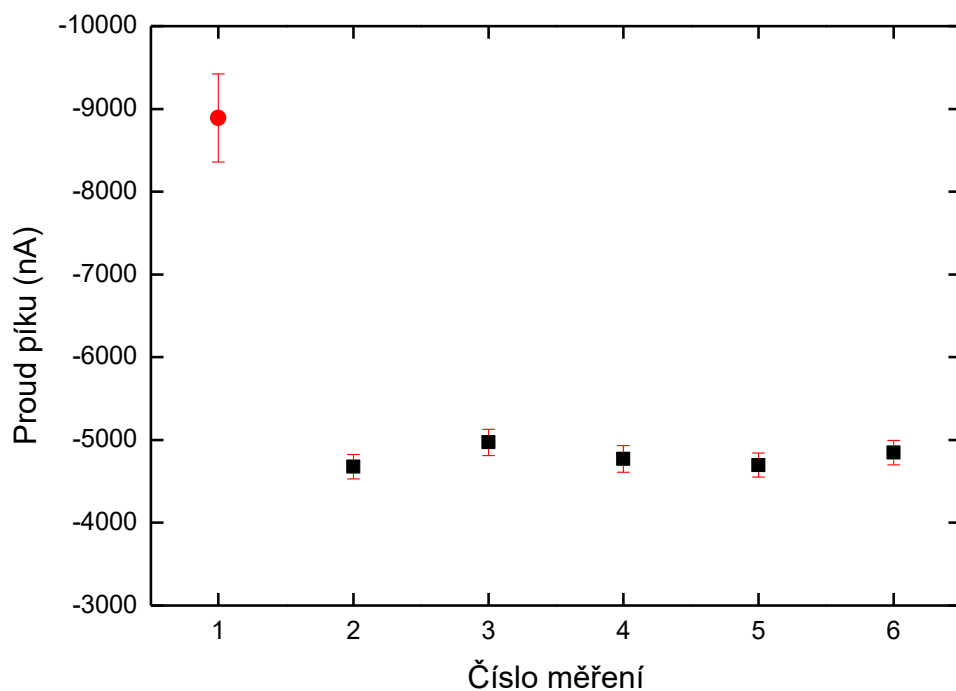
k výměně stejného počtu elektronů a  $H^+$  iontů (rovnice 1). Obr. 9 a 10 ukazují značný pokles proudu píku při pH 8, což může být způsobeno nedostatkem  $H^+$  iontů v prostředí základního elektrolytu. Elektrodová reakce proto probíhá pomaleji a voltametrický pík je tudíž menší. Na obr. 11 je také patrná změna v průběhu trendu (zlom při pH 8) a následně určená směrnice lineární závislosti v oblasti pH 8–13 (červené body) s hodnotou  $23,9 \text{ mV}/\{\text{pH}\}$ . Tato změna trendu je pravděpodobně způsobena menší rychlostí elektrodové reakce v důsledku nedostatku  $H^+$  iontů v prostředí. Na obr. 9, 10 i 11 je patrná další změna trendu oblasti pH 2–3, která může souviset s protonací a deprotonací přítomné nitroskupiny (v této oblasti pH lze očekávat pH odpovídající hodnotě disociační konstanty  $\text{NO}_2\text{phen}$ ).

Obr. 10 ukazuje červené hodnoty naměřené v prvním měření, kde je signál značně větší, a černé hodnoty značí průměry dalších čtyř měření, které se statisticky již téměř neliší. Tato skutečnost může být způsobena pasivací elektrody. Elektroda proto byla při následujících experimentech vždy před měřením (či před navázáním DNA) oleštěna o práškovou aluminu s deionizovanou vodou.

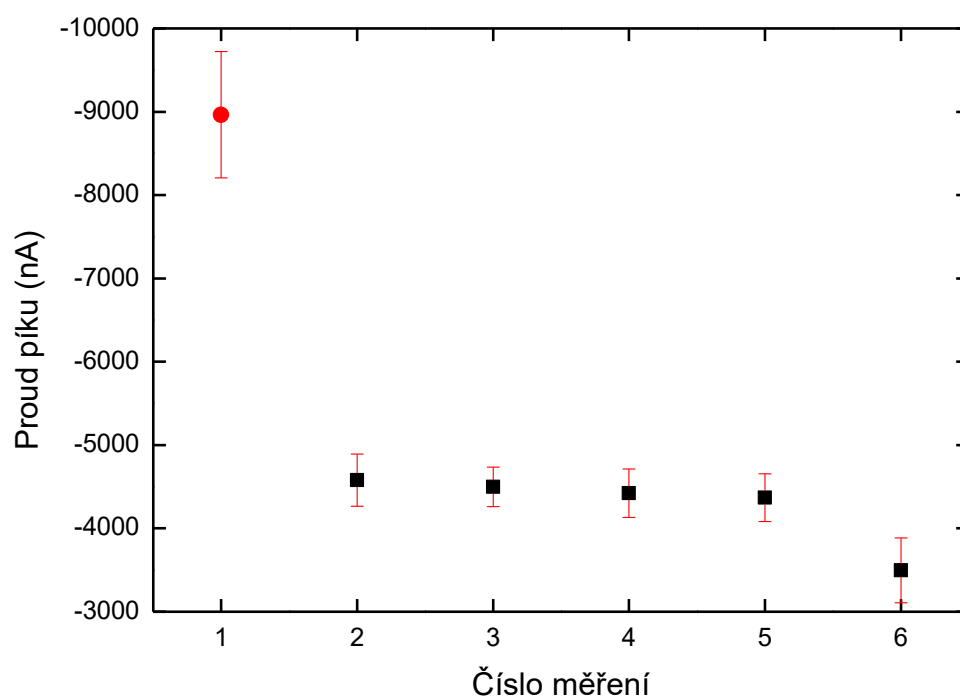
Obr. 12a zobrazuje příklad voltamogramu při pH 10, na kterém lze pozorovat čtyři píky, které poskytuje  $\text{NO}_2\text{phen}$ . Pík 1 je charakteristický, dostatečně velký a pravděpodobně se jedná o pík čtyřelektronové redukce nitroskupiny (rovnice 1), proto byl vybrán pro další analýzy. Pík 2 odpovídá pravděpodobně redukcí hydroxylaminové skupiny za vzniku aminoskupiny (rovnice 2). Píky 3 a 4 jsou patrné při vyšších pH a odpovídají pravděpodobně redukcí probíhající na dusíkových atomech matečného phen. Obr. 12b ukazuje vyhodnocení potenciálů všech pozorovaných DPV píků v závislosti na rostoucím pH.

### 4.3 Opakovatelnost měření

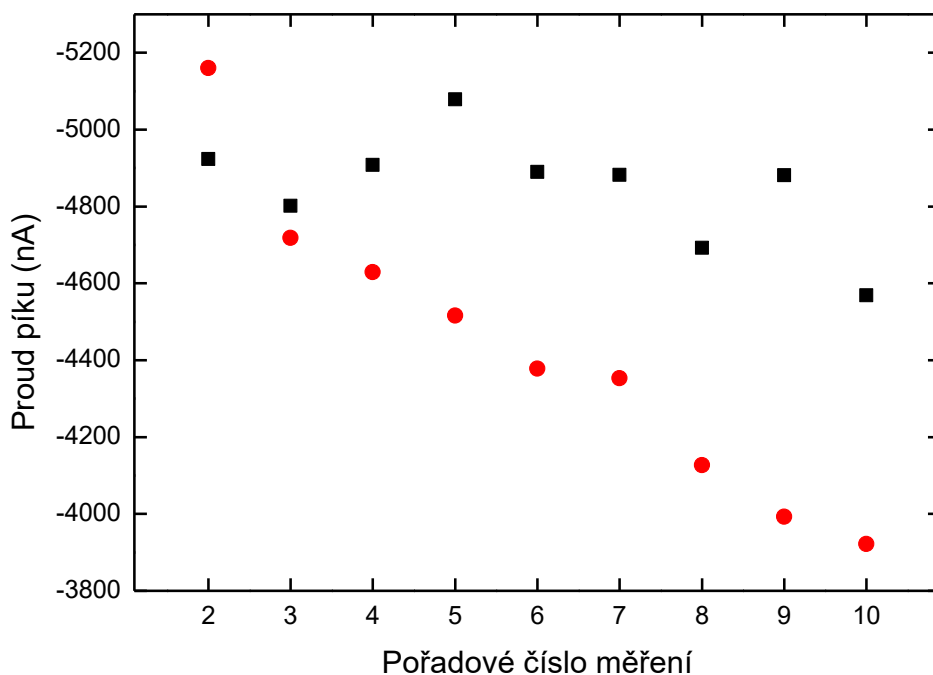
Při optimalizaci podmínek bylo nutné zajistit opakovatelnost DPV měření, která byla proměřena ve dvou nejvhodnějších pH (pH 6 a pH 7). Pro obě pH bylo provedeno 5 sérií stanovení po deseti opakujících se měřeních. Měření bylo provedeno v prostředí BR pufru o koncentraci  $\text{NO}_2\text{phen} 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Po každé sérii měření byla UTGE oleštěna o aluminu a roztok probublán dusíkem. Z průměrných výšek píků byly sestaveny obr. 13 (pro pH 6) a 14 (pro pH 7) včetně chybových úseček představujících směrodatné odchylky. V grafech je porovnáváno první měření (měření 1, červený bod) z každé z pěti sérií a průměry vždy 2. až 10. měření v rámci každé série (měření 2–6, černé body). Obr. 7 zobrazuje vývoj jedné vybrané série (2. až 10. měření) měření při pH 6 a pH 7.



Obrázek 13: Opakovatelnost měření  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 6. (1. měření, červený bod – průměr prvních měření v pěti sériích, 2. až 6. měření, černé body – vždy průměr dalších měření z jednotlivých sérií). V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchytky



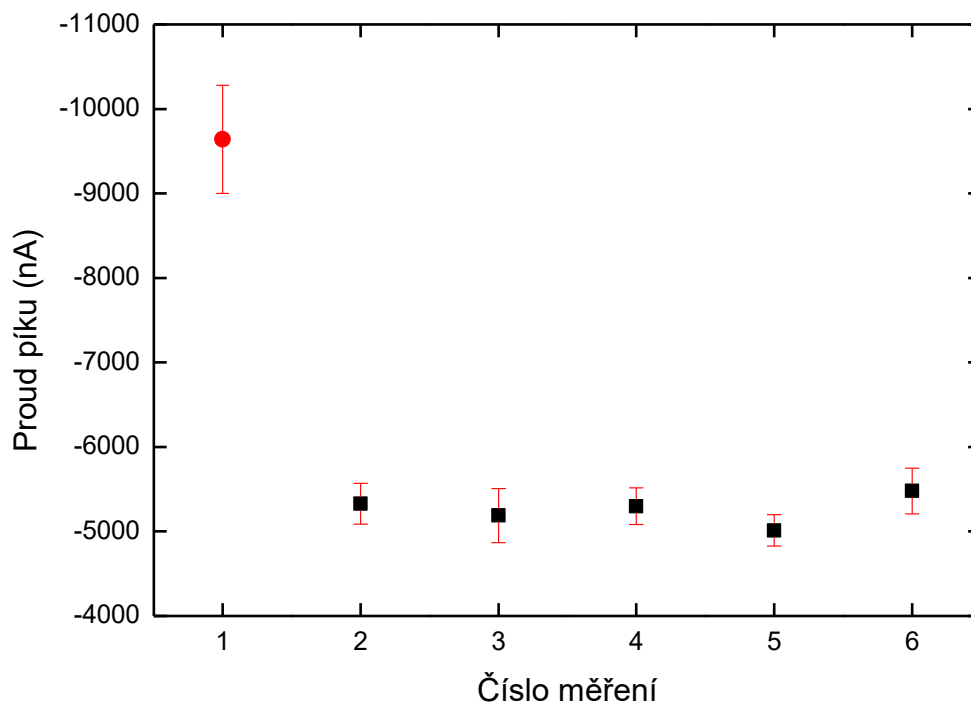
Obrázek 14: Opakovatelnost měření  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 7. (1. měření, červený bod – průměr prvních měření v pěti sériích, 2. až 6. měření, černé body – vždy průměr dalších měření z jednotlivých sérií). V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchytky



Obrázek 15: Opakovatelnost měření  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí BR pufru o pH 6 (černě) a pH 7 (červeně); u každého pH vybrána jedna série měření

Z obr. 13 a 14 bylo učiněno rozhodnutí, zda je výhodnější pracovat pouze s prvním měřením ihned po oleštění, nebo s průměry 2. až 10. měření v sérii. Vzhledem ke značné odlehlosti výsledků 1. měření od výsledků měření následujících, způsobené oleštěním elektrody o aluminu a následnou pasivací elektrody produkty elektrodové reakce, bylo zvoleno jako výhodnější dále pracovat s průměry dalších měření. Porovnáním směrodatných odchylek dalších měření u obou grafů (obr. 13 a 14) je patrné, že pH 6 je optimální (menší směrodatné odchylky) než pH 7, a bude tedy vhodnější dále pracovat v prostředí o pH 6. K tomuto rozhodnutí přispěly výsledky z obr. 15, který ukazuje příklad jedné série měření při obou pH, kde je patrný stále klesající trend u pH 7, což není příliš vhodné, na rozdíl od pH 6, u kterého je hodnota proudu píku distribuovaná v okolí jedné průměrné hodnoty. U pH 6 je výhodná i o něco vyšší průměrná výška píku.

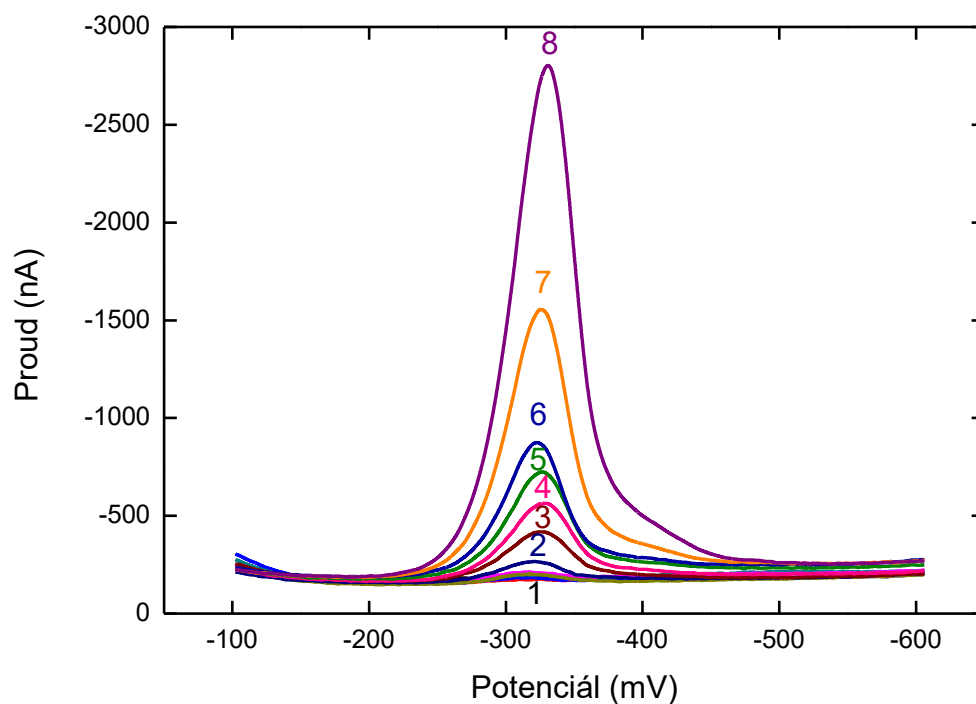
V dalších experimentech byla předpokládána práce s DNA, proto musel být zvolen vhodnější (jednodušší) pufr, kterým byl  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátový pufr o optimalizované hodnotě pH 6. Zde byla znovu prověřena opakovatelnost měření stejným způsobem (zobrazeno v obr. 16). Opakovatelnost měření se v tomto případě prokázala také jako vhodná, relativní směrodatné odchylky u jednotlivých sérií měření nepřesahovaly 5 %.



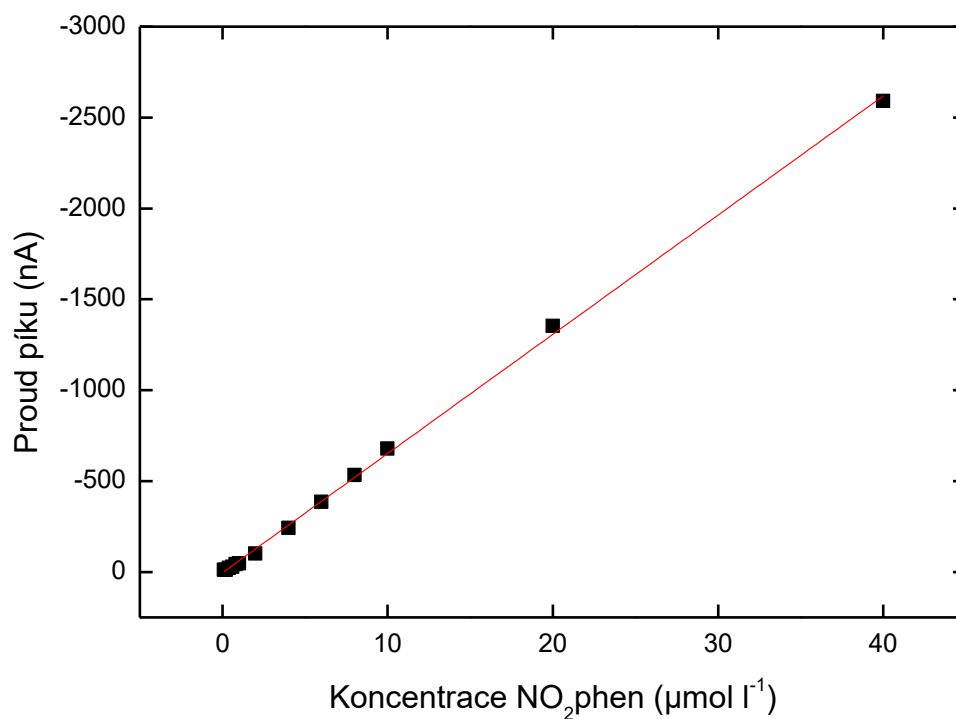
Obrázek 16: Opakovatelnost měření  $\text{NO}_2\text{phen}$  ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) na UTGE pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. (1. měření, červený bod – průměr prvních měření v pěti sériích, 2. až 6. měření, černé body – vždy průměr dalších měření z jednotlivých sérií). V grafu zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchylky

#### 4.4 Kalibrační závislost

Dalším krokem bylo zjištění koncentračního rozmezí, ve kterém  $\text{NO}_2\text{phen}$  poskytuje při DPV lineární kalibrační závislost. Měření bylo prováděno ve fosfátovém pufru o pH 6. Proměřeny byly vzorky  $\text{NO}_2\text{phen}$  o koncentracích v řádech  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$  a  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  (konkrétně: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20; 40; 60; 80; 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ). Měření probíhalo vždy desetkrát pro každou koncentraci a z vyhodnocení byla z předešlých důvodů (kap. 4.3) vyloučena první hodnota. Obr. 17 ukazuje voltamogramy zaznamenané v lineární části proměřované kalibrační závislosti (od koncentrace 0,1  $\mu\text{mol l}^{-1}$  do 40  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ). Stejně tak obr. 18 zobrazuje odpovídající lineární část kalibrační křivky. Při vyšších hodnotách koncentrací (60; 80; 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) již body leží mimo zjištěnou lineární závislost (není zobrazeno). Jejich hodnoty (proudy píků) jsou nižší, než by odpovídalo očekávané lineární závislosti, což je způsobeno vyšší mírou pasivace povrchu elektrody při vyšších koncentracích analytu. Parametry získané kalibrační přímkou jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 17: Voltamogramy  $\text{NO}_2\text{phen}$  při jeho různých koncentracích; měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Koncentrace 0,1 – 1 (1), 2 (2), 4 (3), 6 (4), 8 (5), 10 (6), 20 (7), 40 (8)  $\mu\text{mol l}^{-1}$



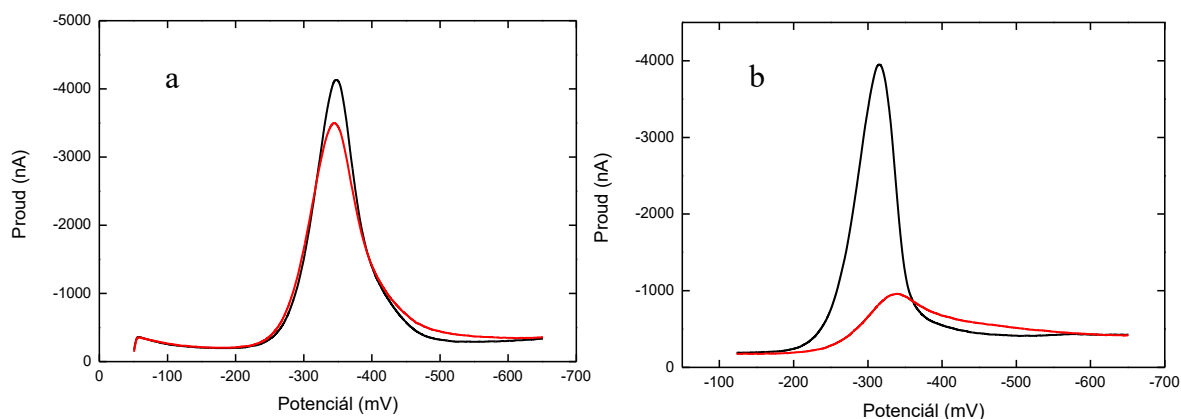
Obrázek 18: Kalibrační závislost pro  $\text{NO}_2\text{phen}$ ; měřeno na UTGE pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Závislost proložena lineární regresí

Tabulka 3: Parametry kalibrační přímky pro  $\text{NO}_2\text{phen}$  měřené na UTGE pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6

Směrnice ( $\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1}$ )	Úsek (nA)	Korelační koeficient
-65,6	4,6	-0,9996

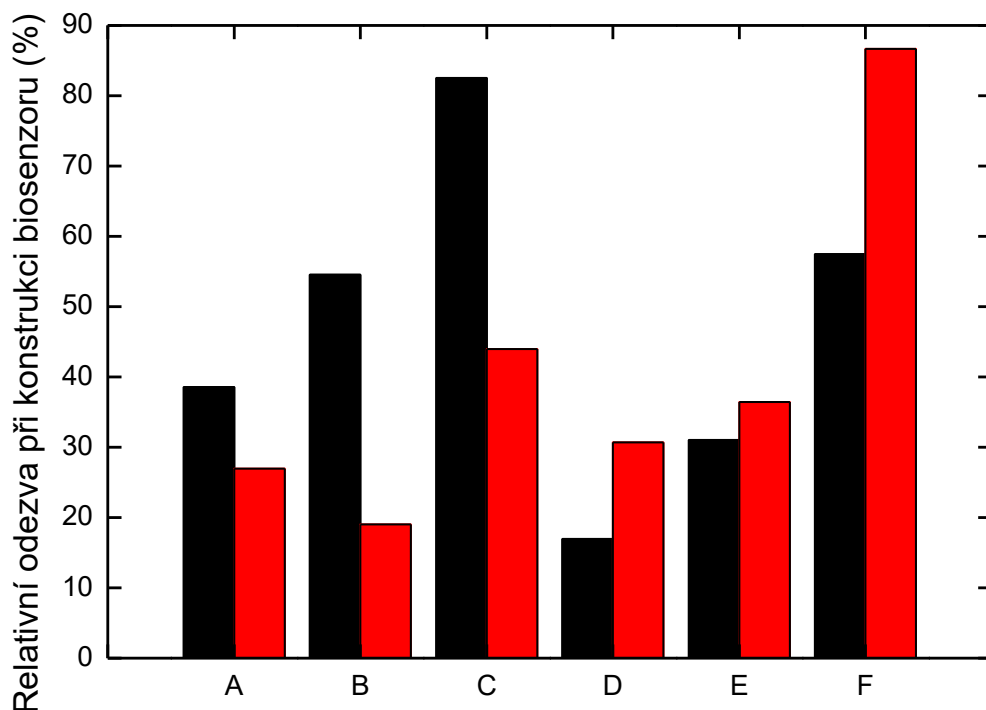
#### 4.5 Optimalizace vhodných koncentrací $\text{NO}_2\text{phen}$ a DNA

Při nižších koncentracích  $\text{NO}_2\text{phen}$  je výška píku velice malá a analyt hůře detekovatelný. Zde byly zkoumány a porovnávány koncentrace analytu  $1 \cdot 10^{-4}$  a  $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$ . Dalším parametrem byla vhodná koncentrace DNA pro přípravu DNA/UTGE. Vybrány byly koncentrace 10 mg  $\text{ml}^{-1}$ , 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  a 0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$ . Různé kombinace koncentrací  $\text{NO}_2\text{phen}$  a DNA byly proměřeny v obou módech zkoumání popsanych v experimentální části (kap. 3.3). V první části byla zjišťována adsorpce  $\text{NO}_2\text{phen}$  na pracovní elektrodu samotnou a modifikovanou DNA. Příklady voltamogramů jsou zobrazeny na obr. 19a (pro mód I) a 19b (pro mód II) a je v nich ukázán pokles signálu  $\text{NO}_2\text{phen}$  po navázání DNA. Obr. 20 je zkonstruován pomocí podílu těchto signálů (výška píku  $\text{NO}_2\text{phen}$  na DNA/UTGE ku výšce píku  $\text{NO}_2\text{phen}$  na UTGE), a zobrazuje tedy, na kolik procent signál klesl po navázání DNA (značeno jako relativní odezva při konstrukci biosenzoru). Hodnotu 100 % představuje signál na nemodifikované elektrodě.



Obrázek 19: (a) Voltamogram  $\text{NO}_2\text{phen}$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  na UTGE (černá křivka) a na DNA/UTGE (DNA akumulována z roztoku o koncentraci 0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) (červená křivka); měřeno v módu I (podmínky C na obr. 20) pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. (b) Voltamogram  $\text{NO}_2\text{phen}$  o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  na UTGE (černá křivka) a na DNA/UTGE (DNA akumulována z roztoku o koncentraci 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) (červená křivka); měřeno v módu II (podmínky B na obr. 20) pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6



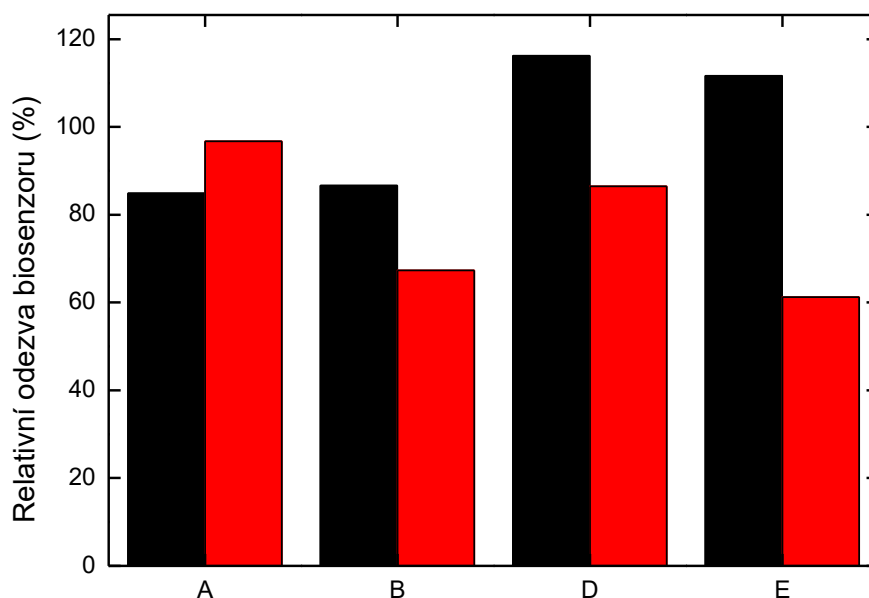


Obrázek 20: Relativní odezva při konstrukci biosenzoru v závislosti na různých kombinacích koncentrací  $\text{NO}_2\text{phen}$  a DNA. Měřeno na UTGE a DNA/UTGE pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Černé barvě odpovídá měření v módu I, červené v módu II. A – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 10 mg  $\text{ml}^{-1}$ , B – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , C – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , D – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 10 mg  $\text{ml}^{-1}$ , E – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 1 mg  $\text{ml}^{-1}$ , F – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-6}$  mol  $\text{l}^{-1}$  a koncentrace DNA 0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$

Je zřejmé, že  $\text{NO}_2\text{phen}$  poskytuje vyšší voltametrickou odezvu na UTGE než na DNA/UTGE (obr. 19). Z toho byl vyvozen závěr, že nejvhodnější bude, když relativní odezva při konstrukci biosenzoru (obr. 20) bude co nejmenší, a rozdíl mezi výsledky získanými na UTGE a DNA/UTGE tedy co největší. Porovnáme-li obr. 19a a 19b, vidíme, že vyhodnocení experimentu na obr. 19b bude snazší a výsledky budou zatíženy menší chybou díky velkému rozdílu maxim signálů. Z tohoto důvodu byla jako nevhodná pro další experimenty vyloučena měření s koncentrací DNA 0,1 mg  $\text{ml}^{-1}$ . Stejně tak v obr. 20 je zřejmý důvod vyloučení (pro další experimenty) měření s podmínkami C a F, kdy je relativní odezva při konstrukci biosenzoru největší a pokles ze 100 % minimální.

Jako optimálnější podmínky se dají určit podmínky D u módu I a podmínky B u módu II, ale výška píků při měření v módu I je velmi malá, proto obtížně hodnotitelná. Bylo tedy provedeno další optimalizační měření v obou módech pro podmínky A, B, D a E. Měření bylo ovšem provedeno již s poškozováním DNA UVC zářením pro optimalizaci výsledné

detekce poškození DNA. Termín relativní odezva biosenzoru dále představuje opět podíl dvou signálů, zde ale výšky píku po poškození UVC zářením a před poškozením s navázanou nepoškozenou DNA. 100 % zde představuje výsledek získaný na DNA/UTGE s nepoškozenou DNA. Výsledky optimalizace jsou znázorněny na obr. 21.



Obrázek 21: Relativní odezva biosenzoru (DNA/UTGE) v závislosti na různých kombinacích koncentrací  $\text{NO}_2\text{phen}$  a DNA použitých při vyšetřování působení UVC záření na DNA po dobu 20 min ve vzdálenosti 1 cm od zdroje záření. Měřeno pomocí DPV v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Černé barvě odpovídá měření v módu I, červené v módu II. A – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a koncentrace DNA  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , B – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a koncentrace DNA  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ , D – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  a koncentrace DNA  $10 \text{ mg ml}^{-1}$ , E – koncentrace  $\text{NO}_2\text{phen}$   $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$  a koncentrace DNA  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

Obr. 21 vyobrazuje relativní odezvu biosenzoru, která může představovat míru poškození DNA. Na pracovní elektrodu s navázanou DNA (DNA/UTGE) působilo UVC záření po dobu 20 min a biosenzor byl vzdálen 1 cm od zdroje záření. V módu II se jeví jako ideální podmínky E.

V módu I by mohly být zvoleny podmínky A nebo B z důvodu vhodně snížené relativní odezvy biosenzoru a také z důvodu velmi malých výšek píků při nižší koncentraci  $\text{NO}_2\text{phen}$  (podmínky D a E). Nakonec byly zvoleny podmínky B kvůli stejné koncentraci DNA jako u optimálních podmínka při módu I (podmínky E).

Proud píku  $\text{NO}_2\text{phen}$  po navázání DNA poklesl (obr. 19) a po poškození DNA klesl ještě více (obr. 21). Tato skutečnost může zobrazovat míru poškození DNA, ale pravděpodobně z hlediska zamezení přístupu  $\text{NO}_2\text{phen}$  k elektrodě (poškozená DNA více

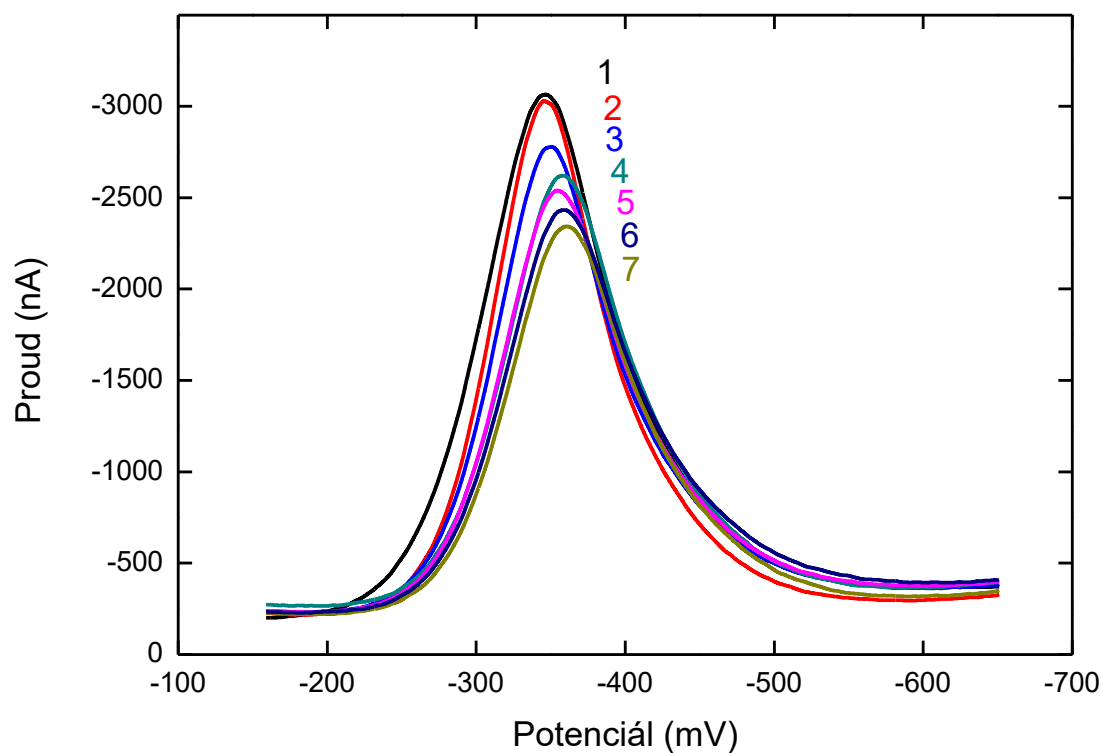
blokuje povrch UTGE), případně nemožnosti interkalace NO<sub>2</sub>phen do DNA (poškozená DNA není schopná nabídnout interkalační místa pro NO<sub>2</sub>phen).

#### 4.6 Závislost na čase ozařování

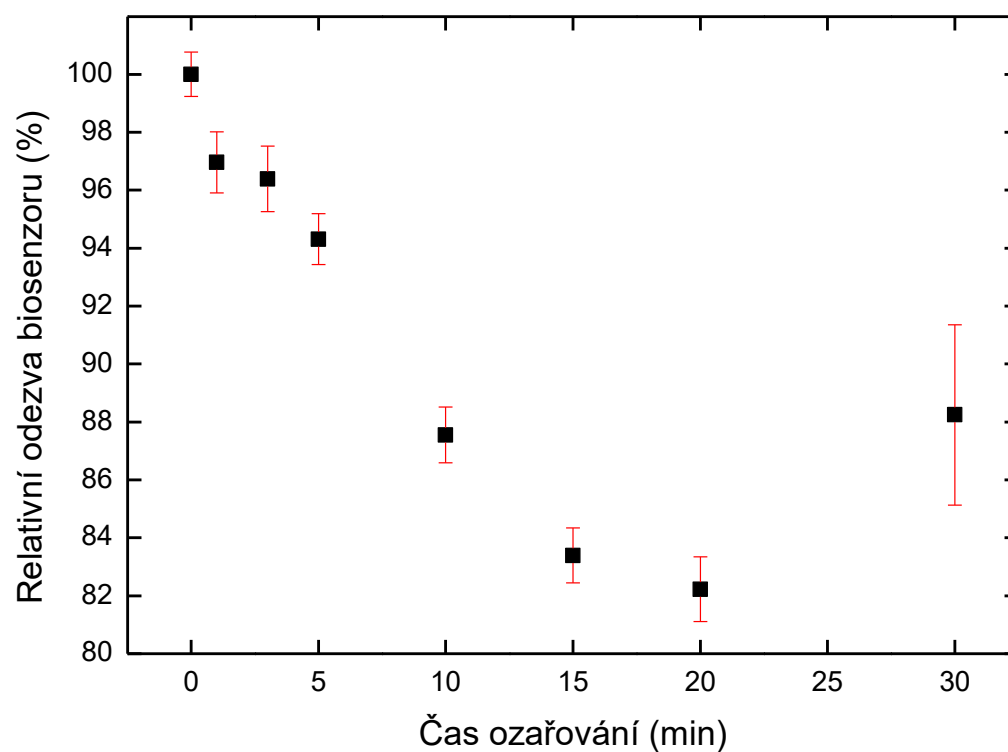
Nakonec byla zkoumána detekce poškození DNA v závislosti na čase ozařování UVC zářením. Měření probíhalo v obou módech.

V módu I byla DNA ( $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) nejdříve navázána na povrch UTGE a následně byla provedena série deseti měření v roztoku NO<sub>2</sub>phen ( $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Poté byla DNA/UTGE vyjmuta z měřeného roztoku, ozářena po různou dobu (konkrétně 1, 3, 5, 10, 15, 20 a 30 min) ze vzdálenosti 1 cm a následně vložena zpět do měřeného roztoku a opět byla provedena série měření. Z každé série bylo vyloučeno 1. měření, výsledky tudíž byly zpracovány vždy z devíti měření. Celé měření bylo kompletně provedeno třikrát. Příklad měření pro každý čas je zobrazen na obr. 22. Obr. 23 ukazuje relativní odezvu biosenzoru v závislosti na čase ozařování UVC.

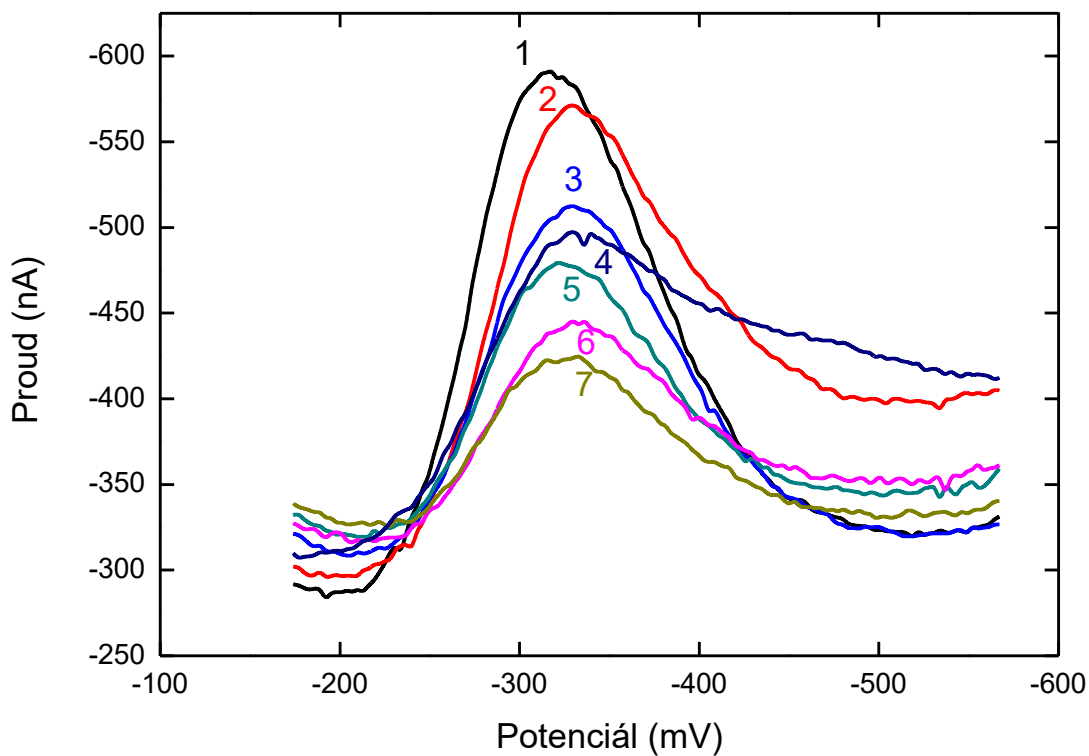
V módu II byla DNA ( $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) nejdříve navázána na povrch UTGE a následně byla UTGE nechána 5 min v roztoku NO<sub>2</sub>phen ( $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ) za stálého míchání v prostředí fosfátového pufru o pH 6. Poté byla DNA/UTGE vyjmuta a bylo provedeno 1 měření v 10 ml fosfátového pufru o pH 6. Následně byla vyjmuta a ozářena po různou dobu (konkrétně 1, 3, 5, 10, 15, 20 a 30 min) ze vzdálenosti 1 cm. Poté byla ponořena opět do roztoku NO<sub>2</sub>phen ( $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ ) a za stálého míchání ponechána 5 min. Nakonec bylo provedeno 1 měření v 10 ml fosfátového pufru o pH 6. Celý proces byl zopakován pětkrát (vícekrát než v módu I z důvodu pouze jednoho výsledku získaného z jednoho měření). Příklad měření pro každý čas je zobrazen na obr. 24. Obr. 25 ukazuje relativní odezvu biosenzoru v závislosti na čase ozařování UVC.



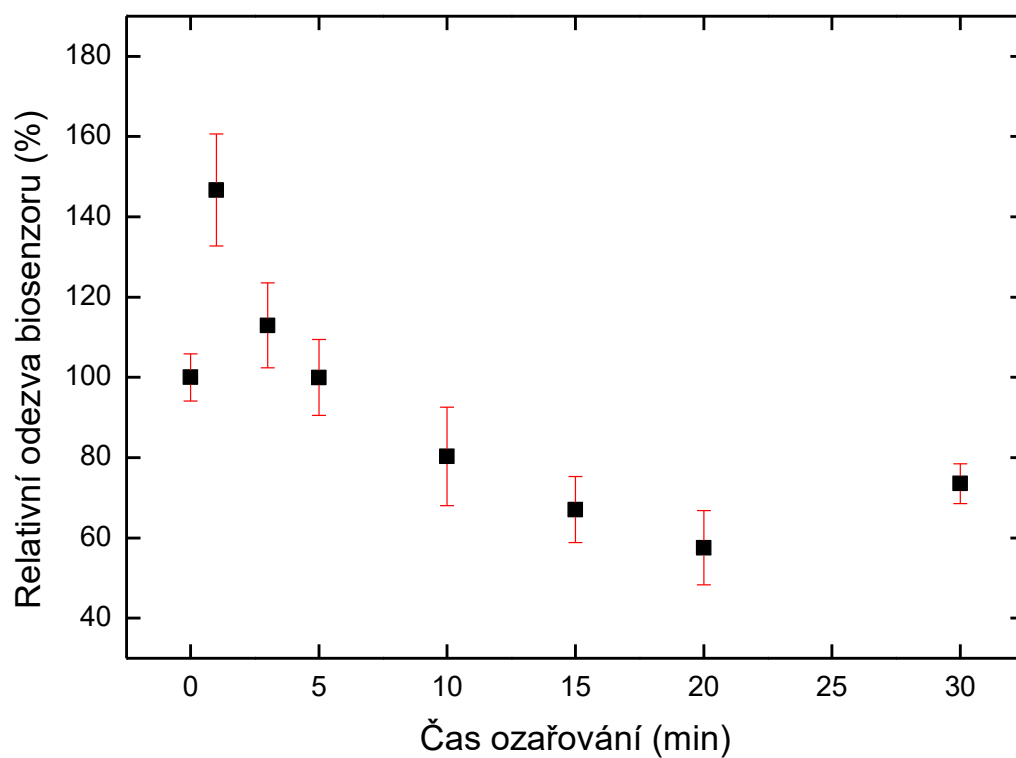
Obrázek 22: Příklady voltamogramů měřených módem I po 1 (1), 3 (2), 5 (3), 10 (4), 15 (5), 20 (7), 30 (6) min ozařování UVC zářením ve vzdálenosti 1 cm od zdroje; měřeno pomocí DPV na DNA/UTGE



Obrázek 23: Relativní odezva biosenzoru v závislosti na čase ozařování. V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchylky. Měřeno módem I pomocí DPV na DNA/UTGE; vzdálenost od zdroje záření byla 1 cm



Obrázek 24: Příklad voltamogramů měřených módem II po 1 (1), 3 (2), 5 (3), 10 (4), 15 (5), 20 (7), 30 (6) min ozařování UVC zářením ve vzdálenosti 1 cm od zdroje; měřeno pomocí DPV na DNA/UTGE



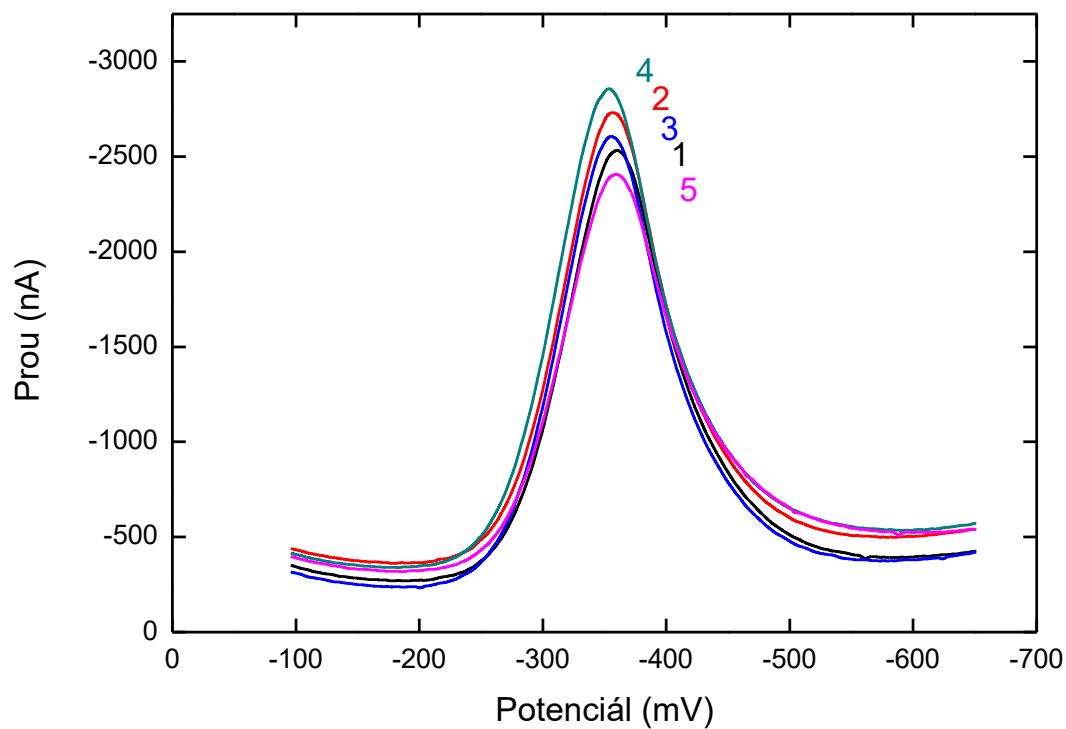
Obrázek 25: Relativní odezva biosenzoru v závislosti na čase ozařování. V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchylky. Měřeno módem II pomocí DPV na DNA/UTGE; vzdálenost od zdroje záření byla 1 cm

Na začátku je třeba vysvětlit, že při poškozování DNA UVC zářením zřejmě probíhají dva děje. Nejdříve se dvoušroubovice nativní DNA začne rozvírat a je možné, že tak uvolňuje přístup k elektrodě a NO<sub>2</sub>phen se může více adsorbovat na elektrodu. Tento děj by mohl vysvětlit vzrůst signálu nad 100 % při nižším čase poškozování (1 a 3 min) v módu II (patrné z obr. 25). Dále v grafech vidíme postupný pokles relativní odezvy biosenzoru, který dosahuje maxima při 20 min ozařování DNA. Můžeme tedy odvodit, že je pravděpodobně do 20 min stále více zabraňováno adsorpci NO<sub>2</sub>phen na elektrodu nebo interkalaci NO<sub>2</sub>phen do DNA. Zde lze pozorovat druhý děj, kdy se DNA přetváří, deformuje a zřejmě tvoří stále více kompaktní vrstvu. Po dvaceti minutách nastává zlom a při ozařování 30 min relativní odezva biosenzoru opět roste. Poškození DNA je v tuto chvíli tak velké, že povrch již není souvislý a opět uvolňuje místa k adsorpci NO<sub>2</sub>phen na elektrodu.

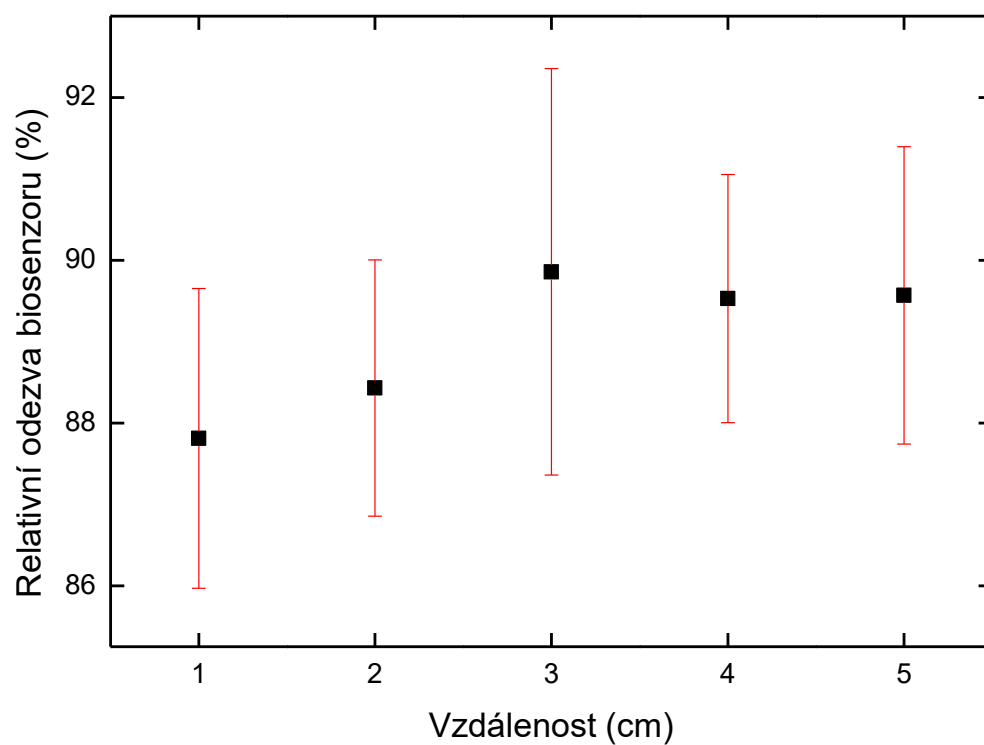
Mód I má určitou výhodu v možnosti opakování několika měření za sebou a měření nevyžaduje tolik času. Získáme tedy značný počet výsledků během několika minut. Relativní odezva biosenzoru ale neklesne pod 82 % (obr. 23), což znamená, že poškození se neprojeví v takové míře. Na druhou stranu směrodatné odchytky jsou menší než při měření v módu II (obr. 25). Mód II disponuje poklesem relativní odezvy biosenzoru až na 57 %. Vzhledem k tomu, že se ale jedná vždy pouze o jedno měření, a to první, které má směrodatné odchytky větší a celková analýza je časově náročnější než u módu I, je měření zdlouhavé. Zato je ale robustnější a malé nepřesnosti nezpůsobí velkou chybu měření.

#### **4.7 Závislost na vzdálenosti od zdroje ozařování**

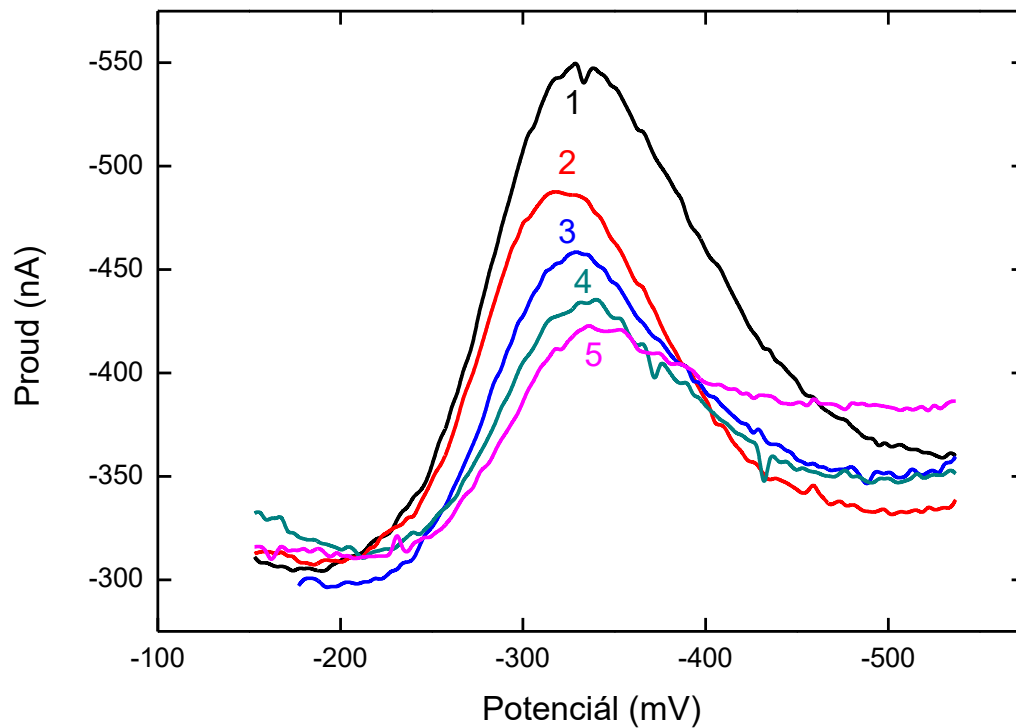
V posledním měření byla zkoumána detekce poškození DNA v závislosti na vzdálenosti od zdroje UVC záření. Měření probíhalo v obou módech za stejných podmínek a stejným způsobem jako měření závislosti na čase ozařování (kap. 4.6). Jediný rozdíl byl, že měření probíhalo vždy za konstantního času poškozování DNA UVC zářením, a to 10 min, pouze se měnila vzdálenost od zdroje ozařování, konkrétně byly studovány vzdálenosti 1, 2, 3, 4 a 5 cm. Příklad měření pro každou vzdálenost v módu I je zobrazen na obr. 26, v módu II na obr. 28. Obr 27 ukazuje relativní odezvu biosenzoru v závislosti na vzdálenosti od zdroje ozařování UVC měřením v módu I a obr. 29 v módu II.



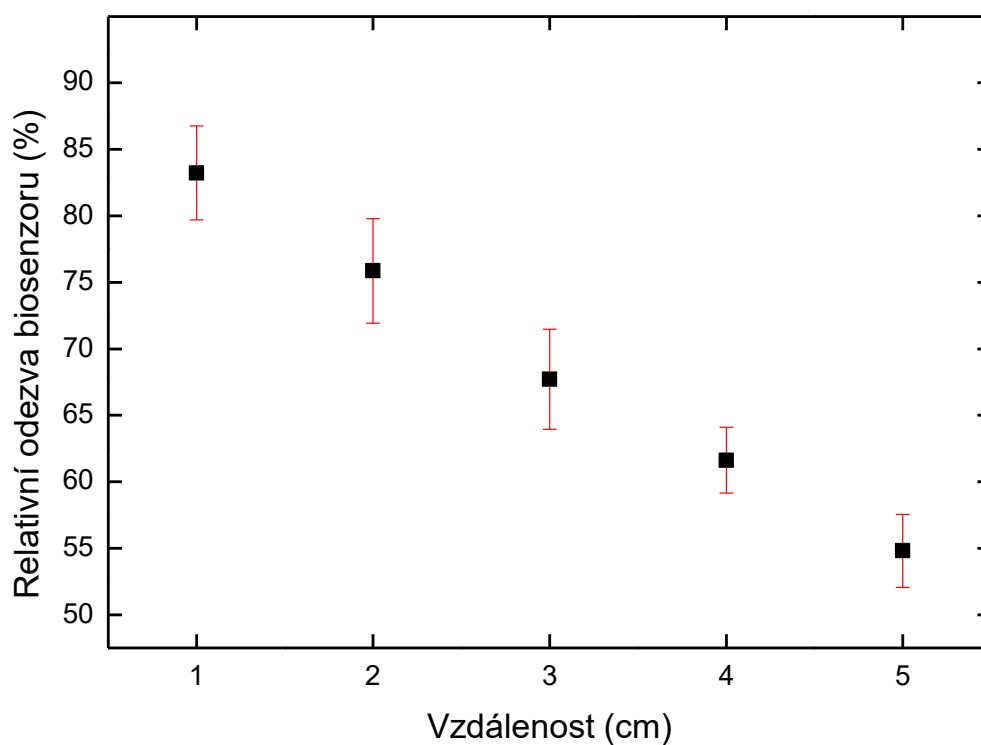
Obrázek 26: Příklady voltamogramů měřených módem I po 10 min ozařování UVC zářením ze vzdáleností odpovídajícím popiskům grafu v cm; měřeno pomocí DPV na DNA/UTGE



Obrázek 27: Relativní odezva biosenzoru v závislosti na vzdálenosti od zdroje ozařování. V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchylky. Měřeno módem I pomocí DPV na DNA/UTGE



Obrázek 28: Příklad voltamogramů měřených módem II po 10 min ozařování UVC zářením ze vzdáleností odpovídajícím popiskům grafu v cm; měřeno pomocí DPV na DNA/UTGE



Obrázek 29: Relativní odezva biosenzoru v závislosti na vzdálenosti od zdroje ozařování. V grafu jsou zobrazeny chybové úsečky reprezentující směrodatné odchylky. Měřeno módem II pomocí DPV na DNA/UTGE



Z porovnání grafů je vidět, že výsledky měření v módu I (obr. 26 a 27) jsou vzhledem k velmi velkému překryvu směrodatných odchylek prakticky statisticky nerozlišitelné. Tento způsob měření je tedy pro praktickou detekci poškození DNA nevhodný. V módu II ale vidíme lineárně klesající trend (obr. 29) patrný díky velkému rozdílu (poklesu) proudu píku (obr. 28). Z grafu je patrné, že čím větší vzdálenost od zdroje záření je, tím více je zabraňováno přístupu  $\text{NO}_2\text{phen}$  k elektrodě, neboli tím je vrstva poškozené DNA na povrchu elektrody kompaktnější. Převládá zde tedy pravděpodobně druhý děj (popsaný v kap. 4.6). Měření v módu II je sice více časově náročné, ale využitelné pro zkoumání takového typu závislosti, tj. závislosti míry poškození DNA na vzdálenosti biosenzoru od zdroje poškozujícího záření.

## 5. Závěr

Práce si kladla za cíl najít alternativní metodu detekce poškození DNA. Zjistit, zda netradiční redoxní indikátor 5-nitro-1,10-fenantrolin dokáže poskytovat dostatečně rozdílný a reprodukovatelný signál indikující poškozenou a nepoškozenou DNA. Dále pak zjistit míru jejího poškození. Měření probíhalo pomocí DPV na UTGE (resp. DNA/UTGE) v tříelektrodovém zapojení.

Po optimalizaci a zkoumání opakovatelnosti měření bylo chování  $\text{NO}_2\text{phen}$  studováno na biosenzoru (pracovní elektrodě modifikované DNA). Signál se ukázal jako reprodukovatelný a rozdílný před a po poškození DNA UVC zářením. Bylo tedy přistoupeno k detekci míry poškození DNA. Studovány byly dvě závislosti, a to závislost na čase ozařování UVC lampou a závislost na vzdálenosti od zdroje záření. Obě měření byla prováděna dvěma způsoby (módy), které jsou detailně popsány v textu bakalářské práce. Relativní odezva biosenzoru klesala se zvyšujícím se časem ozařování až do 20 min ozařování, což poukázvalo na zvyšující se poškození DNA. Měření se ukázalo vhodné v obou módech. Mód I je časově méně náročný, ale rozdíl signálů není tak velký jako u módu II. Závislost na vzdálenosti se prokázala měřitelná pouze v módu II a relativní odezva biosenzoru klesala s rostoucí vzdáleností od zdroje UVC záření.

## 6. Literatura

1. Hammett L. P., Walden G. H., Edmonds S. M.: **New Indicators for Oxidimetry: Some Phenanthroline and Diphenylamine Derivatives**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 5, 1092-1094
2. Smith G. F., Richter F. P.: **Substituted 1,10-Phenanthroline Ferrous Complex Oxidation-Reduction Indicators Potential Determinations as a Function of Acid Concentration**, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1944, 16, 9, 580-581
3. Ram D. K., Mandal A. K., Lahiri S. C.: **Studies on the Dissociation Constants of 5-Nitro-1,10-phenanthroline in Mixed Solvents**, *Adv. Synth. Catal.*, 1977, 319, 5, 719-722
4. Xu C.: **Photophysical Properties of Lanthanide Complexes with 5-Nitro-1,10-phenanthroline**, *Monatsh. Chem.*, 2010, 141, 6, 631-635
5. Oztekin Y., Krikstolaityte V., Ramanaviciene A., Yazicigil Z., Ramanavicius A.: **1,10-Phenanthroline Derivatives as Mediators for Glucose Oxidase**, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, 26, 1, 267-270
6. Katzianer D. S., Yano T., Rubin H., Zhu J.: **A High-Throughput Small-Molecule Screen to Identify a Novel Chemical Inhibitor of Clostridium Difficile**, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2014, 44, 1, 69-73
7. Kidwai S., Park C. Y., Mawatwal S.: **Dual Mechanism of Action of 5-Nitro-1,10-phenanthroline against Mycobacterium Tuberculosis**, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, 61, 11, e00969-17
8. Bencini A., Lippolis V.: **1,10-Phenanthroline: A Versatile Building Block for the Construction of Ligands for Various Purposes**, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, 254, 17-18, 2096-2180
9. Voet D., Voet J.: **Biochemie**, 1. vyd., Praha: *Victoria Publishing*, 1995
10. Štípek S.: **Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace: učební texty**, Praha: *Medprint*, 1997
11. Alberts B. a kol.: **The Molecular Biology of the Cell**, 5. vyd., New York: *Garland Science*, 2007

12. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15767009>, staženo 10.07.2019
13. Diculescu V. C., Paquim A. M. C., Brett A. M. O.: **Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage**, *Sensors*, 2005, 5, 6, 377-393
14. Hájková A., Barek J., Vyskočil V.: **Electrochemical DNA Biosensor for Detection of DNA Damage Induced by Hydroxyl Radicals**, *Bioelectrochemistry*, 2017, 116, 1-9
15. Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.: **Recent Progress in Electrochemical Sensors and Assays for DNA Damage and Repair**. *Trend. Anal. Chem.*, 2016, 79, 160-167
16. Vyskočil V., Hájková A.: **Uhlíkové elektrody modifikované deoxyribonukleovou kyselinou jako nástroje pro elektrochemickou detekci jejího poškození**, *Chem. Listy*, 2016, 110, 3, 207-214
17. Jackson S. P., Bartek J.: **The DNA-damage Response in Human Biology and Disease**, *Nature*, 2009, 461, 1071-1078
18. Khan Academy: DNA Proofreading and Repair. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-molecular-genetics/hs-discovery-and-structure-of-dna/a/dna-proofreading-and-repair>, staženo 25.07.2019
19. Maynard S., Schurman S. H., Harboe C., de Souza-Pinto N. C., Bohr V. A.: **Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage and Association with Cancer and Aging**, *Carcinogenesis*, 2008, 30, 1, 2-10
20. Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams P. M., Maffei T. G. G., Wright C. J., Doak S. H.: **NanoGenotoxicology: The DNA Damaging Potential of Engineered Nanomaterials**, *Biomaterials*, 2009, 30, 23-24, 3891-3914
21. Liu H. K., Sadler P. J.: **Metal Complexes as DNA Intercalators**, *Acc. Chem. Res.*, 2011, 44, 5, 349-359
22. Martinez R., Chacon-Garcia L.: **The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What It Worked and What Did Not Work**, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 2, 127-151
23. Mukherjee A., Sasikala W. D.: **Chapter One - Drug–DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism**, *Adv. Protein Chem. Str.*, 2013, 92, 1-62
24. Williams L. D.: **Specific Binding of o-Phenanthroline at a DNA Structural Lesion**, *Nucleic. Acids. Res.*, 1988, 16, 24, 11607-11615

25. Zeglis B. M., Pierre V. C., Barton J. K.: **Metallo-intercalators and Metallo-insertors**, *Chem. Commun.*, 2007, 2007, 44, 4565-4579
26. Monchauda D., Teulade-Fichou M. P.: **A Hitchhiker's Guide to G-quadruplex Ligands**, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, 4, 6, 627-636
27. Schuch A. P., Moreno N. C., Schuch N. J., Menck C. F. M., Garcia C. C. M.: **Sunlight Damage to Cellular DNA: Focus on Oxidatively Generated Lesions**, *Free Radical. Bio. Med.*, 2017, 107, 110-124
28. Sinha R. P., Häder D. P.: **UV-induced DNA Damage and Repair: A Review**, *Photoch. Photobio. Sci.*, 2002, 4, 1, 225-236
29. D'Orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A., Scott T.: **UV Radiation and the Skin**, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14, 6, 12222-12248
30. Huselton C. A., Hill H. Z., O'Neill J. P.: **Melanin Photosensitizes Ultraviolet Light (UVC) DNA Damage in Pigmented Cells**, *Environ. Mol. Mutagen.*, 1990, 16, 1, 37-43
31. Sachsenmaier C., Radler-Pohl A., Müller A., Herrlich P., Rahmsdorf H. J.: **Damage to DNA by UV Light and Activation of Transcription Factors**, *Biochem. Pharmacol.*, 1994, 47, 1, 129-136
32. Sipa K., Brycht M., Leniart A., Nosal-Wiercińska A., Skrzypek S.: **Improved Electroanalytical Characteristics for the Determination of Pesticide Metobromuron in the Presence of Nanomaterials**, *Anal. Chim. Acta*, 2018, 1030, 61-69
33. Sadikoglu M., Saglikoglu G., Yagmur S., Orta E., Yilmaz S.: **Voltammetric Determination of Acyclovir in Human Urine Using Ultra Trace Graphite and Glassy Carbon Electrodes**, *Curr. Anal. Chem.*, 2011, 7, 2, 130-135
34. Arustamian D.: **Jednoduchý elektrochemický DNA biosenzor pro detekci poškození dna způsobeného UV zářením**, diplomová práce, Praha: *Univerzita Karlova*, 2018
35. Yosypchuk O., Karásek J., Vyskočil V., Barek J., Pecková K.: **The Use of Silver Solid Amalgam Electrodes for Voltammetric and Amperometric Determination of Nitrated Polyaromatic Compounds Used as Markers of Incomplete Combustion**, *Sci. World J.*, 2012, 2012, 231986