

**Konstrukcja i zastosowanie sitodrukowanych
czujników elektrochemicznych w badaniach
oddziaływań DNA z błękitem metylenowym,
antracyklinami i ich formamidynowymi
pochodnymi**



Adriana Palińska-Saadi

Praca doktorska wykonana
w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej
Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Promotor pracy: Prof. dr hab. Magdalena Maj-Żurawska

Warszawa, 2013

Praca była częściowo finansowana w ramach:

- projektu badawczego promotorskiego nr N N204 154540 przez Narodowe Centrum Nauki,
- stypendium i udzielenia wsparcia towarzyszącego nr 74/ES/ZS-II/W-2151.1/11 w ramach projektu systemowego Samorządu Województwa Mazowieckiego pn. *Potencjał naukowy wsparciem dla gospodarki Mazowsza – stypendia dla doktorantów* (Priorytet VIII Regionalne kadry gospodarki, Działanie 8.2 Transfer wiedzy, Poddziałanie 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji),
- grantu DSM dla młodej kadry i doktorantów finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



„Cała nauka, w porównaniu z rzeczywistością, jest prymitywna i dziecinna – ale nadal jest to najcenniejsza rzecz, jaką posiadamy.”

Albert Einstein

*Moją pracę doktorską dedykuję
ukochanemu Dziadkowi Jasiowi,
który odszedł zbyt wcześnie...*

PODZIĘKOWANIA

Składam serdeczne podziękowania...

Pani Prof. dr hab. Magdalenie Maj-Żurawskiej

za opiekę naukową, ciągle zainteresowanie, cenne wskazówki, inspirujące dyskusje oraz okazaną życzliwość i wsparcie;

Ś.P. Prof. dr hab. Stanisławowi Głąbowi

za przyjęcie mnie na pracownię oraz wszelką pomoc;

Pani Prof. dr hab. Ewie Bułskiej

za stworzenie miłej atmosfery pracy naukowej;

***Panu Dr Selimowi Achmatowiczowi oraz Jego Współpracownikom
z Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie***

za nieustanne dostarczanie sitodrukowanych układów trójelektrodowych, długie konstruktywne dyskusje, cenne uwagi, niekończącą się pomysłowość oraz ogromną życzliwość;

Pani Prof. dr hab. Irenie Oszczapowicz, Panu Prof. dr hab. Januszowi Oszczapowiczowi, oraz Pani Dr Małgorzacie Łukawskiej z Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie

za dostarczanie antracyklin i ich formamidynowych pochodnych, owocną współpracę oraz wspólne poszukiwania rozwiązań problemów eksperymentalnych;

Pani Dr Hannie Elżanowskiej, Mgr Blance Kępskiej, Mgr Agnieszce Ogórek, Mgr Ewelinie Krawczyk, Mgr Agnieszce Gniazdowskiej

za podarowanie DNA plazmidowego, długie godziny spędzone w laboratoriach przy doświadczeniach z błękitem metylenowym, budujące rozmowy, wszelką pomoc oraz radosną atmosferę;

Pani Dr Joannie Grzyb i Pani Dr Annie Wałkiewicz z Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

za wykonanie obrazów AFM, ogromną pomysłowość, otwartość na nowe wyzwania naukowe oraz miłą współpracę;

moim Studentom, Mgr Jolancie Gędzie, Mgr Annie Siemianowskiej, Mgr Krzysztofowi Szpyrukowi, Mgr Magdalenie Łukasiewicz Merino, Mgr Angelice Żarnowskiej, Mgr Arturowi Radomyskiemu, Mgr Agnieszce Sobocińskiej, Mgr Ewie Karamuz oraz Mgr Klaudii Wróbel

za niesamowite zaangażowanie w prowadzone eksperymenty, wiele godzin wspólnie spędzonych w laboratorium, niekończące się rozmowy (na tematy nie tylko chemiczne) oraz przyjaźń trwającą często po dziś dzień;

Pani Annie Suskiej

za codzienne rozmowy, przyjazną atmosferę oraz nieustanną pomoc w rozwiązywaniu wszelkich problemów technicznych i nie tylko;

Wszystkim Współpracownikom z Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

za stworzenie serdecznej i rodzinnej atmosfery pracy;

a także...

Rodzicom i Dziadkom,

za nieustanne wsparcie, wielką wiarę w moje możliwości, bezwarunkową miłość oraz za to, że jestem, jaką jestem i że w ogóle jestem;

Samirowi

za pomoc w przygotowaniu ilustracji oraz w opracowaniu graficznym rozprawy, ciągle dodawanie otuchy, ciepłą i pachnącą herbatę, promienny uśmiech oraz za to, że jest blisko mnie;

Prawdziwym Przyjaciołom

za relaksujące spotkania, bezgraniczną pomoc, głębokie zrozumienie, ciepłe słowa oraz za to, że po prostu są.



SPIS TREŚCI

SKRÓTY UŻYTE W PRACY	9
I. CZĘŚĆ LITERATUROWA.....	13
1. DNA, czyli kwas deoksyrybonukleinowy.....	15
1.1. Budowa DNA	16
1.1.1. Monomery DNA	17
1.1.2. Pojedyncza nić DNA	18
1.1.3. Podwójna nić DNA.....	19
1.1.4. Formy DNA	22
1.2. Znaczenie biologiczne DNA.....	24
1.3. Plazmidy.....	25
1.3.1. Struktura plazmidów.....	26
1.3.1. Wykrywanie, izolacja i oczyszczanie plazmidów	27
1.3.2. Występowanie plazmidów.....	29
1.3.3. Rola biologiczna DNA plazmidowego.....	29
1.3.4. Znaczenie plazmidów.....	32
1.4. Właściwości fizykochemiczne DNA.....	34
1.4.1. Stabilność cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego	34
1.4.2. Właściwości elektrochemiczne DNA.....	39
1.4.2.1. Elektroaktywność kwasu deoksyrybonukleinowego.....	39
1.4.2.2. Przewodnictwo elektryczne kwasu deoksyrybonukleinowego.....	48
1.4.3. Właściwości spektroskopowe DNA.....	54
1.4.4. Interakcje kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi.....	55
1.4.4.1. Sposoby oddziaływania kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi.....	56
1.4.4.2. Metody badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi	59
2. Substancje oddziałujące z DNA.....	62
2.1. Błękit metylenowy.....	62
2.1.1. Właściwości błękitu metylenowego.....	62
2.1.1.1. Sposób oddziaływania błękitu metylenowego z DNA.....	63
2.1.1.2. Właściwości elektrochemiczne błękitu metylenowego.....	64
2.1.1.3. Właściwości spektralne błękitu metylenowego	67
2.2. Antracykliny	69
2.2.1. Właściwości daunorubicyny i doksorubicyny	71
2.2.1.1. Właściwości antynowotworowe daunorubicyny i doksorubicyny.....	71
2.2.1.2. Sposób oddziaływania daunorubicyny i doksorubicyny z DNA.....	72
2.2.1.3. Właściwości elektrochemiczne daunorubicyny i doksorubicyny	74
2.2.1.4. Właściwości spektralne daunorubicyny i doksorubicyny.....	76

2.2.2. Pochodne daunorubicyny i doksorubicyny.....	77
3. Elektrochemiczne bioczuJNIKI DNA.....	80
3.1. Budowa elektrochemicznego bioczuJNIKA DNA.....	80
3.2. Sposoby unieruchamiania DNA na elektrodzie.....	81
3.3. Pomiary przy użyciu elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA.....	83
3.3.1. Badanie interakcji DNA z różnymi substancjami chemicznymi	83
3.3.2. Badanie hybrydyzacji DNA.....	84
3.4. Zastosowanie elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA.....	86
4. Sitodruk	88
4.1. Procedura sitodruku	88
4.2. Zastosowanie.....	90
4.3. Elektrody sitodrukowane	90
4.3.1. Sitodrukowanie elektrod	91
4.3.2. Właściwości elektrod sitodrukowanych	92
4.3.3. Zastosowanie elektrod sitodrukowanych.....	93
5. Nanorurki węglowe	95
5.1. Budowa nanorurek węglowych.....	95
5.2. Właściwości nanorurek węglowych.....	96
5.3. Preparatyka nanorurek węglowych	97
5.3.1. Synteza nanorurek węglowych	97
5.3.2. Oczyszczanie i izolacja nanorurek węglowych	98
5.3.3. Modyfikowanie nanorurek węglowych	99
5.4. Zastosowanie nanorurek węglowych	101
5.4.1. Nanorurki węglowe w czujnikach elektrochemicznych	103
6. Voltamperometria.....	105
6.1. Podstawy pomiarów voltamperometrycznych.....	105
6.2. Układ pomiarowy w analizie voltamperometrycznej.....	107
6.3. Metody voltamperometryczne	108
6.3.1. Voltamperometria cykliczna.....	109
6.3.2. Voltamperometria fali prostokątnej.....	110
7. Spektrofotometria UV-Vis	113
7.1. Podstawy pomiarów spektrofotometrycznych.....	113
7.2. Układ pomiarowy w analizie spektrofotometrycznej.....	115
7.3. Zastosowanie spektrofotometrii.....	116
II. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	117
1. Cel pracy	118
2. Aparatura pomiarowa.....	119
2.1. Aparatura stosowana w pomiarach voltamperometrycznych.....	119
2.2. Aparatura stosowana w pomiarach spektrofotometrycznych	121
2.3. Aparatura stosowana w obrazowaniu AFM	122
3. Odczytniki chemiczne i roztwory podstawowe	123

4. Praca doświadczalna.....	127
4.1. Optymalizacja przygotowania powierzchni elektrod sitodrukowanych.....	129
4.1.1. Sposoby przygotowania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej.....	129
4.1.2. Procedura pomiarowa.....	130
4.1.3. Wyniki.....	131
4.1.4. Wnioski.....	134
4.2. Modyfikacja elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi.....	136
4.2.1. Przygotowanie zawiesiny nanorurek węglowych.....	136
4.2.1.1. Dobór rozpuszczalnika do sporządzenia zawiesiny nanorurek węglowych.....	136
4.2.1.2. Badanie wpływu rozpuszczalników na elektrodę oraz właściwości elektrochemiczne kwasu deoksyrybonukleinowego.....	138
4.2.1.2.1. Procedura pomiarowa.....	138
4.2.1.2.2. Wyniki.....	139
4.2.1.3. Wnioski.....	141
4.2.2. Modyfikacja nanorurkami węglowymi poprzez nakroplenie ich zawiesiny na elektrodę.....	142
4.2.2.1. Procedura pomiarowa.....	142
4.2.2.2. Dobór zawiesiny nanorurek węglowych do konstrukcji bioczuJNIKA DNA....	143
4.2.2.3. Modyfikacja nanorurkami węglowymi różnych rodzajów elektrod sitodrukowanych.....	145
4.2.2.4. Wpływ czyszczenia nanorurek węglowych na ich właściwości elektryczne	148
4.2.2.5. Wnioski.....	150
4.2.3. Nanorurki węglowe jako składnik pasty grafitowej do sitodruku.....	151
4.2.3.1. Procedura pomiarowa.....	152
4.2.3.2. Wyniki.....	153
4.2.3.3. Wnioski.....	154
4.2.4. Podsumowanie.....	155
4.3. Badanie oddziaływań różnych rodzajów DNA z błękitem metylenowym (MB).....	157
4.3.1. Badanie trwałości błękitu metylenowego w roztworze.....	157
4.3.1.1. Procedura pomiarowa.....	157
4.3.1.2. Wyniki.....	158
4.3.1.3. Wnioski.....	160
4.3.2. Badanie elektroaktywności błękitu metylenowego.....	160
4.3.2.1. Procedura pomiarowa.....	161
4.3.2.2. Wyniki.....	162
4.3.2.3. Wnioski.....	163
4.3.3. Badanie oddziaływań błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA.....	164
4.3.3.1. Elektrochemiczne czujniki sitodrukowane w badaniu oddziaływań błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA.....	164
4.3.3.1.1. Procedura pomiarowa.....	165
4.3.3.1.2. Wyniki.....	167
4.3.3.1.3. Wnioski.....	173

4.3.3.2. Badanie elektrochemicznych właściwości różnych form DNA plazmidowego	174
4.3.3.2.1. Procedura pomiarowa	174
4.3.3.2.2. Wyniki.....	176
4.3.3.2.3. Wnioski	178
4.3.3.3. Rozróżnianie różnych form DNA plazmidowego na podstawie ich oddziaływania z błękitem metylenowym	179
4.3.3.3.1. Procedura pomiarowa	179
4.3.3.3.2. Wyniki.....	180
4.3.3.3.3. Wnioski	185
4.3.3.4. Podsumowanie.....	185
4.4. Badanie oddziaływań antracyklin i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami DNA.....	187
4.4.1. Badanie trwałości antracyklin i ich formamidynowych pochodnych w roztworze.....	187
4.4.1.1. Procedura pomiarowa	188
4.4.1.2. Wyniki.....	189
4.4.1.3. Wnioski	192
4.4.2. Badanie elektroaktywności antracyklin i ich formamidynowych pochodnych	192
4.4.2.1. Procedura pomiarowa	192
4.4.2.2. Wyniki.....	193
4.4.2.3. Wnioski	195
4.4.3. Badanie oddziaływań antracyklin i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami DNA.....	196
4.4.3.1. Elektrochemiczne bioczuJNIki sitodrukowane w badaniu oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych z DNA.....	196
4.4.3.1.1. Procedura pomiarowa	197
4.4.3.1.2. Wyniki.....	199
4.4.3.1.3. Wnioski	220
4.4.3.2. Spektrofotometryczne badanie oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych z DNA.....	224
4.4.3.2.1. Procedura pomiarowa	224
4.4.3.2.2. Wyniki.....	225
4.4.3.2.3. Wnioski	229
4.4.3.3. Podsumowanie.....	230
PODSUMOWANIE.....	231
BIBLIOGRAFIA.....	234
ZAŁĄCZNIKI.....	258
SPIS ILUSTRACJI	269
SPIS TABEL	278
WYKAZ PUBLIKACJI I KONFERENCJI NAUKOWYCH.....	280

SKRÓTY UŻYTE W PRACY

2-oxoA – 2-oksoadenina (6-amino-2-oksopuryna)

8-oxoG – 8-oksoguanina (2-amino-6,8-dioksopuryna)

A – adenina

(A)₈ – jednoniciowe oligonukleotydy 8-merowe o sekwencji 5'AAAAAAAAA3'

AcB-K – bufor octanowy o stężeniu 0,25 M zawierający 10 mM KCl (pH 4,75)

AcB-Mg – bufor octanowy o stężeniu 0,25 M zawierający 18 mM MgCl₂ (pH 4,75)

AFM – mikroskopia sił atomowych (ang. Atomic Force Microscopy)

C – cytozyna

cccDNA – dwuniciowe łańcuchy kwasu deoksyrybonukleinowego o cząsteczkach kolistych bez przerwanej pojedynczej nici (ang. covalently closed circle DNA)

CFM – mikroskopia sił chemicznych (ang. Chemical Force Microscopy)

CV – woltamperometria cykliczna (ang. Cyclic Voltammetry)

CVD – piroliza katalityczna (CVD, ang. Chemical Vapour Deposition)

dA – deoksyadenozyna

dAMP (AMP) – 2'-deoksyadenozyno-5'-monofosforan

d(AT)₄ – dwuniciowe oligonukleotydy 8-merowe o sekwencji 5'ATATATAT3'

DAU – daunorubicyna

DAU-Fhex – chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-daunorubicyny, formamidynowa pochodna daunorubicyny zawierająca podstawnik heksametylenoiminowy w części daunozaminowej

DAU-Fmor – chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-daunorubicyny, formamidynowa pochodna daunorubicyny zawierająca podstawnik morfolinowy w części daunozaminowej

dC – deoksytydyna

dCMP (CMP) – 2'-deoksytydino-5'-monofosforan

dG – deoksyguanozyna

d(GC)₄ – dwuniciowe oligonukleotydy 8-merowe o sekwencji 5'GCGCGCGC3'

dGMP (GMP) – 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. Deoxyribonucleic Acid)

DOX – doksorubicyna

DOX-Fhex – chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-doksorubicyny, formamidynowa pochodna doksorubicyny zawierająca podstawnik heksametylenoiminowy w części daunozaminowej

DOX-Fmor – chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-doksorubicyny, formamidynowa pochodna doksorubicyny zawierająca podstawnik morfolinowy w części daunozaminowej

DPV – różnicowa woltamperometria pulsowa (ang. Differential Pulse Voltammetry)

dsDNA – podwójna helisa kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. double-stranded DNA)

dsDNA-ct – dwuniciowe łańcuchy DNA chromosomalnego, wyizolowanego z grasicy cielęcej (ang. calf thymus dsDNA)

dsDNA-ss – dwuniciowe łańcuchy DNA chromosomalnego, wyizolowanego ze spermy łososia (ang. salmon sperm dsDNA)

dT – deoksytymidyna

dTMP (TMP) – 2'-deoksytymidyno-5'-monofosforan

FET – tranzystor polowy (ang. Field-Effect Transistor)

G – guanina

GCE – elektroda z węgla szklanego (ang. Glassy Carbon Electrode)

IUPAC – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry)

KER – kroplowa elektroda rtęciowa (ang. DME – Dropping Mercury Electrode)

linDNA – dwuniciowe łańcuchy kwasu deoksyrybonukleinowego o cząsteczkach liniowych (ang. linear DNA)

linpGEX-4T-2 – DNA plazmidowe w formie liniowej o wielkości 4970 par zasad, wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'

linpUC19 – DNA plazmidowe w formie liniowej o wielkości 2686 par zasad, wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'

LMB – zredukowana forma błękitu metylenowego (ang. Leucomethylene Blue)

MB – błękit metylenowy (ang. Methylene Blue)

MWCNT – wielościennie nanorurki węglowe (ang. Multi-Walled Carbon Nanotubes)

NASA – Narodowa Agencja Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej (ang. National Aeronautics and Space Administration)

NEK – nasycona elektroda kalomelowa (ang. SCE – Saturated Calomel Electrode)

ocDNA – dwuniciowe łańcuchy kwasu deoksyrybonukleinowego o cząsteczkach kolistych z przerwaną jedną nicią (ang. opened-circular DNA)

relDNA – dwuniciowe łańcuchy kwasu deoksyrybonukleinowego o rozluźnionych cząsteczkach niezawierających dodatkowych skrętów (ang. relaxed DNA)

RF – ryboflawina (ang. riboflavin)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxygen Species)

RSD – względne odchylenie standardowe (ang. Relative Standard Deviation)

scDNA – kwas deoksyrybonukleinowy o kolistych cząsteczkach skręconych superhelikalnie (ang. supercoiled DNA)

scpGEX-4T-2 – DNA plazmidowe w formie superhelikalnej o wielkości 4970 par zasad, wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'

scpUC19 – DNA plazmidowe w formie superhelikalnej o wielkości 2686 par zasad, wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'

SD – odchylenie standardowe (ang. Standard Deviation)

SPE – elektroda sitodrukowana (ang. Screen-Printed Electrode)

SPE-IT – włoskie sitodrukowane układy trójelektrodowe firmy Palmsens

SPE-PL – sitodrukowane układy trójelektrodowe wytwarzane w ITME w Warszawie

ssDNA – pojedyncza nić kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. single-stranded DNA)

SWCNT – jednościenne nanorurki węglowe (ang. Single-Walled Carbon Nanotubes)

SWV – woltamperometria fali prostokątnej (ang. Square Wave Voltammetry)

T – tymina

T_m – temperatura topnienia kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. melting temperature)

WKER – wisząca kroplowa elektroda rtęciowa (ang. HMDE – Hanging Mercury Drop Electrode)

I. CZĘŚĆ LITERATUROWA

*„Po to, by być niepospolicie uczonym,
trzeba zacząć od pospolitego uczenia się.”*

Karol Dickens

WSTĘP

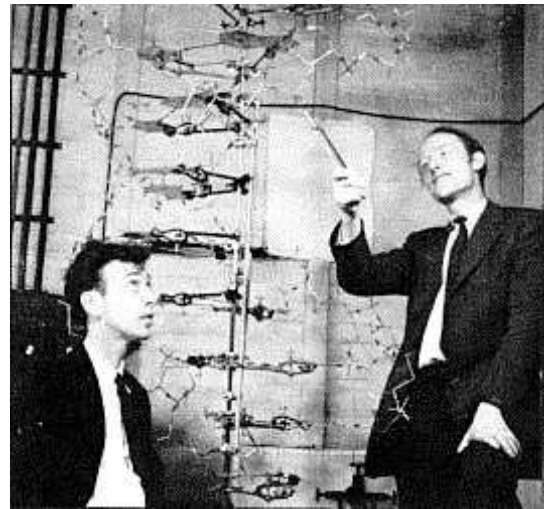
W 1962 roku Leland C. Clark, modyfikując klasyczną gazową elektrodę tlenową przez umieszczenie na jej powierzchni enzymu – oksydazy glukozowej, stworzył nowe narzędzie analityczne – bioczuJNIK elektrochemiczny. Tym samym otworzył on drogę rozwoju nowych technik analitycznych, umożliwiających wykonywanie eksperymentów z pogranicza chemii i biologii. Od tego czasu biosensory cieszą się dużą popularnością wśród naukowców i są wciąż udoskonalane zarówno przez stosowanie jako warstwy receptorowej coraz bardziej różnorodnych rodzajów materiału biologicznego, jak i przez liczne modyfikacje w konstrukcji urządzenia oraz w procedurze pomiarowej.

Na szczególną uwagę zasługują biosensory, w których biologicznym elementem receptorowym jest warstwa kwasu deoksyrybonukleinowego, odgrywającego ogromną rolę w procesach biologicznych jako nośnik informacji genetycznej. Badania z wykorzystaniem DNA dostarczają wielu istotnych informacji na temat oddziaływania różnych indywidualów chemicznych z nicią kwasu, mutacji występujących w łańcuchach DNA oraz chorób genetycznych.

Obecnie kierunki rozwoju elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA obejmują przede wszystkim poszukiwanie nowych metod unieruchamiania łańcuchów kwasu na elektrodzie, różnorodne modyfikacje powierzchni przetworników, miniaturyzację układów pomiarowych oraz automatyzację wykonywanych pomiarów. Ma to przede wszystkim na celu konstrukcję tanich, skutecznych i prostych w obsłudze narzędzi, które w przyszłości mogłyby być dostępne komercyjnie i stosowane nawet przez niewykwalifikowane osoby w oznaczeniach medycznych, farmakologicznych oraz środowiskowych.

1. DNA, czyli kwas deoksyrybonukleinowy

Po raz pierwszy został wyizolowany w roku 1896 przez Friedricha Mieschera i nazwany wówczas nukleina, lecz prawdziwą rewolucją w świecie nauki było określenie jego trójwymiarowej struktury przez Jamesa Watsona i Francis Cricka w roku 1953 (RYS. 1) [1]. Jego cząsteczki mają szerokość 2 nm i są na tyle małe, że mieszczą się w jądrze komórkowym, którego średnica wynosi około 5 μm [2], a jednocześnie tak duże, że w przypadku komórki ludzkiej po rozwinięciu osiągają długość blisko 2 metrów [3]. Zmiany w jego strukturze są siłą napędową ewolucji w świecie organizmów żywych, a jednocześnie mogą prowadzić do ciężkich, nieuleczalnych chorób genetycznych, które nierzadko kończą się śmiercią [4]. Najnowsze doniesienia Narodowej Agencji Aeronautyki i Przestrzeni Kosmicznej (ang. National Aeronautics and Space Administration, NASA) głoszą, iż jego składniki mogą mieć kosmiczne pochodzenie [5], a naukowcy z Instytutu Weizmanna w Izraelu w 2001 roku jako pierwsi wykorzystali go do konstrukcji komputera, który zamiast sygnałów elektrycznych do działania wykorzystuje reakcje enzymatyczne [6] (RYS. 2) [7].



RYS. 1 – James Watson i Francis Crick z oryginalnym modelem helisy DNA [1].



RYS. 2 – Prof. Ehuda Shapiro i Yaakov Benenson prezentują komputer DNA [7].

Wszystkie powyższe informacje dotyczą jednej i tej samej substancji – DNA, czyli kwasu deoksyrybonukleinowego. Jest on biomolekułą, mającą postać długich, nierozgałęzionych polimerów, stanowiącą podstawę życia i funkcjonowania żywych organizmów. Za pośrednictwem DNA informacje genetyczne przekazywane są organizmom potomnym oraz w nim zakodowane są informacje o tym, jakie białka mają być syntetyzowane przez daną komórkę [2].

DNA jako kompletny zestaw genów organizmu stanowi przedmiot zainteresowania badaczy wielu różnych dziedzin naukowych, ale ostatnio przebojem wkracza on również w inne „nienaukowe” obszary życia. Stał się on inspiracją dla artystów, którzy chętnie czynią z niego tematy swoich prac (RYS. 3 A, B) [8, 9], architektów, dla których jego struktura staje się podstawą konstruowanych obiektów (RYS. 3 C, D) [10, 11], dekoratorów wnętrz, którzy wprowadzają jego kształt do przedmiotów codziennego użytku (RYS. 3 E, F) [12, 13], czy projektantów mody, którzy DNA wykorzystują jako motyw dekoracyjny odzieży i biżuterii (RYS. 3 G, H) [14, 15].



RYS. 3 – Wykorzystanie motywu DNA w różnych dziedzinach życia codziennego: A – Pomnik ku czci Francisca Cricka w Northampton projektu Lucy Glendinning [8], B – Indywidualny portret DNA wykonany przez firmę Artres [9], C – Most DNA w Marina Bay w Singapurze projektu australijskiej firmy Cox Group, firmy Arup i singapurskiej grupy Architects 61 [10], D – Wieża DNA w Kings Park w Zachodniej Australii [11], E – Lampa PiroLED w kształcie DNA produkcji firmy Osram [12], F – Elegancki stół z nogami inspirowanymi strukturą DNA projektu Paula Leobach [13], G – Koszulka z motywem DNA marki Gildan [14], H – Kolczyki w kształcie helisy DNA [15].

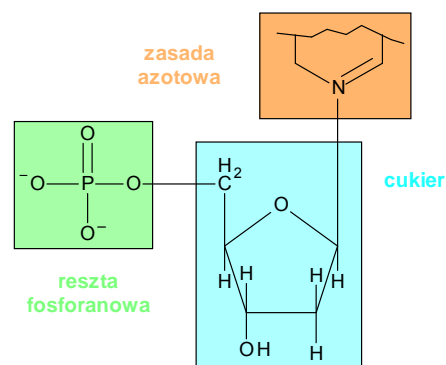
1.1. Budowa DNA

Kwas deoksyrybonukleinowy jest związkiem chemicznymi zbudowanym zaledwie z pięciu pierwiastków: węgla, wodoru, tlenu, azotu i fosforu. Jest to makrocząsteczka o stosunkowo prostej budowie [4], ale jednocześnie ze względu na pełnione funkcje musi mieć ona strukturę umożliwiającą sprawne odczytywanie i przekazanie informacji genetycznej. DNA jest biopolimerem o długich nierozgałęzionych łańcuchach, składających się z różnej liczby monomerów, zależnej od gatunku, np. wirus polioma zawiera DNA zbudowane z 5100 monomerów [16], podczas gdy cząsteczka DNA ludzkiego może być zbudowana nawet z 220 milionów monomerów [17].

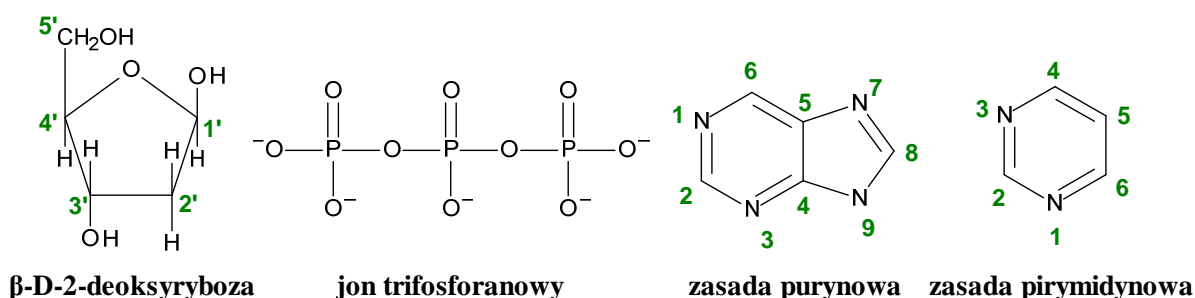
1.1.1. Monomery DNA

Jednostki monomeryczne tworzące DNA noszą nazwę deoksyrybonukleotydów (RYS. 4). Każdy z nich zbudowany jest z trzech elementów (RYS. 5):

- cyklicznego pięciowęglowego cukru prostego – β -D-2-deoksyrybozy, która od wyjściowej pentozy różni się brakiem atomu tlenu przy drugim atomie węgla,
- jednej, dwóch lub trzech reszt kwasu fosforowego (V),
- heterocyklicznej zasady azotowej, będącej pochodną puryny lub pirymidyny [16].

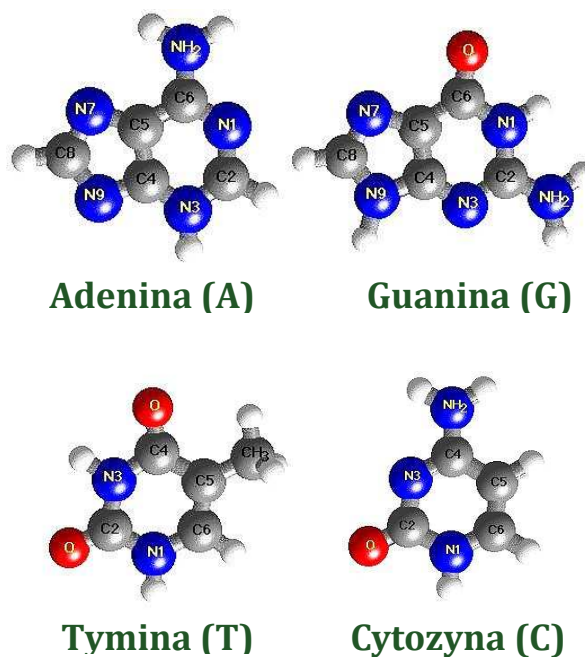


RYS. 4 – Budowa deoksyrybonukleotydu.



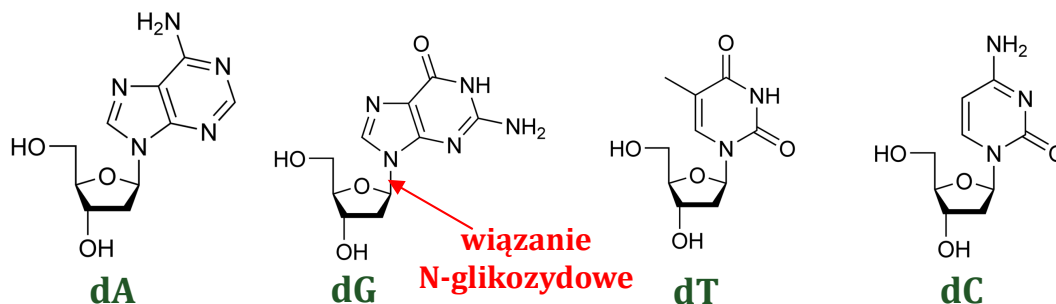
RYS. 5 – Elementy tworzące deoksyrybonukleotyd.

Zasady nukleinowe, tworzące strukturę DNA, są związkami aromatycznymi, zawierającymi w płaskim pierścieniu atomy węgla i azotu. W skład każdego deoksyrybonukleotydu wchodzi jedna z czterech zasad. Dwie z nich – guanina (G) i adenina (A) są pochodnymi dwupierścieniowej puryny, zaś pozostałe dwie – cytozyna (C) i tymina (T) to pochodne jednopierścieniowej pirymidyny (RYS. 6) [18]. Zarówno guanina i adenina, jak i cytozyna i tymina różnią się między sobą jedynie grupami egzocyklicznymi [19].



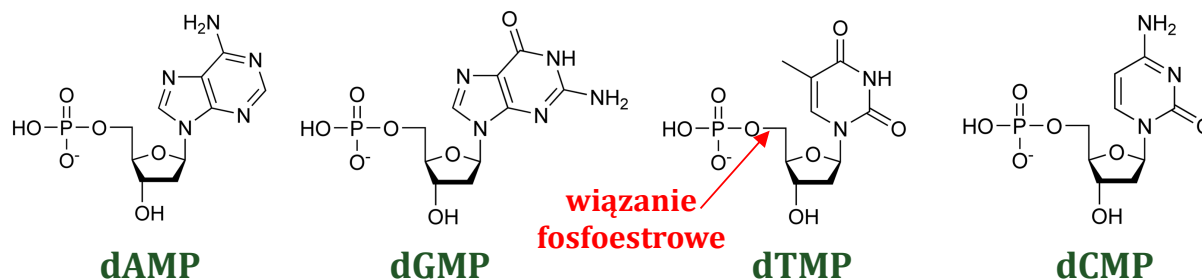
RYS. 6 – Wzory strukturalne zasad nukleinowych tworzących deoksyrybonukleotydy [18].

Wszystkie elementy tworzące deoksyrybonukleotyd są ze sobą połączone w ściśle określony sposób. Dana zasada nukleinowa związana jest z cząsteczką deoksyrybozy poprzez wiązanie N-glikozydowe o konfiguracji β , co oznacza, że zasada położona jest nad płaszczyzną wyznaczaną przez pierścień cukrowy. Wiązanie to tworzy się pomiędzy węglem C-1' deoksyrybozy a azotem N-9 zasady purynowej bądź azotem N-1 zasady pirymidynowej. W wyniku połączenia zasady purynowej lub pirymidynowej z cukrem tworzy się związek o nazwie nukleozyd. Tak więc w przypadku DNA mamy do czynienia z czterema rodzajami nukleozydów: deoksyguanozyną (dG), deoksyadenozyną (dA), deoksytymidyną (dT) i deoksyocytydyną (dC) [16, 19] (RYS. 7).



RYS. 7 – Budowa deoksyrybonukleozydów.

Aby powstał deoksyrybonukleotyd, stanowiący jednostkę budulcową DNA, do deoksyrybonukleozydu musi zostać przyłączona przynajmniej jedna grupa fosforanowa. Polega to na utworzeniu wiązania fosfoestrowego pomiędzy resztą kwasu fosforowego (V) a atomem tlenu grupy hydroksylowej znajdującej się przy atomie węgla C-5' cząsteczki cukru. Wówczas powstaje ester fosforanowy danego deoksyrybonukleozydu. Z cukrem może łączyć się ugrupowanie fosforanowe zawierające jedną, dwie lub trzy reszty fosforanowe połączone ze sobą, lecz w strukturze DNA występują jedynie nukleotydy z jedną resztą fosforanową. Kwas deoksyrybonukleinowy tworzony jest przez cztery rodzaje nukleotydów: 2'-deoksyadenozyno-5'-monofosforan (dAMP), 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan (dGMP), 2'-deoksytymidyno-5'-monofosforan (dTMP) oraz 2'-deoksyocytydino-5'-monofosforan (dCMP) [20] (RYS. 8).

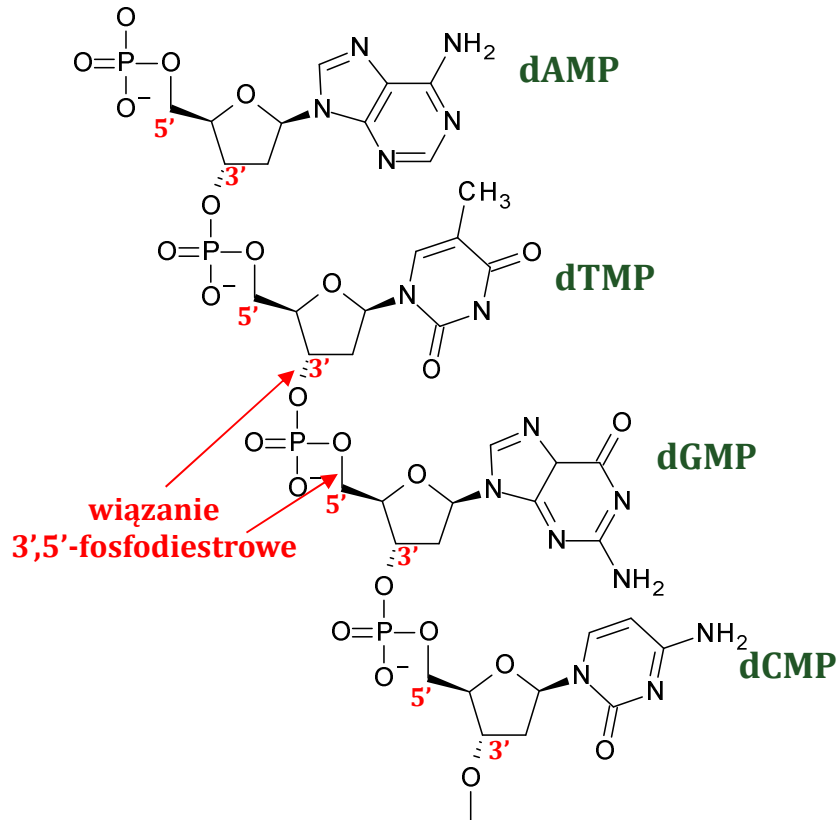


RYS. 8 – Budowa deoksyrybonukleotydów.

1.1.2. Pojedyncza nić DNA

Pojedyncza nić DNA (ssDNA – ang. single-stranded DNA) tworzona jest przez połączenie kolejnych deoksyrybonukleotydów w ściśle określony sposób. W cząsteczce deoksyrybozy grupa hydroksylowa węgla C-4' jest podstawiona na skutek utworzenia formy pierścieniowej, węgiel C-2' pozbawiony jest grupy hydroksylowej, a grupa hydroksylowa w pozycji 5' jest zaangażowana w utworzenie wiązania fosfoestrowego z fosforanem, więc jedynie grupa hydroksylowa przy węglu C-3' może uczestniczyć w procesie łączenia kolejnych monomerów DNA [21]. W syntezie łańcucha

polinukleotydowego biorą udział 4 rodzaje trifosforanów deoksyrybonukleotydów. Dochodzi do ataku nukleofilowego grupy 3'-OH danego deoksyrybonukleotydu na atom fosforu kolejnego trifosforanu deoksyrybonukleotydu położony najbliżej deoksyrybozy. Wówczas następuje eliminacja grupy hydroksylowej, uwalniane są dwie skrajne reszty fosforanowe w postaci pirofosforanu i tworzy się wiązanie pomiędzy fosforanem przy węglu C-5' jednego deoksyrybonukleotydu a węglem C-3' kolejnego [16]. Wiązanie utworzone w ten sposób ma charakter wiązania estrowego i nazywane jest wiązaniem 3',5'-fosfodiestrowym. W analogiczny sposób przyłączane są kolejne deoksyrybonukleotydy i powstaje struktura długiego łańcucha.



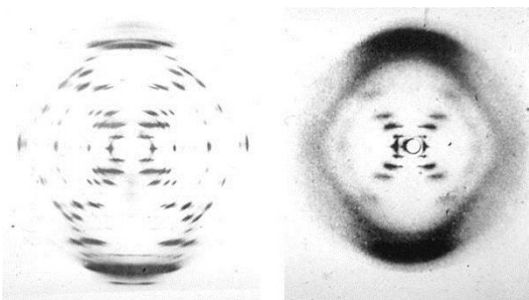
RYS. 9 – Fragment pojedynczej nici DNA.

W strukturze, powstającej w opisany powyżej sposób, naprzemiennie połączone są ze sobą reszty cukrowe i fosforanowe, które stanowią niezmienny szkielet polinukleotydu. Jedynym zmiennym elementem jest kolejność zasad azotowych (RYS. 9). W nici polinukleotydowej wszystkie grupy 3'- i 5'-hydroksylowe, oprócz tych na końcach łańcucha, uczestniczą w tworzeniu wiązań fosfoestrowych. W rezultacie powoduje to polarność ssDNA, gdyż jego koniec 5', zawiera niezwiązany fosforan, a koniec 3' wolną grupę hydroksylową cukru [19]. Przy określaniu sekwencji zasad azotowych przyjmuje się kierunek nici od końca 5' do końca 3' (5' → 3').

1.1.3. Podwójna nić DNA

Przestrzenna struktura DNA długo pozostawała nierozwikłaną zagadką. Milowym krokiem, zbliżającym do jej rozwiązania, były zdjęcia rentgenograficzne kryształów DNA wykonane w 1952 roku przez Mauricea Wilkinsa i Rosalindę Franklin z King's College w Londynie. Zdjęcia te przedstawiały obrazy dyfrakcyjne uzyskane dla dwóch różnych soli DNA i wskazywały na helikalność cząsteczki oraz pozwalały określić jej główne wymiary [1, 2] (RYS. 10) [22]. Po tych dokonaniach rozpoczął się wyścig, kto pierwszy odkryje prawidłową strukturę DNA. Pojawiały się różne teorie, a wśród nich także Linusa Paulinga, przypisująca DNA strukturę potrójnej helisy (RYS.

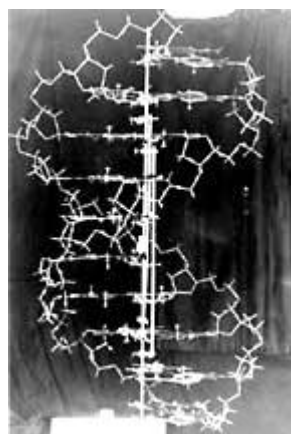
11) [23], skupiającej wewnątrz grupy fosforanowe, na zewnątrz zaś zasady azotowe. Założenia te były jednak błędne, gdyż zgromadzony wewnątrz ładunek ujemny spowodowałby natychmiastowy rozpad takiej struktury [1]. Absolutny przełom nastąpił w roku 1953, kiedy James Watson i Francis Crick, pracując w Cambridge University w Anglii, zebrali wszystkie dotychczasowe informacje o DNA i zdołali opracować jego prawidłową trójwymiarową strukturę [24]. Przedstawili oni DNA jako podwójną helisę, wewnątrz której znajdują się komplementarnie sparowane zasady azotowe, a na zewnątrz reszty cukrowe i fosforanowe (RYS. 12) [25]. Watson, Crick i Wilkins za to odkrycie otrzymali w 1962 roku nagrodę Nobla.



RYS. 10 – Zdjęcia rentgenowskie uwodnionych włókien DNA w postaci soli litowej (A) i sodowej (B) wykonane przez M. Wilkinsa i R. Franklin [22].



RYS. 11 – Model potrójnej helisy DNA zaproponowany przez Linusa Paulinga [23].

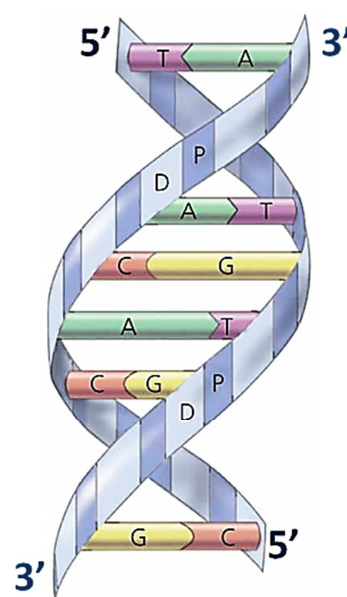


RYS. 12 – Oryginalna podwójna helisa DNA skonstruowana przez J. Watsona i F. Ccricka [25].

Podwójna nić DNA (dsDNA – ang. double-stranded DNA) zbudowana jest z dwóch łańcuchów polinukleotydowych, które oplatają się wokół siebie i ulegają skręceniu wokół własnej osi (RYS. 13) [26]. Ułożone są one antyrównolegle, co oznacza, iż nić o kierunku 5'→3' łączy się komplementarnie z nicią o kierunku 3'→5'. Powstała w ten sposób spirala zawiera na zewnątrz szkielet cukrowo-fosforanowy, zaś wewnątrz komplementarne pary zasad azotowych, ułożone jedna nad drugą jak szczeble drabiny [4].

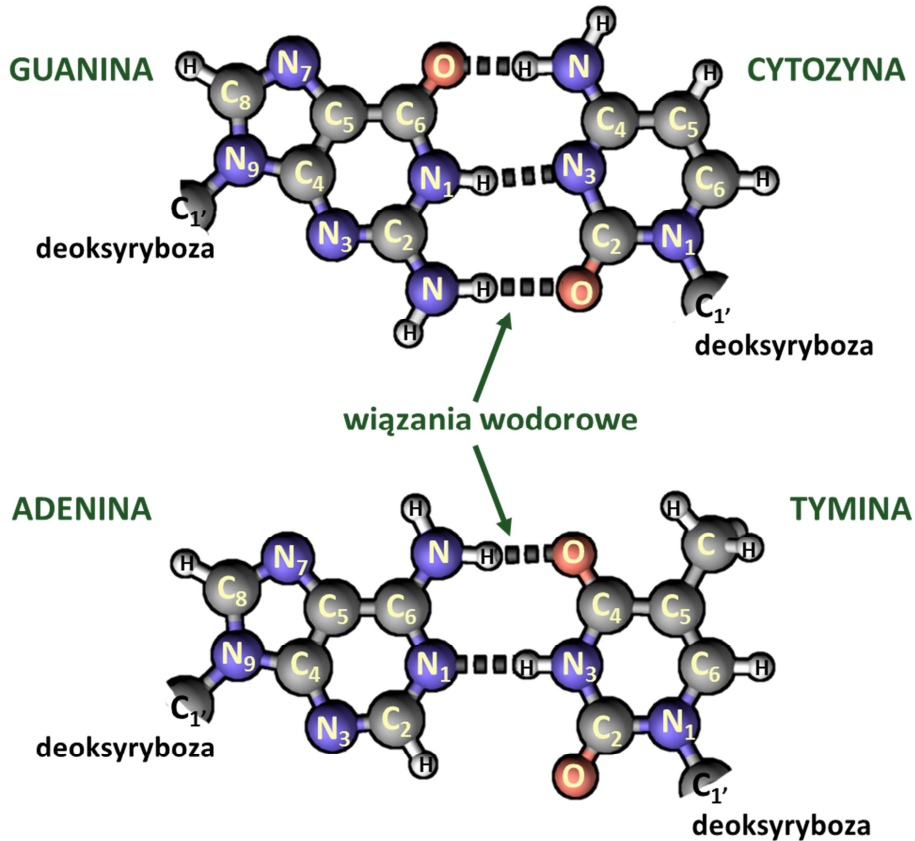
Biorąc pod uwagę stabilność i strukturę podwójnej helisy, sumaryczna wielkość sparowanych zasad musi być taka sama, by mogły zmieścić się wewnątrz spirali. Zważywszy na to, dwupierścieniowa puryna łączy się zawsze z jednopierścieniową pirymidyną. Drugim czynnikiem, warunkującym parowanie się zasad azotowych, jest możliwość utworzenia wiązań wodorowych w określonym miejscu cząsteczki danej zasady [20]. Wymogom tym może sprostać tylko jeden sposób połączenia zasad azotowych (RYS. 14) [27]:

- guanina związana jest z cytozyną za pomocą trzech wiązań wodorowych (G≡C) – wiązania te tworzą się pomiędzy:
 1. grupą aminową przy węglu C-4 cytozyny a tlenem przy węglu C-6 guaniny,

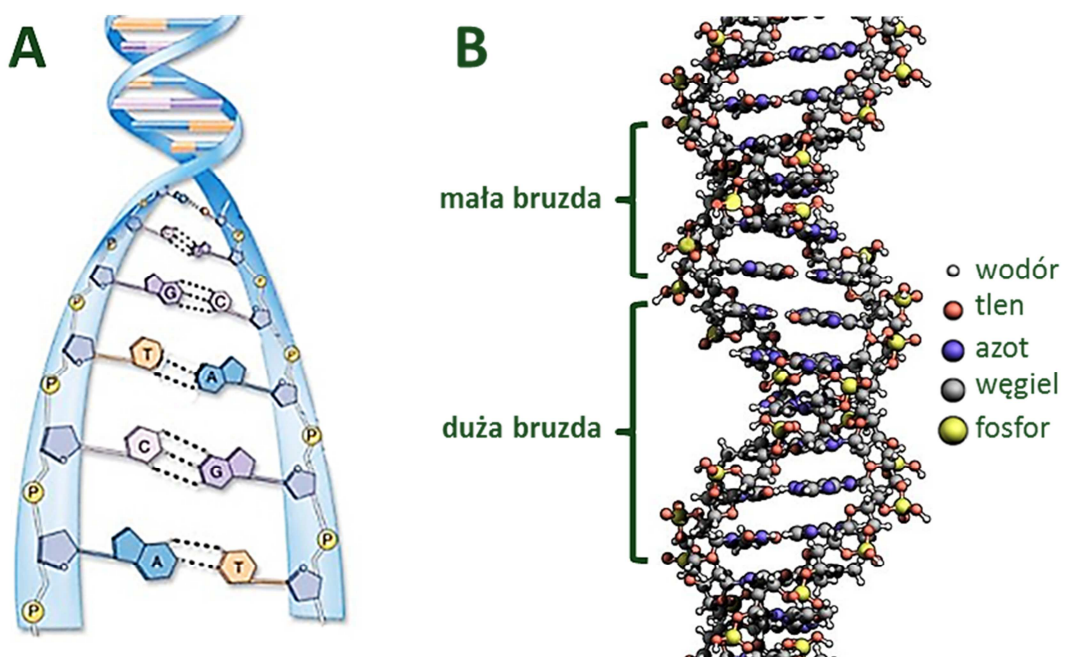


RYS. 13 – Model podwójnej helisy DNA (A – adenina, T – tymina, C – cytozyna, G – guanina, D – deokseryboza, P – fosforan) [26].

2. azotem N-3 cytozyny a wodorem przy azocie N-1 guaniny,
 3. tlenem przy węglu C-2 cytozyny a grupą aminową przy węglu C-2 guaniny;
- adenina związana jest z tyminą za pomocą dwóch słabszych wiązań wodorowych (A=T) – wiązania te tworzą się pomiędzy:
 1. tlenem przy węglu C-4 tyminy a grupą aminową przy węglu C-6 adeniny,
 2. wodorem przy azocie N-3 tyminy a azotem N-1 adeniny [28].

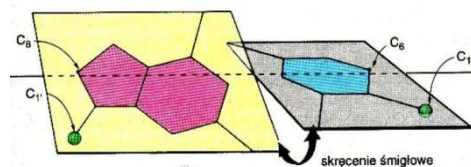


RYS. 14 – Komplementarne pary zasad azotowych [27].



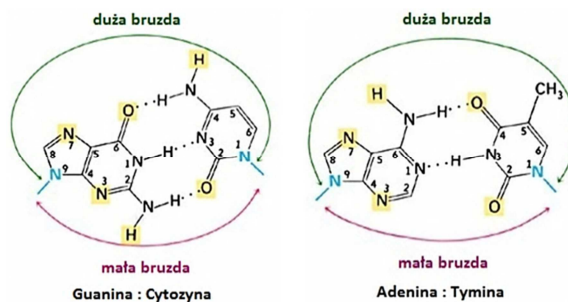
RYS. 15 – Podwójna helisa DNA: A – komplementarność dwóch nici polinukleotydowych, B – model atomowy [27].

Struktura przestrzenna dsDNA jest ściśle określona (RYS. 15) [27, 29]. Cząsteczki deoksyrybozy, wchodzące w skład zewnętrznego szkieletu cukrowo-fosforanowego, zorientowane są w taki sposób, że ich płaszczyzny są prostopadłe do zasad azotowych, ukrytych wewnątrz helisy. Płaszczyzny poszczególnych zasad azotowych natomiast, ułożone są prostopadłe do osi helisy, ale jednocześnie pierścienie komplementarnych par zasad nie leżą dokładnie w tej samej płaszczyźnie. Są one lekko skręcone względem siebie jak łopaty śmigła (RYS.16) [16].



RYS.16 – Skręcenie względem siebie płaszczyzn dwóch komplementarnych zasad azotowych w dsDNA [16].

Inną asymetrycznością w helisie DNA jest ułożenie wiązań glikozydowych komplementarnych zasad azotowych. Wiązania te nie leżą idealnie naprzeciwko siebie, a konsekwencją tego jest występowanie na powierzchni nici dwóch wgłębień – dużej i małej bruzdy (rowka). Sparowane zasady są ułożone w określony sposób względem rowków. Do małego rowka skierowany jest azot N-3 puryny oraz tlen O-2 pirymidyny danej pary zasad, do dużego zaś przeciwna strona komplementarnych zasad (RYS. 17) [16]. W bruzdach znajduje się wiele atomów i grup, które stanowią donory i akceptory wodoru (Tabela 1), a więc są one miejscami, gdzie potencjalnie mogą tworzyć się wiązania wodorowe z molekułami innych substancji [16].



RYS. 17 – Usytuowanie komplementarnych par zasad względem bruzd dsDNA [16].

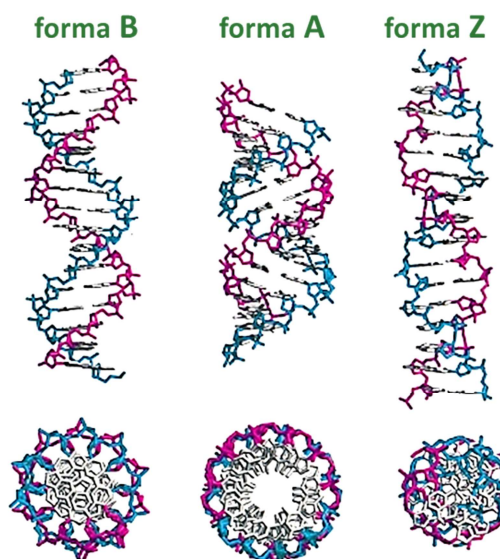
TABELA 1 – Potencjalne centra akceptorowe i donorowe wiązań wodorowych w dużej i małej bruzdzie dsDNA.

Zasada azotowa	Duża bruzda		Mała bruzda	
	akceptory	donory	akceptory	donory
Guanina	N-7, O przy C-6	-	N-3	NH ₂ przy C-2
Cytozyna	-	NH ₂ przy C-4	O przy C-2	-
Adenina	N-7	NH ₂ przy C-6	N-3	-
Tymina	O przy C-4	-	O przy C-2	-

1.1.4. Formy DNA

Badania rentgenograficzne DNA wykazały, że można wyróżnić liczne II-rzędowe struktury DNA obecne zarówno w próbkach naturalnych, jak i syntetycznych. W zależności od warunków udało się otrzymać następujące formy: A, A', B, α -B', β -B'', C, C'', D, E, T, Z. Najistotniejsze spośród nich to A, B oraz Z (RYS.18) [30]. Formy te różnią się między sobą kierunkiem skrętu helisy, wymiarami oraz kształtem. To, jaką formę przyjmuje dany łańcuch dsDNA, zależy między innymi od środowiska i sekwencji zasad [28].

Naturalne cząsteczki DNA przyjmują najczęściej formę B. Występuje ona w środowisku wodnym, a jej obraz rentgenograficzny wskazuje na strukturę parakrystaliczną, w której monomery są ułożone równoległe, ale mniej regularnie [21]. Formę tę



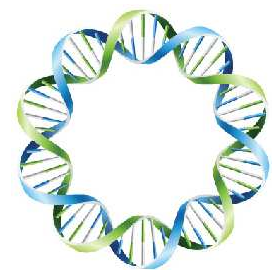
RYS.18 – Najpopularniejsze formy dsDNA [30].

przyjmują również dwuniciowe kompleksy oligo- i polinukleotydów w wodnych roztworach o małej sile jonowej i pH bliskim obojętnemu [28]. Forma A-DNA z kolei jest charakterystyczna dla środowiska mniej uwodnionego, gdyż grupy fosforanowe wiążą wówczas o kilka cząsteczek wody mniej niż struktura B-DNA. Odwodnienie środowiska prowadzi zatem do przekształcenia B-DNA w A-DNA [31]. W warunkach *in vivo* konfigurację A można zauważyć dla hybryd DNA-RNA oraz dwuniciowych rejonów RNA [16]. Niezwykle interesującą strukturę DNA stanowi forma Z. Jako jedyna z odkrytych dotychczas struktur DNA charakteryzuje się lewoskrętnością. Forma ta występuje w krótkich fragmentach oligonukleotydowych zbudowanych z reszt purynowych i pirymidynowych występujących naprzemiennie i jest ona specyficzna dla powtarzającej się sekwencji GC w łańcuchu polinukleotydowym. W formie tej grupy fosforanowe leżą bardzo blisko siebie i zminimalizowaniu oddziaływań elektrostatycznych między nimi sprzyja środowisko o dużym stężeniu soli [16]. Porównanie charakterystycznych cech najbardziej popularnych konfiguracji DNA przedstawiono poniżej (Tabela 2) [16].

TABELA 2 – Porównanie charakterystycznych cech podstawowych form dsDNA [16].

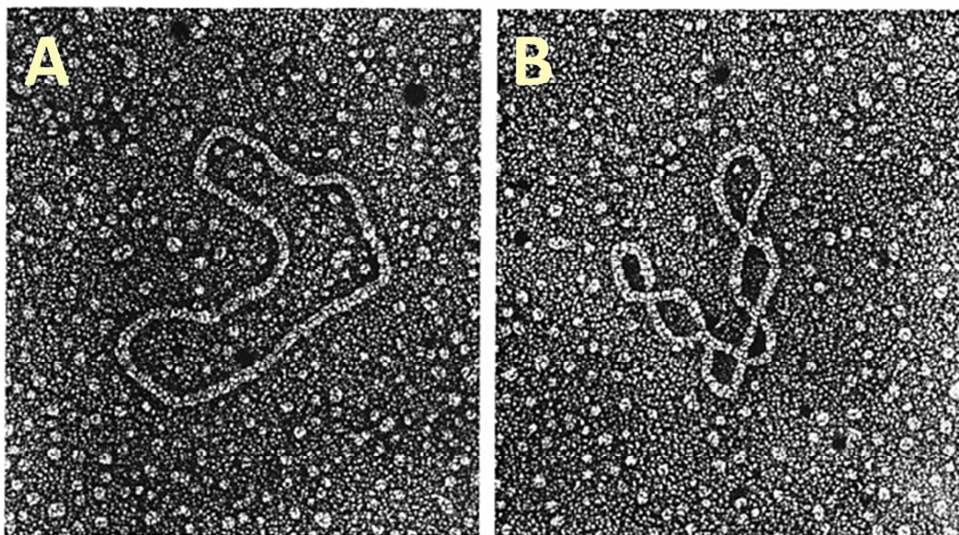
Cecha	Forma DNA		
	A	B	Z
kierunek skrętu	prawoskrętna	prawoskrętna	lewoskrętna
średnica helisy [nm]	2,55	2,37	1,84
skok helisy [nm]	2,53	3,54	4,56
liczba par zasad na skręt helisy	11	10,4	12
odległość między kolejnymi parami zasad [nm]	0,23	0,34	0,38
odchylenie pary zasad od prostopadłej osi helisy	19°	1°	9°
konformacja reszty cukrowej	C-2'-endo	C-3'-endo	C-2'-endo dla pirymidyn C-3'-endo dla puryn
duży rowek	wąski i bardzo głęboki	szeroki i dość głęboki	płaski
mały rowek	bardzo szeroki i płytki	wąski i dość głęboki	bardzo wąski i głęboki

Dotychczas DNA zostało zdefiniowane jako polimer o długich, nierozgałęzionych, liniowych cząsteczkach, lecz może ono przyjmować także strukturę kolistą (RYS. 19) [32], przy czym określenie to nie opisuje geometrycznego kształtu molekuly, a wskazuje na ciągłość łańcucha DNA i kowalencyjne połączenie jego końców [16]. Tego typu cząsteczki występują powszechnie w przyrodzie, stanowią materiał genetyczny części wirusów, chromosomalne i pozachromosomalne DNA w komórkach bakteryjnych, czy też molekuly kwasu deoksyrybonukleinowego w mitochondriach i chloroplastach [21].



RYS. 19 – Kolistą cząsteczka DNA [32].

Dwuniciowe kolisty cząsteczki DNA mogą przybierać różne formy. Jeśli molekula taka nie zawiera żadnych dodatkowych splotów, znajduje się w formie rozluźnionej (zrelaksowanej) (RYS. 20A) [33]. Jeżeli natomiast ulega ona skręcaniu, zginaniu, otwarciu w wyniku przzerwania jednej bądź obu nici i ponownemu ich połączeniu, w cząsteczce powstają naprężenia i staje się ona niestabilna energetycznie. Aby przeciwdziałać takiemu stanowi, dochodzi do jej dalszego skręcenia wokół samej siebie, w wyniku czego tworzy się forma superhelikalna (RYS. 20B) [33], która jest bardziej zwarta i pomaga w energetycznej stabilizacji struktury [34].



RYS. 20 – Kolistka cząsteczka dsDNA: A - forma zrelaksowana, B - forma superhelikalna [33].

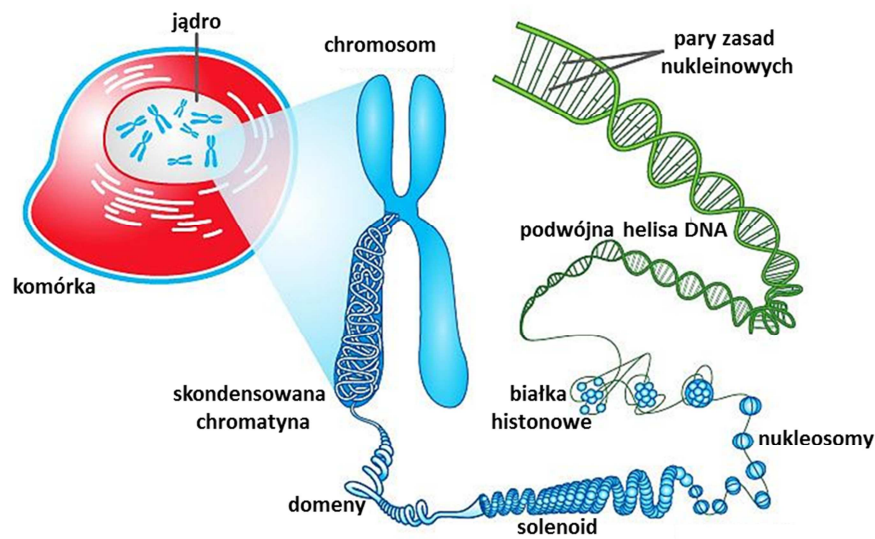
1.2. Znaczenie biologiczne DNA

Komórka jest najmniejszym elementem świata żywego, w którym toczy się życie. Komórki różnią się między sobą złożonością budowy, lecz każda z nich wykazuje niebywałą zdolność do samodzielnego prowadzenia wszystkich procesów życiowych. Prawie każda żywa komórka zawiera kwas deoksyrybonukleinowy, który jest powielany i przekazywany podczas podziału komórkowego.

Sposób organizacji DNA w komórce zależy jednak od stopnia jej złożoności. W komórkach najprostszych jednokomórkowych organizmów – Prokaryota materiał genetyczny skupiony jest w jednym lub kilku miejscach, zwanych nukleoidami, lecz nie jest on oddzielony żadną błoną od pozostałych organelli. Ze względu na swą długość DNA musi być ściśnięty i upakowany w komórce. Ma on postać pojedynczego kolistego chromosomu, a struktura ta utrzymywana jest przy udziale wyspecjalizowanych białek [2].

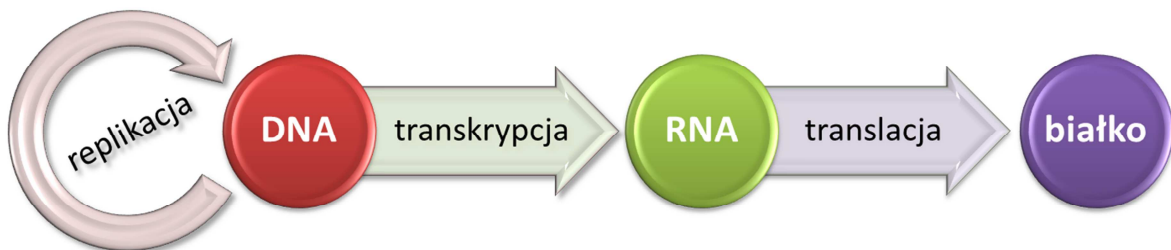
Zupełnie inna sytuacja ma miejsce w komórkach organizmów wyższych. Eukarionty zawierają wiele organelli, a wśród nich najistotniejsze jest jądro, w którym zgromadzony jest materiał genetyczny. Od cytoplazmy oddziela je podwójna porowata otoczką, a wewnątrz znajduje się kariolimfa, zanurzone w niej jąderko oraz chromatyna, stanowiąca kompleks DNA i białek [35]. Chromatyna ma postać nieregularnej sieci złożonej z włókien (łańcuchów DNA) oraz ziarnistości (białek histonowych i niehistonowych). Chromatyna może przybierać różne formy w zależności od fazy rozwojowej komórki. Zawsze jednak jest ona upakowana, gdyż w inny sposób długie nici polinukleotydowe nie zmieściłyby się w jądrze (RYS. 21) [36]. Ujemnie naładowane łańcuchy DNA oplatają się wokół kwaśnych białek histonowych, tworząc charakterystyczne struktury zwane nukleosomami. Nukleosom tworzony jest przez nici DNA składającą się z około 140 par zasad, owiniętą na rdzeń zbudowany z dwóch dysków ułożonych równolegle, przy czym każdy z dysków zawiera po jednej cząsteczce histonów typu H2A, H2B, H3, H4. Inny histon (H1) stanowi element spinający i łączący kolejne nukleosomy ze sobą. Długość DNA pomiędzy nukleosomami jest różna i zależy od gatunku [2, 20]. Kolejnym etapem upakowania materiału genetycznego jest zwinięcie łańcucha nukleosomów w charakterystyczną ciasną „rurkę” – solenoid o średnicy 36 nm, który z kolei tworzy następnie pofałdowane pętle ułożone obok siebie, tak zwane domeny. Ostatnim stadium organizacji DNA w komórce są chromosomy, które stanowią najbardziej zwarte struktury, a stan ten jest osiągnięty podczas podziału komórki. Dzięki tak skomplikowanemu mechanizmowi

zwijania materiału genetycznego jego długość w porównaniu z prostą nicią DNA może zostać skrócona nawet około 10000 razy [16].



RYS. 21 – Upakowanie materiału genetycznego w jądrze komórkowym komórki eukariotycznej [36].

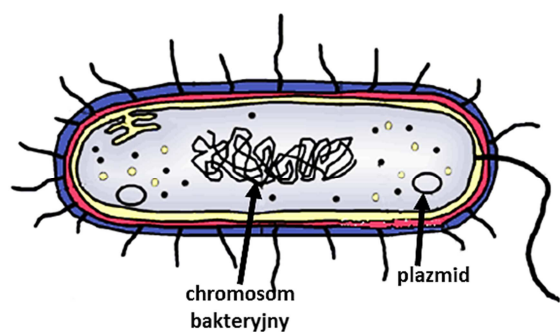
Kwas deoksyrybonukleinowy to materia, stanowiącą podstawę życia i funkcjonowania żywych organizmów. To w nim zapisane są dane dotyczące syntetyzowanych białek oraz informacja genetyczna przekazywana organizmom potomnym. Schemat ukazujący przepływ informacji od DNA, przez RNA do białka został skrótowo zapisany w centralnym dogmacie biologii molekularnej (RYS. 22) [37].



RYS. 22 – Centralny dogmat biologii molekularnej.

1.3. Plazmidy

W komórkach wielu organizmów prokariotycznych i nielicznych eukariotycznych, oprócz chromosomalnego materiału genetycznego, występują również autonomiczne, pozachromosomowe cząsteczki DNA zwykle o kształcie kolistym, rzadziej liniowym (RYS. 23) [38]. Plazmidy, bo o nich tutaj mowa, cechuje całkowita niezależność i fizyczna odrębność od chromosomu. Ich obecność nie jest niezbędna danej komórce do życia, ale dzięki nim zyskuje ona dodatkowe cechy, które umożliwiają jej przystosowanie się do danych warunków bytowych, oraz odgrywają istotną rolę w ewolucji [39].



RYS. 23 – Organizacja DNA w komórce bakteryjnej [38].

Termin plazmid po raz pierwszy został użyty w roku 1952 przez Joshua Lederberga, lecz wówczas obejmował on wszystkie znane „pozachromosomowe cząstki genetyczne”, a więc także

pasożyty, symbionty, organelle, wirusy. Dopiero 10 lat później terminu plazmid zaczęto używać zgodnie z obowiązującą współcześnie definicją. Jednak już na przełomie lat 40. i 50. XX wieku podczas badań nad rekombinacją u bakterii *Escherichia coli* K12 odkryta została cząstka, spełniająca kryteria obecnej definicji plazmidów. Nosiła ona nazwę faktor F (ang. Fertility – płodność), gdyż gwarantowała komórce zdolność przekazywania materiału genetycznego innej komórce podczas bezpośredniego kontaktu. Kolejnym bardzo istotnym krokiem dla postępu badań nad plazmidami było opisanie w roku 1960 przez Mitsuhashi pierwszego plazmidu typu R (ang. Resistance – opór). Był nim plazmid NR1 izolowany z *Schigella flexneri* strain 222/CTS, warunkujący oporność na chloramfenikol, tetracyklinę i streptomycynę. Następnie na początku lat 70. zidentyfikowano pierwsze plazmidy kataboliczne oraz rozpoczęto pionierskie eksperymenty z naturalnymi plazmidami, co dało początek inżynierii genetycznej [39]. Dotychczas odkryto już wiele różnorodnych plazmidów i wciąż izoluje się nowe zarówno naturalne, jak i zmutowane.

Ze względu na bogactwo form i rodzajów izolowanych plazmidów ważną kwestią jest ich nazewnictwo, które pozwala na ich systematyczne uporządkowanie. Początkowo podstawą nadawania im nazw były cechy fenotypowe, jakie obecność danego plazmidu wprowadzała do komórki gospodarza (np. R – plazmidy gwarantujące oporność na antybiotyki, CAM – plazmidy umożliwiające degradację kamfory, czy Col – plazmidy odpowiedzialne za produkcję kolicyn. Ze względu na nieustanny wzrost liczby poznawanych plazmidów zapewniających taką samą cechę fenotypową gospodarza, z czasem do tych prostych oznaczeń dodawano inne litery oraz liczby. W krótkim czasie doprowadziło to do wielu niejasności i nieporozumień w nazewnictwie. Wówczas Novick zaproponował w roku 1976 pewnego rodzaju standaryzację w nadawaniu nazw plazmidom. Polegała ona na tym, że odtąd plazmidy miały być oznaczane symbolami literowymi poprzedzonymi małą literą „p” oraz numerami. Symbole literowe pochodziły zwykle od nazwisk ich odkrywców lub ośrodków, w których pracowali (np. pBR322 to plazmid skonstruowany przez Bolivara i Rodrigueza jako 322 plazmid w ich kolekcji, a pUB to seria plazmidów pochodzących z laboratorium University of Bristol [39].

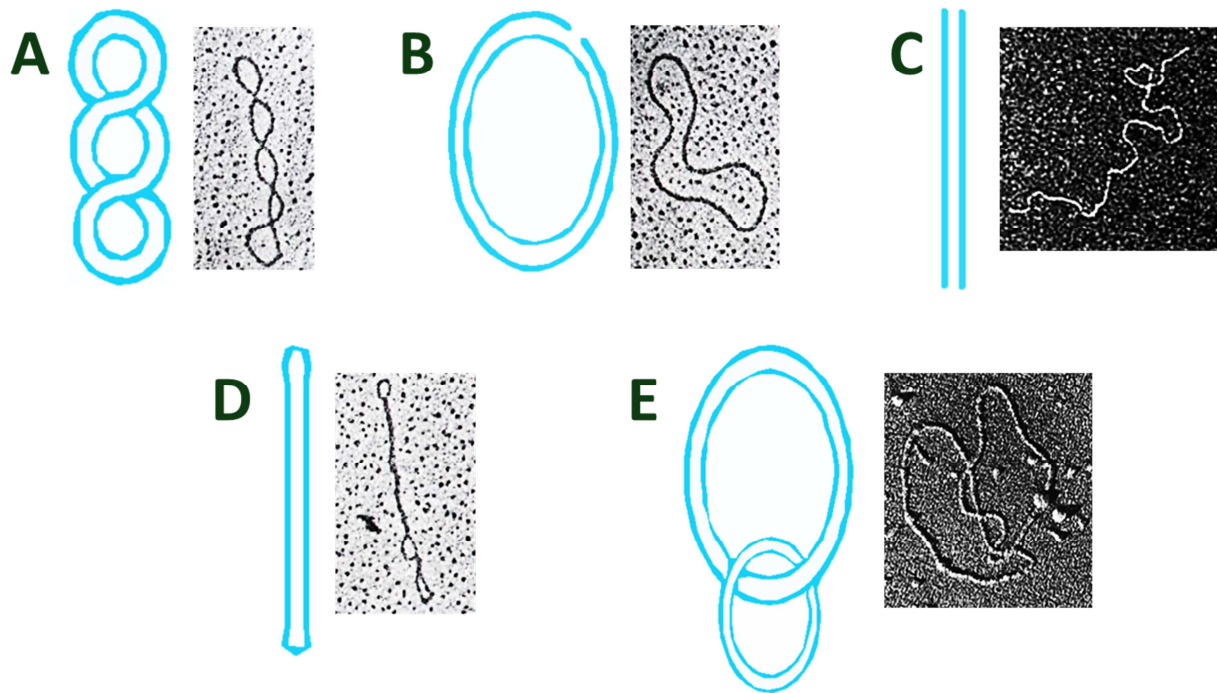
1.3.1. Struktura plazmidów

Plazmidy to cząsteczki dsDNA o bardzo zróżnicowanych rozmiarach. Ich wielkość może wynosić od 1000 do nawet 1700000 par zasad. Najmniejsze plazmidy zostały zidentyfikowane w *Hemophilus somnus* sp., *Mycoplasma* sp., czy też *Helicobacter pylori*. Największe zaś, megaplazmidy, występują między innymi u bakterii z grupy *Rhizobium*. Duże plazmidy kodują geny odpowiedzialne za skomplikowane procesy fizjologiczne oraz oporność na kilka antybiotyków i innych substancji [39].

Choć plazmidy są stosunkowo małymi i prostymi molekułami, to mogą mieć one różnorodną strukturę. Zdecydowana większość plazmidów przyjmuje formę kolistą cccDNA (ang. covalently closed circle), co oznacza, że obie nici polinukleotydowe są zamknięte. Tego typu plazmidy izolowane z komórek bakteryjnych zwykle znajdują się w konformacji superhelikalnej scDNA, co oznacza, że ich cząsteczki są dodatkowo skręcone (ang. supercoiled) (RYS. 24A) [37]. Jeżeli jeden z łańcuchów polinukleotydowych tworzących plazmid zostaje przecięty, wówczas plazmid przyjmuje formę ocDNA (ang. open-circular) i traci superhelikalność, tworząc strukturę rozluźnioną relDNA bez dodatkowych skrętów (ang. relaxed) (RYS. 24B) [37]. W przypadku, gdy przerwaniu ulegają obie nici DNA na podobnej wysokości, cząsteczka plazmidu staje się liniowa (linDNA) [40]. Pierwsze liniowe molekuly wykryto u drożdży *Kluyveromyces lactis* w latach 80. ubiegłego wieku, a wkrótce także u bakterii (*Streptomyces*, *Borrelia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*). Plazmidy liniowe mogą mieć strukturę dwojakiego rodzaju. Po pierwsze, może to być „prawdziwa” cząsteczka liniowa dwuniciowego DNA posiadająca wolne końce (RYS. 24C) [41]. Sekwencje nukleotydowe tego typu plazmidów posiadają długie powtórzenia terminalne, a do końców 5'

łańcuchów DNA zwykle przyłączone są białka terminalne, chroniące przed atakiem endonukleaz. Po drugie, plazmidy mogą tworzyć strukturę „szpilki do włosów” (ang. hairpin loop), która w obrazie mikroskopu elektronowego wygląda jak molekula liniowa. Tego typu cząsteczka zawiera jednak kowalencyjnie połączone końce, gdyż w rzeczywistości stanowi ona jeden łańcuch polinukleotydowy, komplementarny na całej długości, oprócz krótkich naprzeciwległych odcinków, tworzących na końcach molekuly jednoniciowe pętle [39] (RYS. 24D) [37].

Czasem zdarza się również, iż izolowane plazmidy mają bardziej skomplikowane kształty. Przyjmują na przykład strukturę katenanów (RYS. 24E) [42], w której dwa plazmidy, niezwiązane ze sobą chemicznie, połączone są mechanicznie jak ogniwa łańcucha. Jest to jednak przypadek bardzo rzadki i przypuszcza się, że wynika z błędów mających miejsce podczas replikacji [40].



RYS. 24 – Schematy i zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego przedstawiające różne formy plazmidów: A – superhelikalną [37], B – zrelaksowaną z przerwaną jedną nicią [37], C – liniową [41], D – pseudoliniową [37], E – katenanu [42].

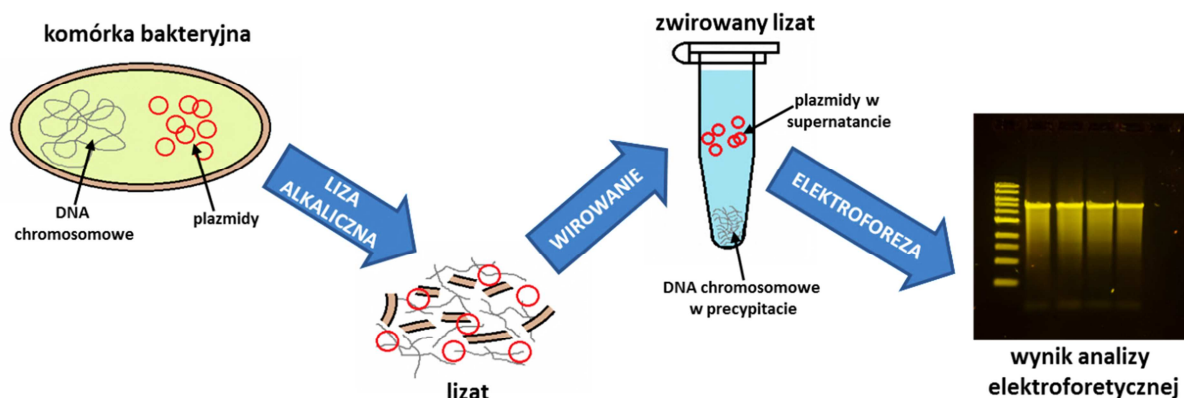
1.3.1. Wykrywanie, izolacja i oczyszczanie plazmidów

Kluczową kwestią w pracy laboratoryjnej z DNA plazmidowym jest opracowanie metod pozwalających na stwierdzenie jego obecności w danych komórkach bakteryjnych. Można wyróżnić tu dwa podstawowe podejścia do tego zagadnienia.

Po pierwsze, stosowane są metody pośrednie, w których o obecności danego plazmidu w komórce bakteryjnej stwierdza się na podstawie cechy fenotypowej gospodarza zależnej od potencjalnej obecności plazmidu. Do metod takich należy analiza kinetyki rozprzestrzeniania się danej cechy w populacji komórek bakteryjnych, selekcja klonów, które utraciły badaną cechę fenotypową w wyniku podziałania na hodowlę komórek czynnikiem usuwającym z nich plazmidy, czy też izolacja egzogenna, w której na drodze koniugacji dochodzi do przekazania plazmidów od dawcy obdarzonego określoną cechą fenotypową do biorcy stanowiącego dobrze scharakteryzowany szczep bakteryjny [39].

Po drugie, obecność plazmidów w komórkach można wykazać bezpośrednio, stosując metody fizykochemiczne. Wówczas, izolując plazmidy z komórki, potwierdza się ich obecność w puli całkowitego DNA komórkowego. Izolacja plazmidów rozpoczyna się od łagodnej lizy

hodowli bakteryjnej, dzięki której kwasy deoksyrybonukleinowe zostają oddzielone od innych składników komórkowych. Z powstałego lizatu, składającego się w dużej mierze z chromosomowego materiału genetycznego, wydziela się DNA plazmidowe. Sposób przeprowadzenia lizy zależy od rodzaju izolowanych plazmidów. W przypadku niezbyt dużych cząsteczek kolistych jest to zwykle liza alkaliczna, podczas której oprócz lizy komórek dochodzi także do fragmentacji i denaturacji DNA chromosomowego, podczas gdy zdecydowanie mniejsze molekuly DNA plazmidowego pozostają nienaruszone. Po zwirowaniu otrzymanego lizatu fragmenty DNA chromosomowego oraz wielkocząsteczkowe fragmenty komórkowe przechodzą do osadu, podczas gdy plazmidy pozostają w supernatancie. Następnie dokonywana jest analiza elektroforetyczna w żelu agarozowym, która pozwala na wykrycie wyizolowanych plazmidów, a także określenie ich liczby i wielkości (RYS. 25). W przypadku dużych plazmidów, które łatwo ulegają mechanicznym uszkodzeniom podczas opisanej analizy elektroforetycznej i przechodzą do frakcji DNA liniowego, stosuje się metody, w których liza komórek zachodzi bezpośrednio w żelu agarozowym, lub elektroforezę typu PFGE (ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis) przystosowaną do analizy dużych cząsteczek DNA. Liza alkaliczna nie jest także odpowiednią metodą przy identyfikacji plazmidów liniowych, gdyż ulegają one denaturacji razem z DNA chromosomalnym. Dlatego też w tym przypadku konieczne jest przeprowadzenie preparatyki w warunkach neutralnych, niepowodujących denaturacji [39, 40].



RYS. 25 – Schemat wykrywania plazmidów metodą bezpośrednią.

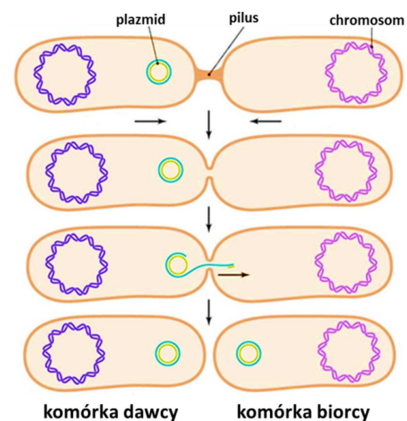
Wiele eksperymentów wykonywanych z wykorzystaniem plazmidów nie wymaga jedynie ich identyfikacji, ale przede wszystkim namnożenia, izolacji i oczyszczenia. W celu uzyskania czystej zawiesiny plazmidów jednego określonego rodzaju, należy wyhodować odpowiednie kolonie bakteryjne, posiadające tylko ten jeden plazmid w komórkach. Dany plazmid wprowadza się do mieszaniny bakteryjnej, po czym dodaje się specjalnej pożywki, by bakterie mogły się namnożyć. Następnie kolonię bakteryjną umieszcza się na podłożu z pożywką, zawierającą substancję zaburzającą systemy regulujące replikację materiału genetycznego, w wyniku czego dochodzi do nagromadzenia się w komórkach cząsteczek plazmidów [43]. Kolejnym etapem jest izolacja DNA plazmidowego z komórek bakteryjnych. Stosuje się tutaj techniki takie, jak w przypadku wykrywania plazmidów metodami bezpośrednimi, jednak szczególną uwagę przywiązuje się do dbałości o czystość otrzymanego preparatu. Aby mógł on zostać wykorzystany do dalszej charakterystyki molekularnej, nie może być zanieczyszczony DNA chromosomalnym, białkami, RNA czy inhibitorami reakcji enzymatycznych [39]. Obecnie do oczyszczania wyizolowanych plazmidów najczęściej stosowane są komercyjnie dostępne zestawy buforów, których użycie pozwala na szybkie uzyskanie próbek o czystości rzędu 99,9% [43].

1.3.2. Występowanie plazmidów

Plazmidy to cząsteczki DNA występujące w komórkach bakteryjnych, lecz bakterie to nie jedyny ich gospodarz. Również w domenie Eucaryota nie brak tych wyjątkowych cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego. Ich obecność prawdopodobnie wynika z usamodzielnienia się fragmentów DNA chromosomalnego lub mitochondrialnego, bądź też wniknięcia do komórek i „oswojenia” genomów wirusów DNA. W komórkach eukariotycznych plazmidy można znaleźć grzybów (w szczególności drożdży), ameb, czy śluzowców, ale także w organizmach wyższych, nawet ssaków. Przypuszcza się, że zwiększenie liczby cząsteczek plazmidów w komórkach grzybów wiąże się z ich starzeniem, ale nie wiadomo, czy zjawisko to dotyczy również innych eukariontów [44-46]. Zdarza się, że takie same plazmidy występują w zupełnie różnych organizmach. Zależy to od zakresu gospodarza, charakterystycznego dla danego plazmidu. Jeśli zakres ten jest wąski, plazmid może występować tylko w swoim naturalnym gospodarzu lub pokrewnych bakteriach, np. plazmidy typu pUC mogą ulegać powieleniu jedynie w różnych szczepach *Escherichia coli*. Natomiast plazmidy o szerokim zakresie gospodarza mogą funkcjonować w wielu różnych organizmach, czasem nawet bardzo odległych filogenetycznie [39].

Ilość cząsteczek plazmidów występujących w danej komórce gospodarza może być bardzo różna i zależy od samego plazmidu. Opisuje to charakterystyczna dla każdego plazmidu liczba kopii, która określa, ile molekuł plazmidu przypada na jeden ekwiwalent chromosomu. Wyróżnia się plazmidy jednokopiowe, gdy w komórce znajduje się tylko jedna cząsteczka danego plazmidu (np. plazmid F), niskokopiowe, gdy liczba kopii wynosi 3-8 (np. pSC101), wysokokopiowe, gdy liczba ta sięga 15-30 (np. ColE1) [39].

Niezależnie od liczby kopii danego plazmidu w komórce gospodarza, plazmidy stanowią zaledwie 1% całej komórkowej informacji genetycznej [4]. Plazmidy funkcjonują w komórce niezależnie od DNA chromosomalnego i ulegają też niezależnej replikacji przeprowadzanej w kontrolowany sposób. Plazmidy mogą również ulegać transferowi koniugacyjnemu, w wyniku którego przechodzą one z jednej komórki do drugiej na drodze koniugacji (RYS. 26) [47]. Procesowi temu towarzyszy specyficzna replikacja, w wyniku której potomne cząsteczki DNA znajdują się w dwóch różnych komórkach [44].



RYS. 26 - Schemat procesu koniugacji bakterii [47].

1.3.3. Rola biologiczna DNA plazmidowego

Mimo iż plazmidy powszechnie występują u bakterii, ich obecność nie jest niezbędna komórce gospodarza do prawidłowego funkcjonowania w normalnych warunkach. Mogą się jednak okazać niezbędne w warunkach ekstremalnych, a to za sprawą zapisanej w nich informacji genetycznej.

Wielkość plazmidów determinuje ilość niesionych przez nie genów, a tym samym liczbę kodowanych białek, która może wynosić od kilku do kilkuset. Geny zawarte w cząsteczkach plazmidów można podzielić na kilka rodzajów:

- geny replikacyjne – obecne w każdym plazmidzie i absolutnie niezbędne dla jego funkcjonowania (replikacji i stabilnego utrzymywania cząsteczki plazmidu w komórce), ale nienadające komórce żadnych specjalnych cech fenotypowych, zwykle geny te skupione są na jednym fragmencie molekuly DNA i stanowią niewielki procent genomu;

- geny horyzontalnego transferu plazmidów – dające możliwość przekazywania plazmidów pomiędzy komórkami na drodze koniugacji, nie są one niezbędne dla ich funkcjonowania, ale odgrywają kluczową rolę w rozprzestrzenianiu się plazmidów w środowisku;
- sekwencje insercyjne – odpowiedzialne za przegrupowania genów w obrębie danej cząsteczki plazmidowej oraz ich transfer między różnymi replikonami w komórce, ich zawartość w genomie plazmidowym jest stosunkowo duża, ale nie są one zgrupowane w jednej części molekuly DNA;
- geny cech fenotypowych – warunkujące komórkom gospodarza różnorodne właściwości metaboliczno-fizjologiczne, w danym plazmidzie może znajdować się różna liczba tych genów;
- rejony „ciche” – stanowiące sekwencje DNA zawarte w plazmidzie, których funkcja nie została jeszcze poznana [45, 48].

Z punktu widzenia adaptacji danej bakterii do szczególnych warunków środowiskowych, zdecydowanie odbiegających od standardowych, najistotniejsze jest bogactwo genów odpowiedzialnych za obdarzanie komórki gospodarza nietypowymi cechami fenotypowymi. Cechy takie mogą być bardzo różnorodne i można podzielić je na kilka grup.

Jedną z najistotniejszych cech determinowanych obecnością plazmidów jest oporność komórek gospodarza na antybiotyki i chemioterapeutyki. Zwykle jest ona zapisana w plazmidach opornościowych i uważa się, iż geny te pochodzą od mikroorganizmów produkujących antybiotyki, u których gwarantują one naturalne zabezpieczenie przed własnym toksycznym metabolitem. Działanie antybiotyków może być realizowane według różnorodnych mechanizmów takich, jak: zaburzenie w syntezie ściany komórkowej bakterii, naruszanie integralności błony cytoplazmatycznej, hamowanie metabolizmu kwasów nukleinowych, czy też hamowanie syntezy białek. Dlatego też bakterie wykształciły wiele szlaków oporności, zapobiegających skutecznie tym zaburzeniom. Oporność na antybiotyk może przejawiać się w jego detoksyfikacji lub inaktywacji, zmniejszeniu poziomu pobierania go lub aktywnym usuwaniu go z komórki, nadprodukcji komórkowego celu jego działania (tzw. tarczy), wytworzeniu zastępczego w stosunku do zahamowanego przez niego szlaku metabolicznego [48]. Lekooporność niektórych bakterii ma zdecydowany wpływ na życie i zdrowie człowieka, gdyż utrudnia lub wręcz uniemożliwia leczenie wielu chorób bakteryjnych.

Inną cechą, którą mogą zapewniać plazmidy obecne w komórkach bakteryjnych, jest oporność na metale ciężkie. Kationy metali takich, jak nikiel, ołów, kadm, bizmut, antymon, czy rtęć oraz niektóre aniony, np. arseniany, borany, chromiany często występują na obszarach uprzemysłowionych i są bardzo toksyczne dla wszystkich organizmów. Tymczasem bakterie wykształciły specjalne mechanizmy, pozwalające im na funkcjonowanie w takim środowisku. W przypadku jonów rtęci polega on na wykształceniu specyficznego systemu transportu związków rtęci do wnętrza komórki, gdzie przy udziale enzymu ulegają one przekształceniu w mniej toksyczną i bardziej lotną formę Hg^0 . Zupełnie inaczej realizowana jest oporność na kationy wapnia, kobaltu i cynku, które wnikają do komórek niespecyficznie lub przez systemy transportujące kationy magnezu. Wówczas są one wydzielane na zewnątrz na drodze specyficznego transportu [48].

Specjalną właściwością niektórych bakterii jest zdolność do produkcji bakteriocyn. Są to antybakteryjne substancje białkowe zdolne do zabijania jedynie szczepów blisko spokrewnionych z producentem, które nie potrafią wyprodukować tychże czynników. Zdolność do syntezy bakteriocyn determinowana jest przez geny zlokalizowane na plazmidach i towarzyszy jej zawsze oporność na tę substancję, co oznacza, że obecność danej bakteriocyny w środowisku nie jest śmiertelna dla komórki producenta. Wydzielenie przez bakterię zsyntetyzowanej bakteriocyny wiąże się z jej śmiercią w wyniku lizy komórki, ale jednocześnie inne bakterie tego samego szczepu, które nie produkują w danym momencie tej substancji, są na nią odporne. Zjawisko

bakteriocynogeni pozwala szczepom wyposażonym w plazmidy determinujące syntezę tego antybakteryjnego czynnika na uzyskanie przewagi selekcyjnej nad współistniejącymi spokrewnionymi bakteriami bezplazmidowymi [48].

Ciekawą cechę fenotypową zapewniają komórkom gospodarza plazmidy degradacyjne (kataboliczne), umożliwiające biodegradację związków organicznych, w tym także substancji silnie toksycznych. Zawierają one geny kodujące szlaki metaboliczne odpowiedzialne za rozkład zarówno prostych związków organicznych (węglowodorów alifatycznych, jedno- i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, związków heterocyklicznych), jak i ich chloropochodnych. Katabolizm substancji toksycznych polega na przekształceniu ich w metabolity pośrednie, które są wprowadzane następnie do metabolizmu podstawowego. Systemy te są zwykle dość skomplikowane i wymagają udziału nawet kilkunastu enzymów kodowanych przez geny zlokalizowane w plazmidach [48].

Ważną, szczególnie z punktu widzenia zdrowia człowieka i zwierząt, cechą determinowaną w dużej mierze przez DNA plazmidowe jest patogenność bakterii, czyli ich zdolność do wywoływania chorób. Często zdarza się jednak, że wywołanie kompletnego procesu chorobowego przez bakterie wymaga współdziałania genów plazmidowych z chromosomowymi. Geny plazmidowe mogą kodować różne czynniki uczestniczące w procesie wywoływania choroby, np. zdolność do adhezji do powierzchni odpowiednich komórek atakowanej tkanki i penetracji do ich wnętrza, rozprzestrzenianie się pomiędzy komórkami, zdolność do produkcji toksyn, oporność na antybakteryjne czynniki obecne w surowicy [48].

Obecność plazmidów w komórkach bakteryjnych nie jest również obojętna dla roślin. Geny kodowane na plazmidach mogą być odpowiedzialne za różne choroby organizmów roślinnych wywoływane przez bakterie, jak również relacje symbiotyczne pomiędzy bakteriami i roślinami. Zwykle są to jednak procesy bardzo skomplikowane, wymagające współdziałania wielu genów plazmidowych i chromosomowych [48].

Istnieje jeszcze wiele innych różnorodnych cech fenotypowych kodowanych przez plazmidy, które mają niebagatelne znaczenie dla funkcjonowania komórek bakteryjnych. Wśród nich można wymienić: ochronę przed działaniem promieniowania UV i jonizującego, zdolność do fermentacji laktozy, utleniania wodoru i dekarboksylacji lizyny, wykorzystywanie sacharozy, produkcję proteazy, zdolność do produkcji antybiotyków, insektocydობójących białek, czy też pigmentację. Lista tych cech wciąż się wydłuża wraz z trwającymi nieustannie badaniami naukowymi.

Wszystkie opisane powyżej cechy fenotypowe determinowane przez obecność plazmidów w komórkach bakteryjnych zostały przedstawione w poniższej tabeli (Tabela 3) [48].

TABELA 3 – Cechy fenotypowe determinowane obecnością plazmidów [48].

FENOTYP	PLAZMID	NATURALNY GOSPODARZ
Oporność na antybiotyki i inne leki		
Tetracyklina	RP4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	NR1	<i>Shigella flexneri</i>
Streptomycyna	R6K	<i>Proteus rettgeri</i>
Chloramfenikol	R938	<i>Serratia marcescens</i>
Penicylina	R6K	<i>Proteus rettgeri</i>
Erytromycyna	pIP1527	<i>Escherichia coli</i>
Sulfamidy	pSa	<i>Shigella sp.</i>
Oporność na jony metali ciężkich		
Rtęć	NR1(Tn21)	<i>Shigella flexneri</i>
	p1258	<i>Staphylococcus aureus</i>
Kadm, cynk, kobalt	pMOL30	<i>Ralstonia eutropha</i>
Miedź	pRJ1004	<i>Pseudomonas syringae</i>
Arsen	R773	<i>Escherichia coli</i>

Produkcja antybiotyków i bakteriocyn		
Metylenomycyna	pSCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Kolicyna E1	ColE1	<i>Escherichia coli</i>
Kloacyna DF13	CloDF13	<i>Enterobacter cloacae</i>
Megacyna B11	pSE203	<i>Bacillus megaterium</i>
Katabolizm toksycznych związków		
Toluen	TOL(pWWO)	<i>Pseudomonas putida</i>
Patogenność bakterii		
Produkcja hemolizyny	pJH1	<i>Streptococcus faecalis</i>
Czynnik wirulencji	pXO1	<i>Bacillus anthracis</i>
Antygen kolonizacyjny	pK88	<i>Escherichia coli</i>
Adhezyjna YadA	pYV	<i>Yersinia spp.</i>
Wirulencja	pMYSG6000	<i>Shigella flexneri</i> 2a
Interakcje z roślinami		
Rakowate guzy roślin	pTi	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Kędzierzawość korzeni	pRi	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Tworzenie brodawek korzeniowych	pPN1	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Wiązanie azotu	pIJ1007	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
Zdolność do koniugacji		
	F	<i>Escherichia coli</i>
	RK2	<i>Klebstella aerogenes</i>
	NR1	<i>Shigella flexneri</i>
	pAD1	<i>Enterococcus faecalis</i>
	pSCP1	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Inne właściwości		
Tworzenie pęcherzyków gazowych	pHH1	<i>Halobacterium sp.</i>
Pigmentacja	pPL376	<i>Erwinia herbicola</i>
Fermentacja laktozy	pLM3601	<i>Streptococcus cremoris</i>
Wykorzystywanie sacharozy	CTnscr94	<i>Salmonella senftenberg</i>

1.3.4. Znaczenie plazmidów

Poprzedni rozdział ukazał bez wątplenia istotę obecności plazmidów dla funkcjonowania ich gospodarzy. Jednak rola ta nie ogranicza się jedynie do pojedynczych komórek bakteryjnych, lecz może być kluczowa dla całej populacji, a nawet innych żywych organizmów. Plazmidy mogą zapewniać wzrost różnorodności dzięki zdolności do koniugacyjnego przekazywania plazmidowego materiału genetycznego pomiędzy komórkami blisko spokrewnionych szczepów, gatunkami bakterii odległych filogenetycznie, a nawet pomiędzy różnymi domenami świata zwierzęcego (np. bakterie/rośliny), powodując przekazywanie cech niesionych przez plazmidy nowym gospodarzom. Plazmidy dają również możliwość transferu fragmentów kwasu deoksyrybonukleinowego pomiędzy DNA plazmidowym i chromosomowym, a przez to przyczyniają się do jego rekombinacji. To wszystko warunkuje ewolucyjny rozwój bakterii, którego nie da się przedstawić za pomocą tradycyjnego drzewa, a raczej skomplikowanej sieci zbieżnych i rozbieżnych powiązań. Wszystkie te procesy zachodzą w środowisku naturalnym, powodując krążenie i mieszanie się puli materiału genetycznego całego świata żywego [46, 48].

Znaczenie plazmidów w zdecydowanym stopniu zależy także od ich cech fenotypowych. Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, jedną z nich może być patogenność. Bakterie posiadające odpowiednie plazmidy zdolne są do wywoływania chorób u różnych organizmów [49]. Dla roślin groźne są na przykład bakterie *Rhodococcus fascians* obdarzone dużym liniowym plazmidem, którego obecność powoduje tworzenie się charakterystycznych wyrosli na liściach (tzw. galasów), charakteryzujących się specyficznymi, szczególnie korzystnymi dla owych bakterii, właściwościami

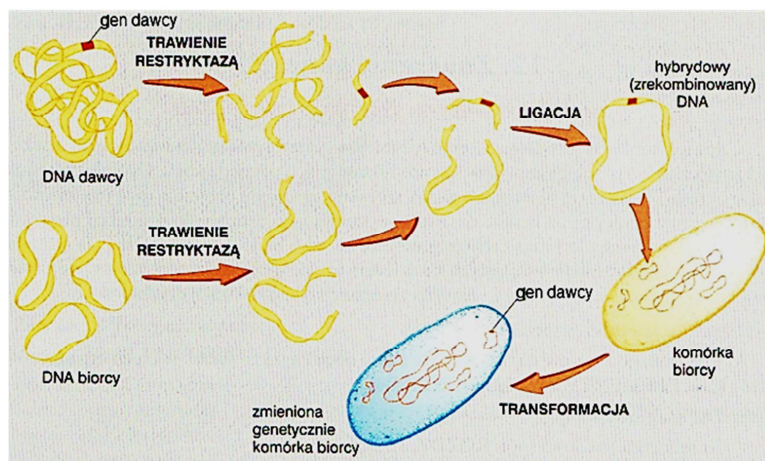
metabolicznymi [50]. Z kolei szczepy *Agrobacterium*, posiadające plazmidy pTi lub pRi, powodują powstawanie rakowatych narośli u nasady łodygi roślin lub kędzierzawość ich korzeni oraz syntezę specyficznych substancji, stanowiących unikatowe źródło substancji odżywczych dla bakterii wyposażonych w wymienione plazmidy [48]. Infekcje bakteryjne warunkowane obecnością plazmidów nie są obce również organizmom zwierzęcym oraz człowiekowi. Groźnymi patogenami są dla nich między innymi krętki rodzaju *Borrelia*, zawierające plazmidy koliste i liniowe. Mogą one wywoływać boreliozę lub gorączkę powrotną [50]. Chorobotwórczymi są także szczepy *Salmonella*, wywołujące liczne zakażenia pokarmowe i infekcje systemowe oraz *Shigella*, będące źródłem dezynterii bakteryjnych [48].

Negatywnym skutkiem obecności plazmidów w komórkach bakteryjnych jest bardzo szybkie rozprzestrzenianie się oporności bakterii na antybiotyki [49]. Zjawisko to jest problemem złożonym i niepokojącym pod względem medycznym. Wynika ono z tworzenia przez różne rodzaje mikroorganizmów, żyjących w danej niszy ekologicznej, dynamicznie rozwijających się mikrokosmosów, w których dochodzi do nieuchronnej wymiany materiału genetycznego, w tym także plazmidów niosących geny oporności na antybiotyki. Dzięki temu drobnoustroje mogą szybko przystosowywać się do wymogów środowiskowych i nie są zmuszone do wykształcenia mechanizmu obronnego *de novo*. Na przykład w warunkach szpitalnych dużym zagrożeniem są szczepy wieloopornego gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*, który wykazuje brak wrażliwości na metycylinę oraz obniżoną wrażliwość na antybiotyki glikopeptydowe i wankomycynę. Również dużym zagrożeniem jest coraz szersze stosowanie antybiotyków w hodowlach zwierzęcych, gdzie oprócz zastosowania terapeutycznego wykorzystuje się je także jako środki promujące wzrost. Wówczas mechanizmy oporności zwierzęcej flory bakteryjnej mogą łatwo zostać przejęte przez bakterie patogenne dla organizmu ludzkiego, co bardzo komplikuje leczenie [51].

Jednak plazmidy mogą mieć również pozytywne znaczenie. Dzięki nim bakterie mogą zyskać zdolność do produkcji antybiotyków. Przykładowo bakterie rodzaju *Streptomyces* wytwarzają 60% antybiotyków produkowanych przez przemysł farmaceutyczny (m. in. metylomycynę, aktynomycynę D, chloramfenikol) [50]. Plazmidy zapewniają również bakteriom z rodziny *Rhizobiaceae* właściwości, pozwalające na symbiozę z roślinami motylkowymi. Bakterie te wytwarzają skomplikowane połączenia z korzeniami roślinnymi w postaci brodawek, w których następuje proces enzymatycznej redukcji azotu cząsteczkowego, przez co roślina może go w łatwy sposób przyswoić [48]. Ważnym procesem, zawdzięczanym w dużym stopniu obecnością plazmidów katabolicznych w komórkach bakteryjnych, jest biodegradacja materii organicznej gromadzącej się w środowisku, co zapewnia nieustanny obieg materii i energii w przyrodzie. Plazmidy te znajdują szerokie zastosowanie w procesach bioremediacji i są wykorzystywane w profesjonalnych urządzeniach usuwających zanieczyszczenia ze ścieków, gleby w pobliżu zakładów przemysłowych i innych skażonych miejsc. Na przykład bakterie z rodzaju *Rhodococcus* są zdolne do degradacji pestycydów, leków, polichlorodwufenyli, trójchloroetanu itp. [48, 50].

Niesłychanie istotna jest rola plazmidów w badaniach naukowych. Dzięki ich niewielkim rozmiarom są one doskonałymi obiektami badawczymi, pozwalającymi na poznanie mechanizmów regulacyjnych replikacji DNA czy też rozdziału do komórek potomnych kopii powielonego DNA. Bardzo ważną dziedziną nauki, która nie istniałaby bez plazmidów, jest inżynieria genetyczna, czyli zespół technik biologii molekularnej umożliwiających ingerencję w materiał genetyczny organizmu w celu zmiany jego cech dziedzicznych. Liczne procesy biotechnologiczne, oparte na komórkach niosących zrekombinowane molekuly DNA, wymagają użycia narzędzi, jakimi są cząsteczki plazmidowe [48, 49]. Właściwości plazmidów pozwalają na wykorzystanie ich jako przenośniki (wektory) obcego DNA oraz do klonowania określonych genów. Procesy te wymagają rozcięcia za pomocą enzymu restrykcyjnego kolistego plazmidu oraz obcego DNA, zawierającego gen do przeniesienia lub sklonowania. Następnie miesza się powstałe fragmenty DNA, a ich końce odnajdują się i łączą ze sobą na zasadzie komplementarności, tworząc zrekombinowany DNA

plazmidowy. Powstała w ten sposób cząsteczka DNA zostaje wprowadzona do komórek bakteryjnych, gdzie następuje jej namnożenie lub do komórek gospodarza, gdzie może w naturalny sposób ulegać replikacji i kolejnym procesom, prowadzącym na przykład do produkcji białka zakodowanego w sklonowanym genie [19, 46] (RYS. 27) [4]. Laboratoria światowe dysponują obecnie setkami różnych wektorów plazmidowych, sztucznie



RYS. 27 – Model ogólnej strategii inżynierii genetycznej z użyciem wektora plazmidowego [4].

modyfikowanych w celu usprawnienia dostarczania genów komórkom docelowym, selekcji komórek zawierających zrekombinowany plazmid, badania sposobu i poziomu ekspresji niesionego na plazmidzie genu. Opisane tutaj techniki inżynierii genetycznej, angażujące DNA plazmidowe, są obecnie szeroko wykorzystywane. Rośliny modyfikowane genetycznie mogą powstawać poprzez wprowadzanie obcych genów do ich komórek za pomocą wektorów plazmidowych, przy czym wykorzystywane są tutaj naturalne zdolności niektórych bakterii z rodzaju *Agrobacterium* do infekowania zranionych roślin i przekazywania im części kolistego plazmidu. W wyniku tego rośliny transgeniczne (np. kukurydza, ziemniaki, pomidory, truskawki, ryż) zyskują zupełnie nowe właściwości takie, jak: poprawa cech jakościowych oraz odporność na herbicydy, owady, choroby bakteryjne, wirusowe czy grzybiczne [52, 53]. Klonowanie ludzkich genów i wprowadzanie ich do bakterii umożliwia uzyskiwanie szczepów bakteryjnych wytwarzających w dużych ilościach naturalne białka ludzkie. Jest to skuteczny sposób otrzymywania na skalę przemysłową wielu białek o znaczeniu leczniczym czy gospodarczym, m. in.: insuliny ludzkiej, ludzkiego hormonu wzrostu, czynników krzepnięcia krwi, enzymów trawiennych wykorzystywanych w produkcji mleczarskiej, czy też antygenów, stosowanych w produkcji szczepionek przeciwko infekcjom wirusowym (np. żółtacze) [54]. Plazmidy mogą być także stosowane w terapii genowej, polegającej na wprowadzeniu do wybranych komórek funkcjonalnego genu w celu uzupełnienia jego niesprawnej lub brakującej wersji [55].

1.4. Właściwości fizykochemiczne DNA

Kwas deoksyrybonukleinowy jest bardzo interesującą substancją z biologicznego i biochemicznego punktu widzenia, lecz godne uwagi są również jego właściwości fizykochemiczne, wynikające ze specyficznej struktury. Obejmują one wiele różnorodnych cech, lecz w tym rozdziale omówione zostaną tylko te z nich, które wydają się istotne ze względu na przeprowadzoną przeze mnie eksperymentalną pracę badawczą.

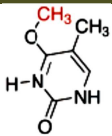
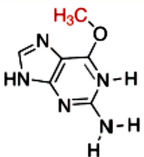
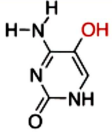
1.4.1. Stabilność cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego

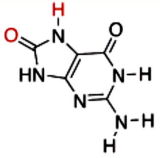
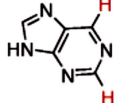
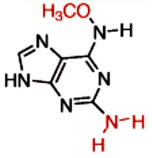
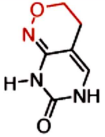
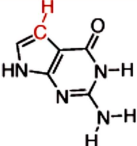
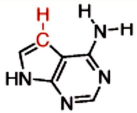
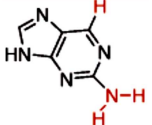

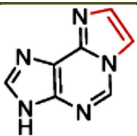
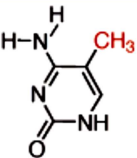
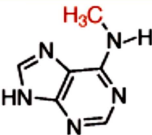
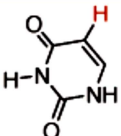
Jak już zostało opisane w poprzednim rozdziale (I.1.1.3), DNA to cząsteczka zbudowana z dwóch polinukleotydowych nici, połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi, oplecionych wokół siebie i skręconych. Dzięki takiej budowie helisa DNA zyskuje pewną stabilność, którą zawdzięcza maksymalnej ilości możliwych do utworzenia wiązań wodorowych, występujących

między sparowanymi komplementarnie zasadami [19]. Istotny wpływ na stabilność helisy DNA ma również proporcja par zasad A-T i G-C w niej zawartych. Jako że guanina i cytozyna łączą się poprzez 3 wiązania wodorowe, a adenina i tymina tylko poprzez 2, to większa ilość par G-C w łańcuchu gwarantuje zdecydowany wzrost stabilności [21]. Nie bez znaczenia dla stabilności molekuly DNA są także siły spiętrzające zasady (ang. base-stacking), które są oddziaływaniami hydrofobowymi, występującymi pomiędzy ułożonymi równolegle heterocyklicznymi pierścieniami zasad [21]. Jednocześnie jednak cząsteczka kwasu deoksyrybonukleinowego nie jest strukturą sztywną. Na dany monomer przypada sześć wiązań, wokół których może następować rotacja: wiązanie N-glikozydowe między zasadą azotową i cukrem, wiązanie między węglem C-4' a węglem C-5' cząsteczki cukru oraz cztery wiązania mostka fosfodiesterowego łączące kolejne nukleotydy. Rotacje te są ograniczone ze względu na zawadę steryczną, wynikającą ze struktury przestrzennej łańcucha polinukleotydowego. Podwójna helisa jest dość giętka i bez problemu może ulegać zagięciom lub przyjmować formę superhelikalną czy strukturę łuku.

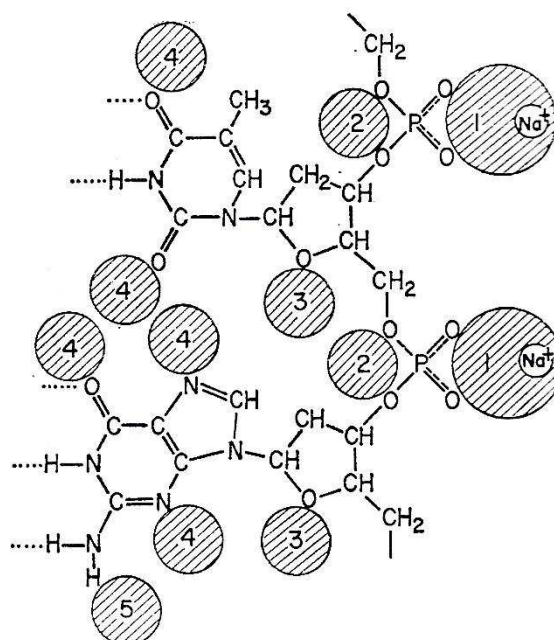
Omawiając czynniki mające wpływ na właściwości i stabilność helisy DNA, nie można pominąć zjawiska zastępowania typowych zasad nukleinowych w łańcuchu DNA przez ich zmodyfikowane formy. Źródłem tego zjawiska mogą być procesy o charakterze hydrolytycznym i utleniającym niszczące DNA, działanie substancji alkilujących i czynników rakotwórczych, fizjologiczne modyfikacje enzymatyczne zasad, a także syntetyczne wprowadzenie do helisy DNA zmodyfikowanych zasad o działaniu terapeutycznym lub pełniących funkcję znaczników fluorescencyjnych [56]. Obecność w łańcuchu DNA zmodyfikowanych zasad azotowych w znaczący sposób wpływa na jego właściwości. Mogą one bowiem powodować zaburzenia w łączeniu komplementarnych zasad dwóch nici DNA oraz ich asocjacji warstwowej, a tym samym prowadzić do dynamicznych zmian struktury helisy, obniżenia jej temperatury topnienia T_m i ograniczenia zdolności do przewodzenia ładunku elektrycznego [56]. Przykładowe modyfikacje zasad wraz z ich wpływem na DNA przedstawione zostały w poniższej tabeli (Tabela 4) [56]. Zmiana zasad nie pozostaje także bez znaczenia dla procesów biologicznych zachodzących z udziałem DNA (replikacja, transkrypcja). Istnieją jednak komórkowe mechanizmy naprawcze, w których specjalne enzymy potrafią rozpoznać część zmodyfikowanych zasad wstawionych do helisy DNA i przekształcić je w formy standardowe [4, 37].

TABELA 4 – Zmodyfikowane zasady nukleinowe mogące zastępować typowe zasady w helisie DNA [56].

NAZWA	WZÓR STRUKTURALNY (na czerwono zaznaczono różnice w porównaniu z typową zasadą)	ŹRÓDŁO POWSTANIA	WPŁYWA NA DNA
04-metylotymina		metylowanie	<ul style="list-style-type: none"> • obniżenie temperatury topnienia • osłabienie przewodnictwa elektrycznego
06-metyloguanina			
5-hydroksycytozyna		utlenianie	

8-oksoguanina			
nebularyna		produkt naturalny	
K		zasady syntetyczne	<ul style="list-style-type: none"> • nieznaczny wpływ na temperaturę topnienia • nieznaczny wpływ na przewodnictwo elektryczne
P			
7-deazaguanina			
7-dezaadenina			
2-aminopuryna			
5-fluorouracyl			
etenoadenina			
5-metylocytozyna		metylowanie enzymatyczne	• brak
N6-metyloadenina			
uracyl		błąd polimerazy w procesie replikacji	

Jednak stabilność DNA znajdującego się w roztworze nie jest warunkowana jedynie przez jego budowę. Bardzo ważną kwestią jest również wilgotność, a tym samym zawartość wody w środowisku, w którym znajduje się kwas deoksyrybonukleinowy. Warto zauważyć, iż w komórce, miejscu naturalnego występowania DNA, znajduje się właśnie środowisko wodne, a więc wpływ cząsteczek wody na jego strukturę wydaje się być szczególnie istotny. Zresztą zostało to już zasygnalizowane wcześniej przy okazji omawiania form DNA (rozdział I.1.1.4), gdzie wskazano, że wilgotność ma determinujący wpływ na kształt jego cząsteczki. Kwas deoksyrybonukleinowy jest polielektrolitem i ulega silnej hydratacji, będąc zarówno rozpuszczonym w roztworze, jak i znajdując się w stanie stałym w atmosferze o wysokiej wilgotności [31]. Badania spektrometryczne w podczerwieni wykazały, iż w cząsteczce DNA występuje kilka miejsc, w których może dochodzić do adsorpcji wody (RYS. 28) [57]. W pozycjach tych może znajdować się więcej niż jedna molekula H_2O , a jednocześnie jedna molekula H_2O może być związana w dwóch pozycjach. Wszystkie grupy DNA wiążące się z wodą zawierają albo atom obdarzony wolną parą elektronową, albo atomy wodoru, co gwarantuje utworzenie wiązań wodorowych. Podczas stopniowego wzrostu wilgotności środowiska, w którym znajduje się DNA, poszczególne miejsca w molekuale kwasu są zajmowane przez wodę w określonej kolejności. Przy wzroście względnej wilgotności od 0% do 50% cząsteczki wody przyłączają się do grup fosforanowych (zakreskowana pozycja 1 na RYS. 28). Gdy wilgotność osiąga wartość 50-60%, atomy tlenu w cząsteczkach cukru oraz tworzące wiązania fosfodiesterowe zaczynają wiązać wodę (zakreskowane pozycje 2 i 3 na RYS. 28). Dopiero gdy wilgotność przekroczy 60% dochodzi do adsorpcji wody przez grupy zlokalizowane na nukleotydach (zakreskowane pozycje 4 i 5 na RYS. 28). Powyżej wilgotności 65% zaczynają zachodzić strukturalne zmiany w DNA, molekuly wody wypełniają bruzdy, a przy 80% następuje całkowite hydratowanie cząsteczki kwasu, która „puchnie” z powodu nadmiaru wody, i wówczas następuje zmiana jej formy, by umożliwić dalsze przyłączanie wody. Proces opisany powyżej, zachodzący wraz ze wzrostem wilgotności, to przejście DNA z formy A do B. Nie zachodzi on jednak gwałtownie, lecz stopniowo wraz z ilością molekuł wody przyłączanych do kwasu [31, 57].

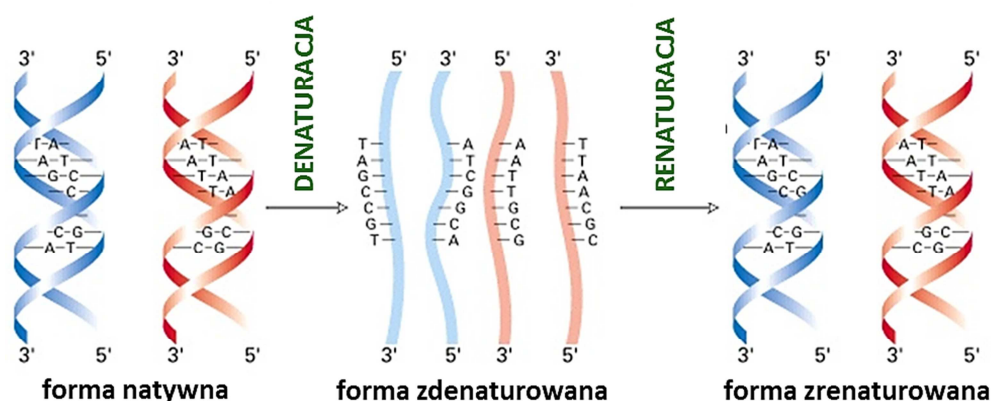


RYS. 28 – Schemat pojedynczej nici DNA zawierającej tyminę i guaninę. Pola zakreskowanego wskazują na miejsca potencjalnego wiązania cząsteczek wody [57].

Nie bez znaczenia dla molekuł kwasu deoksyrybonukleinowego jest także środowisko, w którym się one znajdują. DNA wykazuje szczególną wrażliwość na środowisko kwaśne, powodujące hydrolizę do różnych produktów, których obecność zależy od stężenia i rodzaju stosowanych kwasów, czasu trwania procesu oraz temperatury. Przykładowo ogrzewanie DNA w 1 M HCl w temperaturze 100°C początkowo powoduje powstanie cząsteczek pozbawionych zasad purynowych, zaś po 1 godzinie ulegają one rozpadowi do mononukleotydów pirymidynowych, pentozy i kwasu fosforowego. Jeszcze bardziej drastyczne jest działanie na DNA mocnych kwasów mineralnych (np. 72% HClO_4) i podwyższonej temperatury (100°C przez 1 godzinę), gdyż prowadzi do całkowitej hydrolizy i rozpadu DNA na poszczególne elementy składowe nukleotydów. Kwas deoksyrybonukleinowy wykazuje natomiast oporność na działanie zasad, co gwarantowane jest przez nieobecność grupy OH przy węglu C2' deoksyrybozy, przez co uniemożliwione jest tworzenie cyklicznych fosforanów nukleotydów, jak ma to miejsce

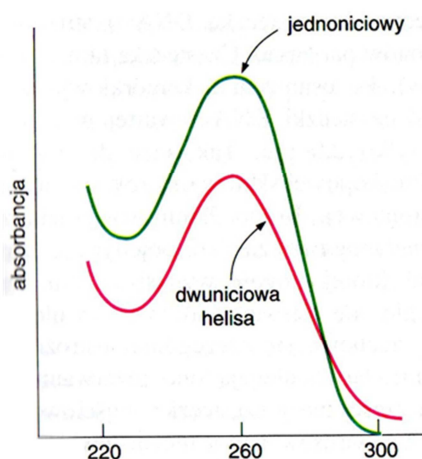
w przypadku RNA. Nawet po pozostawieniu DNA na 20-40 godzin w 1 M roztworze NaOH w temperaturze 37°C nie powstają żadne produkty hydrolizy alkalicznej [58].

Jednak DNA nie zawsze pozostaje w formie podwójnej helisy. Proces, w którym następuje rozplecenie podwójnej nici kwasu deoksyrybonukleinowego i rozsuniecie poszczególnych łańcuchów, nosi nazwę denaturacji. Może być on wywoływany przez różnorodne czynniki wpływające w zdecydowany sposób na trwałość helisy. Należą do nich między innymi: pH [59-61], substancje organiczne [62-64], jony metali [65-67], temperatura [68-70], promieniowanie [71-73], potencjał elektryczny [74, 75]. Po usunięciu danego czynnika denaturującego może zachodzić proces odwrotny – renaturacja, polegający na odtworzeniu komplementarnej struktury podwójnej helisy DNA [58] (RYS. 29) [76].



RYS. 29 – Denaturacja i renaturacja podwójnej helisy DNA [76].

Znacząca zmiana pH roztworu, w którym znajduje się DNA, wpływa na wiązania wodorowe występujące pomiędzy komplementarnymi parami zasad jego dwuniciowej cząsteczki. W środowisku kwaśnym zostają one wyeliminowane, gdyż następuje protonowanie atomu azotu N1 adeniny lub cytozyny. W środowisku zasadowym natomiast, dochodzi do zmiany równowagi form tautomerycznych zasad azotowych (równowaga przesuwa się w stronę formy enolowej), utraty protonu przez cząsteczkę oraz stabilnego zlokalizowania ujemnego ładunku na atomie tlenu, przez co nie może on już uczestniczyć w tworzeniu wiązań wodorowych z komplementarnymi zasadami [58, 77].

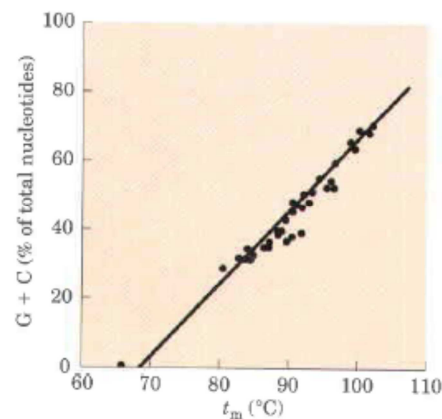


RYS. 30 – Zmiana absorbancji przy 260 nm podczas denaturacji DNA [16].

Kolejnym, godnym uwagi czynnikiem denaturującym jest temperatura. Ogrzewanie DNA do pewnej, charakterystycznej dla cząsteczki o określonej sekwencji nukleotydowej temperatury, zwanej temperaturą topnienia (T_m), powoduje częściowe zerwanie wiązań wodorowych i utratę połowy helikalnej struktury. Topnienie DNA jest procesem nagłym i towarzyszy mu efekt hiperchromizmu, polegający na wzroście absorpcji światła o długości 260 nm [78, 79] (RYS. 30) [16], który spowodowany jest zanikiem asocjacji warstwowej par zasad. Gdy temperatura wzrasta o 5°C powyżej T_m , dwie nici DNA są zupełnie rozdzielone i odsuwają się od siebie na skutek ruchów Browna. Wartość temperatury topnienia jest bardzo silnie determinowana przez sekwencję zasad azotowych danej molekuly DNA. Guanina i cytozyna, tworząc komplementarną parę zasad, łączą się ze sobą trzema wiązaniami wodorowymi, podczas gdy adenina i tymina jedynie dwoma. Większa liczba wiązań występujących pomiędzy zasadami nukleinowymi, wymaga wyższej energii do ich zerwania. Ponadto, sąsiadujące pary G-C ulegają silniejszej asocjacji warstwowej (ang. base-stacking) niż leżące obok siebie pary A-T. Oba te

Wartość temperatury topnienia jest bardzo silnie determinowana przez sekwencję zasad azotowych danej molekuly DNA. Guanina i cytozyna, tworząc komplementarną parę zasad, łączą się ze sobą trzema wiązaniami wodorowymi, podczas gdy adenina i tymina jedynie dwoma. Większa liczba wiązań występujących pomiędzy zasadami nukleinowymi, wymaga wyższej energii do ich zerwania. Ponadto, sąsiadujące pary G-C ulegają silniejszej asocjacji warstwowej (ang. base-stacking) niż leżące obok siebie pary A-T. Oba te

czynniki powodują, że temperatura topnienia cząsteczek DNA bogatych w pary G-C jest wyższa niż cząsteczek z wysoką zawartością par A-T, które łatwiej ulegają topnieniu [16, 21, 37, 58]. Wykazano, że temperatura topnienia próbek DNA pochodzących z różnych źródeł wzrasta liniowo wraz ze wzrostem procentowej zawartości guaniny i cytozyny w cząsteczce kwasu (RYS. 31) [37]. Na wysokość temperatury topnienia DNA bardzo znaczący wpływ ma również obecność w roztworze kationów metali (np. Na^+ , Mg^{2+}). Oddziałują one elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi helisy, stanowiąc dla nich przeciwwjony. Takie interakcje powodują stabilizowanie cząsteczki DNA, a tym samym wzrost T_m [80].



RYS. 31 – Zależność temperatury topnienia DNA od procentowej zawartości G+C w cząsteczce DNA [37].

Denaturacja DNA jest procesem odwracalnym. Po obniżeniu temperatury poniżej wartości T_m rozplecione łańcuchy DNA ulegają renaturacji, ponownemu komplementarnemu połączeniu. Proces ten przebiega w dwóch etapach. Pierwszy z nich zachodzi stosunkowo powoli i polega na przypadkowym „odnajdywaniu się” komplementarnych cząsteczek i łączeniu ich niewielkich segmentów. Drugi etap zaś, jest gwałtowny i dochodzi wówczas do spontanicznego parowania niepołączonych dotychczas par zasad i utworzenia podwójnej helisy. Proces renaturacji zachodzi jednak tylko przy powolnym obniżaniu temperatury. Gdy ochładzanie zachodzi gwałtownie, obie nici DNA pozostają rozplecione, nawet gdy temperatura znacznie spada poniżej T_m [21, 37, 81].

Elastyczność DNA oraz zdolność do denaturacji i renaturacji ma ogromne znaczenie z punktu widzenia pełnionych przez niego funkcji biologicznych. Trudno byłoby wyobrazić sobie upakowanie materiału genetycznego w jądrze komórkowym oraz przebieg procesów replikacji i transkrypcji, gdyby DNA pozbawione było tych cech [16].

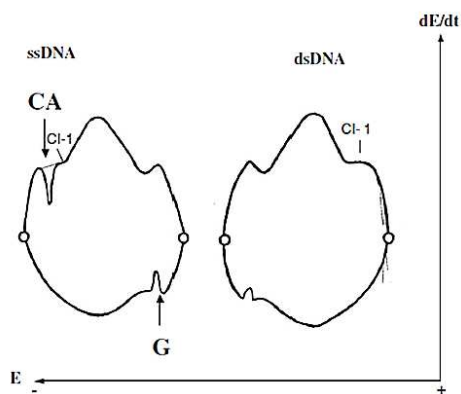
1.4.2. Właściwości elektrochemiczne DNA

Zważywszy na temat mojej rozprawy doktorskiej, w prowadzonej przeze mnie pracy doświadczalnej znalazły zastosowanie przede wszystkim elektrochemiczne techniki analityczne. Z tego też powodu niezwykle istotne wydaje się szczegółowe omówienie elektrochemicznych właściwości kwasu deoksyrybonukleinowego. DNA, jak wiele innych związków organicznych, zawiera w cząsteczce ugrupowania mogące ulegać reakcjom redoks. Jednym ze sposobów inicjowania takich procesów jest przyłożenie odpowiedniego napięcia do przetwornika elektrycznego, na którym zaadsorbowany jest kwas, co w zależności od jego wartości może powodować utlenianie bądź redukcję DNA. Kwas deoksyrybonukleinowy wykazuje również pewne przewodnictwo elektryczne, które opisywane jest wieloma mechanizmami, wynikającymi ze struktury DNA.

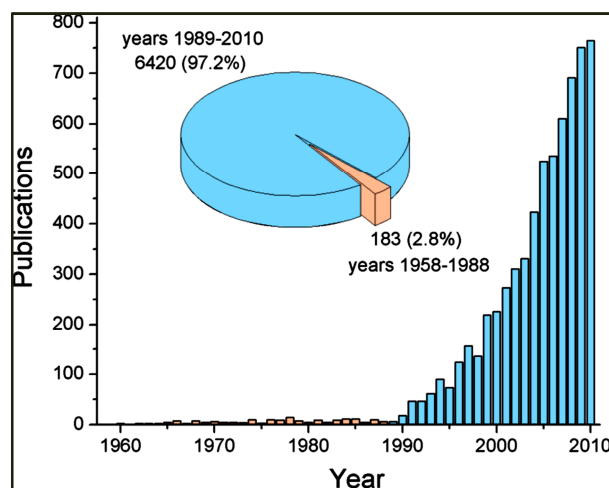
1.4.2.1. Elektroaktywność kwasu deoksyrybonukleinowego

Zainteresowanie elektrochemicznymi właściwościami DNA rozpoczęło się ponad 50 lat temu, lecz w latach 1949-1957 ukazała się zaledwie jedna publikacja o tej tematyce [82], w której dowodząco brak aktywności elektrochemicznej kwasów nukleinowych [83]. Przełomem okazał się rok 1958, kiedy to Emil Paleček odkrył i jako pierwszy opublikował, iż sam DNA ulega reakcjom redoks pod wpływem przyłożonego napięcia [84, 85]. Paleček wraz z zespołem badawczym, stosując techniki polarograficzne pokazał, iż na kąpiącej elektrodzie rtęciowej (KER) zasady azotowe DNA – adenina i cytozyna ulegają redukcji, zaś produkt redukcji guaniny ulega utlenieniu

[84, 86, 75] (RYS. 32) [75]. Odkrycia te spowodowały wzrost zainteresowania tematyką elektroaktywności kwasów nukleinowych, co poskutkowało wzrostem liczby publikacji na ten temat, która w latach 1960-1989 wynosiła średnio 10 prac rocznie (RYS. 33) [82]. Sukcesywny rozwój metod woltamperometrycznych i materiałów elektrodowych dał nowe możliwości eksperymentalne, pozwalające na dogłębną analizę tego zagadnienia [75, 82]. W związku z tym zainteresowanie elektrochemicznymi właściwościami DNA wzrosło jeszcze bardziej. W przeciągu ostatnich 50 lat opublikowanych zostało w sumie ponad 6000 prac o tej tematyce, przy czym około 97% z nich powstało w ciągu ostatnich 20 lat, a tylko w roku 2010 ukazało się ich około 760 (RYS. 33) [82].

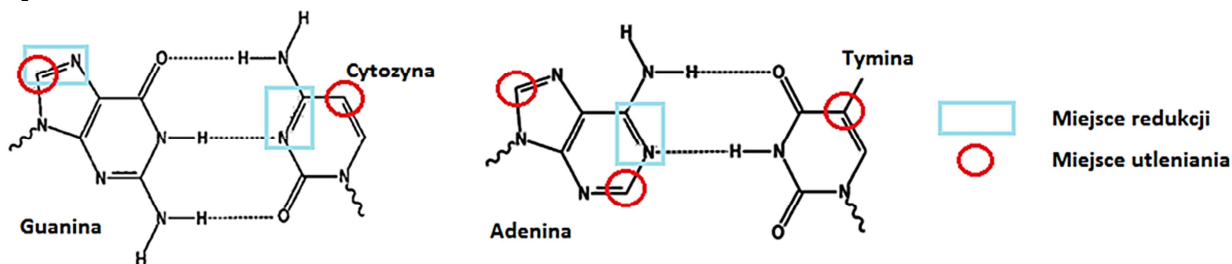


RYS. 32 – Schematyczne krzywe $dE/dt = f(E)$ natywnego DNA dwuniciowego (dsDNA) i zdenaturowanego termalnie jednoniciowego DNA (ssDNA) uzyskane metodą polarografii oscylograficznej przy kontrolowanym prądzie zmiennym. Katodowe wcięcie CA obrazuje redukcję cytozyny i adeniny, zaś wcięcie Cl-1 ma naturę pojemnościową. Wcięcie anodowe G odpowiada utlenieniu produktu redukcji guaniny [75].



RYS. 33 – Ilość prac na temat elektrochemicznych właściwości DNA opublikowana pomiędzy rokiem 1958 a 2010 [82].

Liczne badania wykazały, iż na elektrodach rtęciowych i węglowych reakcjom redoks ulegają jedynie elektroaktywne centra DNA zlokalizowane w resztach zasad azotowych, tworzących nukleotydy (RYS. 34) [87]. Reszty cukrowe oraz grupy fosforanowe w tych warunkach nie wykazują elektroaktywności [88, 89]. Jednak na elektrodzie miedziovej w środowisku zasadowym może dochodzić do elektrokatalitycznego utlenienia deoksyrybozy przy potencjale powyżej +0,4 V [90, 91].

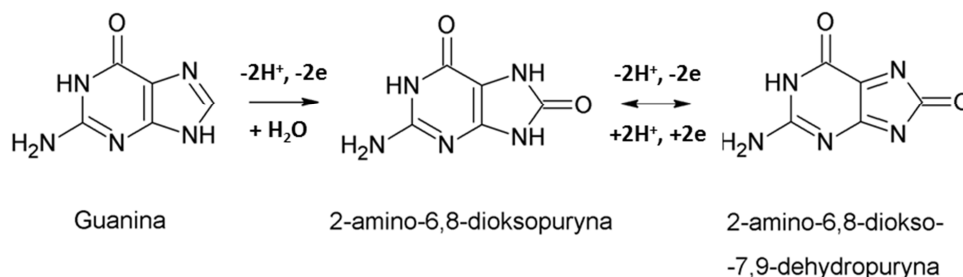


RYS. 34 – Centra elektroaktywne w komplementarnych parach zasad azotowych [87].

Dotychczas elektroredukcja DNA była obserwowana jedynie na elektrodach rtęciowych. Przyczyną tego są bardzo niskie wartości potencjału redukcji zasad azotowych, których nie można osiągnąć na elektrodach innego typu [89]. Względem nasyconej elektrody kalomelowej (NEK) wynoszą one odpowiednio -1,5 V dla adeniny, -1,5 V dla cytozyny oraz -1,8 V dla guaniny. W tych warunkach nie obserwuje się natomiast sygnału redukcji tyminy. Ponadto, produkt redukcji guaniny, 7,8-dihydroguanina, ulega utlenieniu przy potencjale -0,3 V [85, 88, 92]. Ze względu na potencjałowy zakres pracy elektrody rtęciowej, który obejmuje wartości potencjałów od ok. -2,0 V do ok. +0,4 V [93], nie jest możliwe rejestrowanie za jej pomocą sygnałów utlenienia zasad

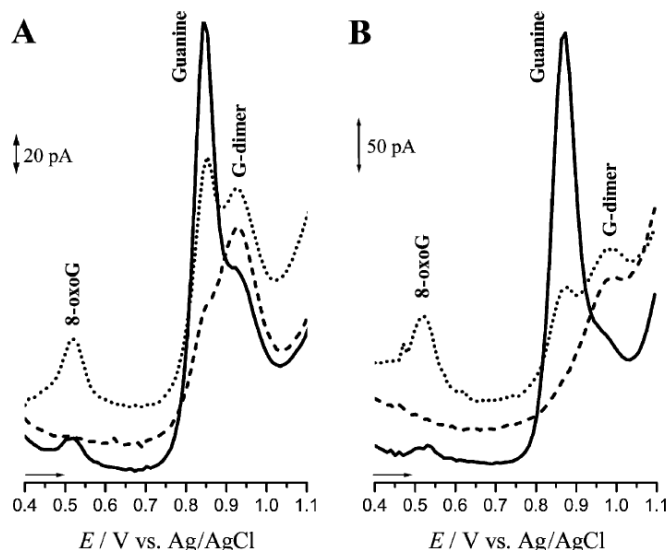
azotowych, gdyż ich potencjały są wysokie i wykraczają poza podany zakres [88]. Powyżej potencjału +0,4 V względem NEK rtęć ulega rozpuszczeniu z wytworzeniem jonów Hg_2^{2+} lub Hg^{2+} [93], z którymi reagują zasady azotowe, tworząc trudno rozpuszczalne substancje [88]. Z tego też powodu monitorowanie procesu utleniania DNA wymaga zastosowania przetworników elektrycznych wykonanych z innych materiałów [89].

Największą popularność w badaniu elektrotleniania DNA zdobyły elektrody węglowe różnego typu [90]. Jednak pomiary wykonywane za ich pomocą charakteryzują się zdecydowanie niższą czułością niż te prowadzone na elektrodach rtęciowych, a przez to wymagają użycia większych stężeń kwasu nukleinowego [89]. Na elektrodach węglowych utlenianie dsDNA objawia się w postaci dwóch sygnałów, pochodzących od guaniny i adeniny, występujących przy potencjałach odpowiednio +1,0 V i +1,2 V względem NEK [92]. Sygnałów utleniania tyminy i cytozyny związanych w łańcuchu dsDNA nie da się monitorować nawet na elektrodach węglowych, gdyż ich potencjały wykraczają poza potencjałowy zakres pracy tych elektrod, który wynosi od ok. -1,2 V do ok. +1,5 V [94]. Reakjom utleniania kwasu deoksyrybonukleinowego oraz zasad azotowych chciałabym poświęcić szczególną uwagę ze względu na specyfikę prowadzonych przeze mnie badań eksperymentalnych i wykorzystywanie sygnałów utleniania guaniny i adeniny zawartej w różnych rodzajach dsDNA jako jedne z głównych sygnałów analitycznych.



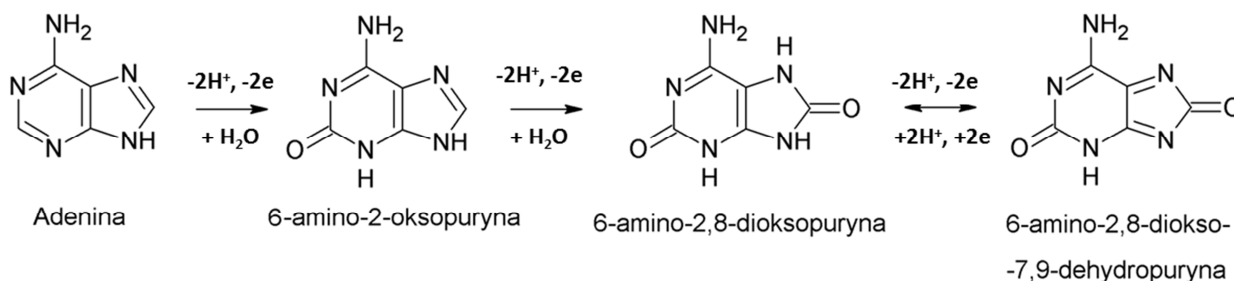
RYS. 35 – Proces utleniania guaniny [95, 96].

Elektrotlenianie zasad nukleinowych przebiega różnie w zależności od tego, czy występują one w postaci wolnej, czy są związane w strukturze DNA. Proces utleniania niezwiązanej guaniny jest nieodwracalny i przebiega dwuetapowo (RYS. 35) [95, 96]. W pierwszym etapie następuje nieodwracalne utlenienie guaniny do elektroaktywnej 8-oksoguaniny (8-oxoG, 2-amino-6,8-diokso-puryny), czemu towarzyszy utrata dwóch elektronów. Reakcja ta uwidacznia się na woltamperogramie w postaci pików przy potencjale +0,8 V względem nasyconej elektrody chlorosrebrowej (RYS. 36) [97]. Jednocześnie ma miejsce także jednoelektronowe odwracalne utlenianie dimerów guaniny, o czym świadczy pojawienie się niewielkiego pików przy potencjale ok. +0,95 V (RYS. 36) [97]. Tworzenie i utlenianie dimerów może zachodzić w przypadku roztworu czystej guaniny, lecz nie byłoby ono możliwe w sytuacji, gdy guanina tworzyłaby strukturę DNA. Drugi etap utleniania guaniny można zaobserwować dopiero na piątym



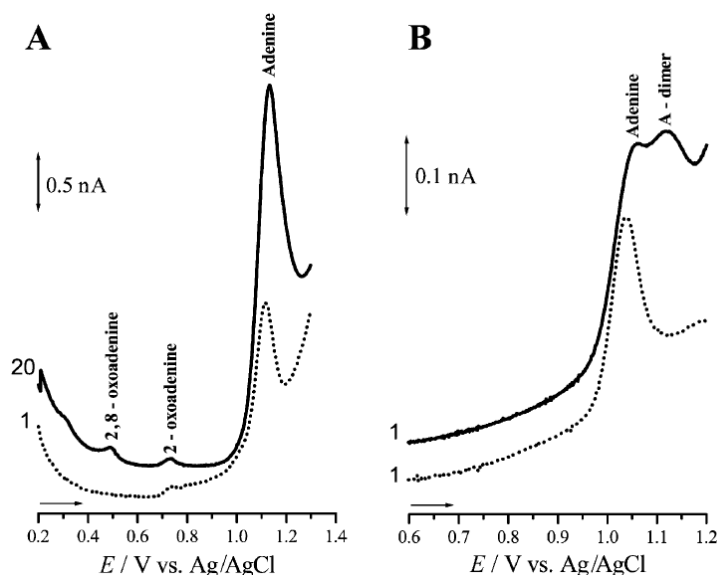
RYS. 36 – Woltamperogramy DPV prezentujące utlenianie: A – 0,5 mM i B – 50 μM guaniny w buforze octanowym o stężeniu 0,2 M (pH 4,5) na mikroelektrodzie z węgla szklonego. (—) piąty skan zarejestrowany w roztworze guaniny, (···) pierwszy i (---) drugi skan zarejestrowany po przeniesieniu elektrody do roztworu elektrolitu podstawowego [97].

zarejestrowanym kolejno woltamperogramie. Polega on na dwuelektronowym odwracalnym utlenieniu 8-oxoG, produktu pierwszego etapu procesu, adsorbującego się stopniowo na powierzchni elektrody. O utlenianiu 8-oksoguaniny świadczy pojawienie się sygnału przy potencjale ok. +0,55 V (RYS. 36) [97], lecz produkt tej reakcji (2-amino-6,8-diokso-7,9-dehydropuryna) ulega szybkiej hydrolizie.



RYS. 37 – Proces utleniania adeniny [95, 96].

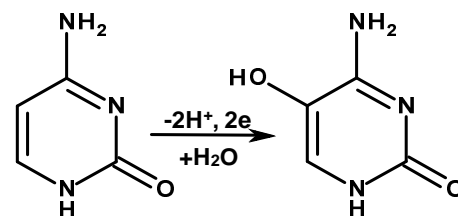
Proces elektrotlenienia adeniny w formie niezwiązanej przebiega trój etapowo z udziałem sześciu elektronów i jest nieodwracalny (RYS. 37) [95, 96]. W jego wyniku adenina zostaje początkowo utleniona do elektroaktywnego produktu – 6-amino-2-oksopuryny (2-oksoadeniny), co skutkuje pojawieniem się na woltamperogramie wyraźnego pik przy potencjale +1,05 V (RYS. 38) [97]. Następnie zaś 2-oksoadenina utlenia się do elektroaktywnej 6-amino-2,8-dioksopuryny (2,8-dioksoadeniny), a ta z kolei do 6-amino-2,8-diokso-7,9-dehydropuryny. Procesy te powodują pojawienie się na woltamperogramie dwóch bardzo niskich sygnałów prądowych w zakresie potencjałów +0,5–+0,7 V, lecz można je obserwować jedynie dla milimolowych stężeń adeniny i dopiero po zarejestrowaniu kolejno 20 woltamperogramów (RYS. 38) [97]. Ponadto, w przypadku mikromolowych stężeń roztworu adeniny na woltamperogramie pojawia się również pik przy potencjale ok. +1,12 V, który odpowiada procesowi utleniania dimerów adeniny (RYS. 38) [97].



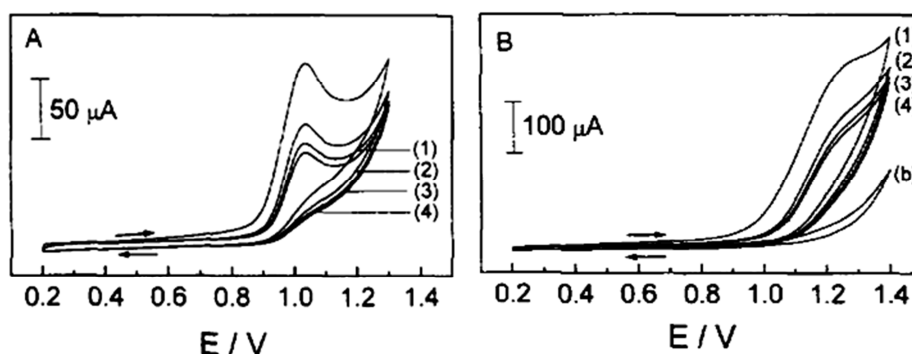
RYS. 38 – Woltamperogramy DPV prezentujące utlenianie: A – 1 mM i B – 10 μ M adeniny w buforze octanowym o stężeniu 0,2 M (pH 4,5) na mikroelektrodzie z węgla szklistego. (—) A – dwudziesty, B – pierwszy skan zarejestrowany w roztworze adeniny, (···) pierwszy skan zarejestrowany po przeniesieniu elektrody do roztworu elektrolitu podstawowego [97].

Procesy elektrotleniania purynowych zasad azotowych są dużo lepiej poznane niż zasad pirymidynowych. Główną przyczyną tego stanu rzeczy są wysokie potencjały utlenienia tyminy i cytozyny, a co za tym idzie trudność w monitorowaniu ich sygnałów. Mimo to podejmowano

próby bardziej wnikliwej analizy tych procesów. Mechanizm elektrotleniania cytozyny na powierzchni elektrody nie jest do końca poznany. Pojawiają się sugestie, że ilość protonów i elektronów zaangażowanych w proces zależy od pH i może on wówczas prowadzić do utworzenia 3-N-tlenku cytozyny [98]. Inna teoria zaś sugeruje, że reakcja ta przebiega jednoetapowo przy udziale dwóch elektronów i dwóch protonów według podanego schematu (RYS. 39) [99]. Elektrotlenianie cytozyny jest procesem nieodwracalnym, o czym świadczy pojawienie się na woltamperogramach cyklicznych zarejestrowanych w jej roztworze tylko jednego sygnału przy potencjale ok. +1,2 V (względem Ag/AgCl) w buforze o pH 10,8 (RYS. 40B) [98] lub +1,48 V (względem NEK) w buforze o pH 5,0 [99]. W obu tych przypadkach na woltamperogramach brak jest jakichkolwiek sygnałów redukcji.

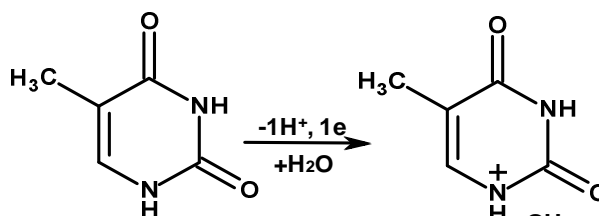


RYS. 39 – Proces utleniania cytozyny [99].



RYS. 40 – Woltamperogramy cykliczne prezentujące utlenianie: A – 2,6 mM tyminy, B – 5 mM cytozyny w roztworze buforu boranowego o pH odpowiednio 10,0 oraz 10,8. (1)-(4) – kolejno zarejestrowane skany [98].

Utlenianie tyminy na elektrodzie przebiega nieodwracalnie i podobnie jak w przypadku cytozyny, jego mechanizm nie został dokładnie poznany. Najprawdopodobniej jest to proces jednoelektronowy, biegnący według zaprezentowanego równania (RYS. 41) [100, 101]. Na woltamperogramie cyklicznym zarejestrowanym w roztworze tyminy widnieje tylko jeden pik (RYS. 40A) [98], odpowiadający utlenianiu zasady, którego potencjał osiąga wartość od +0,9 V do +1,4 V w zależności od pH oraz modyfikacji zastosowanej elektrody [98, 100, 101]. Zarówno w przypadku tyminy, jak i omówionej wcześniej cytozyny, brak jest informacji na temat elektroaktywności produktów utlenienia tych zasad.

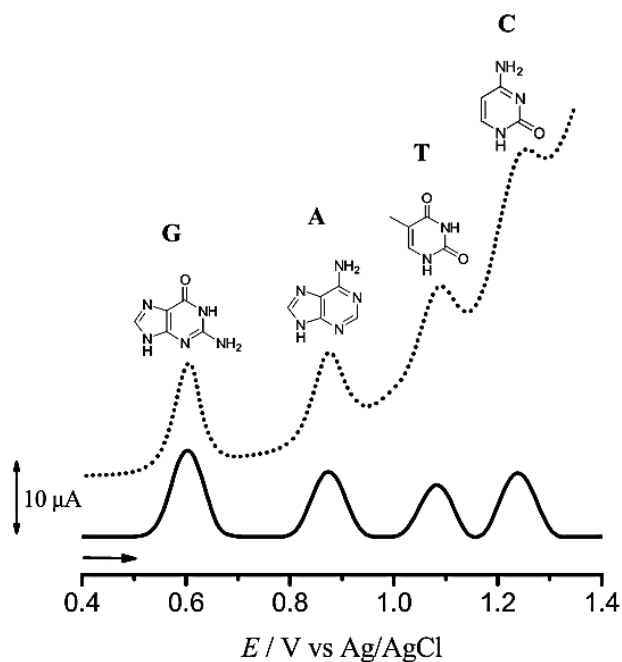


RYS. 41 – Proces utleniania tyminy [100, 101].

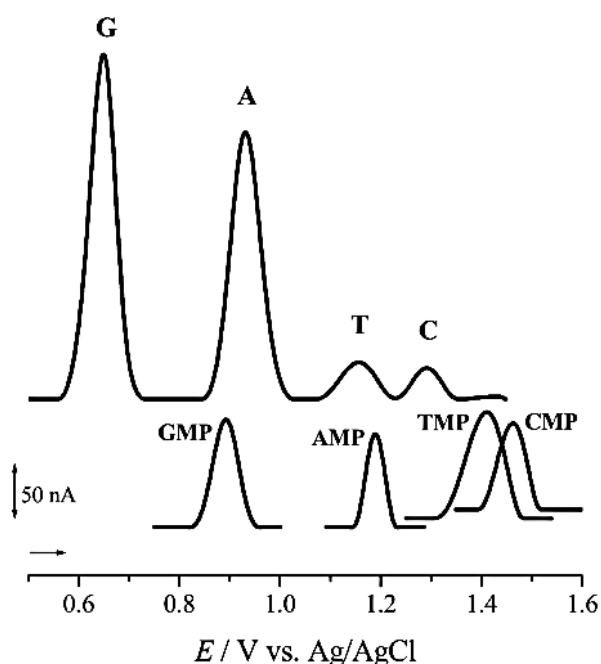
Omówione dotychczas procesy utleniania zasad nukleinowych dotyczyły sytuacji, gdy analizowany roztwór zawierał tylko jedną z nich. Jednak podstawowym celem analitycznym jest monitorowanie procesów redoks wszystkich zasad jednocześnie, gdyż w takiej formie występują w cząsteczkach DNA. Szerokie badania podejmujące tą tematykę zostały przeprowadzone przez Anę Marię Oliveira-Brett i jej zespół [98, 102-104]. Analiza mieszaniny guaniny i adeniny o stężeniu 20 μM oraz cytozyny i tyminy o stężeniu 200 μM wykonana metodą różnicowej woltamperometrii pulsowej (DPV, ang. Differential Pulse Voltammetry) na elektrodzie z węgla szklanego w środowisku buforu fosforanowego o pH 7,4 ujawniła sygnały utlenienia wszystkich zasad nukleinowych: guaniny przy potencjale +0,70 V, adeniny przy +0,96 V, tyminy przy +1,16 V i cytozyny przy +1,31 V względem elektrody Ag/AgCl (RYS. 42) [102]. Mimo iż stężenie zasad pirymidynowych w mieszaninie było dziesięciokrotnie wyższe niż zasad purynowych, to i tak

powierzchnie pod pikami w przypadku guaniny i adeniny były większe niż w przypadku tyminy i cytozyny. Świadczy to o trudnościach w detekcji zasad pirymidynowych na drodze woltamperometrycznego utleniania, spowodowanych wysokimi wartościami potencjałów ich sygnałów, które są bliskie potencjałom utleniania składników elektrolitu podstawowego [102]. Potencjały i prądy sygnałów utleniania zasad azotowych zarejestrowanych w ich mieszaninie silnie zależą od pH. Wraz z jego wzrostem od 3 do 12 następuje przesunięcie potencjału pików o ok. 500 mV w stronę mniej dodatnich potencjałów. Zależność potencjału od pH dla guaniny i adeniny jest liniowa w tym zakresie, zaś dla tyminy i cytozyny wykazuje dwa fragmenty liniowe o różnych nachyleniach w zakresach 3-9 oraz 9-12. Bardziej zróżnicowana jest zależność prądów utleniania zasad azotowych od pH. Piki guaniny i adeniny wykazują prawie liniowy spadek wraz ze wzrostem pH w zakresie od 3 do 12, podczas gdy wysokość pików tyminy i cytozyny pozostaje prawie niezmienną, ale w przypadku tyminy następuje niewielki wzrost prądu powyżej pH 10, zaś w przypadku cytozyny stopniowy spadek począwszy od pH 7 [102]. Najnowsze badania wykazują także silną zależność potencjału, prądu oraz szerokości piku utleniania danej zasady nukleinowej od obecności innych zasad w roztworze. Efekt ten jest najbardziej widoczny, gdy w roztworze obecne są dwie lub trzy zasady. Najsilniejszy wpływ inne zasady wywołują na sygnał cytozyny na elektrodzie z węgla szklanego oraz sygnał adeniny na elektrodzie z węgla szklanego modyfikowanej zredukowanym elektrochemicznie tlenkiem grafenu [105].

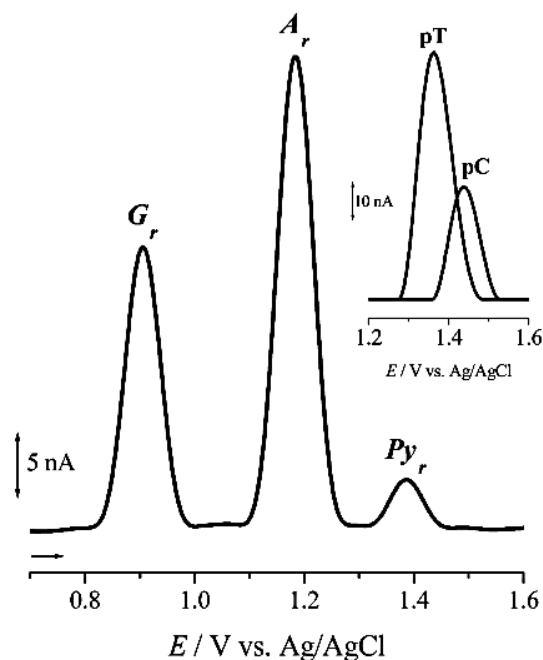
W strukturze DNA każda zasada azotowa połączona jest z elementem cukrowo-fosforanowym, tworząc w ten sposób nukleotyd, co w zdecydowany sposób wpływa na mechanizm jej procesu redoks, znacznie go komplikując [106]. Dlatego też istotne jest zbadanie elektrotleniania 2'-deoksy-5'-monofosforanów poszczególnych zasad i sprawdzenie, czy związanie ich w strukturze deoksyrybonukleotydów powoduje zmiany w wyglądzie ich krzywych woltamperometrycznych. Na woltamperogramach zarejestrowanych w roztworach poszczególnych nukleotydów widoczne były wyraźne piki utleniania przy potencjałach: +0,89 V dla GMP, +1,19 V dla AMP, +1,41 V dla TMP i +1,46 V dla CMP (RYS. 43) [102]. W porównaniu z sygnałami utleniania niezwiązanych zasad azotowych, sygnały GMP, AMP i TMP były przesunięte o 250 mV w stronę bardziej dodatnich potencjałów, a w przypadku CMP wartość ta wyniosła 170 mV. Fakt ten wskazuje, iż związanie poszczególnych zasad w formę deoksyrybonukleotydów powoduje utrudnienie ich utleniania na elektrodzie. Powodem tego może być utworzenie wiązania N-glikozydowego pomiędzy cząsteczkami cukru i zasady, co wpływa na układ elektronów π w pierścieniach puryn i pirymidyn, utrudniając oddawanie elektronów przez zasady w procesie utleniania. Ponadto, prądy utleniania nukleotydów są niższe niż odpowiednich zasad przy tej samej wartości stężenia. Może być to spowodowane niższym współczynnikiem dyfuzji nukleotydów w porównaniu z wolnymi zasadami oraz wzrostem energii solwatacji, wynikającym z obecności polarnej grupy cukrowo-fosforanowej [102].



RYS. 42 – Woltamperogram DPV zarejestrowany w mieszaninie 20 μM guaniny (G), 20 μM adeniny (A), 200 μM tyminy (T) i 200 μM cytozyny (C) w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego (pH 7,4) na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) o średnicy 3 mm. (····) zarejestrowany woltamperogram, (—) woltamperogram po korekcji linii podstawowej [102].



RYS. 43 – Voltamperogramy DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowane w roztworach: $20 \mu\text{M}$ 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu (GMP), $20 \mu\text{M}$ 2'-deoksyadenozyno-5'-monofosforanu (AMP), $500 \mu\text{M}$ 2'-deoksytymidyno-5'-monofosforanu (TMP), $500 \mu\text{M}$ 2'-deoksycytydyno-5'-monofosforanu (CMP), oraz dla porównania w równomolowej ($20 \mu\text{M}$) mieszaninie guaniny (G), adeniny (A), tyminy (T), cytozyny (C), w środowisku $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) [102].



RYS. 44 – Voltamperogram DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowany w $40 \mu\text{g/ml}$ roztworze ssDNA w środowisku $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE). G_r – reszta guaninowa, A_r – reszta adeninowa, Py_r – reszty zasad pirymidynowych. Wstawienie: Voltamperogramy DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowany w $100 \mu\text{g/ml}$ roztworach: poli(dT) (pT) i poli(dC) (pC) w środowisku $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) [102].

Jeszcze inaczej przedstawia się utlenianie zasad azotowych, gdy występują one jako element tworzący pojedynczą nić kwasu deoksyrybonukleinowego. W tej sytuacji na voltamperogramie zarejestrowanym w roztworze ss-DNA widoczne są trzy sygnały przy potencjałach $+0,90 \text{ V}$, $+1,20 \text{ V}$ i $+1,39 \text{ V}$, które pochodzą od utleniania odpowiednio reszty guaninowej, reszty adeninowej oraz reszt zasad pirymidynowych (tyminy i cytozyny) (RYS. 44) [102]. W przypadku zasad pirymidynowych dochodzi do nałożenia się pików od tyminy i cytozyny [107], co zostało potwierdzone poprzez osobną analizę ssDNA składającego się wyłącznie z tyminy (poli(T)) lub wyłącznie z cytozyny (poli(C)) (wstawienie na RYS. 44) [102]. W przypadku ssDNA, podobnie jak dla wolnych zasad oraz nukleotydów, prądy utleniania zasad purynowych są wyższe niż zasad pirymidynowych. Obserwowane sygnały utleniania zasad azotowych zawartych w ssDNA w znacznym stopniu zależą również od jego sekwencji nukleotydowej [107], co w określonych warunkach umożliwia rejestrowanie sygnałów utleniania tyminy i cytozyny, zawartych w pojedynczych łańcuchach DNA. Korzystając z oligonukleotydów o ściśle określonej długości i składzie, wykazano, iż sygnał tyminy pojawia się na voltamperogramie jedynie w przypadku, gdy zawartość tej zasady w pojedynczych niciach oligonukleotydowych wynosi blisko 50%, zaś sygnał cytozyny udaje się zarejestrować jedynie w przypadku oligonukleotydowego ssDNA, niezawierającego w sekwencji zasad tyminowych [107].

DNA występujące w żywych organizmach ma postać podwójnej helisy, a więc kluczową kwestią jest analiza procesu utleniania zasad azotowych związanych w strukturze dsDNA. Niestety, ze względu na niskie prądy utleniania oraz przesuwanie się sygnałów w stronę bardziej dodatnich potencjałów, zadanie to nie jest tak proste, jak w przypadku wolnych zasad. Na voltamperogramie dsDNA zarejestrowanym na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) widoczne są jedynie dwa piki,

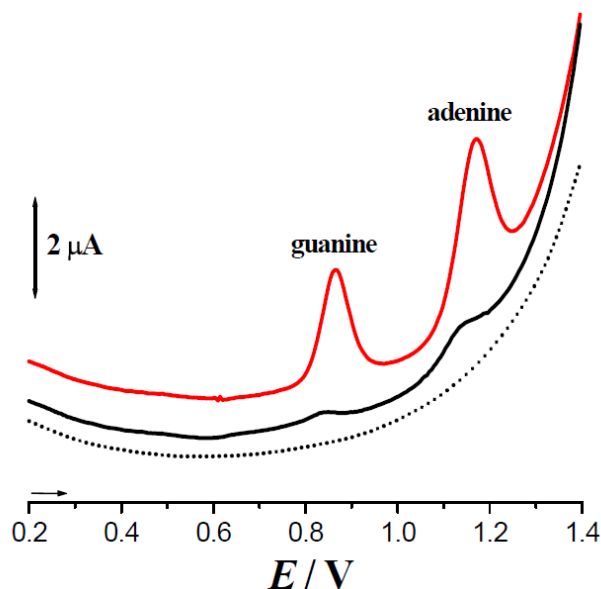
odpowiadające utlenianiu reszt guaninowych (ok. +0,9 V) i adeninowych (ok. +1,2 V), lecz brak jest jakichkolwiek sygnałów od zasad pirymidynowych (RYS. 45) [108]. Bez zastosowania korekcji linii podstawowej sygnały dla dsDNA są ledwo widoczne na woltamperogramie, a ich wysokość jest dużo mniejsza niż dla ssDNA. Może to wynikać z utrudnienia transferu elektronów z wnętrza helisy, gdzie umiejscowione są zasady nukleinowe, do powierzchni elektrody [108, 109].

Dynamiczny rozwój materiałów elektrodowych pozwolił na konstrukcję czulej elektrody z węgla szklanego modyfikowanej zredukowanym chemicznie tlenkiem grafenu, na której można rejestrować jednocześnie sygnały utlenienia czterech zasad azotowych zawartych zarówno w dsDNA, jak i ssDNA.

Sygnały otrzymane za pomocą tej elektrody są wyraźne, nie nakładają się na siebie i osiągają wyższe wartości w porównaniu z pomiarami wykonanymi na elektrodzie grafitowej i z węgla szklanego. Odpowiedzialny za to jest zredukowany tlenek grafenu pokrywający elektrodę, który dzięki swym wyjątkowym właściwościom strukturalnym i przewodzącym ułatwia przepływ elektronów pomiędzy przetwornikiem a substancją w roztworze. Zastosowanie elektrody z węgla szklanego modyfikowanej zredukowanym chemicznie tlenkiem grafenu jest nowym rozwiązaniem, umożliwiającym jednoczesną detekcję wszystkich zasad nukleinowych DNA bez potrzeby wcześniejszej hydrolizy próbki [110].

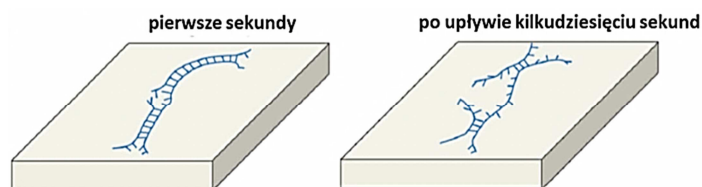
Zależność sygnałów utlenienia guaniny i adeniny od tego, czy stanowią one elementy pojedynczej czy podwójnej nici DNA stwarza wygodne narzędzie, pozwalające na rozróżnienie tych dwóch struktur. Analogiczna sytuacja ma także miejsce w przypadku monitorowania sygnałów elektroredukcji adeniny i cytozyny na elektrodach rtęciowych, jednak tutaj efekt jest jeszcze bardziej wyraźny. Tak duże różnice w sygnałach zasad azotowych, występujących w dsDNA oraz ssDNA, najprawdopodobniej wynikają z niedostępności miejsc, które w pierwszej kolejności ulegają procesom redoks w ich molekułach (RYS. 34). Elektroaktywne centra redukcji A i C znajdują się wewnątrz podwójnej helisy DNA i są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z komplementarnymi zasadami. Stąd też sygnały redukcji tych zasad wykazują bardzo dużą czułość na wszelkie zmiany w strukturze DNA. Elektroaktywne centra utleniania G i T usytuowane są odpowiednio w dużej i małej bruzdzie helisy i nie biorą udziału w tworzeniu komplementarnych wiązań wodorowych, co skutkuje znacznie mniejszymi różnicami w wysokościach sygnałów tych zasad w zależności od struktury DNA [82, 88, 92]. Przyczyną występowania tych różnic może być niejednakowa elastyczność form dsDNA i ssDNA. Podwójna helisa DNA jest bardziej sztywna niż forma pojedynczej nici i trudniej jest jej wnikać w chropowatą powierzchnię elektrody węglowej [89, 90]. Już od lat 60. i 70. XX wieku analiza oparta na różnicach w sygnałach prądowych uzyskiwanych dla ssDNA i dsDNA była szeroko stosowana do badania strukturalnych zmian kwasów deoksyrybonukleinowych, w tym uszkodzeń helisy spowodowanych różnymi czynnikami chemicznymi i fizycznymi oraz procesów denaturacji i renaturacji [82, 88, 89].

Rozróżnienie form ssDNA i dsDNA jest możliwe nie tylko na podstawie sygnałów redoks zasad nukleinowych, ale również poprzez badanie procesów adsorpcji/desorpcji DNA na elektrodach rtęciowych, czemu towarzyszy pojawienie się charakterystycznych sygnałów pojemnościowych na diagramach tensametrycznych zarejestrowanych metodami



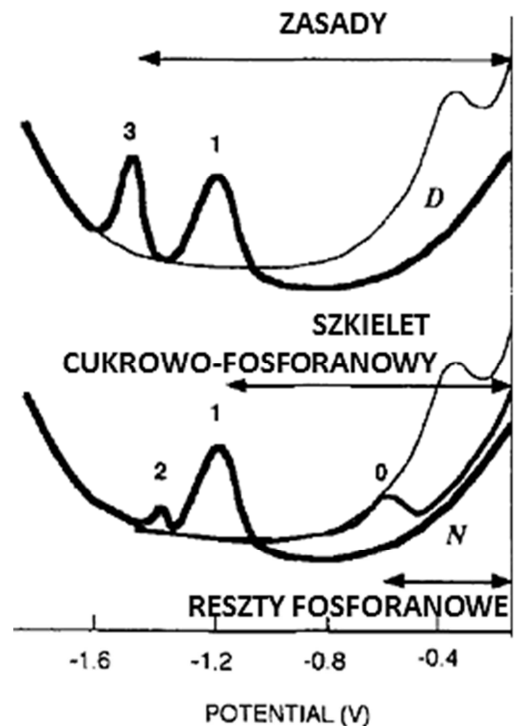
RYS. 45 – Woltamperogramy DPV zarejestrowane w 60 µg/ml roztworach: (—) ssDNA (pierwszy skan), (···) dsDNA (pierwszy skan), (—) dsDNA (czterdziesty skan) zaarejestrowane w środowisku 0,1 M buforu octanowego o pH 4,5 [108].

zmiennoprądowymi [75, 82, 88, 92]. W przypadku adsorpcji dsDNA i ssDNA na KER w roztworze o średniej sile jonowej i pH obojętnym lub lekko zasadowym, monitorowanej metodą polarografii zmiennoprądowej, osadzanie kwasu deoksyrybonukleinowego na elektrodzie następuje w zakresie potencjałów od 0 do -1,0 V i w procesie tym mogą uczestniczyć reszty fosforanowe, zasady nukleinowe, jak i cząsteczki cukru. W tych warunkach na polarogramie pojawiają się jedynie piki tensametryczne, zaś brak jest sygnałów wskazujących na redukcję zasad (RYS. 46) [88]. Sygnał przy potencjale ok. -1,2 V (na RYS. 46 oznaczony jako 1) występuje zarówno dla natywnej (N), jak i zdenaturowanej (D) formy kwasu. Jego obecność świadczy o desorpcji lub reorientacji odcinków DNA, związanych z elektrodą poprzez szkielet cukrowo-fosforanowy. Na polarogramie zarejestrowanym dla dsDNA widoczny jest niewielki pik 2 ok. -1,3 V, przypisywany lokalnie zniekształconym rejonom dsDNA, w których może następować częściowy udział zasad azotowych w procesie adsorpcji/desorpcji na elektrodzie. Z punktu widzenia rozróżnienia formy dsDNA od ssDNA najistotniejszy wydaje się być sygnał 3, przy potencjale ok. -1,45 V. Występuje on jedynie w przypadku zdenaturowanej formy kwasu lub częściowego rozplecenia końców dsDNA i odpowiada desorpcji fragmentów zaadsorbowanych poprzez zasady azotowe. Tego typu adsorpcja jest niemożliwa w przypadku natywnej formy DNA, gdyż wówczas zasady nukleinowe znajdują się wewnątrz helisy i nie mogą uczestniczyć w procesie osadzania kwasu na elektrodzie [88, 92]. Warto tutaj wspomnieć także o pewnym zjawisku, któremu ulega DNA zaadsorbowane na elektrodach rtęciowych. Otóż liczne badania [88, 92, 111, 112] wykazały, że wydłużony kontakt dsDNA z elektrodą, do której przyłożony jest potencjał z wąskiego zakresu ok. -1,2 V (tzw. region U) [75, 82] powoduje znaczące zmiany w strukturze kwasu. W pierwszych sekundach następuje powolne otwieranie helisy, zaś gdy ujemny potencjał przyłożony jest przez kilkadziesiąt sekund helisa ulega rozplataniu i częściowej denaturacji (RYS. 47) [82]. Objawem tego jest pojawienie się na diagramach tensametrycznych sygnału charakterystycznego dla struktury ssDNA, odpowiadającego pikowi 3 na RYS. 46, lecz ma to miejsce jedynie przy skanowaniu potencjałem od wartości dodatnich do ujemnych [82, 92, 113].



RYS. 47 – Schemat zmian zachodzących w strukturze dsDNA na elektrodzie rtęciowej wywołanych przyłożeniem ujemnego potencjału z zakresu U (ok. -1,2 V) [82].

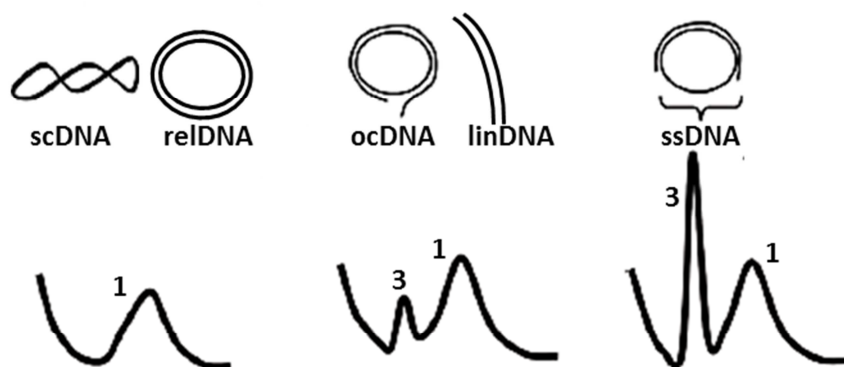
Opisując elektroaktywność różnych form DNA, nie można pominąć także plazmidów. Pierwsze elektrochemiczne eksperymenty z tym rodzajem kwasu deoksyrybonukleinowego zostały opisane ponad 20 lat temu [114]. Wówczas metodami polarograficznymi zbadane zostały na KER właściwości adsorpcyjne i redoks dwóch form plazmidów – superhelikalnej (scDNA) oraz



RYS. 46 – Polarogramy zmiennoprądowe prezentujące procesy adsorpcji/desorpcji natywnego dsDNA (N) i zdenaturowanego ssDNA (D) na KER w roztworze o średniej sile jonowej i lekko zasadowym pH. Poprzeczne strzałki wskazują zakresy potencjału, w których w adsorpcję DNA zaangażowane są poszczególne jego elementy. Szczegóły dotyczące oznaczeń sygnałów znajdują się w tekście [88].

z pękniętą jedną nicią (ocDNA). Badania te wykazały, iż scDNA adsorbuje się na elektrodzie rtęciowej słabiej niż ocDNA oraz nie wykazuje żadnych sygnałów prądowych, wskazujących na jego redukcję. Tego typu eksperymenty nie cieszyły się jednak dużą popularnością, gdyż wymagały użycia stosunkowo dużych ilości DNA o bardzo wysokiej czystości [111]. Stosując metodę potencjometrii adsorpcyjnej z zateżaniem oraz metody woltamperometryczne, udało się zarejestrować elektrotlenianie guaniny oraz elektroredukcję adeniny i cytozyny zawartych w superhelikalnej formie plazmidów na elektrodzie z węgla szklanego, ale sygnały dla scDNA były zawsze nieco niższe niż dla formy liniowej [111, 115].

Znacznie częściej w celu wykrycia i identyfikacji różnych form DNA plazmidowego bada się proces ich adsorpcji/desorpcji na powierzchni elektrody rtęciowej, podobnie jak przy opisanym powyżej rozróżnianiu dsDNA i ssDNA. Na diagramach zarejestrowanych na wiszącej kroplowej elektrodzie rtęciowej (WKER) metodą woltamperometrii zmiennoprądowej dla różnych form plazmidów zawsze pojawia się pik przy potencjale ok. -1,2 V (pik 1 na RYS. 48), jednak dla scDNA i relDNA jest on niższy niż dla pozostałych form DNA. Sygnał pozwalający definitywnie odróżnić zamknięte koliste formy plazmidów od ocDNA, linDNA czy ssDNA występuje przy potencjale ok. -1,45 V (pik 3 na RYS. 48) [113]. Jest on charakterystyczny dla cząsteczek kwasów nukleinowych, zawierających wolne końce lub fragmenty pojedynczych nici (RYS. 48) [82, 88]. W odróżnieniu od ocDNA i linDNA, superhelikalne plazmidy nie ulegają procesowi rozplatania na elektrodzie rtęciowej przy ujemnych potencjałach z zakresu U bez względu na kierunek skanowania potencjałem, a tym samym nie ujawniają sygnału, świadczącego o denaturacji i udziale zasad azotowych w adsorpcji. Monitorowanie obecności i wysokości pików 3 (na RYS. 46 i RYS. 48) jest łatwym i czułym sposobem wykrywania uszkodzeń szkieletu cukrowo-fosforanowego scDNA, a tym samym badania wpływu różnych czynników (np. promieniowania, wolnych rodników) na DNA [88, 113].



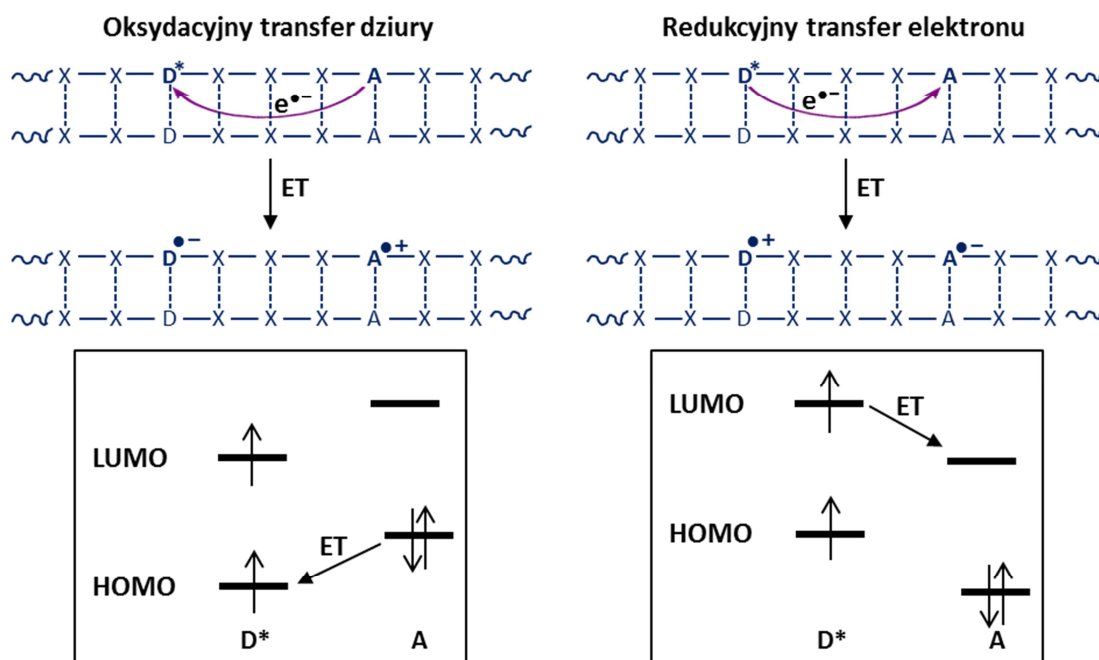
RYS. 48 – Schemat różnych form plazmidów i ich sygnałów tensametrycznych zarejestrowanych zmiennoprądowymi metodami polarograficznymi lub woltamperometrycznymi [82, 88].

1.4.2.2. Przewodnictwo elektryczne kwasu deoksyrybonukleinowego

Pierwsze eksperymenty, w których próbowano wytłumaczyć zjawisko przepływu ładunku przez DNA, rozpoczęły się niespełna 10 lat po odkryciu przez Watsona i Cricka przestrzennej struktury molekuł tego kwasu [116]. W roku 1962 Eley i Spivey jako pierwsi zaobserwowali przepływ elektronów w łańcuchach DNA i zmierzili przewodnictwo elektryczne w suchym preparacie kwasu [117]. W kolejnych latach wykonane zostały eksperymenty potwierdzające to zjawisko [118-120], a następnie pojawiło się wiele teorii próbujących wytłumaczyć jego mechanizm [116, 121-126]. Teorie te dostarczyły sporo rozbieżności odnośnie właściwości przewodzących DNA, określając go jako przewodnik molekularny, półprzewodnik, a nawet izolator [116, 124, 127-130].

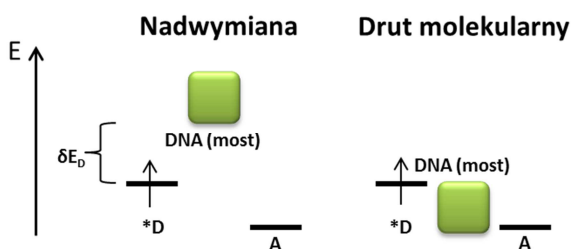
Przewodnictwo elektryczne DNA bada się przede wszystkim z wykorzystywaniem metod spektroskopowych [130-135] i elektrochemicznych [131, 132, 136-138]. Analiza przepływu ładunku przez DNA wymaga skonstruowania specjalnego układu, zawierającego donor i akceptor ładunku. Zwykle osiąga się to poprzez przygotowanie łańcuchów DNA ze specjalnie zmodyfikowanymi fragmentami nukleotydów (adeniną [121, 130, 133, 139], częścią cukrową [123, 134], dimerem tyminy [140]), przyłączenie do helisy interkalujących substancji foto- i/lub elektroaktywnych [141] (organicznych kompleksów metali: rodu [121, 131, 135], rutenu [120, 135], kobaltu [120], irydu [138], a także błękitu metylenowego [132, 138], daunorubicyny [136-138], flawiny [140]), działanie promieniowania [125, 142].

Omawianie przewodnictwa elektrycznego DNA należy rozpocząć od rozróżnienia dwóch typów tego zjawiska. Mianowicie, może polegać ono na oksydacyjnym przepływie dziury elektronowej (ang. oxidative hole transfer) lub redukcyjnym przepływie elektronu (ang. reductive electron transfer) [127]. Mimo dość mylącej nazwy, w obu przypadkach mamy do czynienia z transferem elektronu, lecz odbywa się on w różnych kierunkach. Transfer dziury elektronowej polega na przepływie elektronu od akceptora dziury (zasady nukleinowej DNA lub molekuly interkalującej do DNA), znajdującego się na końcu szlaku, do donora dziury, którego wzbudzenie fotochemiczne lub fotofizyczne inicjuje cały proces. Wówczas akceptor ulega utlenieniu, a donor redukcji. Sytuacja wygląda nieco inaczej w przypadku transferu elektronu przez DNA. Tutaj fotowzbudzony donor elektronu inicjuje proces i ulega utlenieniu, elektron zaś przepływa do końcowego akceptora, który przyjmując go, ulega redukcji. Ponadto, procesy przepływu dziury i elektronu są kontrolowane przez przejścia elektronowe pomiędzy różnymi orbitalami: HOMO dla przepływu dziury oraz LUMO dla przepływu elektronu (RYS. 49) [127].



RYS. 49 – Porównanie oksydacyjnego transferu dziury elektronowej i redukcyjnego transferu elektronu w DNA (D – donor dziury/elektronu, A – akceptor dziury/elektronu, ET – transfer elektronu). Opracowano na podstawie [127].

Bez względu na kierunek przepływu ładunku przez kwas deoksyrybonukleinowy, jego natura zależy od różnic w poziomach energetycznych pomiędzy DNA a donorem i akceptorem elektronu. DNA stanowi tutaj pewnego rodzaju most (ang. bridge), po którym elektron może poruszać się od donora do akceptora [122, 127] (RYS. 50) [127]. Jeżeli poziomy energetyczne donora i akceptora są zbliżone do poziomu DNA, wówczas elektron dostaje się na poziom mostu i wędruje do akceptora, będąc zlokalizowanym na kolejnych orbitalach cząsteczki kwasu. W tej sytuacji DNA pełni rolę drutu molekularnego (ang. molecular wire), a transport elektronu jest



RYS. 50 – Porównanie transferu ładunku na zasadzie nadwymiany elektronu oraz drutu molekularnego. Opracowano na podstawie [127].

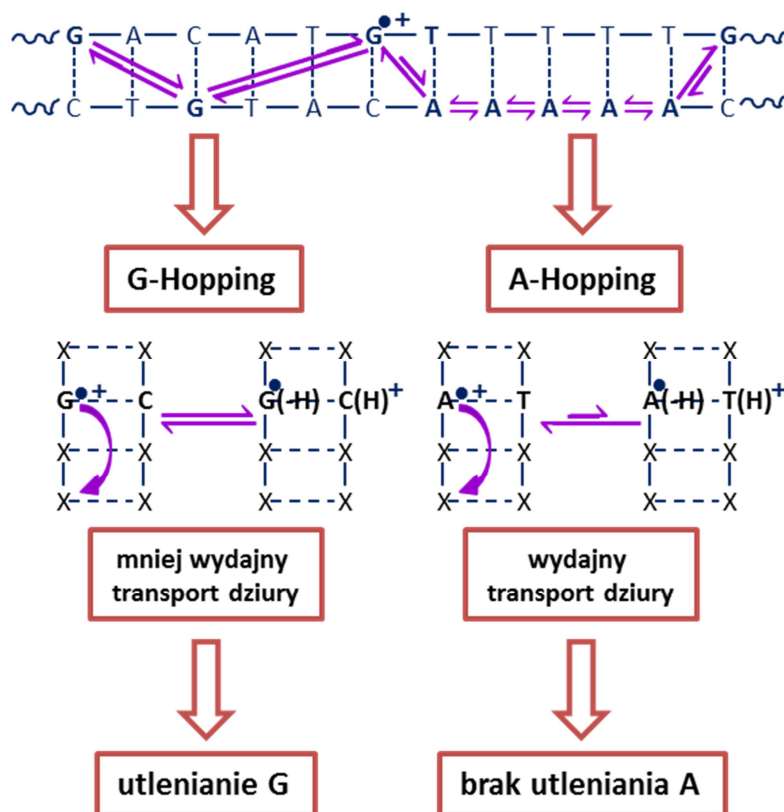
wieloetapowy i może odbywać się na dużych dystansach (nawet do 200 Å [143]) niezależnie od odległości. Jeśli zaś stan energetyczny donora jest zdecydowanie niższy niż poziom mostu, to mamy do czynienia z mechanizmem nadwymiany elektronu (ang. superexchange mechanism), nazywanym także mechanizmem tunelowania (ang. tunneling mechanism). Polega on na koherentnym przeskoku elektronu z donora do akceptora bez osiągnięcia poziomu mostu. W tym

przypadku jednoetapowy transfer elektronu odbywa się na ograniczonym dystansie (ok. 10 Å) i zależy w sposób wykładniczy od odległości [90, 127, 131, 144].

Dwa sposoby migracji elektronu wzdłuż helisy DNA sprawiają, że można wyróżnić także dwa rodzaje przepływu dziury elektronowej: proces jednoetapowy oparty na mechanizmie tunelowania oraz proces wieloetapowy oparty na przeskoku dziury wzdłuż helisy DNA (ang. hole hopping) [125, 127]. Mechanizm nadwymiany ładunku jest stosunkowo prosty, ale jego ograniczony zasięg sprawia, że samodzielnie nie może on odegrać kluczowej roli podczas przepływu ładunku przez DNA na duże odległości.

Procesem o wiele bardziej złożonym jest przeskoczek dziury. Jak wspomniano już powyżej, w tym przypadku poziomy energetyczne donora dziury elektronowej i DNA są do siebie zbliżone, a więc dodatni ładunek może zostać termicznie wprowadzony na orbitale zasad nukleinowych. Jednak nie wszystkie zasady utleniają się jednakowo łatwo (rozdział I.1.4.2.1). Najniższy potencjał utlenienia wykazuje guanina i to właśnie kationorodnik tej zasady, będący produktem jej jednoelektronowego utlenienia, pełni rolę przejściowego nośnika ładunku podczas procesu hoppingu [127, 142, 144]. Ładunek przemieszcza się, przeskakując z guaniny na guaninę, aż zostanie spułapkowany przez końcowy akceptor (RYS. 51) [127]. Proces ten nie odznacza się najlepszą wydajnością, gdyż konkuruje z transferem protonu przez parę G^{•+}C.

Ze względu na zbliżone wartości pK_a zasad G^{•+} i C tworzy się pewna równowaga odwracalnego protonowania tych zasad, powodująca separację niesparowanego elektronu, który pozostaje zlokalizowany na guaninie i ładunku, który przesuwa się w stronę cytozyny, co może zaburzać przeskoczek dziury wzdłuż helisy DNA [127, 145]. Istnieje również możliwość zablokowania transferu ładunku przez prowadzącą do pełnego utlenienia zasady, reakcję G^{•+} z H₂O lub O₂, o ile przebiega ona szybciej niż przeskoczek ładunku na kolejną guaninę [125, 127, 131]. Przeskoczek dziury elektronowej odbywa się pomiędzy guaninami, a pojawienie się w nici ugrupowania GGG prowadzi zwykle do zatrzymania procesu, gdyż powoduje relaksację

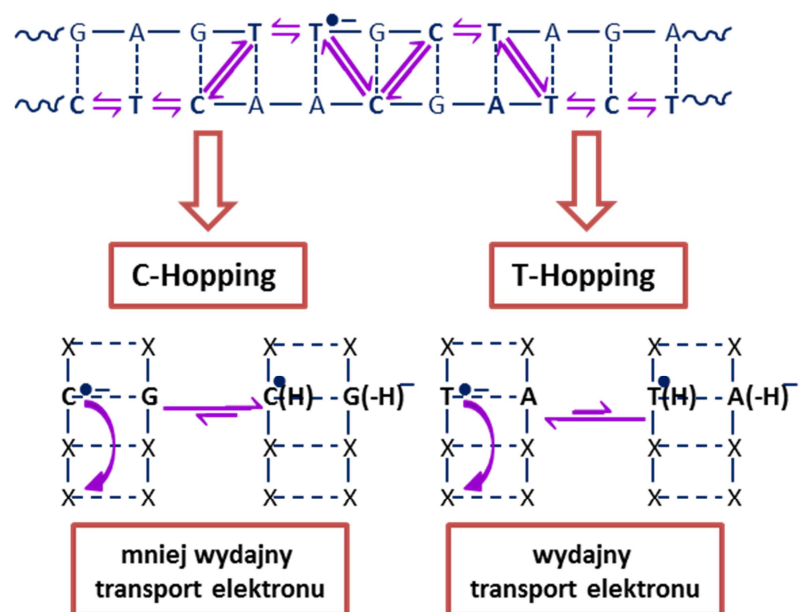


RYS. 51 – Porównanie mechanizmów przeskoku dziury wzdłuż helisy DNA z udziałem guaniny (po lewej) lub adeniny (po prawej) jako pośredni nośnik ładunku. Opracowano na podstawie [127].

ładunku $(G^+GG) \rightarrow (GGG)^+$ i stanowi jego akceptor. W przypadku występowania dubletu GG w nici relaksacja ładunku jest zwykle wolniejsza, więc nie stanowi czynnika blokującego dalszy przepływ ładunku [122, 123].

Warto zauważyć, że w opisanym powyżej G-hoppingu mamy do czynienia z połączeniem przeskoku ładunku z mechanizmem tunelowania. Każdy pojedynczy przeskok dziury pomiędzy guaninami stanowi proces nadwymiany ładunku, który odbywa się bez udziału adeniny i tyminy, tworzących sekwencję DNA pomiędzy poszczególnymi zasadami guaninowymi. Wydajność przebiegającego w ten sposób procesu zależy od dystansu danego przeskoku oraz łącznej liczby wszystkich przeskoków [125, 127, 143]. Sytuacja jednak zmienia się, gdy w przestrzeni pomiędzy guaninami występują więcej niż trzy pary AT. Wówczas adenina również zaczyna odgrywać rolę przejściowego nośnika ładunku [121, 144]. Jednak utlenienie adeniny przez G^+ jest procesem endotermicznym i etap przeskoku ładunku z G^+ na A zachodzi z małą wydajnością. Dlatego też w momencie utworzenia A^+ następuje szybki A-hopping przez kolejne zasady adeninowe, aż do napotkania kolejnej guaniny, która może przyjąć ładunek (RYS. 51) [127]. W tym przypadku pK_a utlenionej formy A^+ zdecydowanie przewyższa wartość pK_a tyminy, więc zarówno ładunek jak i niesparowany elektron pozostają na adeninie, gwarantując jednocześnie lepszą wydajność hoppingu [127, 141]. Proces ten zachodzi także szybciej niż G-hopping i nie zależy od odległości [146, 147].

Zagadnieniem dużo słabiej poznanym z punktu widzenia mechanizmu jest redukcyjny transfer elektronu przez DNA. Pewnego rodzaju modelowym układem, wykorzystywanym do badania tego procesu, jest zastosowanie zredukowanej, fotowzbudzonej flawiny jako donora elektronu oraz cyklobutanowego dimeru tyminy jako jego akceptora. Dimer tyminy jest mutacją nici kwasu deoksyrybonukleinowego wywołaną promieniowaniem UV, często występującą w naturze. Organizmy żywe wykształciły jednak enzymatyczny mechanizm jej naprawy, polegający na przepływie elektronu od FAD (dinukleotydu flawinoadeninowego), koenzymu fotolizy DNA, do dimeru i otwarciu pierścienia cyklobutanu [140]. Podobnie jak w przypadku dziury, transfer elektronu może odbywać się według mechanizmu tunelowania lub hoppingu w zależności od warunków [125]. Jednak nadwymiana elektronu możliwa jest jedynie w szczególnych warunkach, kiedy do aktywacji procesu stosowane jest promieniowanie γ w bardzo niskiej temperaturze (poniżej 80 K) [125, 148]. Dużo bardziej popularny jest mechanizm przeskoku elektronu, w którym pokonuje on duże odległości wzdłuż helisy DNA, angażując wszystkie zasady nukleinowe. Przejściowymi nośnikami ładunku są zaś jedynie C^\cdot i T^\cdot (RYS. 52) [127], anionorodniki zasad najłatwiej ulegających redukcji. Ze względu na nieco niższy potencjał redukcji T^\cdot niż C^\cdot , przeskok elektronu z udziałem cytozyny jest trudniejszy. Ponadto, cytozynowe anionorodniki są bardziej silniejszemu protonowaniu. Proces ten może konkurować z hoppingiem elektronów, co powoduje spadek jego wydajności i szybkości migracji ładunku, ale nie hamuje go zupełnie [140, 149-151]. W oparciu o badania teoretyczne stwierdzono, że dla transferu elektronu istotne jest także, jakie zasady znajdują się w otoczeniu cytozyny i tyminy.

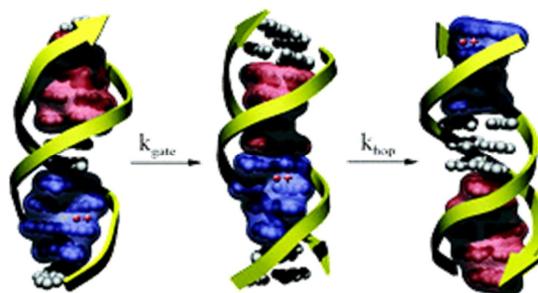


RYS. 52 – Porównanie mechanizmów przeskoku elektronu wzdłuż helisy DNA z udziałem cytozyny (po lewej) lub tyminy (po prawej) jako pośredni nośnik ładunku. Opracowano na podstawie [127].

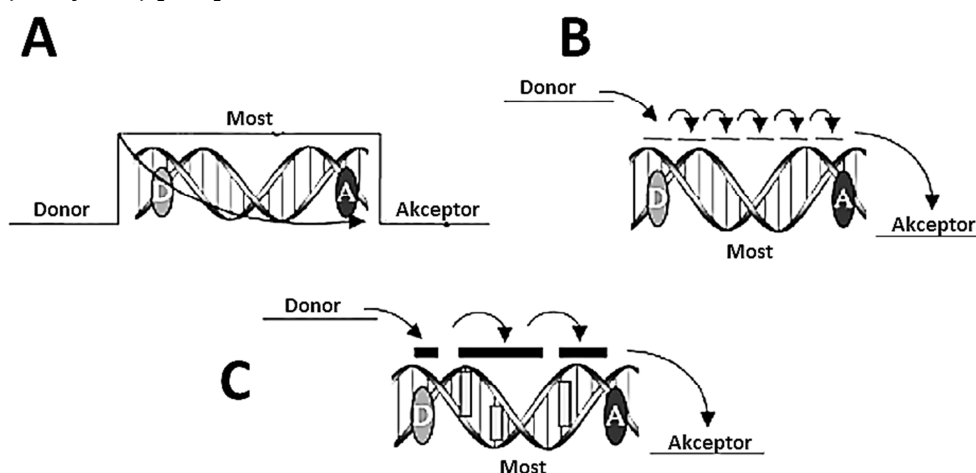
Sekwencjami, najbardziej sprzyjającymi temu procesowi, są TCC, CCC, TTC, CTC [152]. Przepływ nadmiarowego elektronu wzdłuż helisy DNA może odbywać się na odległości przekraczające nawet 30 Å, a jego wydajność raczej w niewielkim stopniu zależy od pokonywanego dystansu [140, 153].

Liczne eksperymenty dostarczały coraz to nowszych szczegółów dotyczących przepływu ładunku wzdłuż helisy DNA, lecz nie zawsze zgadzały się one w pełni z zaproponowanymi powyżej mechanizmami tego procesu. Dlatego też pojawiały się nowe teorie, w których starano się wytłumaczyć zjawisko migracji ładunku przez DNA w bardziej złożony i dokładny sposób. Jedną z nich jest model przeskoku polaronu przy udziale fononu zaproponowany dla wyjaśnienia transportu kationorodnika [124, 144, 154, 155]. W modelu tym przyjmuje się, że DNA wraz z otoczeniem (rozpuszczalnikiem, jonami) podlega ciągłym ruchom, których skala czasowa pokrywa się z procesem hoppingu. Ruchy te powodują lokalne zaburzenia otoczenia kationorodnika, co prowadzi do jego stabilizacji i delokalizacji na kilku zasadach nukleinowych (polaron). Termiczne ruchy DNA i jego otoczenia (fonony) sprawiają, że kation przemieszcza się, migrując od jednego do drugiego polaronu [127, 155].

Inną zaproponowaną teorią jest mechanizm transferu ładunku przez domeny (RYS. 53) [156], w którym hopping nie odbywa się za pośrednictwem pojedynczych zasad nukleinowych, a całych domen, tworzonych przez kilka (4-5) sąsiadujących par zasad [124, 141, 156, 157]. Na skutek ciągłych ruchów molekuł DNA, zasady te krótkotrwale przyjmują konformację, w której ich orbitale π silnie ze sobą oddziałują, tworząc domeny. Tylko taka specyficzna konformacja (zwana aktywną) pozwala na przepływ ładunku wzdłuż helisy pomiędzy domenami, przy czym ładunek jest zdelokalizowany w obrębie danej domeny. Kluczową kwestią dla tego typu mechanizmu są ruchy cząsteczek DNA, a tym samym zasad nukleinowych. Im jest on bardziej intensywny, co może być spowodowane np. podwyższeniem temperatury, tym mniejsze jest prawdopodobieństwo przyjęcia przez helisę konformacji aktywnej [156].



RYS. 53 – Mechanizm przeskoku ładunku wzdłuż helisy DNA za pośrednictwem domen zawierających zdelokalizowany ładunek [156].



RYS. 54 – Porównanie trzech mechanizmów przepływu ładunku wzdłuż helisy DNA: A – mechanizm tunelowania (nadwymiany ładunku), B – mechanizm przeskoku ładunku (hopping ładunku), C – mechanizm przeskoku domeny (hopping domeny) [131].

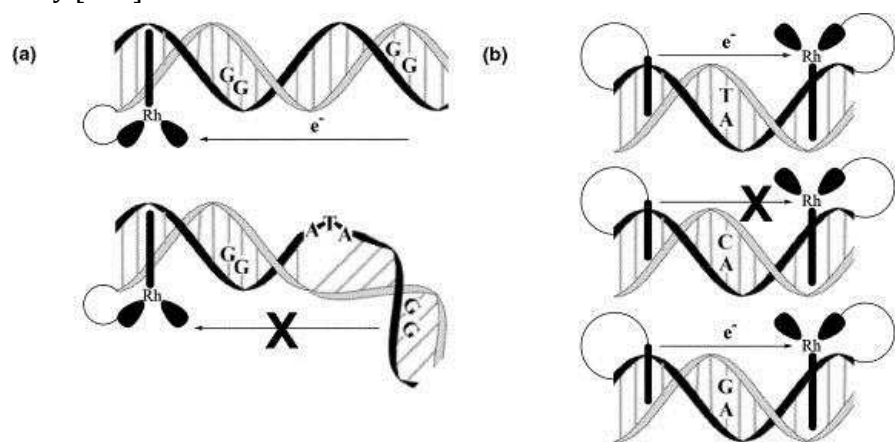
Obecnie wielu naukowców uważa, że traktowanie przepływu ładunku przez DNA jako nadwymianę elektronu, gdzie ładunek przemieszcza się bezpośrednio od donora do akceptora (RYS. 54A) [131], a nawet jako przeskoczenie ładunku przez kolejne zasady nukleinowe (RYS. 54B) [131] jest zbyt dużym uproszczeniem. Dlatego też wciąż trwają badania i pojawiają się nowe teorie, w tym przepływu ładunku poprzez przeskoczenie domen tworzonych przez grupę kilku par zasad (RYS.

54C) [131], które mają na celu pełniejsze wyjaśnienie i lepsze zrozumienie zjawiska przewodnictwa elektrycznego DNA.

Bez względu na mechanizm, na przepływ ładunku (zarówno dziury, jak i elektronu) wzdłuż helisy DNA ma wpływ kilka różnych czynników. Cząsteczki podwójnej helisy DNA zbudowane są z dwóch antyrównoległych nici, a tym samym wykazują kierunkową asymetrię, co nie pozostaje bez znaczenia dla przewodnictwa. Eksperymenty przeprowadzone przez różne grupy badawcze dostarczają jednak bardzo rozbieżnych informacji, według których kierunek przepływu ładunku wzdłuż nici DNA nie wpływa na jego efektywność lub bardziej efektywny przepływ ładunku ma miejsce od końca 5' do końca 3' helisy lub przepływ w kierunku 3'→5' jest szybszy i bardziej wydajny [140, 141, 158].

We wszystkich przedstawionych powyżej mechanizmach przepływu ładunku wzdłuż helisy DNA kluczową rolę odgrywa warstwowe oddziaływanie elektronów π , należących do ułożonych równolegle jedna nad drugą par zasad nukleinowych (ang. base-stacking) [116, 120, 130, 131, 144]. Eksperymenty pokazały, że to właśnie komplementarne zasady nukleinowe, a nie łańcuch cukrowo-fosforanowy, są odpowiedzialne za przewodzenie ładunku przez DNA [136, 141]. Ponadto, jeżeli donorem i/lub akceptorem ładunku są substancje oddziałujące z helisą DNA, to warunkiem niezbędnym do jego przepływu jest interkalacja cząsteczek tych substancji pomiędzy pary zasad, dzięki czemu interkalator również bierze udział w warstwowej asocjacji [132, 135, 136, 141, 144]. Asocjacja warstwowa pomiędzy zasadami należącymi do tej samej pojedynczej nici DNA jest silniejsza niż pomiędzy zasadami leżącymi na dwóch komplementarnych łańcuchach. Powoduje to, że przepływ ładunku między zasadami w ramach tej samej nici jest zdecydowanie szybszy i łatwiejszy niż analogiczny proces odbywający się pomiędzy nimi podwójnej helisy DNA, wymagający przepływu ładunku przez wiązania wodorowe łączące komplementarne zasady [130, 141, 144]. Nie bez znaczenia dla efektywności przepływu ładunku przez DNA jest też jego forma. O ile w formach B i A DNA występuje silna asocjacja warstwowa zasad zarówno tej samej jak i przeciwnych nici, o tyle w formie Z brak jest oddziaływań spiętrzających pomiędzy zasadami danego pojedynczego łańcucha. Skutkuje to zdecydowanie słabszymi właściwościami przewodzącymi formy Z DNA [159]. Jednak struktura spiętrzonych elektronów π , zarówno zasad jak i interkalatorów, nie pozostaje stała podczas całego procesu migracji ładunku. Ulega ona zmianom w czasie inicjacji procesu, transportu ładunku i jego pułapkowania, co jest wynikiem konformacyjnej reorganizacji molekuł DNA na poszczególnych etapach procesu. Z tego też powodu dynamika struktury cząsteczek DNA ma ogromny wpływ na ich przewodnictwo, a nawet staje się czynnikiem go limitującym [141, 143, 144]. W szczególny sposób zostało to uwzględnione w teorii transferu ładunku przez domeny [156].

Każde zaburzenie asocjacji warstwowej zasad, wynikające np. z obecności w helisie niekomplementarnej zasady lub nadmiarowych zasad wystających poza powierzchnię danego łańcucha, czy też zaburzenie struktury lub konformacji helisy DNA, prowadzi do ograniczenia lub nawet zablokowania przepływu ładunku przez DNA [124, 131, 141, 144] (RYS. 55) [143]. Jednak nie



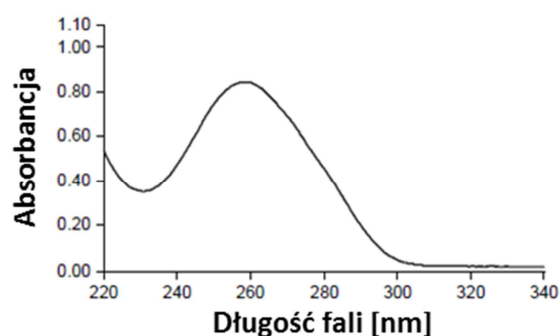
RYS. 55 – Wpływ zaburzeń helisy DNA na przepływ ładunku: a – nadmiarowe zasady wystające poza powierzchnię helisy i zaburzające jej kształt blokują przepływ ładunku, b – błędne wstawienie cytozyny zamiast tyminy blokuje przepływ ładunku, podczas gdy błędne wstawienie guaniny zamiast tyminy usprawnia przepływ ładunku ze względu na zwiększenie asocjacji warstwowej zasad [143].

każde błędne wstawienie zasady do helisy jednakowo wpływa na transfer ładunku. Jeżeli komplementarna zasada zostanie zastąpiona błędną zasadą, ale zapewniającą wzmocnienie asocjacji warstwowej, wówczas następuje intensyfikacja przepływu ładunku. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku sparowania dwóch puryn (np. AG, GG). Jeśli natomiast błędnie sparowane zostaną dwie pirymidyny (np. TT, CT) lub pirymidyna i puryna (np. CA), to siły spiętrzające zasady zostają osłabione, przez co przepływ ładunku zostaje ograniczony [116, 131, 136, 143]. Ta właściwość DNA stwarza możliwość konstrukcji bioczuJNIKÓW, w których na podstawie zmian przewodnictwa można wykrywać mutacje oraz inne deformacje helisy [124, 136, 160]. Tego typu biosensory znajdują zastosowanie na przykład w medycynie przy wykrywaniu mutacji genetycznych [116]. Na strukturę i dynamikę oddziałujących warstwowo zasad mogą wpływać także białka wiążące się z nicią DNA, przez co regulują migrację ładunku przez helisę [141, 161]. Przykładowo metylotransferaza *HhaI* hamuje przepływ ładunku [162, 163], a endonukleaza restrykcyjna *PvuII* powoduje usztywnienie helisy i minimalizuje jej ruchy konformacyjne, a tym samym intensyfikuje przewodnictwo [164].

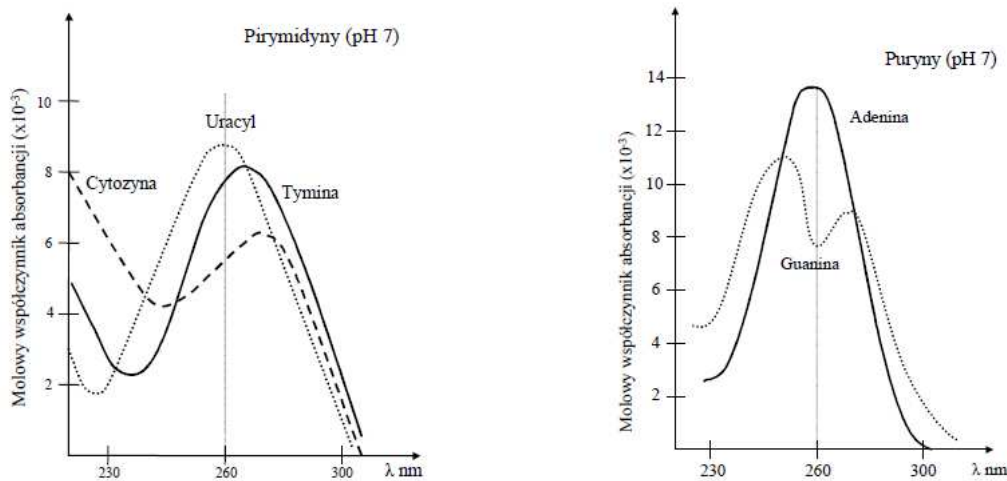
1.4.3. Właściwości spektroskopowe DNA

Ważnych narzędzi analitycznych, pozwalających na badanie struktury kwasów nukleinowych, jak też ich oddziaływań z różnymi substancjami, dostarcza spektroskopia. DNA, jak każda inna materia, składa się z wielu molekuł, tworzonych przez zbiory atomów, a przez to jest on podatny na działanie wielu rodzajów promieniowania elektromagnetycznego, w wyniku czego powstają charakterystyczne widma. DNA może zarówno pochłaniać energię, dając widma absorpcyjne UV-Vis, IR, NMR, CD, emitować ją po wzbudzeniu, wykazując fluorescencję, jak i powodować jej rozproszenie, co uwidaczniane jest na widmach ramanowskich [77, 165, 166]. Z punktu widzenia mojej pracy eksperymentalnej, najistotniejsze jest zachowanie kwasu deoksyrybonukleinowego podczas absorpcji promieniowania z zakresu nadfioletu i światła widzialnego, dlatego też szczegółowe omówienie spektroskopowych właściwości DNA zostanie ograniczone do tego zagadnienia.

Kwas deoksyrybonukleinowy selektywnie pochłania promieniowanie z zakresu nadfioletu, przy czym do silnej absorpcji dochodzi w zakresie fali 240–275 nm [167]. Powstaje wówczas widmo, na którym maksimum absorpcji występuje przy długości fali 260 nm (RYS. 56) [168]. Taki kształt widma nie wynika z obecności ani elementów cukrowych, ani reszt fosforanowych, gdyż nie absorbują one promieniowania w tym zakresie długości fali. Odpowiedzialne za to są heterocykliczne układy purynowe i pirymidynowe zasad azotowych [58], w których dzięki obecności sprzężonych wiązań podwójnych dochodzi do przejść elektronowych pomiędzy orbitalami $\pi \rightarrow \pi^*$. Szerokie pasmo absorpcji DNA wynika z maksimum absorpcji poszczególnych zasad nukleinowych. W środowisku obojętnym przy najniższej długości fali (253 nm) promieniowanie pochłania guanina, zaś przy najwyższej (271 nm) cytozyna [167]. Widma wszystkich zasad azotowych są do siebie podobne, ale odróżnia je intensywność (RYS. 57) [58]. Puryny bowiem silniej pochłaniają światło (najsilniej adenina) niż pirymidyny. Widma absorpcyjne nukleozydów i nukleotydów danej zasady nie różnią się od widm samych zasad, gdyż obecność reszt monocukrów i grup fosforanowych nie wpływa na intensywność i charakter pochłaniania promieniowania [58].



RYS. 56 – Widmo absorpcyjne UV-Vis DNA [168].



RYS. 57 – Widma absorpcyjne UV-Vis zasad azotowych [58].

Absorbancja DNA jest jednak dużo mniejsza niż poszczególnych zasad nukleinowych, gdyż nie stanowi ona addytywnej sumy absorbancji wszystkich zasad wchodzących w skład danego łańcucha kwasu. Zjawisko to nosi nazwę efektu hipochromowego i wynika z występowania asocjacji warstwowej zasad, towarzyszącej helikalnemu uporządkowaniu przestrzennemu nici polinukleotydowych. Analogiczna sytuacja ma miejsce podczas denaturacji DNA, omówionej w jednym z poprzednich podrozdziałów (1.1.4.1). Wówczas absorbancja przy 260 nm jest zdecydowanie słabsza w przypadku DNA natywnego, w porównaniu z formą zdenaturowaną, gdy DNA występuje w postaci pojedynczych łańcuchów [21, 58].

Zdolność DNA do pochłaniania promieniowania UV-Vis znalazło liczne zastosowania praktyczne. Wykorzystuje się ją bowiem do wykrywania, ilościowego oznaczania oraz określania czystości kwasów deoksyrybonukleinowych. Przybliżoną czystość można wyznaczyć na podstawie stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Jeśli preparat nie zawiera zanieczyszczeń, stosunek ten przyjmuje wartość 1,8. W przypadku gdy wartość ta jest wyższa, może wskazywać na zanieczyszczenie preparatu przez RNA, a gdy jest niższa, przez białka [58].

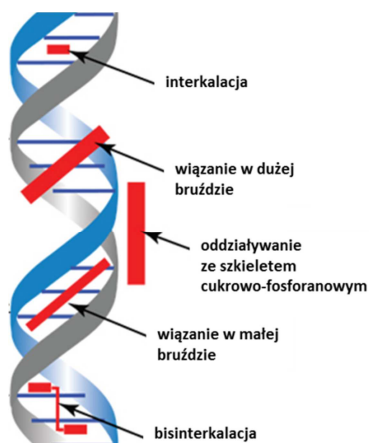
1.4.4. Interakcje kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi

Ze względu na swoją budowę chemiczną i strukturę przestrzenną, podwójna helisa kwasu deoksyrybonukleinowego wykazuje duże skłonności do oddziaływania z cząstkami różnorodnych substancji. Takie interakcje nie są bez znaczenia dla funkcjonalności DNA w komórkach żywych, gdyż zwykle wpływają na jego stabilność termodynamiczną oraz właściwości. Uniemożliwia to odczytanie informacji genetycznej, a tym samym destabilizuje cały organizm. Substancje chemiczne mogą zaburzać procesy związane z ekspresją genów na różnych etapach. Jedne hamują już samą syntezę kwasu, inne oddziałują z podwójną helisą, a jeszcze inne zakłócają dalsze procesy replikacji, transkrypcji czy translacji [169, 170].

Od kilkudziesięciu lat coraz większa liczba badań naukowych skupia się na analizie oddziaływań małych cząstek chemicznych z DNA, w czym pokładane są nadzieje na rozwiązanie wielu kwestii natury biologiczno-chemiczno-medycznej. Prowadząc takie eksperymenty, poszukuje się nowych informacji o strukturze DNA, mechanizmach działania leków antynowotworowych i antywirusowych, mutacjach genowych, chorobach genetycznych oraz podejmuje się próby projektowania nowych środków leczniczych [92, 169, 170]. Ponadto, tego typu doświadczenia wykorzystywane są w badaniach środowiskowych, gdzie pomagają określić wpływ na DNA, a tym

samym na cały organizm żywy, różnorodnych substancji toksycznych występujących w glebie czy w wodzie [92, 171].

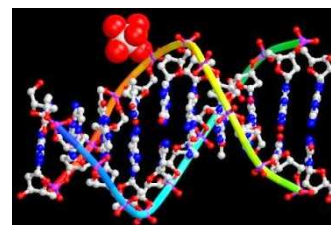
1.4.4.1. Sposoby oddziaływania kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi



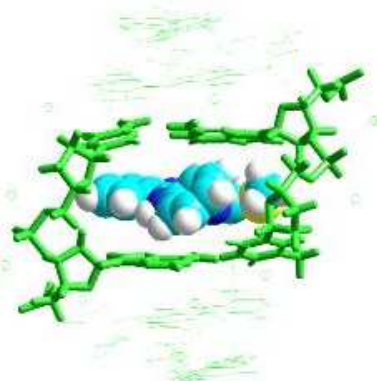
RYS. 58 – Model różnych sposobów oddziaływania substancji chemicznych z helisą DNA [174].

- elektrostatyczne oddziaływanie na zewnątrz helisy DNA
- interkalacja do helisy DNA
- bisinterkalacja do helisy DNA
- wiązanie w mniejszej i większej bruzdzie DNA
- wiązanie kowalencyjne z helisą DNA
- przecinanie nici DNA
- mieszany sposób oddziaływania

Niespecyficzne oddziaływanie elektrostatyczne na zewnątrz helisy polega na przyciąganiu cząsteczek ligandów obdarzonych ładunkiem dodatnim przez ujemnie naładowane grupy fosforanowe stanowiące element składowy szkieletu helisy [92, 169, 175] (RYS. 59) [176]. Oprócz dodatniego ładunku ligandy powinny także zawierać w swej strukturze ugrupowania stanowiące zawadę steryczną, uniemożliwiającą lokowanie we wnętrzu łańcucha DNA. Oddziaływanie to w dużym stopniu zależy od siły jonowej oraz pH roztworu. Jest ono charakterystyczne dla di-tert-butyloproflawiny, 2-tert-butyloamsakryny [177], kwercetyny [178].



RYS. 59 – Wyznaczona krystalograficznie trójwymiarowa struktura kompleksu DNA z hydratowanym jonem magnezu [176].



RYS. 60 – Interkalacja pochodnej 9-anilinoakrydyny do DNA [181].

Substancje chemiczne mogą wpływać na DNA na wiele różnych sposobów, co nie zawsze związane jest z ich bezpośrednimi interakcjami z helisą. Jednak z punktu widzenia tematyki moich badań, szerszego omówienia wymagają te typy oddziaływań, w których dochodzi do bezpośredniego kontaktu pomiędzy fragmentami cząsteczek DNA a molekułami niewielkich związków chemicznych, zwanych ligandami, mimo iż nie są to ligandy z punktu widzenia chemii koordynacyjnej.

Oddziaływania ligandów z kwasem deoksyrybonukleinowym mogą być realizowane na kilka sposobów, które różnią się między sobą fragmentem molekuly DNA zaangażowanej w interakcje oraz naturą sił wiążących ze sobą indywidua chemiczne. Do najpowszechniej występujących oddziaływań należą [92, 169, 170, 172, 173] (RYS. 58) [174]:

Bardziej skomplikowaną formą interakcji pomiędzy DNA a małymi cząsteczkami innych substancji jest interkalacja, której koncepcja po raz pierwszy została zaproponowana w roku 1961 przez Lermana [179]. To specyficzne oddziaływanie polega na wsuwaniu się płaskich, heterocyklicznych układów pomiędzy ułożone równolegle, jedna nad drugą pary, zasad nukleinowych, znajdujących się wewnątrz helisy bez uszkodzenia łączących je wiązań wodorowych [92, 169, 172, 173, 175, 180] (RYS. 60) [181]. Aby dany ligand mógł ulegać interkalacji musi posiadać w swej strukturze układ aromatyczny o minimum 3-4 pierścieniach. Źródłem sił utrzymujących interkalator wewnątrz helisy i zapobiegających jego wysuwaniu się jest nakładanie się orbitali π

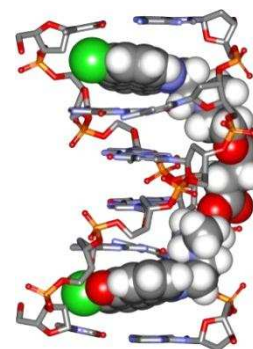
zasad azotowych DNA oraz ligandu, czyli asocjacja warstwowa. Interkalacja do cząsteczki DNA wywołuje znaczące zmiany w jej strukturze przestrzennej, powodując wzrost odległości pomiędzy parami zasad nukleinowych, a tym samym wydłużenie i częściowe rozkręcenie helisy [172]. Szeroka grupa substancji wykazuje zdolność do tworzenia kompleksów interkalacyjnych z DNA [180], a należą do nich przykładowo: oranż akrydyny [182], proflawina [183], bromek etydyny [184, 185], emodyna [186], metaliczne kompleksy fenantroliny, np. kompleks kobaltu (III) [187].

Szczególnym typem interkalacji jest bisinterkalacja, polegająca na jednoczesnym wsunięciu pomiędzy osobne pary zasad nukleinowych dwóch układów wielopierścieniowych (RYS. 61) [174]. Związki mogące wchodzić w tego typu interakcje zbudowane są z dwóch molekuł interkalatorów, połączonych ze sobą długim, zwykle tworzonym przez grupy CH_2 , łącznikiem. Bisinterkalatory zwykle silniej wiążą się z DNA niż ich monomeryczne odpowiedniki [172]. Do przykładowych bisinterkalatorów należą bisnaftalimid LU-79553 [188], homodimer etydyny, heterodimer akrydyny i etydyny [189], echinomycyna [190, 191].

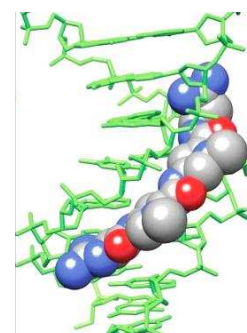
Zupełnie odmiennym sposobem oddziaływania substancji z DNA jest wiązanie ich w małej bruzdzie, co może być w pewnym stopniu porównane do modelu „klucza i zamka” w reakcjach enzymatycznych. Oddziałujące ze sobą molekuly są w bliskim kontakcie, a pomiędzy grupami funkcyjnymi ligandu i fragmentem cząsteczki DNA wewnątrz rowka tworzą się wiązania wodorowe, elektrostatyczne i van der Waalsa [92, 169, 170, 173, 192] (RYS. 62) [193]. Substancje wiążące się w małym rowku zbudowane są zwykle z kilku pojedynczych (rzadziej podwójnych), zwykle aromatycznych pierścieni, połączonych między sobą krótkim łącznikiem. Taka budowa gwarantuje im wydłużoną i elastyczną strukturę, umożliwiającą umiejscowienie w małej bruzdzie DNA [172]. Substancjami, wykazującymi taki model oddziaływania z DNA, są między innymi netropsyna [194], distamycyna [195], Hoechst 33258 [196], pentamidyna [197].

Oprócz małego rowka, w strukturze helisy DNA obecny jest również duży rowek, stanowiący potencjalne miejsce oddziaływań różnych substancji. Jednak jest on o wiele rzadziej angażowany w tego typu interakcje, gdyż jego obszerna przestrzeń uniemożliwia tworzenie wielu połączeń niekowalencyjnych przez małe cząsteczki, jednocześnie tworząc go dostępnym dla większych molekuł, np. białek [172]. Jeśli już dana substancja zwiąże się z DNA w dużej bruzdzie, często dochodzi do utworzenia formy potrójnej helisy [170] (RYS. 63) [198]. Substancjami oddziałującymi z DNA w dużej bruzdzie należą na przykład: dimeryczne kaliksareny [198], norfloksacyna [170].

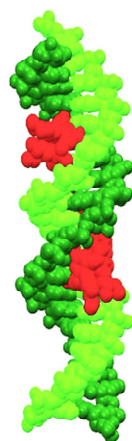
Omówione dotychczas sposoby interakcji substancji chemicznych z DNA oparte były na oddziaływaniach niekowalencyjnych. Istnieje jednak grupa związków, zwanych czynnikami alkilującymi, które w sposób kowalencyjny wiążą się z kwasem deoksyrybonukleinowym (RYS. 64) [195]. Czynniki alkilujące są związkami silnie elektrofilowymi, które mogą tworzyć wiązania z grupami nukleofilowymi DNA [199]. Zawarte w tych związkach grupy metylowe, etylowe i inne powodują alkilację zasad azotowych, przy czym najbardziej podatny na ten proces jest atom azotu N7 guaniny, a w dalszej kolejności atomy azotu N1 guaniny, N1 i N3 adeniny oraz N3 cytozyny [58]. Powstałe w ten sposób addukty poważnie zakłócają biologiczne funkcje kwasu deoksyrybonukleinowego [195]. Alkilowanie DNA wywołują między innymi: monoazydek etydyny pod wpływem światła widzialnego [172], sulfonian dietylowy, sulfonian etylometylowy, etylnitrozomocznik, diepoksybutan. Analogiczny mechanizm



RYS. 61 -
Bisinterkalacja
bisantrapirazolu do
helisy DNA [174].

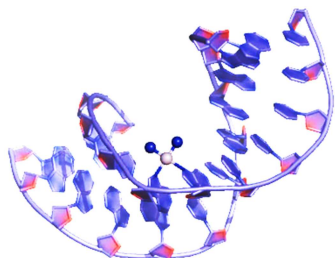


RYS. 62 - Wiązanie
netropsyny w małej
bruzdzie DNA [193].

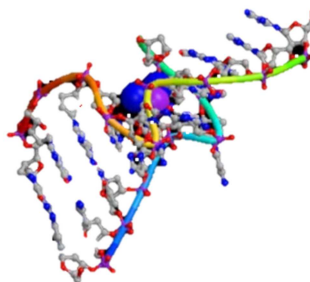


RYS. 63 -
Wiązanie
dimerycz-
nego
kaliksa-
renu
w dużej
bruzdzie
DNA
[198].

działania wykazują również inne związki o bardziej skomplikowanej budowie, powodujące powstawanie krzyżowych wiązań wewnątrznicowych lub międzynicowych pomiędzy zasadami azotowymi [58, 195]. Należą do nich niektóre kompleksy platynowe, takie jak np. cisplatyna i karboplatyna [58, 195], 4,4'-dihydroksychalkon [199, 200], mitomycyna C [201, 202]. Proces ten z angielskiego nazywany jest crosslinking i prowadzi do bardzo poważnych deformacji helisy (RYS. 65) [176].

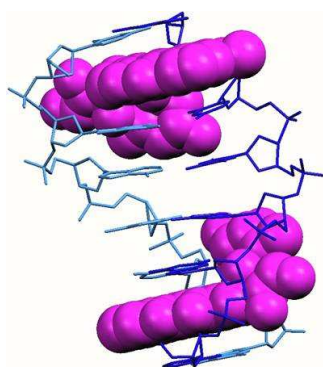


RYS. 64 – Kowalencyjne wiązanie cisplatyny z zasadami nukleinowymi DNA [195].



RYS. 65 – Deformacja helisy DNA wywołana krzyżowym łączeniem zasad nukleinowych (tzw. crosslinking) przez cisplatynę [176].

Najbardziej destrukcyjnym sposobem działania substancji oddziałujących z DNA jest przecinanie przez nie jednej lub obu nici szkieletu cukrowo-fosforanowego helisy. Zwykle jednak rozcinanie łańcuchów przez te substancje nie jest jedyną drogą wpływu na DNA, lecz może towarzyszyć innym rodzajom oddziaływania opisanym powyżej. W wyniku ich działania dochodzi do różnych procesów chemicznych, prowadzących do wydzielenia wolnych rodników, które bezpośrednio przyczyniają się do niszczenia nici DNA [195]. Substancjami działającymi w ten sposób są przykładowo: bleomycyna, esperamycyna, kalicheamycyna czy dynemycyna A.



RYS. 66 – Oddziaływanie doksorubicyny z DNA poprzez interkalację i wiązanie w małej bruzdzie [203].

Jak już zostało nadmienione w poprzednim akapicie, zdarza się, że dana substancja oddziałuje z DNA na kilka sposobów jednocześnie. Zjawisko takich mieszanych interakcji jest dość powszechne i prowadzi do utworzenia trwalszych kompleksów z kwasem nukleinowym. Często zdarza się, że molekula oddziałująca z DNA posiada w swej strukturze zarówno płaskie układy aromatyczne zdolne do interkalacji, jak i ugrupowania mogące tworzyć wiązania wodorowe i oddziaływać elektrostatycznie w bruzdach DNA oraz ze szkieletem cukrowo-fosforanowym [170, 172] (RYS. 66) [203]. Do substancji tego typu należą: nogalamycyna, której podjednostki po interkalacji lokują się w obu rowkach [204], aktynomycyna, w przypadku której oprócz interkalacji układu pierścieniowego następuje lokowanie części peptydowych w małym rowku [205], czy altromycyna B, której centralna część interkaluje do helisy, podczas gdy podstawnik cukrowy wiąże się w dużej bruzdzie, tworząc połączenie kowalencyjne z guaniną [206].

Dla natury interakcji substancji chemicznych z DNA nie bez znaczenia są czynniki takie, jak pH środowiska, siła jonowa roztworu oraz lokalna sekwencja nukleotydowa. W zależności od nich ta sama substancja może oddziaływać z DNA w odmienny sposób [172]. Dzieje się tak w przypadku błękitu metylenowego [207] czy DAPI [208], które interkalują w miejscach bogatych w pary GC, zaś wiążą się w małym rowku w regionach helisy z przewagą par AT, a także lewofloksacyny, która zależnie od siły jonowej oddziałuje z DNA elektrostatycznie lub interkaluje [209].

1.4.4.2. Metody badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z substancjami chemicznymi

Jak zostało wspomniane powyżej, różne substancje chemiczne mogą znacząco wpływać na strukturę oraz aktywność biologiczną kwasu deoksyrybonukleinowego. Z tego też powodu analiza ich oddziaływań z DNA jest istotną tematyką podejmowaną w licznych badaniach eksperymentalnych o szerokim instrumentarium. Obecnie stosuje się wiele różnorodnych technik analitycznych pozwalających ocenić naturę interakcji ligandów z molekułami DNA.

Ogromna grupa stosowanych metod opiera się na zjawiskach spektralnych. Popularne i dość wygodne są pomiary zmian absorpcji promieniowania UV-Vis przez ligand, wynikających z jego oddziaływania z DNA. Interakcje mogą powodować zmianę struktury elektronowej absorbującego promieniowanie fragmentu cząsteczki, co wywołuje efekt batochromowy, czyli przesunięcie maksimum absorpcji w stronę fal dłuższych i hipochromowy, czyli spadek jej intensywności. Tego typu badania mogą dostarczyć informacji na temat stałej wiązania kompleksu DNA-ligand oraz wielkości obszaru oddziaływania [169, 210]. Analogiczne eksperymenty przeprowadza się, wykorzystując właściwości emisyjne niektórych cząsteczek ligandów. W tym przypadku oddziaływania danej substancji z DNA mogą skutkować wzrostem jej fluorescencji i przesunięciem długości emitowanej fali [173]. Do charakteryzowania natury interakcji pomiędzy DNA a ligandami stosowana jest także spektroskopia oscylacyjna, Ramana i IR, dzięki której można określić strukturalne zmiany zarówno w molekułe kwasu, jaki i ligandu, miejsce jego wiązania, czy też preferowane przez niego sekwencje nukleotydowe [169, 211]. Spektroskopia NMR natomiast może dostarczyć informacji nawet o najślabszych oddziaływaniach pomiędzy ligandem a DNA, lecz jest to metoda o niskiej czułości, więc wymaga użycia większych ilości próbek, a ponadto wzbogacenia danej substancji w odpowiednie izotopy [169]. W tego typu badaniach coraz większą popularnością cieszy się także dichroizm kołowy, pozwalający na obserwację morfologicznych zmian w cząsteczkach kwasu. O ile substancje oddziałujące z DNA elektrostatycznie bądź w bruzdach wykazują nieznaczny wpływ na widmo kwasu nukleinowego, o tyle interkalatory powodują jego zdecydowane wzmocnienie [173, 210]. Również elektryczny dichroizm liniowy pozwala na rozróżnienie interkalacji ligandu od wiązania go w rowku DNA [169]. Jeśli absorbanca przez DNA światła spolaryzowanego równoległe do pola elektrycznego jest mniejsza niż absorbanca światła spolaryzowanego prostopadle do tego pola (dichroizm ujemny), wówczas mamy do czynienia z utworzeniem kompleksu interkalacyjnego. Sytuacja odwrotna (dichroizm dodatni) świadczy o oddziaływaniu molekuly w bruzdzie [173, 212]. Różnorodne eksperymenty spektroskopowe były prowadzone między innymi przy badaniu oddziaływania DNA z kompleksami fenantrolinowymi [210] i polipirydyłowymi [213] rutenu (II), mitoksantronem [211], nogalamycyną [214], bromkiem etydydy [215], Hoechst 33258 [215, 216], amsakryną [217], chloridazonem [218], kwasem oleinowym [219].

Druuga grupa metod, stanowiących potężne narzędzie w badaniu interakcji DNA z różnymi substancjami, obejmuje różnego rodzaju pomiary elektrochemiczne. Opierają się one głównie na elektrodowych reakcjach redoks kwasu nukleinowego i ligandu oraz wywołanych oddziaływaniami zmianach potencjału i prądu rejestrowanych sygnałów [170]. Ich wyniki dostarczają informacji na temat mechanizmu oddziaływania, rodzaju utworzonego kompleksu, preferowanych sekwencji nukleotydowych, stałej wiązania, wielkości obszaru oddziaływania, czy też roli generowanych wolnych rodników [92, 169]. Wśród bogactwa technik elektrochemicznych w badaniu interakcji najpopularniejsze są różne odmiany voltamperometrii, polarografia, chronoamperometria, które zostały wykorzystane do badania interakcji DNA z mitoksantronem [211, 220, 221], kompleksami platynowymi [222, 223], bromkiem etydydy [184], nogalamycyną [224], daunomycyną [225, 226], chloridazonem [218].

Dogłębnych informacji na temat interakcji substancji z DNA dostarczają również stosowane od dawna badania krystalograficzne. Umożliwiają one poznanie dokładnej budowy powstałego

kompleksu, odległości pomiędzy poszczególnymi atomami oraz natury sił występujących między nimi. Szczegółowe struktury krystaliczne zostały wyznaczone dla kompleksów DNA z antracyklinami [227-229], oraz proflawiną [230].

O występowaniu oddziaływania pomiędzy cząsteczkami kwasu deoksyrybonukleinowego i innej substancji świadczy także wzrost temperatury topnienia DNA, T_m . Jest to spowodowane stabilizacją helisy wynikającą z interakcji. W tego typu eksperymentach przeprowadza się denaturację termiczną kwasu w obecności i pod nieobecność danej substancji, a następnie porównuje zarejestrowane T_m [173, 210]. W ten sposób zbadano między innymi oddziaływania DNA z kompleksami fenantrolinowymi [210] i polipirydyłowymi [213] rutenu (II), a także daunomycyną [226, 231], chloridazonem [218].

Informacji na temat oddziaływania DNA z różnymi substancjami dostarczają również pomiary lepkości, parametru zależnego ściśle od długości molekuł. Jak wiadomo interkalacja powoduje wydłużenie cząsteczki DNA, przez co wywołuje wzrost lepkości jego roztworu, zaś elektrostatyczne przyciąganie lub wiązanie kowalencyjne nieco ją obniża [173, 210, 215]. Zmiany lepkości zostały wykorzystane do analizy interakcji DNA z fenantrolinowymi kompleksami rutenu (II) [210, 232], daunomycyną [226] czy BePI [233].

Ciekawą techniką badania kompleksów DNA-ligand, opierającą się na procesach biologicznych, jest tzw. odcisk stopy DNA (ang. DNA-footprinting). DNA o znanej sekwencji nukleotydowej znakowane jest fosforem-32, a następnie umieszczane w roztworze razem z deoksyrybonukleazą I, która w normalnych warunkach powoduje rozcinanie łańcuchów DNA. Jednak gdy w układzie obecna jest substancja oddziałująca z DNA, to może ona blokować rejony helisy, w których wiąże się enzym, a tym samym uniemożliwiać przecięcie nici w tym miejscu. Z tego też powodu, utworzone fragmenty DNA, powstałe w wyniku analizy próbek w obecności i pod nieobecność badanego ligandu, będą się znacząco różniły [169, 173]. Technika ta znajduje zastosowanie w przy badaniu specyficzności sekwencyjnej ligandów i została wykorzystana między innymi w przypadku mitromycyny, oliwomycyny i chromomycyny [234], a także nogalamycyny i aktynomycyny [235].

Bardziej nowoczesnym narzędziem użytecznym w określaniu struktury kompleksu DNA-ligand oraz w poszukiwaniu nowych substancji potencjalnie zdolnych do takiego oddziaływania jest modelowanie molekularne [236, 237]. Stosowane tu skomplikowane metody obliczeniowe oraz coraz doskonalsze oprogramowanie komputerowe pozwalają na wyznaczenie elektronowej struktury molekuł, punktowego ładunku na pojedynczych atomach, czy też energii oddziaływania pomiędzy poszczególnymi atomami. To daje możliwość nie tylko określenia sposobu interakcji kwasu nukleinowego z danym ligandem, ale także zaprojektowania dowolnej sekwencji nukleotydowej oraz uwzględnienia roli rozpuszczalnika w stabilizacji kompleksu [169, 238, 239]. Za pomocą metod obliczeniowych udało się wyznaczyć struktury kompleksów DNA z: proflawiną [238], chloridazonem [218], netropsyną [240], pochodnymi indolu [240], czy Hoechst 33258 [240].

Powierzchniowy rezonans plazmonów jest metodą, w której analiza oddziaływania DNA z ligandami odbywa się poprzez monitorowanie w czasie rzeczywistym zmian współczynnika załamania światła na powierzchni sensora z unieruchomionym kwasem nukleinowym przed i po utworzeniu kompleksu z badaną substancją [169, 241]. Jest to bardzo użyteczna technika, pozwalająca na określenie sposobu interakcji pomiędzy DNA a małymi cząsteczkami oraz wyznaczenie stałej wiązania i stechiometrii [242, 243]. Została ona wykorzystana między innymi do badania oddziaływania kwasu deoksyrybonukleinowego z kwasem oleinowym [219], a także bromkiem etydyny, DAPI, aktynomycyną i sperminą [242].

Stosunkowo nową techniką, wykorzystywaną w analizie interakcji pomiędzy makrocząsteczkami o znaczeniu biologicznym i ligandami niewielkich rozmiarów jest elektroforeza kapilarna. Polega ona rozdzieleniu indywiduów chemicznych pod wpływem silnego pola elektrycznego w cienkich kapilarach. Dzięki niej można określić między innymi sekwencje nukleotydowe preferowane przez dane ligandy [169]. Elektroforeza kapilarna została zastosowana

do określenia oddziaływań DNA z bromkiem etydyny [244], eliptycyną [245], berberyną [246], netropsyną [247, 248], distamycyną [247], cisplatyną [249].

Do badania oddziaływań różnych substancji z DNA stosuje się także mikrowagę kwarcową, czułą na zmiany masy substancji unieruchomionych na jej powierzchni. Na powierzchni czujnika immobilizowany jest kwas nukleinowy, który następnie poddawany jest działaniu ligandów. Utworzenie przez nie kompleksów z DNA powoduje wzrost masy na czujniku, a tym samym wywołuje zmianę częstotliwości drgań kryształu kwarcu. Technika ta znalazła zastosowanie w analizie interakcji DNA z nogalamycyną i berenilem [250] oraz mitomycyną C i bleomycyną [251].

Również metody powierzchniowe, takie jak np. mikroskopia sił atomowych (AFM, ang. Atomic Force Microscopy), są z powodzeniem stosowane w analizie interakcji DNA i ligandów. Technika ta pozwala na obrazowanie 3D topologicznych zmian helisy, wywołanych przyłączeniem do niej małych cząsteczek. Wykorzystano ją do badania kompleksów DNA z cisplatyną [252], fenantrolinowym kompleksem kobaltu (III) [187], bromkiem etydyny [253], czy nogalamycyną [214].

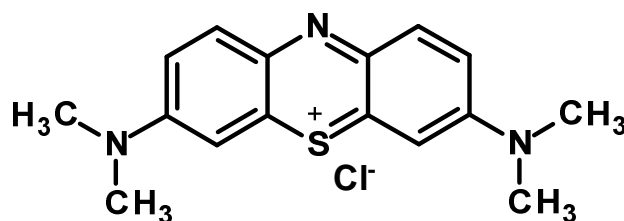
Obecnie chemia analityczna dostarcza szerokiego wachlarza standardowych i innowacyjnych metod eksperymentalnych, które nieustannie się rozwijają. Badania prowadzone przy ich pomocy stwarzają nowe możliwości analizy oddziaływań pomiędzy DNA a różnymi substancjami chemicznymi i rzucają nowe światło na ich naturę, dostarczając coraz bardziej szczegółowych informacji. Ma to nieocenione znaczenie dla lepszego zrozumienia wpływu zarówno substancji toksycznych, jak i farmakologicznych na kwas deoksyrybonukleinowy oraz dla projektowania i syntezy nowych, skuteczniejszych farmaceutyków.

2. Substancje oddziałujące z DNA

Jak zostało pokazane w poprzednim rozdziale, spektrum substancji wchodzących w interakcje z DNA jest bardzo szerokie i różnorodne. Obejmuje ono zarówno jony metali, proste związki organiczne, organiczne kompleksy metali, jak i skomplikowane molekuly wielopierścieniowe, zawierające liczne grupy boczne. Nie sposób jest omówić szczegółowo właściwości wszystkich tych substancji, dlatego też ograniczę się do zaprezentowania tych spośród nich, które są istotne z punktu widzenia przeprowadzonych przeze mnie badań naukowych.

2.1. Błękit metylenowy

Bardzo popularną i dość dobrze poznaną substancją, wchodzącą w interakcje z DNA jest błękit metylenowy (MB, ang. methylene blue). Ten związek organiczny, należący do grupy barwników tiazynowych, został odkryty w roku 1876 przez Heinricha Caro [254]. Jego nazwa systematyczna to chlorek 3,7-bis(dimetyloamino)feno-5-tioazynowy, a wzór sumaryczny $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Błękit metylenowy jest heterocyklicznym związkiem aromatycznym o swoiście symetrycznych cząsteczkach obdarzonych ładunkiem dodatnim (RYS. 67).



RYS. 67 – Wzór strukturalny błękitu metylenowego.

2.1.1. Właściwości błękitu metylenowego



RYS. 68 – Błękit metylenowy w postaci sproszkowanej [255].

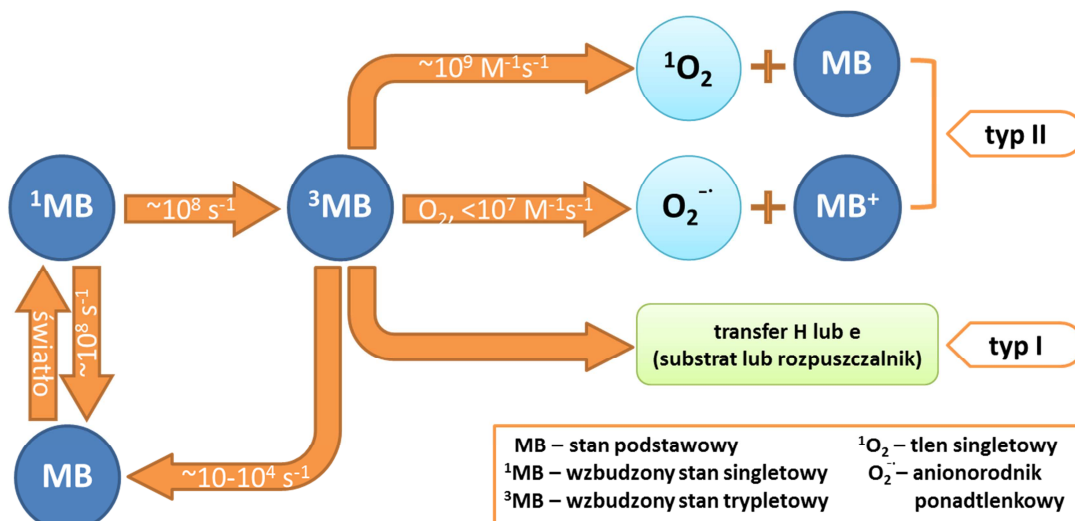


RYS. 69 – Roztwór błękitu metylenowego [257].

W warunkach normalnych błękit metylenowy jest bezwonnym ciałem stałym i występuje w postaci ciemnozielonego proszku, o krystalicznym połysku (RYS. 68) [255]. W temperaturze przekraczającej $190^{\circ}C$ ulega on rozkładowi z wydzieleniem tlenków węgla, azotu i siarki oraz chlorowcopochodnych [256]. MB dobrze rozpuszcza się w wodzie, alkoholu i chloroformie, tworząc roztwory o intensywnie niebieskim zabarwieniu (RYS. 69) [257], zaś nie jest rozpuszczalny w eterze. Jego wodny roztwór wykazuje pH około 3 [258]. Ponadto, molekuly błękitu metylenowego w roztworach mogą ulegać protonowaniu i agregacji, tworząc dimery, a przy wyższym stężeniu nawet trimery i dłuższe polimery [259, 260]. Procesy te zależą od wielu czynników, takich jak: stężenie MB, rodzaj rozpuszczalnika, siła jonowa roztworu, temperatura, obecność surfaktantów [261].

Jedną z kluczowych właściwości błękitu metylenowego jest aktywność fotochemiczna. MB jest bardzo popularnym fotoutleniaczem, który po wzbudzeniu światłem do formy singletowej (1MB), a następnie przejściu w formę tripletową (3MB) może ulegać procesom według dwóch mechanizmów [192, 262, 263] (RYS. 70) [262]. Po pierwsze, 3MB może przyjąć elektron od substancji ulegającej utlenieniu, w wyniku czego przechodzi on w formę półzredukowanego rodnika. Jest to tak zwany mechanizm typu I. Po drugie, zgodnie z mechanizmem typu II tripletowy MB może przekazać energię na obecne w układzie molekuly tlenu, powodując wygenerowanie tlenu singletowego (1O_2), będącego silnym czynnikiem utleniającym, lub anionorodnika nadadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), jednak

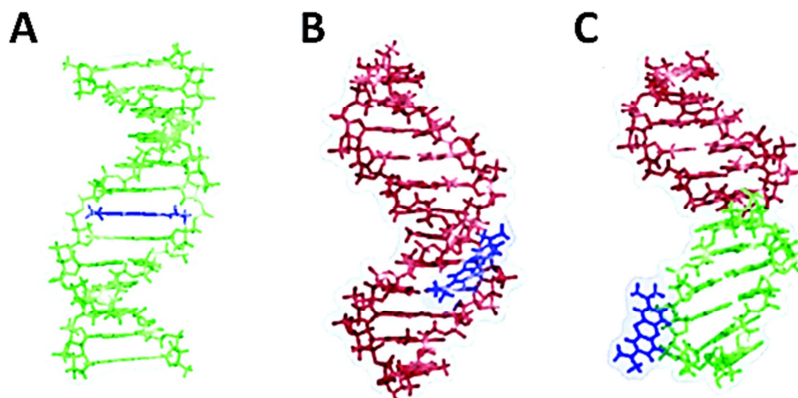
reakcja ta jest dużo wolniejsza [192, 262, 263]. Fotochemiczne reakcje wywoływane obecnością błękitu metylenowego mogą wpływać destrukcyjnie na różne biomolekuły (kwasy nukleinowe, białka, lipidy), organella komórkowe (mitochondria, liposomy), całe komórki (nowotworowe), a nawet powodować śmierć całych organizmów (wirusów, bakterii, grzybów) [207, 254, 263, 264].



RYS. 70 – Schemat fotochemicznych reakcji błękitu metylenowego. Opracowano na podstawie [262].

2.1.1.1. Sposób oddziaływania błękitu metylenowego z DNA

Mimo iż błękit metylenowy jest substancją znaną od lat i był przedmiotem wielu badań eksperymentalnych, wciąż pozostają pewne wątpliwości i niejasności odnośnie jego oddziaływania z DNA [192, 265-267]. Wiązanie MB z kwasem deoksyrybonukleinowym ma charakter niekowalencyjny i jest odwracalne, co oznacza, że molekuly MB tworzące kompleks z helisą mogą odłączać się od niej i przechodzić do roztworu [268, 269]. Jako że MB ma postać kationu, może elektrostatycznie oddziaływać z ujemnie naładowanym szkieletem cukrowo-fosforanowym kwasu [266, 267, 270]. Zawiera on także trójpierścieniowy, heterocykliczny układ aromatyczny, który wsuwa się pomiędzy komplementarne pary zasad nukleinowych (RYS. 71A) [237], czyniąc MB jednym z najpopularniejszych interkalatorów [175, 266, 267, 270]. Ponadto, niektóre badania wskazują na możliwość lokowania cząsteczek błękitu metylenowego w bruzdach helisy [237, 266, 267, 270] (RYS. 71B) [237]. Pojawiły się również spekulacje, że przyłączenie molekuł MB do kwasu może powodować częściowe przekształcenie helisy z formy B w A [271].



RYS. 71 – Modele kompleksu DNA z błękitem metylenowym uzyskane przy pomocy metody obliczeniowej Monte Carlo. A – interkalacja MB do sekwencji nukleotydowej zawierającej pary GC, B – lokowanie MB w małym rowku helisy o sekwencji nukleotydowej zawierającej pary AT, C – oddziaływanie elektrostatyczne ze szkieletem cukrowo-fosforanowym [237].

Interakcje MB z DNA mają dość złożoną naturę i zależą od różnych czynników. Jednym z najważniejszych jest sekwencja nukleotydowa. Liczne badania wskazują, iż MB najchętniej interkaluje w regionach DNA bogatych w pary GC [271], podczas gdy wiązanie w rowkach jest dominujące dla sekwencji zawierających pary AT [267, 272]. Modelowe badania oddziaływania MB z samą guaniną, niezwiązaną w molekułe DNA, pokazały, że wykazuje on duże powinowactwo do tej zasady. W roztworze wodnym w zależności od warunków kompleks MB-G może przyjmować dwie konformacje: „o kształcie litery T”, która opiera się na oddziaływaniach elektrostatycznych pomiędzy cząstkowymi ładunkami poszczególnych cząsteczek, oraz „twarzą w twarz”, gdzie kluczową rolę odgrywają siły spiętrzające [273]. Niezwykłe powinowactwo błękitu metylenowego do wolnej guaniny ma też swoje odzwierciedlenie w interakcjach z molekułami DNA. Liczne eksperymenty potwierdzają, że to właśnie rejony bogate w pary GC występujące naprzemiennie są przez niego preferowane [207, 262].

Nie bez znaczenia dla oddziaływania błękitu metylenowego z kwasem deoksyrybonukleinowym jest także siła jonowa roztworu. Im zawiera on więcej jonów, a więc im siła jonowa jest wyższa, tym mniej molekuł MB jest w stanie związać się z łańcuchem DNA [132, 274, 275]. Siła jonowa determinuje w pewnym stopniu sposób interakcji tych molekuł. Gdy jej wartość jest wysoka, możliwe jest zarówno oddziaływanie niespecyficzne na zewnątrz helisy, jak i interkalacja. Kiedy jednak wartość ta jest niższa, z oczywistych względów może występować przyciąganie elektrostatyczne, ale zdecydowanie dominuje interkalacja [192, 276]. O ile wpływ siły jonowej na interkalację MB pomiędzy pary GC jest niewielki, o tyle w przypadku par AT interkalacja występuje przy niskiej sile jonowej, zaś oddziaływanie w brzdach dominuje w roztworach o wyższej zawartości jonów rozpuszczalnika [175, 267, 276].

Mechanizm oddziaływania błękitu metylenowego z DNA zależy również od stosunku stężeń tych substancji w roztworze ($R_{MB/DNA}$). Zmniejszenie lub zwiększenie zawartości danego składnika w układzie determinuje zmianę sposobu interakcji. Jeśli $R_{MB/DNA}$ jest wysoki dominuje elektrostatyczne przyciąganie. Gdy natomiast ilość DNA w roztworze wzrasta, MB interkaluje do helisy [265, 277].

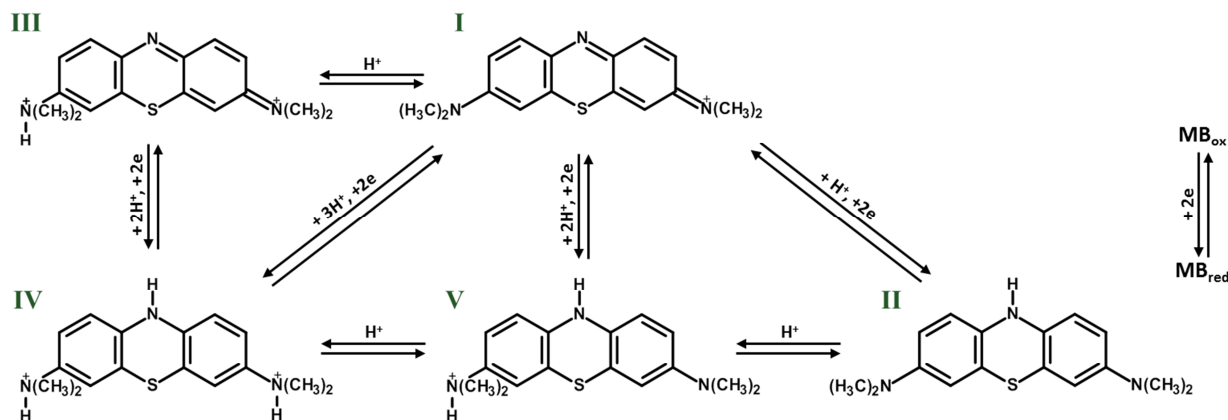
Jednak błękit metylenowy wiąże się nie tylko z podwójną helisą DNA, ale może wchodzić też w interakcje z pojedynczymi nićmi. W tym przypadku oddziaływanie realizowane jest poprzez elektrostatyczne przyciąganie naładowanych dodatnio molekuł MB przez reszty fosforanowe szkieletu ssDNA, przy czym jest ono słabsze niż dla dsDNA z powodu mniejszego lokalnego nagromadzenia ujemnego ładunku [267]. Ze względu na duże powinowactwo MB do guaniny dodatkowo ma miejsce także tworzenie kompleksów MB bezpośrednio z G [278], która w tym przypadku nie jest zaangażowana w tworzenie wiązań wodorowych z komplementarną zasadą. Skutkuje to związaniem większej liczby cząsteczek MB przez ssDNA niż dsDNA [272, 274, 279-281].

Warto również wspomnieć, że błękit metylenowy ze względu na swoje właściwości fotochemiczne oraz tworzenie pod wpływem światła reaktywnych form tlenu i rodników, może powodować uszkodzenia DNA [264]. Zwykle polegają one na procesach redoks zasad nukleinowych, prowadzących do wytworzenia np. 8-oksoguaniny czy 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny [282, 283]. Organizmy żywe wykształciły specjalne mechanizmy naprawcze, pozwalające na identyfikację i naprawę powstałych nieprawidłowości [282], lecz gdy działanie MB i światła jest bardzo intensywne i powoduje poważne zniszczenia materiału genetycznego żywej komórki, może prowadzić nawet do jej śmierci.

2.1.1.2. Właściwości elektrochemiczne błękitu metylenowego

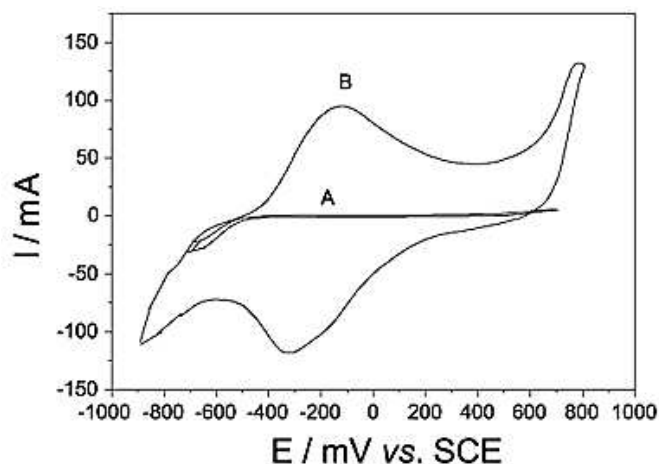
Błękit metylenowy jest substancją elektroaktywną i ulega odwracalnej redukcji i utlenieniu. Jednak procesy te ściśle zależą od pH środowiska, które determinuje ilość kationów wodorowych biorących udział w danej reakcji redoks [254, 284] (*RYS. 72*) [284]. Gdy pH ma wartość poniżej 5,4, podstawowa forma MB (oznaczona jako I na *RYS. 72*) może ulegać jedno- lub dwuetapowej

redukcji, której towarzyszy przyłączenie w sumie trzech kationów H^+ i dwóch elektronów, w wyniku czego powstaje forma IV. Jeśli natomiast pH roztworu przyjmuje wartość z zakresu 5,4–6, do formy I MB przyłączają się dwa jony H^+ i dwa elektrony, tworząc formę V [284]. Najpopularniejsza jest jednak reakcja zachodząca przy pH powyżej 6, kiedy to poprzez przyłączenie do formy I dwóch elektronów i jednego protonu utworzona zostaje zredukowana forma II MB, tzw. forma leuko (LMB, ang. leucomethylene blue) [267, 284]. LMB w przeciwieństwie do formy podstawowej nie jest obdarzony ładunkiem dodatnim oraz nie ma charakterystycznego niebieskiego zabarwienia, lecz jest bezbarwny [285]. Warto zauważyć także, że formy II, IV i V różnią się między sobą jedynie ilością przyłączonych protonów, a więc IV stanowi kwas dwuprotonowy, który tracąc jeden proton, dysocjuje do V, a następnie odłączając kolejny kation H^+ , tworzy zasadę LMB (forma II) [284].



RYS. 72 – Procesy redoks błękitu metylenowego w zależności od pH [284].

Procesy redoks MB objawiają się w postaci dwóch sygnałów na cyklicznych krzywych woltamperometrycznych. Pierwszy z nich odpowiada utlenianiu i przy pH 7,0 na elektrodzie z pasty zawierającej grafit, octan celulozy oraz TiO_2 pojawia się przy potencjale ok. -0,1 V względem NEK, drugi zaś obrazuje redukcję i w tych samych warunkach występuje przy potencjale ok. -0,3 V (RYS. 73) [254]. Potencjał tych pików ściśle zależy od pH roztworu i ulega przesunięciu w stronę ujemnych wartości wraz ze spadkiem zawartości kationów wodorowych w roztworze [284]. Z kolei na wysokość tych pików duży wpływ wywiera stężenie MB w roztworze. W przypadku pomiarów wykonywanych w buforze o pH 7,2 na elektrodzie w postaci mikrowłókna węglowego sygnały są trudne do identyfikacji poniżej stężenia 10^{-7} M, w zakresie stężeń od 4×10^{-6} do 6×10^{-3} M następuje liniowy wzrost ich wysokości wraz ze wzrostem stężenia, a powyżej stężenia 6×10^{-3} M ma miejsce powolny spadek wysokości pików, co sugeruje tworzenie dimerów i większych agregatów [284].



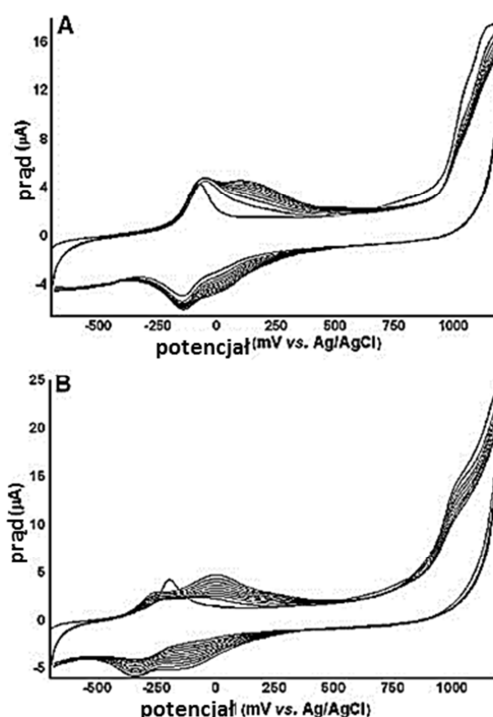
RYS. 73 – Woltamperogram cykliczny prezentujący procesy redoks błękitu metylenowego na elektrodzie z pasty zawierającej grafit, octan celulozy i TiO_2 zarejestrowany w 1 M roztworze KCl o pH 7,0 [254].

Jak już zostało wspomniane powyżej, oprócz dimerów i trimerów możliwe jest również tworzenie przez błękit metylenowy dłuższych form polimerowych (poliMB). Świetnym sposobem na ich otrzymanie jest elektropolimeryzacja MB, polegająca na tworzeniu polimeru na elektrodzie zanurzonej w roztworze MB w wyniku przykładania zmieniającego się cyklicznie napięcia

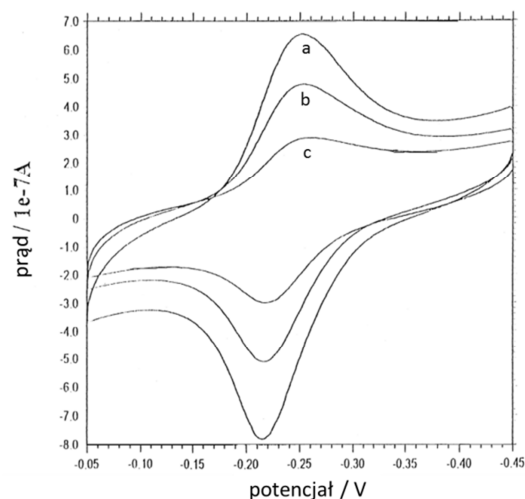
w szerokim zakresie potencjału [286-291]. W eksperymencie przeprowadzonym na elektrodzie z węgla szklatego w roztworze fosforanów o pH 5,0 lub 10,0 zawierającym 0,1 M NaNO_3 oraz 0,05 mM MB dziesięciokrotnie cyklicznie przykładany był potencjał w zakresie od -0,7 do +1,2 V względem Ag/AgCl [288]. Wówczas na woltamperogramach (RYS. 74) [288] oprócz odwracalnego pików utlenienia monomerów MB, który w tych warunkach występuje przy potencjale ok. -0,1 V (przy pH 5,0) oraz ok. -0,27 V (przy pH 10,0), na kolejnych skanach przy nieco bardziej dodatnich potencjałach pojawia się również nowa para pików redoks, które informują o powstawaniu form przejściowych podczas tworzenia się polimeru. Ich wysokość stopniowo rośnie przy kolejnych cyklicznych zmianach potencjału, świadcząc o gromadzeniu się warstwy polimeru na elektrodzie. Ponadto, na woltamperogramach obecny jest również szeroki nieodwracalny sygnał anodowy, pojawiający się w zakresie potencjałów 0,9–1,15 V. Przypisywany jest on tworzeniu się kationorodników MB, a jego wysokość maleje wraz z kolejnymi skanami. Mechanizm elektropolimeryzacji błękitu metylenowego nie jest do końca poznany. Pojawiają się teorie, że może być on związany z utlenianiem grup aminowych w monomerach, powstawaniem kationorodników towarzyszących dimeryzacji oraz tworzeniem polimeru poprzez wiązania węgiel-węgiel lub węgiel-azot [288, 291].

Nie bez znaczenia dla woltamperometrycznych sygnałów błękitu metylenowego jest jego oddziaływanie z kwasem deoksyrybonukleinowym. Utworzenie kompleksu MB z DNA może powodować zmiany zarówno w potencjałach, jak i prądach jego pików redoks, lecz liczne eksperymenty pokazały, że tendencja i wielkość tych zmian ściśle zależy od warunków. Przykładowo badanie interakcji błękitu metylenowego z dsDNA na platynowej elektrodzie w kształcie dysku w buforze Tris-HCl o pH 7,2 pokazało, iż sygnały redoks MB ulegają obniżeniu w wyniku oddziaływania z kwasem, zaś ich potencjał pozostaje niezmienny (RYS. 75) [292]. Przyczyny spadku sygnału doszukiwano się w obniżeniu wartości współczynnika dyfuzji i stężenia ligandu przy powierzchni elektrody w obecności DNA. Natomiast

brak zmiany potencjału pików interpretowano jako dowód na taki sam sposób oddziaływania z DNA zarówno utlenionej, jak i zredukowanej formy MB [292]. Nieco odmienne wyniki uzyskano na elektrodzie złotej modyfikowanej dsDNA w buforze fosforanowym o pH 7,0 [269]. W tym przypadku zaobserwowano przesunięcie pików redukcji MB na osi potencjałów o 30 mV w stronę bardziej ujemnych potencjałów oraz silniejsze wiązanie z DNA zredukowanej formy błękitu metylenowego w porównaniu z formą utlenioną. Ponadto, obliczono, że na helisę zbudowaną z 15 par zasad przypada 1,4 cząsteczki MB i wyznaczono stałą wiązania kompleksu $K = 3,8 \times 10^6$ [269]. Warto także zwrócić uwagę, iż w dotychczasowych badaniach oddziaływania MB z DNA skupiano



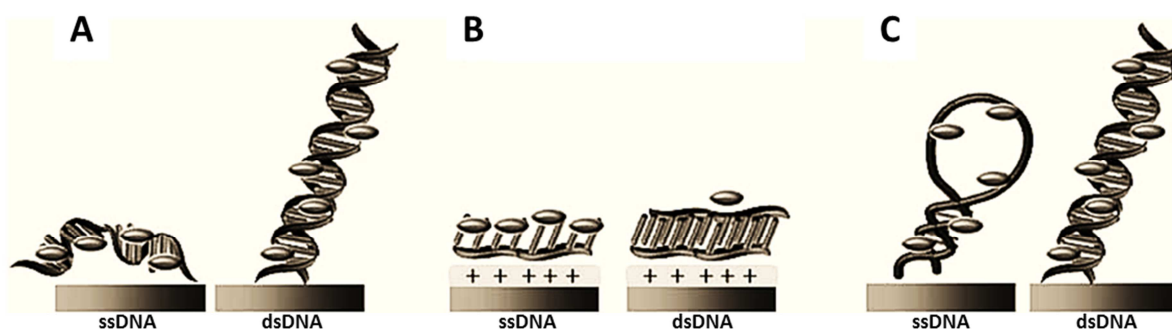
RYS. 74 – Woltamperogramy cykliczne (10 skanów) 0,05 mM MB zarejestrowane na elektrodzie z węgla szklatego w roztworze fosforanów o pH : A – 5,0, B – 10,0 zawierającym 0,1 M NaNO_3 [288].



RYS. 75 – Woltamperogramy cykliczne 5×10^{-5} M MB w buforze Tris-HCl o pH 7,2: a – bez DNA oraz w obecności b – 6×10^{-5} M DNA, c – $2,6 \times 10^{-4}$ M DNA [292].

się przede wszystkim na analizie zmiany sygnału redukcji [138, 159, 275, 280, 281, 293], a nie utlenienia, błękitu metylenowego.

Jak wiadomo, błękit metylenowy wchodzi w interakcje i z pojedynczymi, i z podwójnymi łańcuchami DNA. Postać molekuł kwasu odgrywa kluczową rolę dla zmian w sygnałach redoks oddziałującego z nimi błękitu metylenowego. Ciężko jednak określić jednoznacznie wpływ tego czynnika, gdyż jak pokazuje wiele eksperymentów, sygnał redukcji MB uzyskany po oddziaływaniu z dsDNA po hybrydyzacji może być zarówno niższy [272, 279, 280, 293, 294], jak i wyższy [295-297] od sygnału otrzymanego pierwotnie w obecności ssDNA. Źródłem tak niespójnych wyników należy doszukiwać się w różnym sposobie unieruchamiania i ułożenia DNA na elektrodzie oraz stosowania różnych struktur kwasu w poszczególnych eksperymentach [175]. Jeśli zwykły ssDNA zostaje unieruchomiony na elektrodzie za pomocą specjalnego linkera (np. łańcucha alkilowego zakończonego grupą tiolową) modyfikującego koniec 5' kwasu (RYS. 76A) [175], to sygnał redukcji MB oddziałującego z dsDNA po hybrydyzacji w porównaniu z sygnałem uzyskanym w obecności ssDNA jest niższy dla dłuższych sekwencji (18-21 nukleotydów) [175, 294, 298], zaś wyższy dla krótszych (15 nukleotydów) [175, 295]. Dzieje się tak, gdyż ssDNA wykazuje dużą elastyczność, dzięki której oprócz kierunkowego transferu ładunku do/z elektrody wzdłuż danej nici, możliwy jest również tzw. transfer boczny, wynikający z kontaktu środkowych fragmentów nici z elektrodą, zaś sztywniejsze molekuly dsDNA zdolne są jedynie do transferu kierunkowego [175]. Molekuly ssDNA mogą być unieruchomione na powierzchni elektrody również poprzez elektrostatyczne przyciąganie i wówczas ułożone są one płasko na przetworniku w mało uporządkowany sposób (RYS. 76B) [175]. W tej sytuacji łączenie z komplementarnymi łańcuchami może być utrudnione i prowadzić to do powstawania asymetrycznych i nie do końca zhybrydyzowanych cząsteczek DNA. To prawdopodobnie jest podstawowym powodem obniżenia sygnału redukcji MB po hybrydyzacji w tym przypadku [175, 272, 280]. Specyficzną molekułą DNA jest struktura „spinki do włosów”, której końcowe fragmenty są komplementarne do siebie i po połączeniu tworzą coś w rodzaju „nóżki”, zaś środkowy fragment nie posiada komplementarnego odpowiednika w ramach tej samej cząsteczki i tworzy jakby „pętlę”. Tego typu DNA immobilizowane jest na powierzchni elektrody złotej za pośrednictwem linkerów alkilowo-tiolowych (RYS. 76C) [175]. W tym przypadku sygnał redukcji błękitu metylenowego związanego z dsDNA może być zarówno niższy, jak i wyższy niż przed hybrydyzacją. Jest to zależne od długości i sekwencji użytego DNA [175, 267, 299].



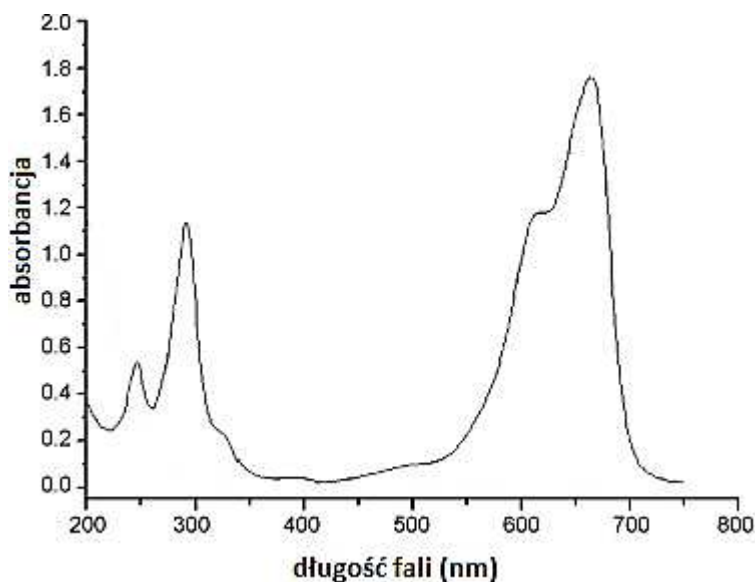
● błękit metylenowy

RYS. 76 – Schemat możliwych sposobów ułożenia pojedynczych i podwójnych łańcuchów DNA na elektrodzie podczas oddziaływania z błękitem metylenowym: A – unieruchomienie DNA za pośrednictwem linkera, modyfikującego jeden z końców molekuly kwasu, B – elektrostatyczne przyciągnięcie molekuly DNA przez dodatnio naładowaną elektrodę, skutkujące płaskim ułożeniem molekuly kwasu, C – unieruchomienie DNA o strukturze „spinki do włosów” za pośrednictwem linkera alkilowo-tiolowego [175].

2.1.1.3. Właściwości spektralne błękitu metylenowego

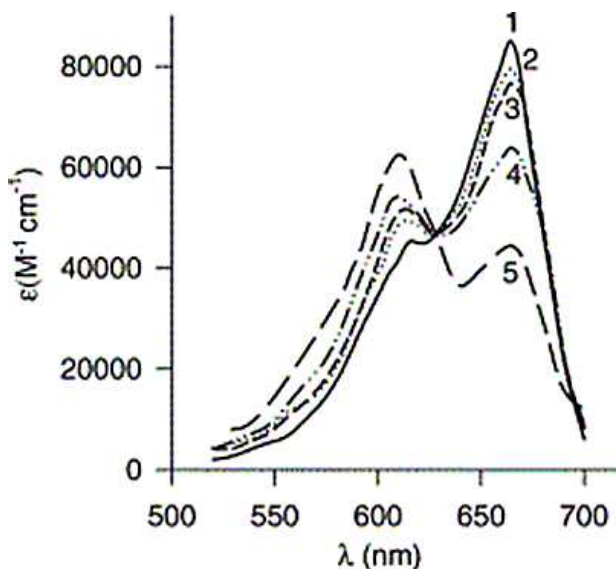
Błękit metylenowy swoje charakterystyczne niebieskie zabarwienie zawdzięcza zdolności do silnego pochłaniania światła z zakresu widzialnego [263]. Na widmie UV-Vis zarejestrowanym

w roztworze wodnym objawia się to szerokim pasmem absorpcji w zakresie długości fali ok. 550–700 nm (RYS. 77) [300]. Wyraźne maksimum absorpcji występuje przy ok. 663–665 nm, a jego molowy współczynnik ekstynkcji wynosi ok. 81000–85000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [262, 263, 300]. Na zboczu tego piku obecny jest jeszcze jeden sygnał w postaci „ramienia” przy długości fali ok. 610–640 nm [262, 291, 300]. Ponadto, na widmie MB widoczne są także mniej intensywne sygnały w zakresie od 240 do 350 nm [262, 290, 300] (RYS. 77) [300].



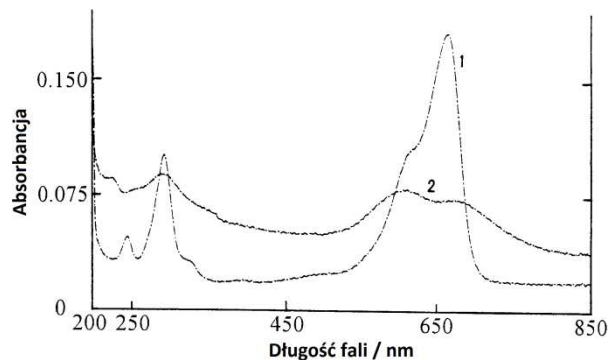
RYS. 77 – Widmo UV-Vis 0,9 mM MB w roztworze wodnym zawierającym NaCl [300].

Szerokie pasmo absorpcji MB pomiędzy 550 nm a 700 nm może dostarczyć wielu cennych informacji na temat form molekuł barwnika obecnych w badanym układzie, gdyż maksymalny sygnał widma odpowiada absorpcji promieniowania przez monomery, a „ramię” przez struktury dimeryczne [260, 263]. Tworzenie się dimerów i wyższych agregatów błękitu metylenowego w decydujący sposób zależy od jego stężenia – im stężenie wyższe, tym więcej form wielocząsteczkowych powstaje [259, 260]. Na widmach MB zarejestrowanych w wodnym roztworze NaCl doskonale widać, iż wraz ze wzrostem stężenia barwnika maleje sygnał przy długości fali 664 nm (efekt hipochromowy), a „ramię” przy 615 nm przesuwa się w stronę krótszych długości fali (efekt hipsokromowy) i rośnie (efekt hiperchromowy), stopniowo przekształcając się w pik (RYS. 78) [260]. Mimo iż wiele eksperymentów potwierdza teorię tworzenia się dimerów MB, to pojawiają się także interpretacje, w których sygnały przy długościach fali ok. 660 nm i ok. 620 nm przypisywane są przejściom energetycznym odpowiednio $n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$. Za zmiany wysokości tych pików odpowiada wówczas polarność środowiska, zmieniająca się wraz ze zmianami rozpuszczalnika, siły jonowej roztworu oraz stężenia barwnika [301].



RYS. 78 – Widmo UV-Vis MB o stężeniu: 1 – 7,5 μM , 2 – 17 μM , 3 – 24 μM , 4 – 44 μM , 5 – 375 μM zarejestrowane w wodnym roztworze NaCl [260].

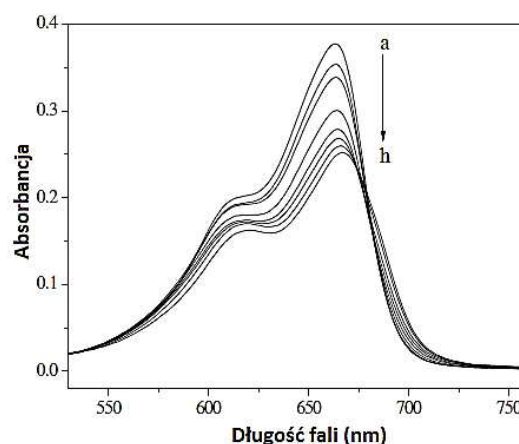
Jak zostało przedstawione w poprzednim podrozdziale, błękit metylenowy może ulegać polimeryzacji na przetworniku elektrycznym w wyniku przyłożenia do niego odpowiednio zmieniającego się napięcia, co uwidacznia się na woltamperogramie. Okazuje się jednak, że również



RYS. 79 – Widma UV-Vis: 1 – MB w roztworze 0,05 M tetraboranu sodu i 0,5 M KCl oraz 2 – poliMB spolimeryzowanego na platynie osadzonej na szkle kwarcowym [290].

[290]. Jak widać w wyniku polimeryzacji zanika sygnał przy 245 nm, a pojawia się niewielki przy 225 nm, a ponadto zdecydowanie spada absorpcja światła ok. 664 nm [290].

Pomiary spektrofotometryczne mogą dostarczyć szerokiej wiedzy nie tylko na temat form występowania błękitu metylenowego, ale też jego oddziaływań z kwasem deoksyrybonukleinowym, gdyż tworzenie tego typu kompleksów znacząco wpływa na wygląd widm absorpcyjnych. Ze względu na właściwości spektralne DNA, polegające na absorpcji promieniowania w zakresie fali 240–300 nm (rozdział I.1.4.3), w analizie interakcji kwasu z MB lepiej monitorować jest sygnały ligandu w paśmie 550–700 nm niż 240–350 nm, gdyż wówczas unika się nakładania widm dwóch różnych substancji. W obecności wzrastającego stężenia DNA na widmie błękitu metylenowego uwidacznia się efekt hipochromowy, polegający na stopniowym spadku absorpcji promieniowania przez MB, oraz efekt batochromowy, objawiający się przesuwaniem maksimum absorpcji w stronę dłuższych fal [192, 277, 302, 303] (RYS. 80) [302]. Zmiany absorpcji MB spowodowane oddziaływaniem z DNA zależą od stosunku stężeń tych substancji ($R_{DNA/MB}$). Jeśli $R_{DNA/MB}$ jest mniejszy niż 4, widoczny jest efekt hipochromowy, a efekt batochromowy jest nieznaczny. Natomiast przy $R_{DNA/MB}$ powyżej 6 tendencja ta jest odwrotna. Na efekty te znaczący wpływ ma również temperatura i siła jonowa roztworu [303]. Wielkość efektu hipochromowego jest także różna w zależności od tego, z jaką formą DNA oddziałuje MB. Silniejsze obniżenie absorpcji ligandu ma miejsce dla pojedynczych łańcuchów kwasu niż dla podwójnej helisy, co wynika z różnic w sposobie ich oddziaływania z błękitem metylenowym [274].



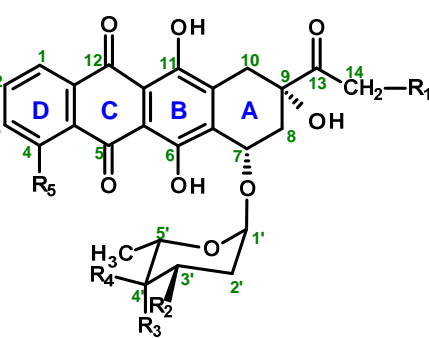


RYS. 80 – Widmo UV-Vis 4 μ M samego MB (a) i MB oddziałującego z DNA z grasicy cielęcej o różnym stężeniu (b-h – odpowiednio 2,78, 6,95, 13,9, 20,85, 27,8, 41,7, 55,6 μ M) zarejestrowane w buforze Tris o pH 7,3 [302].

2.2. Antracykliny

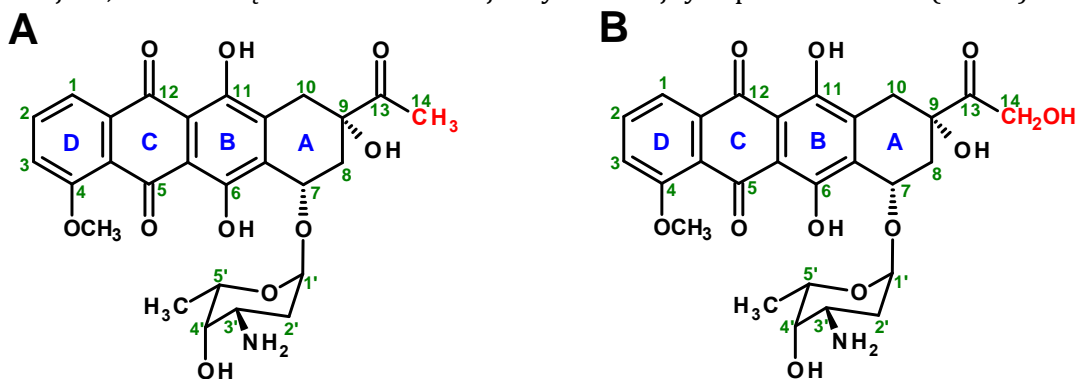
Szeroką grupą związków, silnie oddziałujących z kwasem deoksyrybonukleinowym oraz wywołujących na niego wpływ również na drodze innych różnorodnych mechanizmów są antracykliny. Jako pierwszą spośród nich poznano daunorubicynę (DAU), która na początku lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku została wyizolowana ze szczepu bakterii *Streptomyces peucetius* przez Aurelio Di Marco [304] oraz ze szczepu bakterii *Streptomyces coeruleorubidus* przez Maurice

Dubost [305]. Wkrótce później pojawiła się pochodna DAU, doksorubicyna (DOX), którą najpierw otrzymano syntetycznie, a następnie wyizolowano ze zmutowanego szczepu *Streptomyces peucetius* var. *caesius* [306].

TABELA 5 – Ogólny wzór strukturalny antracyklin oraz przykłady konkretnych związków.

Wzór strukturalny antracyklin	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Nazwa antracykliny
	H	NH ₂	OH	H	OCH ₃	daunorubicyna
	OH	NH ₂	OH	H	OCH ₃	doksorubicyna
	H	NH ₂	OH	H	H	idarubicyna
	OH	NH ₂	H	OH	OCH ₃	epirubicyna
	OH	NH ₂		H	OCH ₃	pirarubicyna
	Br	NH ₂	OH	H	OCH ₃	bromodaunorubicyna
	OH		OH	H	OCH ₃	morfolinodoksorubicyna

Antracykliny to wielopierścieniowe związki organiczne o dość złożonej budowie. Ich cząsteczki składają się z aglikonu i reszty cukrowej (rysunek w Tabeli 5 oraz RYS. 81). Aglikon to układ czterech pierścieni, w którym pierścień B ma formę hydrochinonu, a C chinonu. Ponadto, zawiera on kilka podstawników: grupę metoksyłową w pozycji C4 pierścienia D, łańcuch boczny z grupą karbonylową w pozycji C9 pierścienia A, grupę hydroksylową w tej samej pozycji oraz najistotniejszy spośród nich, daunozaminę – aminocukier, będący resztą zmodyfikowanej L-fukozy, przyłączony do węgla C7 pierścienia A za pomocą wiązania glikozydowego [307]. Obecnie istnieje wiele prostych pochodnych antracyklinowych, w których zmienione zostały podstawniki w układzie aglikonu, np. przy węglu C4 czy C13 oraz w daunozaminie, np. przy węglu C3' czy C4' (Tabela 5). Syntetyzowane są również antracykliny o dużo bardziej skomplikowanych modyfikacjach, ale zostaną one omówione w jednym z kolejnych podrozdziałów (1.2.2.2).



RYS. 81 – Wzory strukturalne: A – daunorubicyny, B – doksorubicyny.

Najpopularniejszymi antracyklinami, które są istotne także z punktu widzenia wykonywanej przez mnie pracy badawczej, są daunorubicyna, nazywana również daunomycyną i rubidomycyną, oraz jej pochodna – doksorubicyna, zwana adriamycyną. Substancje te mają budowę bardzo zbliżoną do siebie. Jediną różniącą je cechą jest zakończenie łańcucha bocznego przyłączonego do węgla C9. W przypadku DAU węgiel C13 łańcucha bocznego łączy się z grupą metylową, zaś w DOX z grupą hydroksymetylową (RYS. 81). Mimo iż na pierwszy rzut oka różnica ta

wyduje się być mało znacząca, w rzeczywistości determinuje ona odmienne właściwości tych związków oraz wpływa na ich oddziaływanie z biomolekułami [307].

2.2.1. Właściwości daunorubicyny i doksorubicyny

Zarówno daunorubicyna, jak i doksorubicyna mogą występować w postaci wolnej zasady, jak i chlorowodoru, lecz w praktyce zdecydowanie częściej spotyka się antracykliny w postaci soli. Obie te substancje w warunkach normalnych są bezwonnymi ciałami stałymi



RYS. 83 – Roztwór doksorubicyny [311].

i mają postać krystaliczną igiełek o zabarwieniu czerwono-pomarańczowym [306, 308, 309] (RYS. 82) [310]. Wykazują one właściwości higroskopijne, a w temperaturze ok. 190°C w przypadku DAU i ok. 205°C w przypadku DOX ulegają procesowi topnienia, czemu towarzyszy ich rozkład. Ze względu na swoją budowę i obecność licznych grup hydrofilowych DAU i DOX są rozpuszczalne w wodzie, metanolu i wodnych roztworach alkoholi, a nie rozpuszczają się w chloroformie, eterze i benzenie. Zabarczenie wodnych roztworów tych substancji zależy od pH i tak w środowisku kwaśnym są one różowo-pomarańczowe, w obojętnym pomarańczowo-czerwone (RYS. 83) [311], a w zasadowym niebiesko-fioletowe [306, 308, 309].



RYS. 82 – Doksorubicyna w postaci krystalicznej [310].

2.2.1.1. Właściwości antynowotworowe daunorubicyny i doksorubicyny

Do zdecydowanie najistotniejszych właściwości daunorubicyny i doksorubicyny należy antynowotworowe działanie cytostatyczne, polegające na hamowaniu podziału i namnażania komórek rakowych, oraz cytotoksyczne, wywołujące ich niszczenie lub śmierć. Dokładny mechanizm antynowotworowej aktywności antybiotyków antracyklinowych nie jest w pełni poznany, ale liczne badania naukowe w tej dziedzinie dostarczają wielu informacji na temat potencjalnego sposobu ich działania [312-314].

Istnieją silne dowody na to, iż DAU i DOX wywołują modyfikacje cząsteczek DNA, zlokalizowanych zarówno w jądrze komórkowym, jak i mitochondriach [307, 315, 316]. Dzięki swojej budowie antracykliny są zdolne do tworzenia interkalacyjnych kompleksów z DNA, których struktura zostanie omówiona szczegółowo w kolejnym podrozdziale. Oddziaływanie antracykliny z DNA powoduje znaczące zniekształcenia helisy i blokuje pewne procesy komórkowe [307, 312, 313, 317]. Antybiotyki antracyklinowe mogą łączyć się z kwasem deoksyrybonukleinowym również za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych, utworzonych w obecności formaldehydu, który może być wytwarzany w warunkach *in vivo*. Do powstania tego typu adduktów niezbędna jest obecność grupy aminowej w pozycji C3' daunozaminy, a więc cecha, którą obdarzona jest daunorubicyna i doksorubicyna. To właśnie ta grupa zostaje połączona z węglem formaldehydowym i po interkalacji tworzy wiązanie kowalencyjne z grupą aminową przy węglu C2 guaniny. Ponadto, tworzone jest także bardzo silne wiązanie wodorowe z guaniną leżącą na przeciwległej nici helisy DNA. W ten sposób powstaje tzw. wirtualne wiązanie międzyniciowe (ang. virtually cross-linking), będące połączeniem interkalacji, wiązania kowalencyjnego i wodorowego [307, 313, 315]. Daunorubicyna i doksorubicyna mogą także w sposób pośredni uszkadzać molekuly DNA. Dzieje się to na skutek generowania reaktywnych form tlenu (ROS, ang. Reactive Oxygen Species) w reakcjach redoks zachodzących z ich udziałem. Jednoelektronowa redukcja układu chinonowego antracykliny, katalizowana przez dehydrogenazę NADH, reduktazę

cytochromową P450, czy też oksydazę ksantynową, wywołuje przekształcenie go w semichinon, który regenerując się szybko do formy wyjściowej, powoduje redukcję tlenu i indukowanie ROS (anionorodnika ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru, rodnika hydroksylowego). Reaktywne formy tlenu mogą wywoływać oksydacyjne uszkodzenia zasad nukleinowych i deoksyrybozy oraz pęknięcia nici DNA [307, 312, 313].

Tak znaczący wpływ antracyklin na molekuly kwasu deoksyrybonukleinowego, prowadzący do zaburzenia jego struktury, nie pozostaje obojętny dla aktywności, oddziałujących bezpośrednio z DNA, enzymów i czynników transkrypcyjnych [307, 312, 313]. Tym samym antybiotyki przyczyniają się do nieprawidłowości w procesach życiowych komórek nowotworowych, prowadząc do ograniczenia ich zdolności proliferacyjnych. Mogą one hamować replikację kwasu nukleinowego, uniemożliwiając działanie polimerazy DNA [306, 307, 313]. Również synteza RNA może zostać przez nie zahamowana na skutek blokowania takich procesów, jak wiązanie polimerazy RNA z macierzystą nicią DNA, inicjacja procesu transkrypcji, elongacja transkryptu, czy wiązanie czynników transkrypcyjnych ze swoistymi sekwencjami DNA [307, 313]. Antracykliny mogą wpływać także na aktywność helikaz, enzymów odpowiedzialnych za zrywanie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami helisy i rozplatanie jej podczas różnych procesów. Poprzez tworzenie kompleksów interkalacyjnych z DNA daunorubicyna i doksorubicyna stabilizują jego strukturę drugorzędową, hamując jednocześnie rozplatanie [307, 312, 313]. Jednak najważniejszym mechanizmem działania DAU i DOX, związanym z ich wpływem na aktywność enzymów, wydaje się być blokowanie topoizomerazy II, odpowiedzialnej za rozcinanie podwójnej helisy, niezbędne podczas niektórych procesów zachodzących z udziałem DNA. Wiązanie się antybiotyku z przeciętą nicią kwasu deoksyrybonukleinowego, kowalencyjnie połączonego w danym momencie z enzymem, stabilizuje ten kompleks i uniemożliwia ponowne połączenie helisy. Skutkiem takiego działania jest fragmentacja łańcuchów DNA i nagromadzenie się kompleksów topoizomeraza II-DNA, co skutkuje śmiercią komórki [307, 312, 313].

Cytotoksyczne właściwości antracyklin przejawiają się w indukowaniu przez nie procesu apoptozy komórek na skutek wpływu na różnorodne mediatory komórkowe [307, 312, 313]. Może następować to przykładowo poprzez uruchamianie hydrolizy sfingomielin i tworzenie ceramidu, stymulację kinaz JNK, degradację serynowo-treoninowej kinazy Akt, aktywację kinazy białkowej p38, czy też obniżenie aktywności czynnika transkrypcyjnego GATA-4. Ponadto, antracykliny mogą bezpośrednio uwalniać z mitochondriów cytochrom c, indukując apoptozę bez uszkodzania DNA oraz zaburzać homeostazę żelaza, którego jony związane w kompleksach białkowych są niezbędne do prawidłowego przebiegu różnych procesów życiowych [307].

Właściwości antynowotworowe przejawiają się nie tylko w hamowaniu niekontrolowanego namnażania komórek rakowych i prowadzeniu do ich śmierci, ale także w indukcji ich różnicowania. Zdolność taką posiadają również antracykliny, które stosowane w niższych stężeniach wpływają selektywnie na ekspresję protoonkogenów, co fenotypowo przejawia się w różnicowaniu komórek nowotworowych i braku ich przerzutów [307, 313]. Indukowanych przez antracykliny czynników, które przypuszczalnie mogą przyczyniać się do regulacji ekspresji genów, jest wiele i zależą one od rodzaju nowotworu. Wymienić tu można na przykład obniżenie poziomu mRNA c-myc i c-myb, wzrost stabilności mRNA γ -globiny i deaminazy porfobilinogenu PBGD oraz czynników transkrypcyjnych GATA-1 i NF-E2, wzrost aktywności esteraży acetylocholinowej [307]. Ponadto, antybiotyki antracyklinowe mogą powodować również akumulację komórek w fazie G₂/M cyklu komórkowego, poprzedzającego proces różnicowania [307, 312, 313].

2.2.1.2. Sposób oddziaływania daunorubicyny i doksorubicyny z DNA

Sposób oddziaływania daunorubicyny i doksorubicyny z kwasem deoksyrybonukleinowym jest dosyć dobrze poznany. Strukturę takich kompleksów starano się wyznaczyć za pomocą

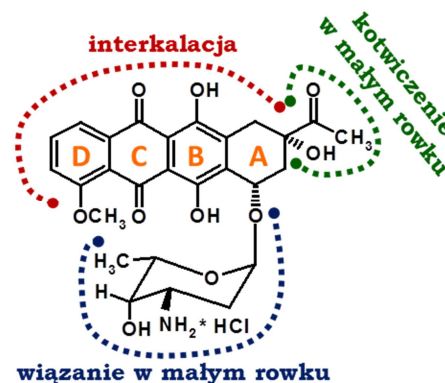
różnorodnych metod, w tym krystalograficznych [227, 229, 318], spektroskopowych (absorpcyjnych, emisyjnych, NMR, NOESY, DOSY) [319-234], analizy równowagowej [228, 231], czy modelowania molekularnego [323, 324]. Różnica w budowie cząsteczek DAU i DOX jest niewielka, stąd też ich kompleksy z DNA są do siebie bardzo podobne.

Daunorubicyna i doksorubicyna wiążą się z DNA w sposób odwracalny, tworząc kompleksy interkalacyjne [307]. Jak wynika z badań krystalograficznych [227, 229, 318] oraz modelowania molekularnego [323, 324], płaski układ aglikonu interkaluje pomiędzy komplementarne pary zasad nukleinowych (RYS. 84), niezależnie od sekwencji nukleotydowej, i utrzymuje się w tej pozycji dzięki siłom spiętrzającym (tzw. stacking). Pierścień D aglikonu ulega nieznacznemu wysunięciu w stronę dużego rowka helisy DNA, gdzie atomy tlenu przy węglach C4 i C5 mogą pośrednio przy udziale jonów obecnych w roztworze (np. Na⁺) oddziaływać z zasadą nukleinową. Pierścień A wraz z podstawnikami przy węglu C9 lokuje się w małym rowku. Tlen z grupy hydroksylowej tworzy dwa bezpośrednie wiązania wodorowe z guaniną, co wydaje się być kluczowe dla antynowotworowej aktywności antracyklin. Grupa acetylowa przy węglu C13 ulega przesunięciu w stronę daunozaminy, a jej tlen tworzy przy udziale molekuł wody pośrednie wiązania wodorowe z helisą [227, 229, 318, 323, 324]. Obecność w molekułe doksorubicyny dodatkowej grupy hydroksylowej przy węglu C14, zlokalizowanej w małym rowku DNA, powoduje inną organizację molekuł rozpuszczalnika niż w przypadku daunorubicyny. Ponadto, tlen tej grupy OH za pośrednictwem cząsteczek H₂O oddziałuje z tlenem fosforanu obecnego w szkielecie helisy, co dodatkowo stabilizuje kompleks [229, 307, 321]. Ważnym elementem w tworzeniu kompleksu DAU i DOX z DNA jest daunozamina, która dzięki możliwości rotacji wokół wiązania glikozydowego, lokuje się w małej bruzdzie. Jej pozycja nie jest jednak stała i zależy silnie od sekwencji nukleotydowej. Tutaj kluczową rolę odgrywa grupa aminowa części cukrowej, która może tworzyć bezpośrednie lub tylko pośrednie, przy udziale molekuł wody, wiązania wodorowe oraz oddziaływać siłami van der Waalsa z fragmentami łańcucha kwasu nukleinowego. W tej sytuacji sekwencja nukleotydowa determinuje odległości pomiędzy grupą NH₂ a akceptorami wiązań wodorowych w helisie, a tym samym stabilność całego kompleksu [227, 229, 323].

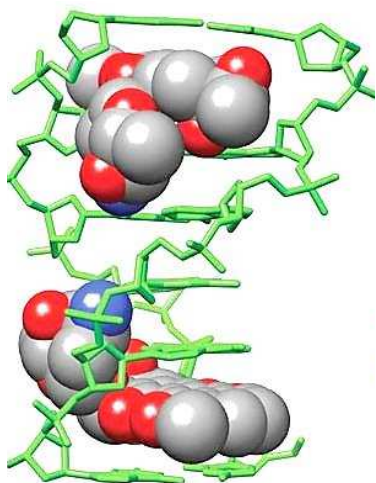
Warto zwrócić uwagę, że stabilność kompleksu DNA z antracykliną wynika z występowania różnego rodzaju interakcji oraz udziału wielu cząsteczek rozpuszczalnika. Oprócz działania sił spiętrzających elektrony π pomiędzy parami zasad a znajdującym się pomiędzy nimi aglikonem, występują również liczne siły van der Waalsa. W bruzdach helisy szczególną rolę odgrywają wiązania wodorowe, które występują pomiędzy ugrupowaniami leku i kwasu nukleinowego bezpośrednio lub z uczestnictwem molekuł rozpuszczalnika, np. wody lub jonów Na⁺ [229, 323].

Utworzenie kompleksu interkalacyjnego z DAU lub DOX powoduje liczne zmiany w strukturze helisy, zniekształcając ją i zmniejszając jej elastyczność. Zasady azotowe znajdujące się w sąsiedztwie interkalatora, powyżej i poniżej jego cząsteczki, ulegają wygięciu, lecz wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi parami nie zostają zerwane. Skutkuje to zwiększeniem odległości pomiędzy nimi i zmianą kątów torsyjnych w helisie [227, 229, 319]. Dystans pomiędzy parami zasad zwiększa się z 3,4 Å dla niezaburzonej formy B DNA do 6,8 Å, skręcenie względem siebie płaszczyzn sąsiadujących zasad maleje z 36° do 25° [307], a helisa ulega rozkręceniu o 8-12° [229, 323]. Wszystkie te zmiany powodują, że konformacja helisy może ulegać częściowemu przekształceniu z formy B w A [319].

Większość eksperymentów, w których badano oddziaływanie antracyklin z kwasem deoksyrybonukleinowym, przeprowadzonych zostało z wykorzystaniem heksamerów o różnym układzie nukleotydów (d(CGACG) [227], d(CGATCG) [229], d(TGTACA) [318]



RYS. 84 – Zaangażowanie poszczególnych fragmentów cząsteczki DAU w tworzenie kompleksu z DNA.



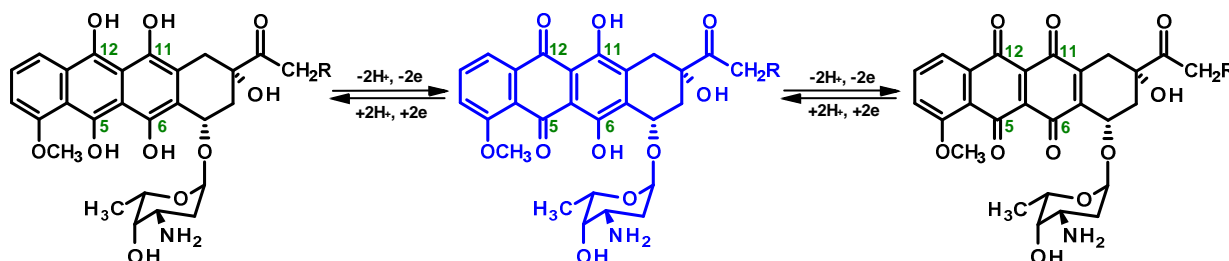
RYS. 85 – Model kompleksu dwóch cząsteczek daunorubicyny z heksamerem DNA [193].

i d(TGATCA) [318, 323, 324]). We wszystkich przypadkach stwierdzono, że z jedną molekułą takiego oligonukleotydu łączą się dwie cząsteczki antracykliny, które interkalują pomiędzy skrajne pary zasad azotowych (RYS. 85) [193]. Na tej podstawie trudno wyciągnąć jednak wnioski co do sekwencji DNA preferowanej przez daunorubicynę i doksorubicynę. Takich informacji dostarczyła analiza restrykcyjna oraz DNA footprinting. Okazało się, że DAU lepiej chroni przed rozcięciem przez enzymy restrykcyjne sekwencję 5'CGATCG3' niż 5'GAATTC3' [228] oraz że fragment 5'GC3' jest najczęściej chroniony przed działaniem DNAzy I [325]. Jednoznacznie sugeruje to, iż preferowanym miejscem wiązania antracyklin z DNA jest sekwencja zawierająca obok siebie guaninę i cytozynę [228, 319, 320, 325]. Ponadto, otoczenie miejsca interkalacji również nie jest obojętne dla tworzenia kompleksu, gdyż wpływa na rodzaje wiązań utworzonych przez daunozaminę w małym rowku. Według analizy krystalograficznej sekwencja

5'AT3', a nie 5'TA3' była preferowana przez aminocukier daunorubicyny i gwarantowała utworzenie stabilniejszego kompleksu [229].

2.2.1.3. Właściwości elektrochemiczne daunorubicyny i doksorubicyny

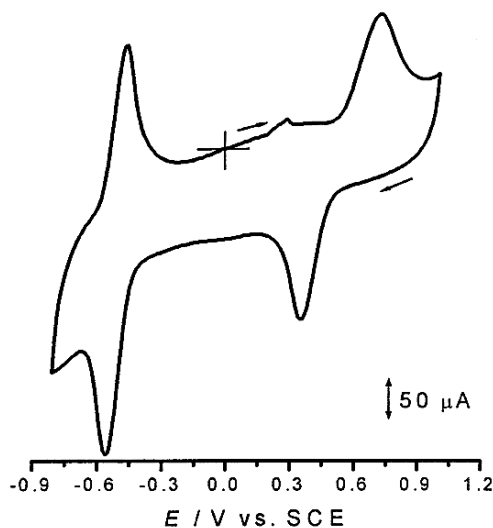
Daunorubicyna i doksorubicyna są substancjami aktywnymi elektrochemicznie i ze względu na bardzo zbliżoną do siebie budowę ulegają takim samym reakcjom redoks. W swojej strukturze zawierają dwa elektroaktywne fragmenty – ugrupowanie chinonowe przy węglach C5 i C12 aglikonu, które ulega redukcji oraz ugrupowanie hydrochinonowe przy węglach C6 i C11 aglikonu, które ulega utlenieniu [314, 326, 327] (RYS. 86) [328, 329]. Procesy te są odwracalne i przebiegają przy udziale 2 protonów i 2 elektronów [328, 329].



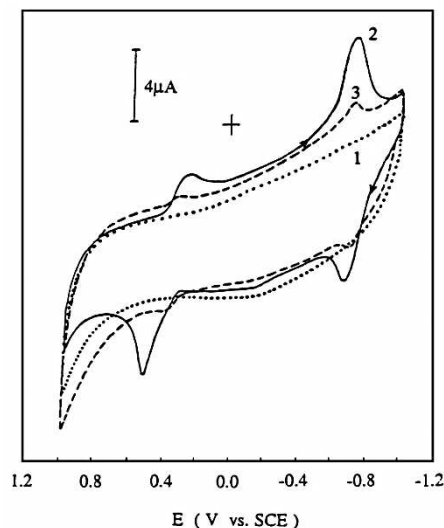
RYS. 86 – Procesy redoks antracyklin: DAU – R = H, DOX – R = OH. Struktura w kolorze niebieskim przedstawia formę podstawową [328, 329].

Procesy redoks DAU i DOX prezentowane są na voltamperogramie cyklicznym w postaci dwóch par pików [314, 326, 328, 330-332]. W skład pierwszej z nich, odpowiadającej odwracalnej redukcji układu chinonowego, wchodzi sygnał redukcji przy potencjale ok. -0,6 V oraz reutlenia przy potencjale ok. -0,4 V względem NEK w środowisku o pH 4,5 (RYS. 87) [326]. Druga para, interpretowana jako odwracalne utlenianie układu hydrochinonowego, zawiera natomiast sygnał utlenienia przy potencjale ok. +0,75 V oraz reredukcji przy potencjale ok. +0,4 V, zarejestrowane w tych samych warunkach [326]. Ponadto, pomiary wykonane na elektrodzie rtęciowej wykazały, że w zakresie potencjałów -1,1--1,3 V zachodzą dodatkowe procesy redoks, zidentyfikowane jako nieodwracalna dwuetapowa redukcja grupy karbonylowej w łańcuchu bocznym przy węglu C9 [327]. Bardziej szczegółowe badania pokazały, że procesy redoks układu chinonowego zależą od zawartości tlenu w układzie [326]. Na voltamperogramie wykonanym bardziej czułą metodą, jaką jest różnicowa voltamperometria pulsowa (DPV), zarejestrowanym w odtlenionym roztworze DOX zarejestrowano faktycznie jedną parę pików, odpowiadającą odwracalnej redukcji tego układu.

Jednak, gdy elektroda zanurzona była w roztworze natlenionym lub znajdującym się w normalnej atmosferze, zachodził na niej wieloetapowy transfer elektronów, co skutkowało pojawieniem się nowych pików na krzywej woltamperometrycznej w podobnym zakresie potencjałów. Spowodowane było to indukowaniem reaktywnych form tlenu przez antracyklinę i utworzeniem rodników. Żadnych zmian wywołanych zawartością tlenu w roztworze nie obserwowano natomiast w sygnałach redoks układu hydrochinonowego [326]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na przebieg reakcji redoks antracyklin jest pH roztworu. Wraz z jego wzrostem sygnał utlenienia DOX w zakresie dodatnich potencjałów zarejestrowany na elektrodzie z węgla szklanego maleje znacząco, przesuując się stopniowo w stronę niższych potencjałów [329].



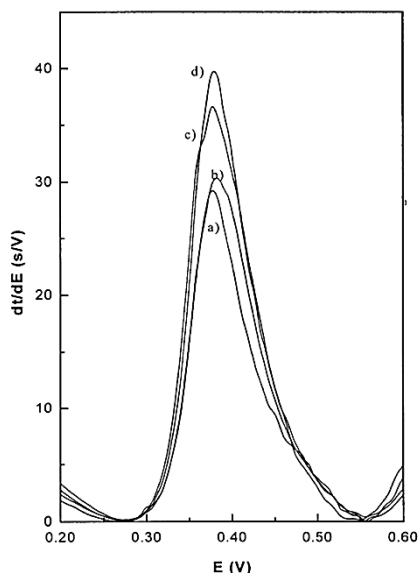
RYS. 87 – Woltamperogram cykliczny prezentujący procesy redoks $5 \mu\text{M}$ doksorubicyny zarejestrowany na elektrodzie z węgla szklanego w roztworze buforu octanowego o pH 4,5 [326].



RYS. 88 – Woltamperogramy cykliczne $1,86 \times 10^{-4} \text{ M}$ DAU: 1 – $0,6546 \text{ mg ml}^{-1}$ DNA bez DAU, 2 – sama DAU, 3 – DAU w obecności $0,6546 \text{ mg/ml}$ DNA zarejestrowane w $1/15 \text{ M}$ buforze fosforanowym o pH 7,0 [330].

Woltamperometryczne sygnały daunorubicyny i doksorubicyny ulegają pewnym zmianom pod wpływem oddziaływania z kwasem deoksyrybonukleinowym. Obecność DNA powoduje spadek wszystkich czterech sygnałów antracykliny oraz ich przesunięcie na osi potencjałów [224, 225, 330, 333] (RYS. 88) [330]. Najprawdopodobniej wynika to z interkalacji molekuł leku do helisy kwasu [225, 330, 333]. Jeśli eksperyment prowadzony jest na elektrodzie zanurzonej w mieszaninie antracykliny i DNA, to interkalacja może skutkować obniżeniem współczynnika dyfuzji molekuł leku do elektrody [330]. Jeżeli zaś elektroda modyfikowana kwasem nukleinowym zostaje zanurzona do roztworu antybiotyku, wówczas część jego molekuł związanych z helisą jest znacznie oddalona od powierzchni przetwornika i niedostępna w procesach redoks [225]. Ponadto, w przypadku DAU na elektrodzie z węgla szklanego zaobserwowano również pojawienie się nowego sygnału utlenienia w postaci „ramienia” przy potencjale ok. +0,8 V (vs. Ag/AgCl) [225]. Przypisano go utlenianiu cząsteczek daunorubicyny związanych w kompleksie z DNA.

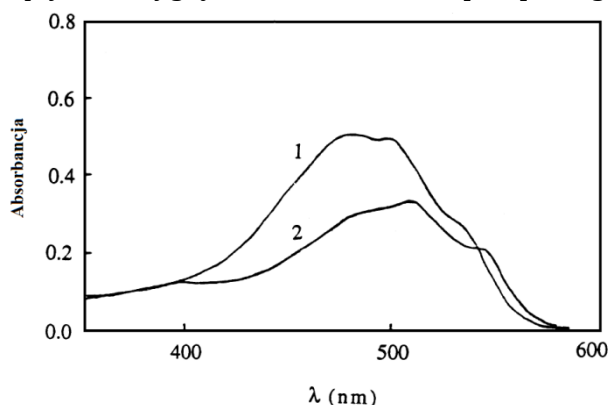
Jak już zostało wspomniane wcześniej, obecność tlenu w roztworze antracyklin skutkuje powstawaniem wolnych rodników, które powodują uszkodzenia oksydacyjne zasad azotowych, w tym guaniny. Podobny efekt można uzyskać, przykładając przez kilka minut potencjał $-0,6 \text{ V}$ do elektrody modyfikowanej DNA i zanurzonej w roztworze antracykliny [314, 326, 334]. Następuje wówczas redukcja antracykliny z jednoczesnym utlenieniem sąsiedniej G, a w pośrednich etapach tego procesu ma miejsce tworzenie form rodnikowych. W rezultacie na woltamperogramach zarejestrowanych na czujniku DNA zanurzonego w roztworze antracykliny z zastosowaniem potencjału depozycji, pojawia się nowy pik, odpowiadający utlenianiu 8-oksoguaniny [314, 326, 334].



RYS. 89 – Chronopotencjogramy 10 μM DAU zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej modyfikowanej 21-merowym oligonukleotydem z *Chlamydia trachomatis* w buforze o pH 7,4: a – bez dodatków oraz w obecności: b – 1 mg/ml niekomplementarnych łańcuchów oligonukleotydowych, c – 0,5 mg/ml i d – 1 mg/ml komplementarnych łańcuchów oligonukleotydowych [335].

2.2.1.4. Właściwości spektralne daunorubicyny i doksorubicyny

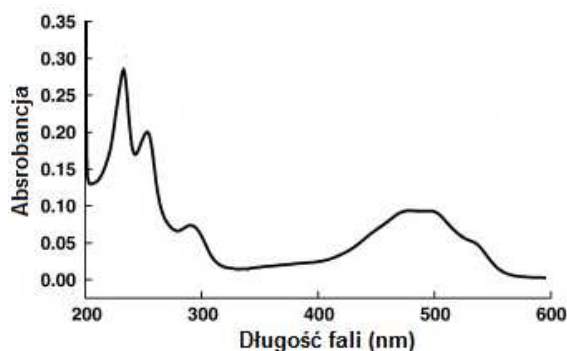
Antracykliny są pochodnymi antrachinonu i to właśnie ten fragment ich cząsteczek jest w głównej mierze odpowiedzialny za absorpcję promieniowania z zakresu UV-Vis. Silny wpływ na absorpcję mają obecne w daunorubicynie i doksorubicynie grupy hydroksylowe w pozycji C6 i C11, które wywołują efekt batochromowy w porównaniu z absorpcją niepodstawionego antrachinonu. Inne podstawniki obecne w cząsteczkach tych antracyklin mają znikomy wpływ na wygląd ich widma UV-Vis [340]. Z tego też



RYS. 91 – Widmo UV-Vis $5,05 \times 10^{-5}$ M DAU zarejestrowane w roztworze: 1 – niezawierającym DNA oraz 2 – zawierającym 0,534 mg/ml dsDNA z grasicy cielęcej [330].

powodu widma DAU i DOX są w zasadzie identyczne i charakteryzuje je kilka pasm absorpcji – najsilniejsze w postaci wyraźnego, ostrego piku przy długości fali 234 nm, dwa niższe przy 252 nm i 290 nm, szerokie o dwóch położonych blisko siebie maksimach absorpcji przy 480 nm i 495 nm oraz stanowiące „ramię” na zboczach ostatniego sygnału przy 532 nm [306] (RYS. 90) [341]. Kształt widma i długości fali, przy których występują poszczególne sygnały nie zależą od polarności rozpuszczalnika [342].

Podobnie jak w przypadku błękitu metylenowego, także tutaj obecność kwasu deoksyrybonukleinowego w układzie wywołuje zmiany w widmach UV-Vis antracyklin. Jako że DNA wykazuje absorpcję promieniowania w zakresie fali 240–300 nm, w analizie jego oddziaływania z antracyklinami uzasadnione jest monitorowanie sygnałów w paśmie 400–570 nm, mimo iż są one niższe niż te w paśmie 200–300 nm. Pozwala to uniknąć nakładania się widm



RYS. 90 – Widmo UV-Vis DOX zarejestrowane w buforze fosforanowym [341].

dwóch różnych substancji i ułatwia interpretację uzyskanych wyników. Utworzenie kompleksu DAU lub DOX z DNA wywołuje silny efekt hipochromowy i batochromowy (RYS. 91) [330]. Jest to skutkiem interkalacji i nakładania się chmur elektronowych sparowanych zasad nukleinowych i układu aglikonu [330, 333, 343]. Wielkość tych efektów zależy także od tego, czy DNA ma formę podwójnej helisy, czy pojedynczych łańcuchów. Silniejsze obniżenie i przesunięcie sygnałów obserwowane jest w przypadku ssDNA [343].

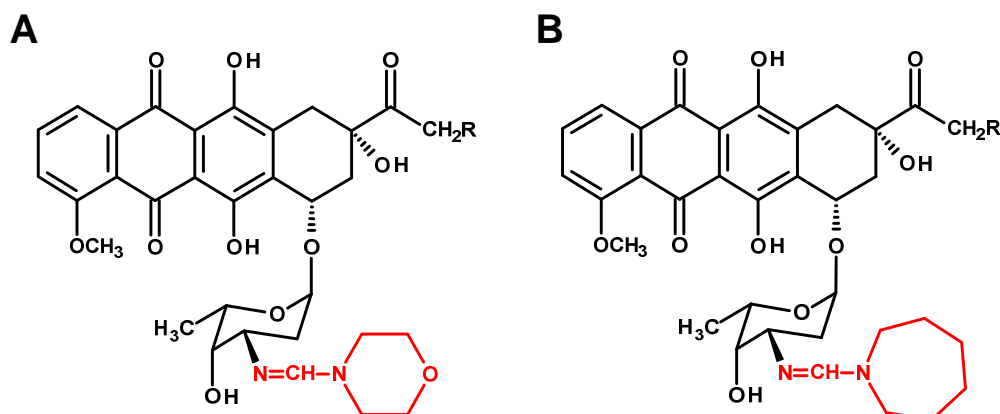
2.2.2. Pochodne daunorubicyny i doksorubicyny

Daunorubicyna i doksorubicyna, podobnie jak inne chemioterapeutyki, ze względu na znaczną toksyczność i wywoływanie licznych efektów ubocznych, nie są idealnymi lekami antynowotworowymi. Najpoważniejszym działaniem niepożądanym obu antracyklin jest kardiotoksyczność, objawiająca się zaburzeniami rytmu serca, przewlekłą niewydolnością serca, arytmia, upośledzeniem kurczliwości mięśnia sercowego. Przypuszcza się, że kardiotoksyczność może wynikać z generowania wolnych rodników, oddziaływania antracyklin z oksydazą cytochromu c i hamowania jej aktywności, zwiększenia peroksydacji lipidów, zaburzeń w gospodarce wapnia, hamowania ekspresji genów swoistych, aktywacji mitochondrialnych kinaz keratynowych, czy też indukcji syntezy tlenu azotu [307, 312]. Aby ograniczyć występowanie licznych poważnych efektów ubocznych, wciąż poszukuje się nowych sposobów na dostarczenie leków bezpośrednio do komórek rakowych i zminimalizowanie wpływu na komórki zdrowe, czyli tzw. terapii celowanej. Dotychczas zaproponowano na przykład podawanie leków w postaci ich kopolimerów z albuminą, kompleksów z DNA, zamkniętej w liposomach, czy też proleków, które są aktywowane przez enzymy wydzielane przez komórki nowotworowe [307, 312, 344]. Liczne niepożądane działania stosowanych aktualnie leków antynowotworowych oraz złożoność procedur dostarczania ich bezpośrednio do komórek chorych zmuszają do nieustannego poszukiwania ich nowych pochodnych, które odznaczałyby się niższą toksycznością i/lub wyższą aktywnością terapeutyczną. Nieustannie trwają prace nad „cudownym lekiem”, który działałby specyficznie, niszcząc wszystkie komórki rakowe i nie uszkadzając komórek zdrowych [345]. Ograniczenie toksyczności przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności działania antynowotworowego na podobnym poziomie stanowi główny cel przy projektowaniu nowych leków, w tym pochodnych antracyklinowych. Ponadto, dąży się także do podwyższenia ich aktywności, intensyfikacji działania antyproliferacyjnego, zwiększenia zdolności do indukcji różnicowania komórek, ułatwienia transportu leku do komórek nowotworowych oraz przełamania bariery oporności [312, 345].

Poszukiwanie i badanie nowych substancji chemioterapeutycznych nie jest zadaniem prostym i tanim. Rozpoczyna się ono od badań przesiewowych (ang. screening), pozwalających na wytypowanie substancji o najbardziej obiecujących właściwościach w leczeniu nowotworów. Analizie poddawany jest wówczas wpływ potencjalnych leków na linie komórkowe nowotworów zwierzęcych i ludzkich *in vitro* [345]. Są to jednak badania dość kosztowne i obecnie poszukuje się innych, tańszych narzędzi przesiewowych, które niekoniecznie skupiałyby się na pomiarach biologicznych, a wykorzystywałyby metody fizykochemiczne, np. bioczujniki DNA [239]. Jedynie substancje dające dobre wyniki podczas badań przesiewowych poddawane są badaniom przedklinicznym, mającym na celu wyznaczenie ich potencjalnie bezpiecznej dawki, która nie powodowałaby nieodwracalnych efektów ubocznych w organizmie człowieka, a jednocześnie wykazywałaby działanie terapeutyczne. Informacji takich dostarczają testy *in vivo* na zwierzętach, określające aktywność przeciwnowotworową danej substancji, toksyczność i farmakokinetykę. Na tym etapie wyznacza się: tolerancję organizmu zwierzęcego na przeciwnowotworowe dawki danego związku, jego wpływ na rozwój nowotworu, dawkę letalną, wchłanianość, biodostępność, wydzielanie, okres półtrwania, metabolizm i wydalanie. Kolejnym krokiem, do którego dopuszczane są jedynie substancje dające pozytywne rezultaty w testach przedklinicznych, są

badania kliniczne. Obejmują one trzy fazy: I – określenie toksyczności danego związku dla człowieka i jego tolerowaną dawkę, II – ocena działania antynowotworowego wobec wybranych nowotworów, III – porównanie bezpośrednio skuteczności nowego środka ze skutecznością leczenia standardowego. Dopiero po wykazaniu lepszych właściwości nowej substancji na tym etapie może on stać się oficjalnie nowym lekiem antynowotworowym [345].

Mimo tak żmudnej procedury wprowadzenia nowych leków do chemioterapii, nieustannie trwają badania nad nowymi pochodnymi antracyklinowymi i takimi modyfikacjami ich struktury, by otrzymane analogi odznaczały się lepszymi właściwościami terapeutycznymi. Dotychczas zidentyfikowano ponad 200 naturalnych antracyklin oraz zsyntetyzowano już ponad 2000 ich pochodnych [312, 344], lecz tylko kilka z nich uzyskało status leków. Wymienić tu można przykładowo epidokсорubicynę (stereoizomer DOX), idarubicynę (analog DAU pozbawiony grupy metoksylowej w pozycji C4), aklacynomycynę (pochodna o trzech fragmentach cukrowych w cząsteczce) oraz pirarubicynę (tetrahydropyranolowa pochodna DOX) [307]. W antynowotworowym działaniu DAU i DOX ważną rolę odgrywa część aminocukrowa, dlatego też główny kierunek w poszukiwaniu nowych potencjalnych leków antracyklinowych stanowią jej modyfikacje. Najbardziej obiecujące spośród nich to wprowadzenie przy grupie aminowej w pozycji C3' daunozaminy pierścienia morfolinowego (np. cyjanomorfolinodokсорubicyna, morfolinodaunorubicyna), podstawników alkilowych (np. PNU 159548, pochodna idarubicyny z resztą azyrydynową) [307, 312, 346], reszty trifluoroacetylowej lub beznzylowej z jednoczesną estryfikacją kwasem walerianowym grupy hydroksylowej w pozycji C14 (np. walarubicyna) [307], a ponadto zastąpienie grupy aminowej w pozycji C3' grupa hydroksylową (np. hydroksydaunorubicyna) [347], synteza pochodnych dwu- i trisacharydowych, w których daunozamina oddzielona jest od aglikonu przez dodatkowe cząsteczki cukrowe (np. sabarubicyna) [307, 346, 348, 349] oraz tworzenie dimerów, w których dwie molekuły antracykliny połączone są łącznikiem (np. WP631, gdzie dwie cząsteczki DAU połączone są łącznikiem p-ksylenowym) [307, 350].



RYS. 92 – Wzory strukturalne formamidynowych pochodnych daunorubicyny ($R = H$) i dokсорubicyny ($R = OH$) zawierających: A – pierścień morfolinowy, B – pierścień heksametylenoiminowy.

Nową grupę analogów antracyklin stanowią pochodne formamidynowe modyfikowane w części cukrowej. Pierwszorzędowa grupa aminowa w pozycji C3' daunozaminy została zastąpiona w nich ugrupowaniem formamidynowym ($-N=CH-NR^1R^2$), zawierającym resztę cyklicznej aminy. W Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie zsyntetyzowane zostały całe serie pochodnych daunorubicyny, dokсорubicyny, epidaunorubicyny i epidokсорubicyny o różnej wielkości pierścienia drugorzędowej aminy cyklicznej [351]. Z punktu widzenia wykonywanych przeze mnie badań, warto przyrzeć się bliżej pochodnym daunorubicyny i dokсорubicyny zawierającym jako aminę cykliczną pierścień morfolinowy (DAU-Fmor, DOX-Fmor) lub heksametylenoiminowy (DAU-Fhex, DOX-Fhex) (RYS. 92). Związki te różnią się między sobą polarnością i zdolnością tworzenia wiązań wodorowych, co może mieć decydujący wpływ na ich właściwości antynowotworowe [352].

Biologiczne właściwości nowych pochodnych DAU i DOX oraz możliwość ich stosowania w terapii nowotworów zostały bardzo szeroko przebadane i porównane ze związkami macierzystymi. Przeprowadzono między innymi liczne eksperymenty na liniach komórkowych ludzkich nowotworów: płuc A549 [353], okrężnicy SW707 [353] i LoVo [354], piersi T47D [353], pęcherza moczowego HCV29T [353], białaczki K562 [355, 356] i HL-60 [354], mięsaka macicy MES-SA [354] oraz białaczki mysiej L1210 [352, 357]. Wykazano w nich, że formamidynowa modyfikacja części daunozaminowej wpływa na wiele właściwości antracyklin, w tym na cytotoksyczność, aktywność antyproliferacyjną, kardiotoxycznosc, pokonywanie oporności lekowej, tworzenie połączeń z kwasem deoksyrybonukleinowym. W porównaniu ze związkami macierzystymi pochodne formamidynowe w mniejszym stopniu ograniczają żywotność komórek K562 [355] oraz charakteryzuje je słabsze działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek L1210 [352]. Aktywność antyproliferacyjna natomiast zależy od rodzaju modyfikacji i silnie wzrasta w przypadku pochodnych zawierających układ morfolinowy, zaś maleje dla pochodnych z układem heksametylenoiminowym [353, 355]. Spośród wszystkich pochodnych DOX-Fmor wykazuje najlepsze właściwości antynowotworowe, powodując dodatkowo najpoważniejsze zmiany morfologiczne w komórkach rakowych K562 związane prawdopodobnie z indukcją procesu różnicowania komórek białaczkowych w kierunku erytrocytów oraz dużym wpływem na ich cykl komórkowy [355]. Z kolei pochodna daunorubicyny z pierścieniem morfolinowym jest w stanie łatwiej wnikać do komórek L1210 w porównaniu ze związkiem macierzystym i DAU-Fhex [352]. Podstawienie grupy aminowej przy węglu C3' części daunozaminowej układem formamidynowym nie pozostaje bez znaczenia dla oddziaływania antracyklin z DNA. Badania pokazują, że rozcinanie łańcuchów DNA w komórkach L1210 przez DAU wynika jedynie z inhibicji topoizomerazy II, podczas gdy jej pochodne mogą uszkadzać DNA także według drugiego mechanizmu, polegającego na kowalencyjnym wiązaniu ich metabolitów do helisy kwasu [352]. Mimo takiego podwójnego mechanizmu działania, wszystkie pochodne wykazują mniejszą niż związki macierzyste tendencję do tworzenia adduktów z łańcuchami DNA, co skutkuje również słabszą inhibicją syntezy RNA [358, 359]. O ile DAU-Fmor i DOX-Fmor wykazują podobną do substancji wyjściowych specyficzność sekwencyjną DNA, tj. blokują sekwencje 5'-GC-3', 5'-CG-3', 5'-TC-3' przed rozcinaniem przez enzymy i związaniem czynników transkrypcyjnych, o tyle DAU-Fhex i DOX-Fhex słabiej oddziałują z DNA i nie wykazują takich właściwości [358]. Jeśli chodzi o mechanizm rodnikowy antynowotworowego działania antracyklin, to wszystkie pochodne charakteryzują się dużą aktywnością w generowaniu wolnych rodników w obecności enzymów flawoproteinowych [360]. Ponadto, modyfikacje antracyklin wpływają na zdolność pokonywania oporności lekowej komórek rakowych i w większości przebadanych przypadków były one w stanie pokonać ją całkowicie lub częściowo, co nie udawało się DAU i DOX [354]. Wprowadzenie układu formamidynowego do cząsteczek daunorubicyny i doksorubicyny pozwala również ograniczyć w pewnym stopniu negatywne skutki chemioterapeutycznego działania antracyklin. DAU-Fmor, DAU-Fhex i DOX-Fhex wykazują mniejszą kardiotoxycznosc niż odpowiednie substancje macierzyste, lecz DOX-Fmor jest bardziej toksyczny i przy niższym stężeniu powoduje śmierć większej liczby testowanych myszy. Dodatkowo wszystkie pochodne powodują różnego typu efekty niepożądane (np. powiększenie jądra komórkowego i degeneracja cytoplazmy, zastój żylny, zwłóknienie mięśnia sercowego), lecz w większości przypadków są one mniej intensywne niż przy terapii DAU i DOX [353].

Na podstawie powyższych informacji można wyciągnąć wniosek, że bardziej obiecującą zmianą struktury antracyklin jest wprowadzenie w części daunozaminowej pierścienia morfolinowego niż heksametylenoiminowego i być może jest to właściwy kierunek w poszukiwaniu bardziej skutecznych i mniej toksycznych chemioterapeutyków. Jak widać, nawet niewielkie zmiany w strukturze danej substancji, które na pierwszy rzut oka mogłyby się wydawać nieistotne, mają ogromny wpływ na jej właściwości biologiczne i mogą przybliżyć do odkrycia „cudownego leku”.

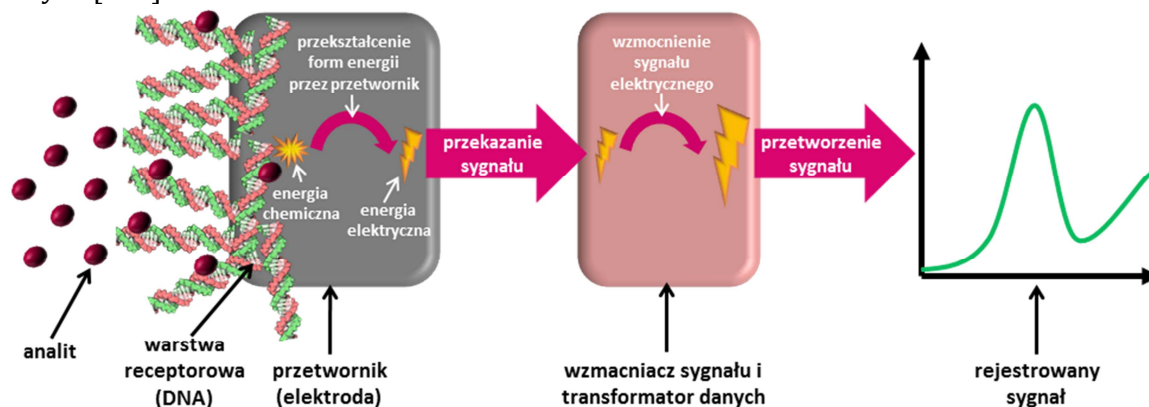
3. Elektrochemiczne bioczuJNIKI DNA

Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) mianem bioczuJNIKA określa się zintegrowane urządzenie analityczne, zawierające biologiczny element rozpoznania (receptor biochemiczny) bezpośrednio i nierozdzielnie połączony z przetwornikiem, oraz umożliwiające specyficzne ilościowe i półilościowe oznaczanie substancji chemicznych [361]. W tego typu układach źródłem sygnału analitycznego są zachodzące procesy biologiczne. W przypadku elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA warstwę receptorową stanowi kwas deoksyrybonukleinowy na stałe unieruchomiony na powierzchni przetwornika elektrycznego, który stanowi elektroda [169, 362]. Biosensorami DNA nazywa się także urządzenia, które nie spełniają w pełni wymienionych powyżej warunków. Choć takie zjawisko nie powinno mieć miejsca w praktyce analitycznej, występuje dość często.

Elektrochemiczne bioczuJNIKI DNA cieszą się ogromną popularnością i są coraz częściej stosowane w różnego rodzaju oznaczeniach. Dzieje się tak dlatego, iż wykazują one wiele zalet w porównaniu z innymi metodami analitycznymi. Pomiary wykonywane przy ich użyciu są dość proste w realizacji i odznaczają się stosunkowo dużą czułością. Nie są one czasochłonne, a na wynik oznaczenia nie trzeba czekać, jak w przypadku różnego typu testów genetycznych czy biologicznych, gdyż jest on dostępny natychmiast po ukończonym pomiarze. Czujniki te z reguły są niewielkich rozmiarów, co pozwala ograniczyć wymaganą objętość próbki i odczynników. Oznaczenia wykonywane za ich pomocą mogą odbywać się zarówno w roztworach wodnych, jak i aprotycznych, przy czym ich właściwości optyczne nie wpływają na wynik. Warto zwrócić także uwagę, iż koszty produkcji elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA i pomiarów wykonywanych przy ich pomocy są zdecydowanie niższe w porównaniu z innymi metodami analitycznymi [363, 364].

3.1. Budowa elektrochemicznego bioczuJNIKA DNA

Elektrochemiczny bioczuJNIK DNA zbudowany jest z elektrody, na której trwale unieruchomiony jest kwas deoksyrybonukleinowy. Pozwala on określać zmiany właściwości elektrochemicznych DNA obecnego w warstwie receptorowej, wywołane jego oddziaływaniem z różnorodnymi indywiduami chemicznymi, oraz oznaczać specyficzne sekwencje nukleotydowe [169]. Standardowo taki sensor zanurzany jest w roztworze próbki, zawierającej składniki wpływające na warstwę receptorową lub nawet wiążące się z nią (RYS. 93). Te procesy biochemiczne są źródłem pewnej energii chemicznej, która następnie zostaje przekształcona przez przetwornik w sygnał elektryczny, proporcjonalny do zmian, które zaszły w receptorowym DNA na skutek interakcji z molekułami analitu bądź hybrydyzacji. Następnie sygnał ten jest przetwarzany elektronicznie i odpowiednio wzmacniany, dzięki czemu dane przyjmują formę użyteczną dla analityka [169].



RYS. 93 – Schemat działania elektrochemicznego bioczuJNIKA DNA.

Obecnie nieustannie poszukuje się coraz doskonalszych konstrukcyjnie bioczuJNIKÓW DNA, skupiając jednocześnie uwagę na zastosowaniu nowych procedur pomiarowych. Niezmiernie istotną kwestią jest opracowanie optymalnych metod immobilizacji DNA na powierzchni elektrod, bo od tego w dużej mierze zależy efektywność pracy danego czujnika.

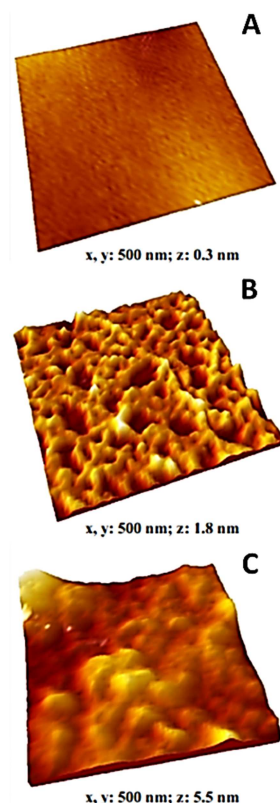
3.2. Sposoby unieruchamiania DNA na elektrodzie

Jak i w większości innych pomiarów elektrochemicznych, tak i w oznaczeniach wykonywanych przy pomocy elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA stosowany jest układ trójelektrodowy, składający się standardowo z elektrody pracującej, na której unieruchamiany jest kwas deoksyrybonukleinowy, elektrody odniesienia oraz elektrody pomocniczej. O ile dwie ostatnie nie odgrywają kluczowej roli przy konstrukcji biosensora i stosowane są ich standardowe wersje, o tyle elektroda pracująca determinuje efektywność unieruchomienia warstwy receptorowej, a tym samym jakość pracy czujnika.

W zależności od przeznaczenia danego biosensora DNA na powierzchni przetwornika elektrochemicznego mogą zostać unieruchomione zarówno pojedyncze, jak i podwójne łańcuchy kwasu deoksyrybonukleinowego. Musi to jednak zostać zrealizowane w taki sposób, by DNA nie stracił swej aktywności biologicznej, a przetwornik mógł monitorować zmiany jego właściwości redoks. Gęstość upakowania powstałej warstwy powinna być ściśle kontrolowana, gdyż ułożenie molekuł kwasu zbyt blisko siebie ogranicza ich dostęp dla oddziałujących z nimi ligandów lub innych komplementarnych nici obecnych w badanym roztworze. Ważne jest również, by procedura immobilizacji DNA była stosunkowo prosta w realizacji, a powstała warstwa receptorowa odznaczała się stabilnością w warunkach pomiarowych [169, 365, 366].

Różnorodność metod unieruchamiania DNA na elektrodach jest ogromna i wciąż pojawiają się nowe pomysły, w których stosowane są coraz bardziej złożone układy. Osadzanie kwasu deoksyrybonukleinowego może być realizowane przez oddziaływania niekowalencyjne lub tworzenie wiązań kowalencyjnych [75]. Pewne sposoby immobilizacji zapewniają bezpośrednią styczność cząsteczek kwasu z powierzchnią przetwornika, a w przypadku innych w kontakcie tym pośredniczą dodatkowe substancje lub ugrupowania chemiczne. Do najpopularniejszych i jednocześnie najprostszych metod należą: adsorpcja fizyczna, adsorpcja przy stałym potencjale, unieruchomienie w warstwie polimerowej, unieruchomienie z wykorzystaniem powinowactwa grup tiolowych do złota, powinowactwa awidyny i biotyny, wiązania amidowego, warstw silanowych, czy też samoorganizujących się warstw fosforanowych [75, 82, 366-368].

Najprostszym sposobem immobilizacji DNA na powierzchni przetwornika jest adsorpcja fizyczna. Biosensor przygotowuje się poprzez nakroplenie na powierzchnię elektrody pracującej roztworu kwasu deoksyrybonukleinowego i pozostawienie układu do wyschnięcia. Skutkuje to utworzeniem cienkiej warstwy receptorowej o przypadkowym i nieuporządkowanym ułożeniu poszczególnych łańcuchów kwasu (RYS. 94) [369]. Taka metoda unieruchamiania jest zwykle stosowana w przypadku różnego typu elektrod węglowych: z węgla szklanego (GCE, ang. Glassy Carbon Electrode), pastowej, grafitowej, ale czasem także elektrody złotej, rtęciowej i ITO (z tlenku indu domieszkowanego cyną)



RYS. 94 – Obrazy AFM wykonane w trybie kontaktowym Magnetic A/C przedstawiające powierzchnię elektrody z wysoce zorganizowanego grafitu pirolitycznego: A – czystą, B – z cienką warstwą dsDNA naniesioną na drodze wolnej adsorpcji z roztworu, C – grubą warstwą dsDNA nakroploną i wysuszoną [369].

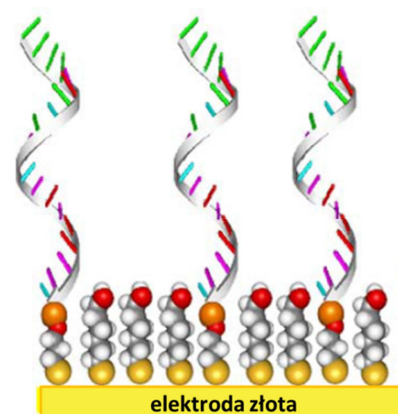
[75, 185, 186, 364, 365, 367].

Równie często stosowaną i stosunkowo łatwą do realizacji metodą immobilizacji jest adsorpcja nici DNA na powierzchni elektrod węglowych przy określonym potencjale. Łańcuchy DNA obdarzone ładunkiem ujemnym są przyciągane przez ujemnie naładowany przetwornik i oddziałują z nim elektrostatycznie [365]. Procedura w tym przypadku jest bardzo prosta: układ trójelektrodowy należy zanurzyć w odpowiednim roztworze DNA, a następnie przyłożyć do grafitowej elektrody pracującej określony potencjał (zwykle rzędu +0,2–+0,5 V) względem elektrody odniesienia i utrzymać ten stan przez kilka minut (2–5 minut) [82, 171, 239, 336]. Napięcie powinno być na tyle wysokie, by umożliwić efektywną adsorpcję kwasu na powierzchni elektrody. Jednocześnie też nie może przekraczać pewnych wartości, by nie spowodować utlenienia zasad azotowych. DNA adsorbuje się na powierzchni elektrody węglowej dzięki jej niejednorodnej i rozwiniętej powierzchni, a ułożenie łańcuchów podobnie jak poprzednio nie jest uporządkowane [367].

Alternatywą dla adsorpcji łańcuchów kwasu deoksyrybonukleinowego na powierzchni elektrody jest immobilizowanie ich w warstwie polimerów. Molekuły DNA są pułapkowane w ich sieci bądź na drodze elektropolimeryzacji polimerów przewodzących (np. polipirolu czy politiofenu) [370], bądź elektrostatycznego przyciągania przez polimery kationowe (np. chitosan lub poli(chlorek diallilodimetyloamoni)) [268, 371]. Ten typ unieruchamiania prowadzi do utworzenia warstwy bogatej w cząsteczki kwasu, lecz ich mobilność i dostępność jest wówczas poważnie ograniczona [365, 372].

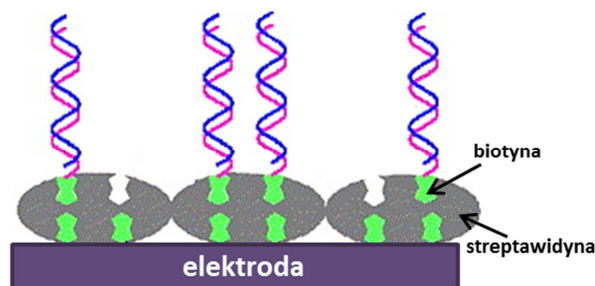
Bardzo dużą popularnością wśród metod immobilizacji kwasów nukleinowych cieszy się wykorzystanie powinowactwa grup tiolowych do powierzchni elektrody złotej [75, 364, 365]. Metoda ta wymaga wcześniejszej modyfikacji jednego z końców łańcucha oligonukleotydowego przez wprowadzenie łańcucha węglowego zakończonego grupą $-SH$. Gdy elektroda złota zostanie zanurzona w roztworze zawierającym tak zmodyfikowane fragmenty cząsteczek kwasów nukleinowych, zostają one połączone z jej powierzchnią przez wiązania kowalencyjne między złotem i siarką (RYS. 95) [160]. W ten sposób powierzchnia złota zostaje pokryta molekułami DNA, lecz pomiędzy nimi pozostają wolne przestrzenie na elektrodzie. Są one eliminowane w kolejnym etapie przygotowania bioczuJNIKA, gdy elektroda zostaje poddana działaniu roztworu alkoholu alifatycznego z ugrupowaniem tiolowym (np. 6-merkpto-1-heksanolu). Wówczas wolne miejsca na złocie zostają pokryte przez związki organotiolowe, tworzące samoorganizujące się monowarstwy (ang. self-assembled monolayers) [75, 160, 362, 365, 373]. Zapewnia to utworzenie regularnej i uporządkowanej warstwy, w której cząsteczki DNA stykają się z powierzchnią elektrody tylko za pośrednictwem łącznika tiolowego i nachylone są do niej pod stałym kątem, co zapewnia jednakową dostępność łańcuchów kwasu dla substancji oddziałujących z nimi [75, 365, 367].

Innym sposobem związania molekuł kwasu deoksyrybonukleinowego z powierzchnią elektrody jest tworzenie w obecności karbodiimidu kowalencyjnych połączeń amidowych pomiędzy grupami aminowymi występującymi w strukturze DNA a grupami karboksylowymi modyfikującymi przetwornik. Proces ten wymaga uprzedniego wyposażenia powierzchni przetwornika w grupy karboksylowe [293, 294, 367, 374]. Można osiągnąć to na przykład poprzez unieruchomienie na elektrodzie nanorurek węglowych zawierających ugrupowania $-COOH$ [375] lub w przypadku elektrody zawierającej tlenek indu domieszkowany cyną (ITO) utworzenie samoorganizujących się warstw kwasu dikarboksylowego na jej powierzchni [374].



RYS. 95 – Schemat immobilizacji DNA na elektrodzie złotej z wykorzystaniem warstw organotiolowych [160].

Ciekawą techniką unieruchomienia DNA na przetworniku jest wykorzystanie naturalnego powinowactwa awidyny lub streptawidyny i biotyny. Każda molekula awidyny/streptawidyny tworzy kompleks z czterema cząsteczkami biotyny, wiążąc je niekowalencyjnie. Zastosowanie systemu awidyno/streptawidyno-biotynowego w bioczuJNIKU DNA wymaga najpierw osadzenia awidyny/streptawidyny na elektrodzie oraz modyfikacji jednego z końców oligonukleotydów przy pomocy biotyny. Następnie tak przygotowana elektroda jest zanurzana w roztworze



RYS. 96 – Schemat immobilizacji DNA na elektrodzie za pośrednictwem układu streptawidyna-biotyna.

zmodyfikowanego kwasu nukleinowego, a jego molekuly zostają unieruchomione na powierzchni elektrody dzięki powinowactwu awidyny/streptawidyny i biotyny (RYS. 96). Warstwa receptorowa utworzona w ten sposób charakteryzuje się dużą stabilnością, porównywalną z immobilizacją kowalencyjną. Zastosowanie znajdują tu elektrody węglowe i złote, które często wymagają dodatkowej modyfikacji [336, 365, 367, 373].

3.3. Pomiary przy użyciu elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA

Elektrochemia wykazuje wiele zalet w porównaniu z innymi metodami detekcji. Jest to technika szybka i stosunkowo tania. Gwarantuje między innymi pożądaną czułość, łatwość wykonania oznaczenia oraz uniwersalność. Dodatkowo zmętnienie oraz inne właściwości optyczne próbki nie stanowią przeszkody w wykonaniu pomiaru, jak to ma miejsce w przypadku metod optycznych [169, 170, 186, 362, 366, 368, 376]. Do najczęściej stosowanych technik elektrochemicznych stosowanych w pomiarach z bioczuJNIKAMI DNA należą [169, 170]: woltamperometria cykliczna [160, 184, 201, 274, 377, 378], różnicowa woltamperometria pulsowa [184, 186, 274, 293, 377, 379], woltamperometria fali prostokątnej [160, 171, 294, 378], potencjometryczna i woltamperometryczna analiza strippingowa [336, 380].

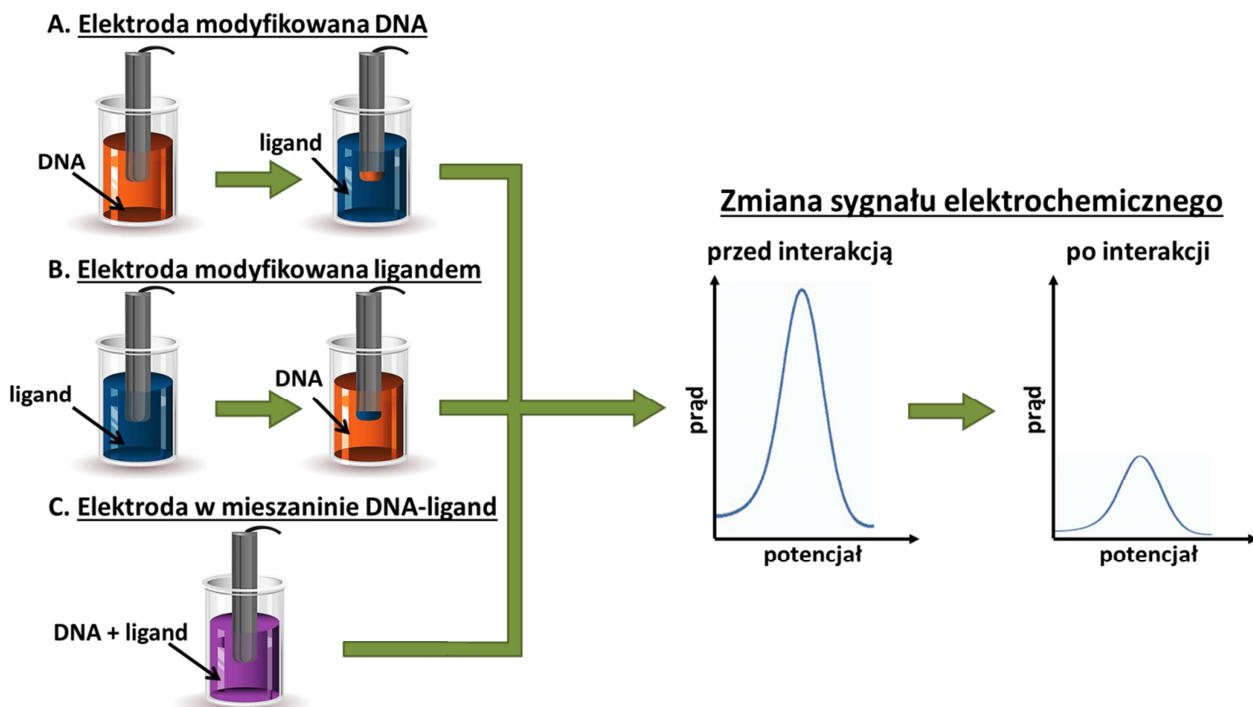
Przy pomocy elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA można wykonywać pomiary dwójakiego rodzaju. Po pierwsze, mogą one służyć do badania oddziaływań nici kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi indywidualnymi chemicznymi [90, 169, 170, 335, 364, 376]. Po drugie, przy ich pomocy można badać komplementarność dwóch pojedynczych nici DNA [335, 362, 364, 366, 376]. Analiza wyników otrzymanych w tego typu analizach może dostarczyć szerokiej wiedzy na temat mechanizmu tych interakcji, natury utworzonych połączeń, wielkości fragmentu molekuly DNA zaangażowanego w tworzenie kompleksu, roli wolnych rodników generowanych podczas oddziaływania czy stałej wiązania [169, 186, 364].

3.3.1. Badanie interakcji DNA z różnymi substancjami chemicznymi

Kwas deoksyrybonukleinowy dzięki swojej budowie jest zdolny do oddziaływania z wieloma bardzo różnorodnymi substancjami chemicznymi, które wpływają na jego strukturę, aktywność biologiczną oraz właściwości redoks. Interakcje DNA z ligandami mogą być badane według trzech procedur [169, 170, 185]:

- przez unieruchomienie na powierzchni przetwornika łańcuchów DNA i zanurzenie elektrody w roztworze danej substancji [171, 186, 239, 336, 381] (RYS. 97A)
- przez osadzenie na elektrodzie danego ligandu i umieszczenie tak przygotowanego urządzenia w roztworze kwasu nukleinowego [326] (RYS. 97B)

- przez zanurzenie elektrody w roztworze zawierającym zarówno DNA, jak i badaną substancję [184, 209, 381] (RYS. 97C)



RYS. 97 – Procedury elektrochemicznego badania oddziaływania DNA z różnymi substancjami chemicznymi. Opracowano na podstawie [170].

We wszystkich tych metodach badawczych mogą być stosowane zarówno pojedyncze, jak i podwójne nici DNA. Monitoruje się tu wynikającą z oddziaływania ligandu z kwasem nukleinowym, zmianę prądowych sygnałów utlenienia zasad azotowych – guaniny i/lub adeniny [170, 171, 336, 382, 383], bądź zmianę sygnałów utlenienia i/lub redukcji badanego związku [170, 184, 186, 211, 381]. Pewnych informacji na temat utworzonego kompleksu może dostarczyć analiza przesunięcia potencjałów sygnałów redoks [170, 211]. Jeśli pik ligandu przesuwają się w stronę potencjałów dodatnich, może świadczyć to o jego interkalacji do helisy DNA, zaś przesunięcie w przeciwnym kierunku interpretowane jest jako oddziaływanie elektrostatyczne [186, 384].

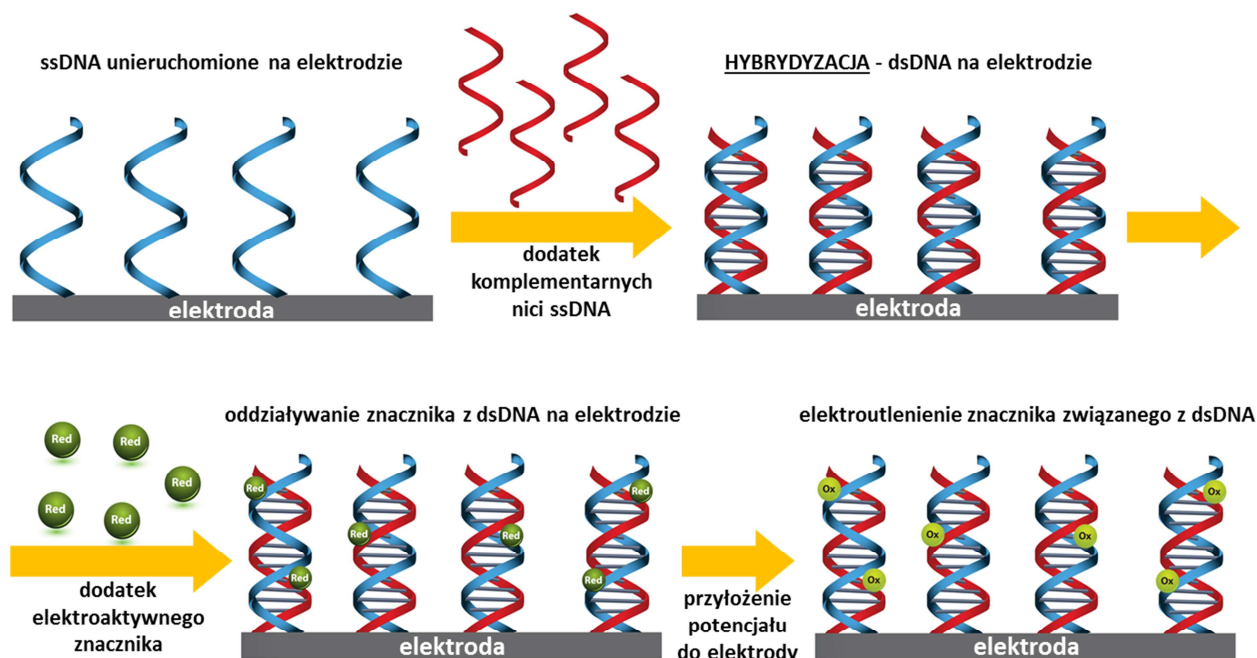
Mimo iż narzędzie używane przy elektrochemicznym badaniu oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi związkami chemicznymi potocznie nazywane jest biosensorem DNA, to zgodnie z definicją w przypadku drugiej i trzeciej procedury nie jest konstruowany standardowy bioczuJNIK DNA, gdyż nie występuje tu immobilizacja kwasu na powierzchni przetwornika. Bez względu na formalne kwestie nazewnictwa, różnego rodzaju biosensory DNA zostały wykorzystane przy badaniu oddziaływania kwasu nukleinowego między innymi z bromkiem etydyny [184, 185], barwnikami (błękitem metylenowym [266, 267], błękitem Nilu [381]), substancjami o działaniu farmakologicznym (np. emodyną [186], cisplatyną i karboplatyną [171, 336], daunorubicyną [225, 336], doksorubicyną [314, 326], mitoksantronem [211], pentamidyną i jej pochodnymi [239], likoryną [383], lewofloksacyną [209]).

3.3.2. Badanie hybrydyzacji DNA

Ważnym rodzajem analiz, w których elektrochemiczne bioczuJNIKI DNA świetnie się sprawdzają, jest badanie komplementarności dwóch pojedynczych nici kwasu deoksyrybonukleinowego oraz wykrywanie miejscowego niedopasowania pomiędzy parami nukleotydów [364]. Oznaczenie opiera się w tym przypadku na zachodzącym na elektrodzie zjawisku hybrydyzacji. W celu konstrukcji tego typu sensora na przetworniku immobilizowane są

pojedyncze nici kwasu deoksyrybonukleinowego, a następnie tak przygotowana elektroda zanurzana jest w roztworze zawierającym komplementarne łańcuchy. W większości eksperymentów prowadzonych według tej procedury używane są nici oligonukleotydowe zawierające od 15 do 50 par zasad w łańcuchu [160, 362, 366, 368].

Istotnym zagadnieniem jest sposób detekcji hybrydyzacji. Obecnie projektowane są coraz bardziej złożone, ale jednocześnie charakteryzujące się lepszymi parametrami, układy i procedury pomiarowe [82, 380]. Ja ograniczę się jednak do krótkiego zaprezentowania jedynie najpopularniejszych i stosunkowo prostych metod. Jedną z nich jest zastosowanie elektroaktywnych znaczników, które oddziałują z nicią DNA, lecz stopień ich powinowactwa do pojedynczego łańcucha kwasu różni się diametralnie w porównaniu z podwójną helisą (RYS. 98). Na skutek komplementarnego łączenia nici zmienia się prąd utlenienia lub redukcji tych substancji, co pozwala określić stopień dopasowania dwóch pojedynczych łańcuchów DNA [363, 365, 366, 368]. Jako znaczniki hybrydyzacji stosowanych jest wiele różnych substancji, a wśród nich kompleksy metali (np. $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, $[\text{Os}(\text{phen})_3]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{bpy})_3]^{2+}$) [362-364, 366-368], płaskie związki aromatyczne [362, 363, 366-368] (np. Hoechst 33258 [385], daunomycyna [336], błękit metylenowy [274, 293, 294], pochodne antrachinonu [160, 386]).



RYS. 98 - Schemat procesu hybrydyzacji DNA na powierzchni elektrody z zastosowaniem elektroaktywnego znacznika w celu detekcji.

W celu badania hybrydyzacji kwas deoksyrybonukleinowy może być znakowany również enzymami, które przyłączane są do niego bezpośrednio lub za pośrednictwem układu biotyna-awidyna. Najczęściej stosowane są w tym celu peroksydazy, które nie znakują pojedynczych nici kwasu unieruchomionych na elektrodzie, lecz łańcuchy obecne w badanej próbce. Po hybrydyzacji, do układu dodaje się nadtlenek wodoru, który ulega redukcji katalizowanej enzymem obecnym w utworzonych na elektrodzie komplementarnych niciach dsDNA. Prąd redukcji H_2O_2 stanowi sygnał analityczny, który dzięki obecności enzymu zostaje znacząco wzmacniony [362, 365, 366, 368, 387].

Innym sposobem oznaczania hybrydyzacji jest monitorowanie elektroaktywności samego kwasu deoksyrybonukleinowego. Na elektrodzie unieruchamiane są łańcuchy kwasu, zawierające w miejscu guaniny inozynę, która podobnie jak guanina wiąże się komplementarnie z cytozyną. Tak przygotowany przetwornik zanurzany jest w roztworze zawierającym komplementarne łańcuchy

oligonukleotydy, a następnie po hybrydyzacji monitorowany jest sygnał utlenienia guaniny [362, 363, 365, 366].

W celu detekcji procesu hybrydyzacji monitorowane mogą być także zmiany różnych właściwości elektrycznych układu [362, 363, 365, 366, 368]. Gdy ssDNA unieruchomiony jest w warstwie polimeru przewodzącego, komplementarne łączenie nici powoduje zmianę jego przewodnictwa. Z kolei przewodnictwo jonowe dwuwarstwy lipidowej, zawierającej pojedyncze łańcuchy kwasu, ulega osłabieniu w wyniku ich hybrydyzacji. Proces ten może wywoływać także zmiany pojemności elektrycznej elektrody złotej modyfikowanej warstwą DNA [388].

3.4. Zastosowanie elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA

Zarówno czujniki do badania interakcji DNA z różnymi molekułami chemicznymi, jaki i te działające na zasadzie hybrydyzacji znalazły wiele różnorodnych zastosowań. Jednocześnie dają one perspektywy przyszłościowego rozwiązania wielu problemów analitycznych.

Dziedzinami, w których bioczuJNIKI DNA odgrywają znaczącą rolę, są medycyna i farmakologia. Poznanie sposobu oddziaływania kwasu deoksyrybonukleinowego z lekami i substancjami o potencjalnym działaniu terapeutycznym, ich wpływu na strukturę i aktywność DNA oraz kinetyki i termodynamiki tworzonych przez nie kompleksów daje możliwość projektowania nowych medykamentów, których mechanizm działania opiera się na bezpośrednim oddziaływaniu z cząsteczkami kwasu deoksyrybonukleinowego [169-171, 364]. Daje to nadzieje na skuteczniejsze leczenie chorób nowotworowych i wirusowych, tym bardziej iż procesy zachodzące na elektrodzie z dużym powodzeniem mogą być porównane do tych mających miejsce *in vivo*, gdyż w komórce podczas tworzenia kompleksu z cząsteczką leku, DNA znajduje się w pobliżu obdarzonych ładunkiem warstw fosfolipidowych i białek [90, 169, 376, 384]. BioczuJNIKI DNA mogą być z powodzeniem stosowane do oznaczania poziomu substancji o działaniu terapeutycznym w różnych próbkach biologicznych, np. karboplatyny w surowicy krwi pacjentek obciążonych rakiem jajnika [222], mitomycyny C w moczu [201], metotreksatu w moczu [378]. Również czujniki działające na zasadzie hybrydyzacji znalazły zastosowanie w medycynie. Umożliwiają one identyfikację mutacji, wykrywanie chorób genetycznych (np. raka piersi [371]) i wirusowych (np. wirusowego zapalenia wątroby typu B [272, 381, 385]), monitorowanie zmian w ekspresji genów, dobór odpowiedniej metody leczenia [364, 376].

Innym obszarem, w którym biosensory DNA znajdują szerokie zastosowanie, jest ekologia i ochrona środowiska. Dzięki nim można badać wpływ różnych substancji toksycznych (kancerogenów, mutagenów, kompleksów metali) na kwas nukleinowy, a także wykrywać ich obecność w określonych próbkach. Przy pomocy bioczuJNIKÓW hybrydyzacyjnych z kolei monitoruje się obecność organizmów mikrobiologicznych oraz modyfikowanych genetycznie. Związki toksyczne i patogeny mogą być oznaczane w naturalnych próbkach środowiskowych – ściekach, wodach rzecznych, glebie, oraz w próbkach żywności [171, 297, 364, 376, 382, 389].

Szerokie możliwości wykorzystywania elektrochemicznych biosensorów DNA skutkują dynamicznym rozwojem tych urządzeń. Aktualnie zdecydowana większość badań prowadzona jest w czystych roztworach buforowych i duże wyzwanie stanowi opracowanie procedury pomiaru umożliwiającej dokonywanie oznaczeń w warunkach *in vivo* bezpośrednio w komórkach lub w naturalnych próbkach biologicznych bez potrzeby izolacji materiału genetycznego. Otworzyłoby to drogę do produkcji prostych testów diagnostycznych, które mogłyby zastąpić analizy laboratoryjne i być wykonywane samodzielnie przez osoby chore w warunkach domowych [169, 362]. Obecnie wykorzystując technologie elektroniczne, konstruowane są już zminiaturyzowane chipy DNA, które umożliwiają równoległą analizę wielu próbek. W perspektywach dąży się do konstrukcji czujników wielkości kart kredytowych, które miałyby zastosowanie kliniczne oraz

w medycynie sądowej [170, 376]. Obecnie kilka urządzeń służących do badania hybrydyzacji DNA jest już dostępnych komercyjnie i umożliwiają one prostą i szybką analizę próbek [82].

W rozwoju nowych elektrochemicznych biocujników DNA niezbędna jest współpraca wielu dziedzin naukowych jak chemia analityczna, biologia molekularna, biochemia czy chemia powierzchni i oddziaływań międzyfazowych. Nie można sobie także wyobrazić wprowadzenia do oznaczeń miniaturyzacji oraz nowoczesnych technologii bez udziału mikroelektroniki [170, 365].

4. Sitodruk

Sitodruk (ang. screen-printing) to technika graficzna, będąca formą tak zwanego malowania szablonowego, wywodzącego się ze starożytnych Chin i Japonii, a za jej twórców uznaje się Yuzensai Miyasaki i Zisukeo Hirose. Pierwszy z nich w XVII wieku wykorzystał tę metodę do ozdabiania kimon, drugi zaś w XIX wieku wynalazł szablon zwany "katagami". Sitodruk umożliwia wykonywanie wielobarwnych nadruków na różnorodnych płaskich powierzchniach przy pomocy szablonów. Niegdyś szablon wycinany był z papieru i наносzony na siatkę z ludzkich lub zwierzęcych włosów napiętą na drewnianej ramie. Dzisiejsze formy sitodrukowe są udoskonaleniem starożytnego pierwowzoru i składają się z prostokątnej, zwykle aluminiowej ramy z naciągniętą siatką kiedyś z jedwabnych nici, a obecnie z nylonu, poliestru lub metalu, oraz przygotowanego precyzyjnie szablonu [390].

Technika ta została spopularyzowana w USA w latach sześćdziesiątych XX wieku przez Andy Warhola, który zastosował ją między innymi do druku portretów Marilyn Monroe w psychodelicznych kolorach [391, 392] (RYS. 99) [393]. Mimo dostępności wielu różnorodnych sposobów powielania obrazu, sitodruk stanowi jedną



RYS. 99 – Portrety Marylin Monroe wykonane przez Andy Warhola techniką sitodruku [393].

z najefektywniejszych metod nadruku wyrazistych i nasyconych kształtów barwnych. Obecnie sitodruk rozwija się bardzo prężnie i w coraz większym stopniu ulega automatyzacji.

4.1. Procedura sitodruku

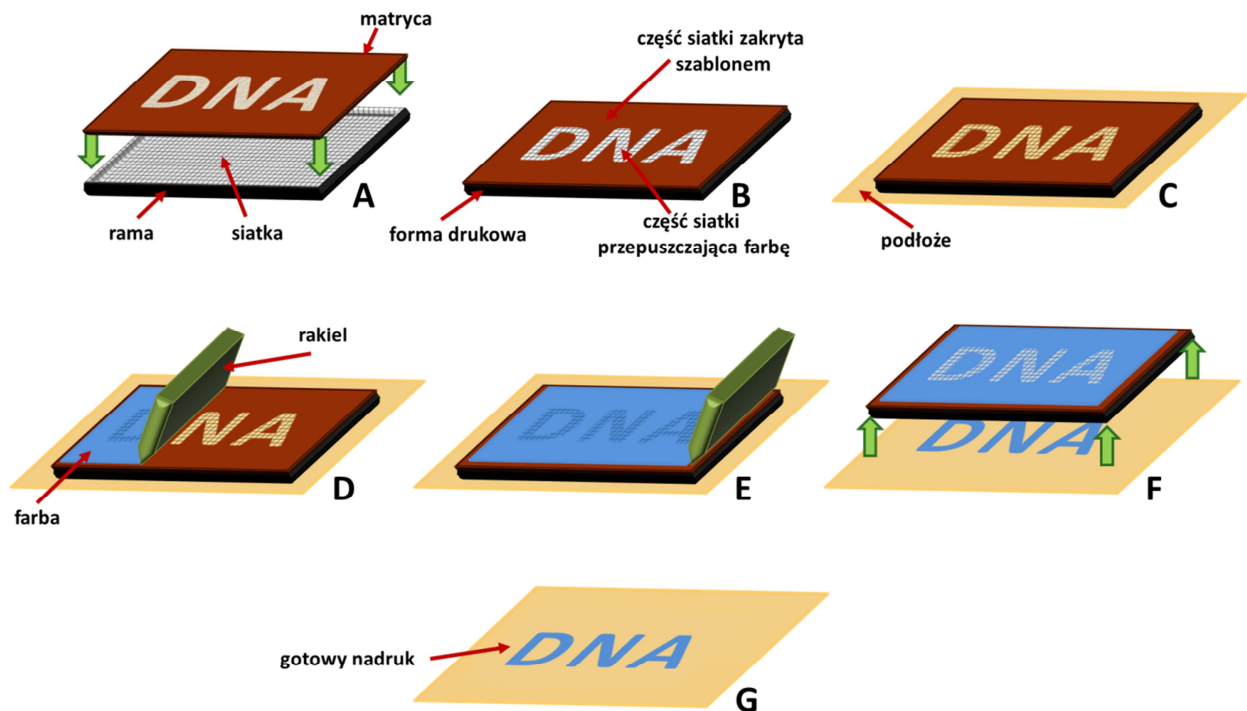
Proces sitodruku polega na przeniesieniu obrazu na podłoże przez matrycę naniesioną na specjalną siatkę sitodrukową. Rozpoczyna się on od przygotowania formy drukowej (RYS. 101A). Najpierw ramę z drewna, stali lub aluminium poddaje się czyszczeniu, wygładzeniu i zmatowieniu, po czym naciąga się na nią oczyszczoną i odtłuszczoną siatkę. Następnie tworzy się szablon przez naniesienie na siatkę matrycy, stanowiącej negatywowo obraz drukowanego wzoru. Jest to jedna z najistotniejszych czynności podczas całego procesu sitodruku, gdyż od staranności jej wykonania zależy jego jakość. Matryca może być zrobiona z substancji światłoczułej lub wycinana. Matryce światłoczułe zawierają zwykle dwuchromiany lub związki azowe i wymagają naświetlenia promieniowaniem UV, gdyż dzięki zachodzącym wówczas zjawiskom fotochemicznym ulegają utwardzeniu. Matryce wycinane natomiast wykonane są bezbarwnych podłoży poliestrowych pokrytych emulsjami syntetycznymi, z których wycina się pożądane kształty. Po przygotowaniu matrycy powstaje gotowa forma drukowa (RYS. 101B), w której oczka siatki stanowiące drukowany obraz są otwarte, zaś pozostałe są zasłonięte i nieprzepuszczalne [394] (RYS. 100) [395].



RYS. 100 – Siatka sitodrukowa pokryta utwardzoną matrycą światłoczułą [395].

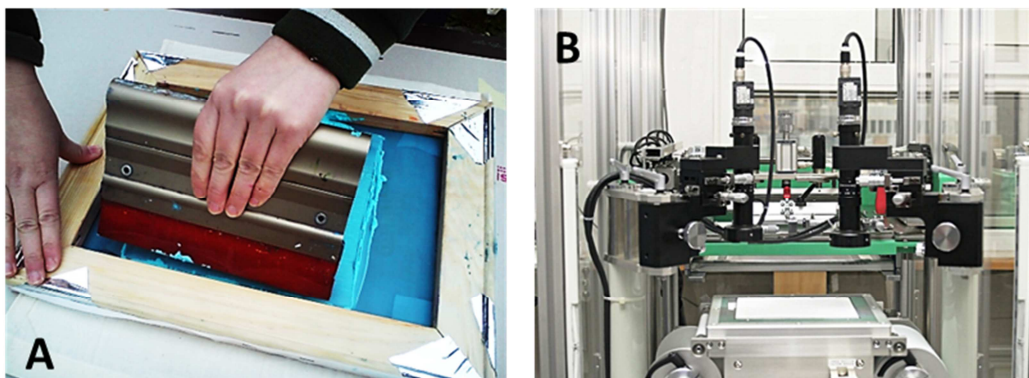
Kolejnym etapem w procedurze sitodrukowej jest druk właściwy. Forma drukowa umieszczana jest nad podłożem (RYS. 101C) i nanosi się na nią farbę (RYS. 101D), która jest równomiernie rozprowadzana po całej siatce za pomocą gumowego rakla (RYS. 101E). Farba zostaje przeciętna przez otwarte oczka siatki i w ten sposób przenika na powierzchnię docelową. Następnie forma drukowa zostaje usunięta z podłoża (RYS. 101F) i powstaje gotowy nadruk (RYS.

101G). Farby stosowane w sitodruku mogą schnąć w wyniku odparowania rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej albo wymagać utwardzenia pod wpływem podwyższonej temperatury, promieniowania UV lub reakcji chemicznej. Na jakość wydruku ogromny wpływ ma twardość i kształt końcówki gumy raklowej. Po zakończeniu druku każda matryca musi zostać oczyszczona z resztek farby, by mogła być stosowana ponownie do wykonania takiego samego nadruku, lub jeśli matryca nie jest już potrzebna, to jest ona usuwana z siatki [394].



RYS. 101 – Proces sitodruku.

Sitodruk charakteryzuje się dużą wydajnością i powtarzalnością, a nadruki wykonane tą metodą odznaczają się odpornością na uszkodzenia i działanie chemikaliów oraz wysoką jakością. Możliwe jest także wykonywanie wydruków wielobarwnych, ale wówczas wymaga zastosowania kolejno osobnych form drukowych z odpowiednimi matrycami dla poszczególnych kolorów nadruku. Drukować można ręcznie (RYS. 102A) [396], lecz obecnie, szczególnie przy druku wielu kopii tego samego obrazu, stosuje się sitodrukarki automatyczne (RYS. 102B) [397], które zdecydowanie przyspieszają cały proces.



RYS. 102 – Sitodruk ręczny (A) [396] oraz sitodrukarka automatyczna (B) [397].

4.2. Zastosowanie

Sitodruk to metoda umożliwiająca zadruk wielu rodzajów podłoży, o różnej fakturze i kształcie. Stosując różne farby oraz naciągi i rodzaje siatek, może być on wykorzystywany do drukowania na takich powierzchniach, jak: papier, tektura, tworzywa sztuczne, szkło, metale, tkaniny, oraz na przedmiotach uformowanych wykonanych z tych materiałów, np. butelkach, płytach kompaktowych. W zależności od właściwości użytych farb drukarskich można uzyskać różnorodne efekty zdobnicze i użytkowe (np. druk wypukły, błyszczący, fosforyzujący) [390, 394].

Obecnie sitodruk znajduje wiele zastosowań, do których można zaliczyć (RYS. 103) [398]:

- zdobienie odzieży, parasoli, flag, upominków,
- umieszczanie logo na gadżetach reklamowych (torbach, balonach, długopisach, kalendarzach, piłkach, naklejkach),
- wytwarzanie układów scalonych i płytek w elektronice,
- umieszczanie nadruków na płytach CD



RYS. 103 – Przedmioty z nadrukiem sitodrukowym [398].

4.3. Elektrody sitodrukowane

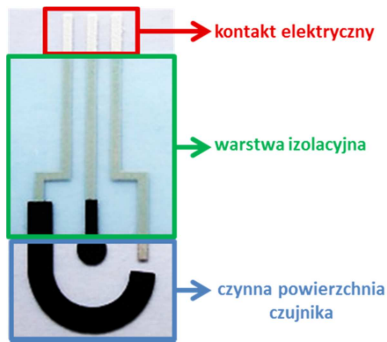
Wśród wielu zastosowań sitodruku jeszcze jedno zasługuje na szczególną uwagę. Ze względu na możliwość drukowania wielowarstwowego, stanowi on niemal doskonałe narzędzie do produkcji płaskich układów elektrodowych, stosowanych jako czujniki w oznaczeniach woltamperometrycznych i potencjometrycznych.

Elektrody sitodrukowane (ang. SPE, Screen-Printed Electrode) to płaskie urządzenia grubowarstwowe (20–100 μm), powstające na drodze nadrukowywania na podłożu poszczególnych warstw tuszu o odpowiednich właściwościach [399]. Mogą składać się one z pojedynczej elektrody bądź stanowić całe układy pomiarowe – trójelektrodowe w przypadku woltamperometrii oraz dwuelektrodowe przy pomiarach potencjometrycznych. Obecnie czujniki sitodrukowane cieszą się coraz większą popularnością i są coraz częściej stosowane w pomiarach analitycznych. Dlatego też nieustannie wzrasta liczba ich producentów, którzy prześcigają się w projektowaniu nowych, udoskonalonych konstrukcji (RYS. 104) [400-405].



RYS. 104 – Sitodrukowane czujniki elektrochemiczne różnych producentów [400-405].

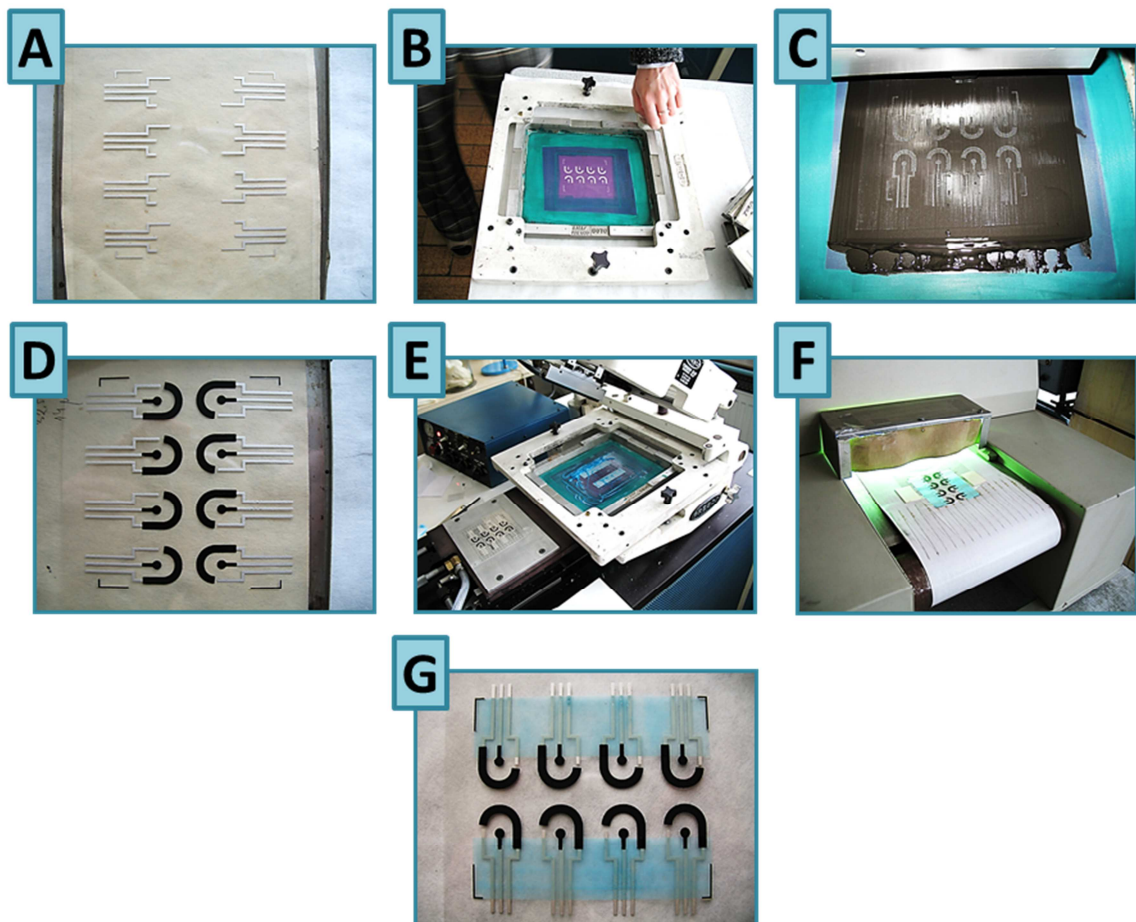
4.3.1. Sitodrukowanie elektrod



RYS. 105 – Konstrukcja czujnika sitodrukowanego.

Każda elektroda sitodrukowana składa się z kilku warstw różnych tuszów naniesionych na płaską, nieprzewodzącą powierzchnię według ściśle określonych szablonów [399]. Układ musi zawierać nadruk kontaktu elektrycznego, umożliwiającego podłączenie czujnika do aparatury pomiarowej, czynnej powierzchni, która podczas analizy zanurzana jest w badanej próbce, oraz warstwy izolacyjnej, osłaniającej pozostałą jego część (RYS. 105). O ile do wytworzenia warstwy izolacyjnej używa się tuszu nieprzewodzącego, o tyle pozostałe elementy wymagają zastosowania materiałów przewodzących prąd elektryczny.

Do produkcji układów sitodrukowanych wykorzystuje się podłoża ceramiczne, plastikowe lub szklane oraz tusze o rozmaitych właściwościach, które warunkują późniejsze zastosowanie danego czujnika. Same elektrody drukowane są przy pomocy dwojakiego rodzaju tuszów. Pierwsze z nich zawierają cząstki metali (złota, srebra lub platyny), lecz wymagają one traktowania zadrukowanej powierzchni bardzo wysoką temperaturą (850–1200°C), co nastęrcza wielu trudności. O wiele wygodniejszym i tańszym rozwiązaniem jest użycie tuszy węglowych, których suszenie odbywa się w temperaturze od pokojowej do 120°C [406]. Oprócz cząstek grafitu zawierają one wiele dodatkowych składników, do których zaliczyć można polimery wiążące oraz substancje zapewniające odpowiednie rozproszenie i przyleganie tuszu do podłoża, lecz dokładny skład pozostaje tajemnicą producenta [399, 407-409].

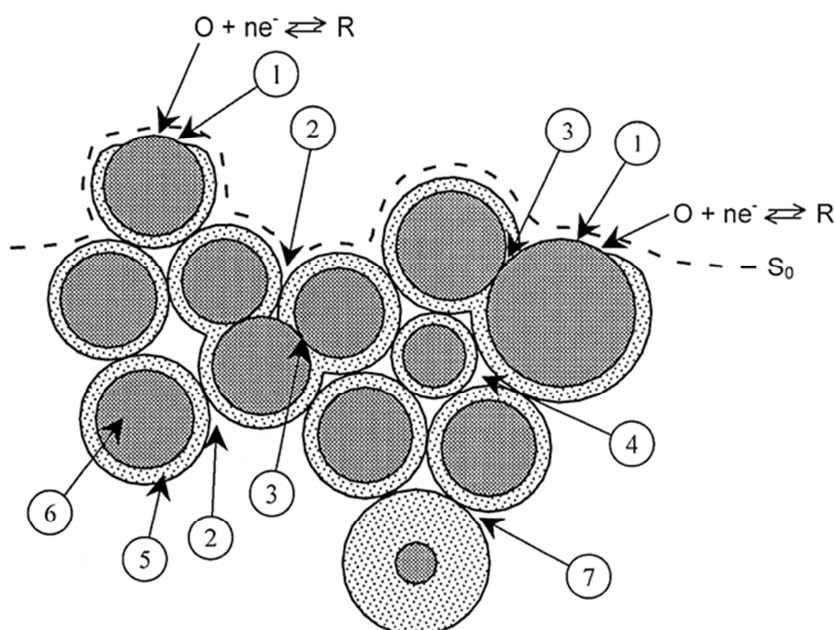


RYS. 106 – Proces sitodruku układów trójelektrodowych, składających się z grafitowej elektrody pracującej, grafitowej elektrody pomocniczej oraz srebrowej elektrody pseudoodniesienia. Zdjęcia wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie dzięki uprzejmości dr Elżbiety Zwierkowskiej i dr Selima Achmatowicza.

Nadruk układów sitodrukowanych jest procesem wieloetapowym, na który składa się nałożenie kolejno warstw: kontaktu elektrycznego, właściwej powierzchni elektrod i warstwy izolującej. Po nałożeniu każdej z nich niezbędne jest ogrzanie jej do odpowiedniej temperatury w celu polimeryzacji tuszu. Szczegółowy opis całej procedury zostanie przedstawiony na przykładzie trójelektrodowego czujnika grafitowego. W tym przypadku rozpoczyna się ona od nadruku na elastycznej folii poliestrowej warstwy srebrowej, która obejmuje ścieżki kontaktu elektrycznego oraz elektrodę odniesienia (RYS. 106A). Następnie drukuje się warstwę grafitową, tworzącą elektrodę pracującą i pomocniczą (RYS. 106B-D). Po obu tych etapach niezbędne jest ogrzewanie w 120°C przez 15 minut. Na końcu zabezpiecza się układ warstwą izolacyjną nakładaną w taki sposób, by jego końcowe fragmenty pozostały odsłonięte (RYS. 106E), po czym jest ona naświetlana promieniowaniem UV przez 30 sekund (RYS. 106F). W ten sposób powstają układy sitodrukowane gotowe do zastosowań analitycznych (RYS. 106G).

4.3.2. Właściwości elektrod sitodrukowanych

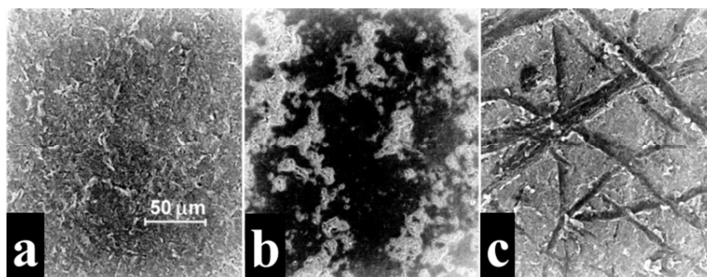
Właściwości układów sitodrukowanych zależą przede wszystkim od zastosowanych tuszów [410]. Rodzaj i rozmiar cząstek grafitu, zawartość polimerów wiążących, sposób nadruku oraz warunki utwardzania tuszu mają decydujący wpływ na efektywność przepływu elektronów, a tym samym parametry elektrody, takie jak prąd tła, wysokości rejestrowanych sygnałów prądowych, czy potencjałowy zakres działania [399, 407, 408]. Nadrukowana warstwa grafitowa nie jest jednorodna, gdyż ziarna węglowe są w większości pokryte nieprzewodzącymi substancjami wiążącymi i tylko znikoma ich część może uczestniczyć w reakcjach elektrodowych (RYS. 107) [411]. Warstwa substancji wiążącej, otaczająca daną cząstkę grafitu, może być tak gruba, że uniemożliwia całkowicie kontakt elektryczny z sąsiednimi ziarnami, blokując tym samym przepływ elektronów (RYS. 107-7) [411]. Jeśli zaś otoczka ta jest stosunkowo cienka, elektrony mogą być przenoszone pomiędzy cząstkami grafitu na drodze tunelowania (RYS. 107-2) [411]. W idealnej sytuacji ziarna grafitowe stykają się ze sobą bezpośrednio, co gwarantuje dobre przewodnictwo elektryczne pomiędzy nimi (RYS. 107-3) [411].



RYS. 107 – Przybliżona struktura sitodrukowanej warstwy grafitowej. (1) – zniszczenie warstwy substancji wiążącej na ziarnie grafitu w wyniku utleniania, (2) – pośredni kontakt ziaren grafitu, (3) – bezpośredni kontakt ziaren grafitu, (4) – wolne przestrzenie, (5) – substancja wiążąca tuszu, (6) – ziarno grafitu, (7) – ziarno grafitu pokryte zbyt grubą warstwą substancji wiążącej, S_0 – powierzchnia nadrukowanego tuszu [411].

Aby móc w pełni korzystać z możliwości, jakie dają grafitowe czujniki sitodrukowane, należy przed rozpoczęciem pomiarów analitycznych dokonać aktywacji elektrody pracującej, mającej na celu usunięcie z jej powierzchni nieprzewodzącej warstwy substancji wiążącej i odsłonięcie ziaren grafitu [411]. Taka aktywacja może zostać osiągnięta metodami fizycznymi lub chemicznymi. Wśród metod fizycznych wymienić można działanie ultradźwiękami [399, 412] oraz polerowanie przy pomocy papieru (zwykłego lub ściernego) [411, 413], co w znaczący sposób wpływa na morfologię powierzchni elektrody (RYS. 108) [413]. Najpopularniejszymi sposobami aktywacji chemicznej jest natomiast cykliczne elektrootlenienie i elektroredukcja powierzchni elektrody w środowisku stężonego kwasu, zasady lub buforu [407, 409, 411, 414] albo działanie na nią wodorotlenkiem sodu [414]. Wszystkie zabiegi aktywowania powierzchni sitodrukowanej elektrody grafitowej zdecydowanie poprawiają jej parametry pomiarowe. Dzięki nim wzrasta efektywność przepływu elektronów, zmniejsza się opór, poprawia się odtwarzalność pomiarów oraz ułatwiona zostaje adsorpcja różnych substancji na powierzchni czujnika [399, 407, 410-412, 414].

Właściwości elektrod sitodrukowanych mogą zostać zmienione także w wyniku modyfikacji składu tuszów sitodrukarskich poprzez dodanie do nich różnych substancji, takich jak metale, polimery, czynniki kompleksujące, mediatory, enzymy [410, 413]. Istnieje także możliwość osadzania tych substancji na powierzchni już gotowych elektrod [410]. Wówczas układy sitodrukowane mogą być stosowane jako czujniki modyfikowane, w tym także bioczujniki.



RYS. 108 – Mikrografie SEM przedstawiające powierzchnię grafitowej elektrody sitodrukowanej: a – bez modyfikacji mechanicznych, b – polerowaną zwykłym papierem, c – polerowaną papierem ściernym [413].

4.3.3. Zastosowanie elektrod sitodrukowanych

Czujniki sitodrukowane wykazują wiele zalet w stosunku do elektrod tradycyjnych. Ich prosta konstrukcja gwarantuje łatwość użytkowania, a pomiary wykonywane przy ich użyciu odznaczają się wysoką czułością i powtarzalnością. Technologia sitodruku pozwala na produkcję masową niemal identycznych elektrod przy stosunkowo niskich kosztach. Ponadto, łatwość ich miniaturyzacji pozwala na zdecydowane zmniejszenie ilości odczynników zużywanych podczas analiz. Czujniki sitodrukowane są zwykle jednorazowego użytku, dzięki czemu unika się konieczności czyszczenia ich powierzchni po pomiarze. Ważną zaletą jest także łatwość modyfikowania ich powierzchni, co zdecydowanie rozszerza możliwości aplikacyjne [399, 407, 415, 416].

Ze względu na te wszystkie cechy, układy sitodrukowane znajdują wiele rozmaitych zastosowań w analizie chemicznej. Są one dobrym narzędziem do oznaczania metali (Pb, Cu, Hg, Cd), szczególnie po wcześniejszym osadzeniu na nich warstwy rtęci, bizmutu, czy złota [410, 417-419]. Wielokrotnie były stosowane do oznaczania substancji ważnych z biologicznego punktu widzenia, np. witaminy B12 i tetracyklin w żywności, kreatyniny w moczu, czy chlorofilu α [410, 420]. Jednak dopiero immobilizacja na ich powierzchni biologicznej warstwy receptorowej, a tym samym konstrukcja bioczujnika, poszerza spektrum możliwości bioanalizy. Zaprojektowanych zostało wiele biosensorów enzymatycznych, w których to właśnie elektrody sitodrukowane były modyfikowane enzymami. Wykorzystywano je między innymi do oznaczania pestycydów i herbicydów, cholesterolu, glukozy, nadtlenku wodoru, etanolu, związków fenolowych [410, 421, 422]. Również w immunosensorych układy sitodrukowane znalazły zastosowanie i posłużyły do analizy hormonów (estradiolu, testosteronu, gonadotropiny), przeciwciał (anty Salmonelli,

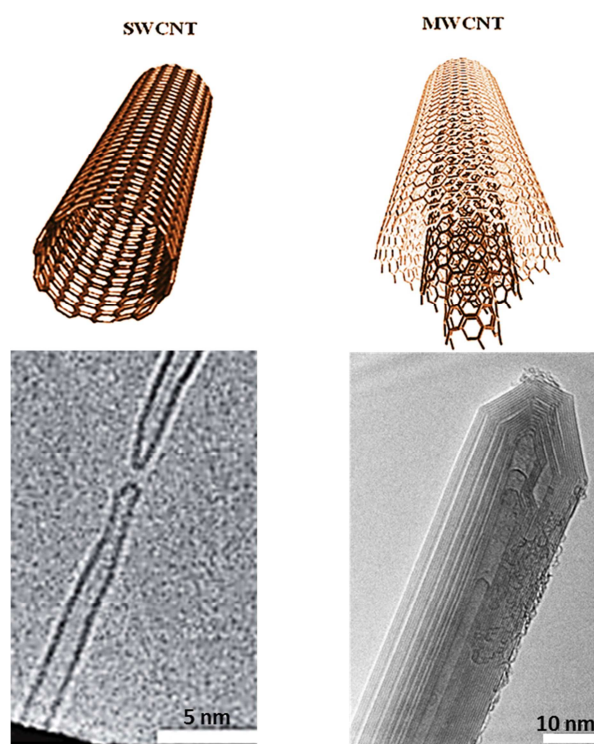
związanych z alergiami), toksyn w owocach morza, mykotoksyn, markerów nowotworowych (α -1-fetoproteiny, antygenu rakowo-płodowego), narkotyków (amfetaminy i jej pochodnych), substancji toksycznych (policyklicznych węglowodorów aromatycznych, polichlorowanych bifenyli, nonylofenolu) [410, 422]. Elektrody sitodrukowane stanowią też doskonałe narzędzie do konstrukcji biosensorów DNA, które wykorzystywane są do badania hybrydyzacji kwasu deoksyrybonukleinowego [335, 336] i jego oddziaływań z różnymi substancjami (cis-platyną, oranżem akrydyny, aflotoksyną B1, pochodnymi pentamidyny, czy pochodnymi kwinazoliny) [171, 239, 335, 423], wykrywania substancji toksycznych w próbkach środowiskowych [171, 335, 389, 424], czy analizy właściwości antyoksydacyjnych ekstraktów roślinnych [425].

Na podstawie tego krótkiego przeglądu zastosowań elektrod sitodrukowanych bez wątplenia widać, że stanowią one ważne narzędzie zarówno w analizach klinicznych, farmakologicznych, środowiskowych, czy żywności. Jeden z sitodrukowanych biocujników do oznaczenia glukozy został nawet wprowadzony do powszechnego użycia jako proste narzędzie do samodzielnego oznaczania poziomu cukru we krwi przez cukrzyków [399].

5. Nanorurki węglowe

Na wiele lat przed oficjalnym odkryciem nanorurek węglowych (CNT, ang. Carbon Nanotubes) naukowcy dostrzegali rurkowe struktury węglowe, lecz nie przykuwały one ich uwagi, gdyż niedostępne były wówczas techniki mikroskopowe, pozwalające na ich analizę na poziomie molekularnym [426]. Jednak już w roku 1976 Oberlin, Endo i Koyama opisali materiał otrzymany podczas rozkładu benzenu jako wielowarstwowe włókna węglowe o zróżnicowanej morfologii zawierające wewnętrzny pusty kanał współosiowy [427]. Z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że były to nanorurki węglowe, odkryte oficjalnie dopiero w 1991 roku przez japońskiego naukowca, specjalizującego się w analizie przy użyciu mikroskopu elektronowego, Iijimę. Badając materiał osadzony na katodzie podczas syntezy fulerenów w łuku węglowym, zaobserwował on w jej rdzeniu nieznaną dotychczas formę zamkniętych struktur grafitowych, w tym nanorurki [428, 429]. Rozpoczęto wówczas bardziej precyzyjne badania nad ich budową i warunkami syntezy, a po odkryciu ich zdumiewających właściwości, zainteresowanie nimi jeszcze bardziej wzrosło i po dziś dzień cieszą się one niekończącą się popularnością w świecie naukowym, a także w dziedzinach przemysłowych, upatrujących się w nich nowych rozwiązań technologicznych.

5.1. Budowa nanorurek węglowych



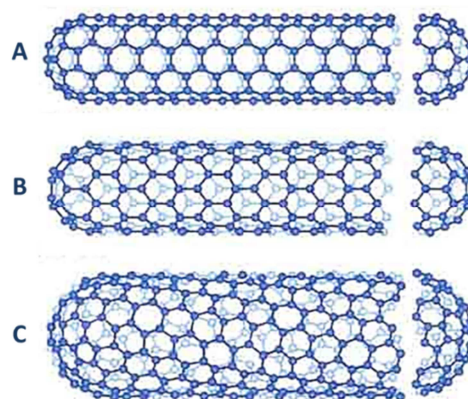
RYS. 109 – Schematy oraz mikrografie TEM nanorurek węglowych jednościennych (SWCNT) i wielościennych (MWCNT) [433-435].

Nanorurki węglowe to struktury zbudowane z czystego węgla. Powstają poprzez cylindryczne zwiniecie płaszczyzn grafenowych, tworzonych przez heksagonalne pierścienie atomów węgla o hybrydyzacji sp^2 [430-432]. Dana nanorurka może być tworzona przez jedną warstwę grafenu i wówczas mamy do czynienia z formą jednościenną (SWCNT, ang. Single-Wall Carbon Nanotubes) lub przez dwie i więcej takich warstw ułożonych koncentrycznie wokół wspólnej osi, tworząc formę wielościenną (MWCNT, ang. Multi-Wall Carbon Nanotubes) (RYS. 109) [433-435]. Odległość pomiędzy poszczególnymi warstwami wynosi 0,34 nm, co jest wartością zbliżoną do dystansu pomiędzy płaszczyznami grafenowymi w graficie [436]. Końce nanorurek mogą być otwarte lub zamknięte przez półsferyczne czasze, przypominające przepołowione fulereny (RYS. 110) [437]. Tego typu zakończenia powstają podczas procesu wzrostu CNT w wyniku włączania do regularnej sieci heksagonalnej

defektów w postaci pierścieni pentagonalnych lub heptagonalnych, powodujących zakrzywienie płaszczyzny na końcu nanorurki [426, 431, 432, 436].

Nanorurki to struktury o szerokości rzędu nanometrów i długości z zakresu mikrometrów. Średnice SWCNT wynoszą zwykle 0,4–2 nm, zaś MWCNT 2–100 nm, co zależy ściśle od ilości warstw [430, 438]. Jednościenne nanorurki węglowe mogą występować w różnych formach zależnie od sposobu skręcenia płaszczyzny grafenowej. Jeśli kąt chiralny, czyli kąt utworzony

pomiędzy osią danej nanorurki a wektorem chiralnym łączącym dwa równocenne krystalograficznie punkty na dwuwymiarowej płaszczyźnie grafenowej, jest równy 30° , to powstaje forma fotelowa (RYS. 110A) [437]. Jeżeli zaś wynosi on 0° , to powstająca struktura ma formę zygzakowatą (RYS. 110B) [437]. Obie te formy są cechuje duża regularność oraz achiralność. Przy każdej innej wartości kąta chiralnego z przedziału $0-30^\circ$ tworzone są nanorurki chiralne (RYS. 110C) [437]. Chiralność CNT ma duży wpływ na ich inne właściwości, w tym elektryczne [426, 432, 439].



RYS. 110 – Struktury SWCNT zależnie od sposobu zwinięcia warstwy grafenowej: A – forma fotelowa, B – forma zygzakowata, C – forma chiralna [437].

5.2. Właściwości nanorurek węglowych

Specyficzna budowa nanorurek sprawia, że obdarzone są one wyjątkowymi właściwościami mechanicznymi i elektrycznymi. Dzięki nim cieszą się one ogromnym zainteresowaniem zarówno świata naukowego, jak i różnych branży technologicznych [429].

Nanorurki są strukturami o niebywałej wręcz trwałości mechanicznej. Zawdzięczają to bardzo silnym wiązaniom pomiędzy atomami węgla, których energia wynosi $6,7 \text{ eV/atom}$ i jest porównywalna z siłą oddziaływań w diamencie ($7,34 \text{ eV/atom}$) [426, 429]. CNT charakteryzuje sprężystość oraz odporność na rozciąganie. Mogą ulegać one elastycznym i odwracalnym odkształceniom pod wpływem czynników zewnętrznych [426, 429, 440]. Ich moduł Younga osiąga wartość rzędu 1000 GPa , a wytrzymałość na rozciąganie 45 GPa . Dla stali wielkości te są odpowiednio 5- i 20-krotnie niższe [426]. Wynikiem tego jest zdolność nanorurek do wręcz ekstremalnych zmian kształtu (wykrzywiania, zginania do bardzo dużych kątów, spętiania, skręcania, ściskania osiowego). Jednak po ustąpieniu wywołującego je czynnika następuje powrót do formy wyjściowej. Podczas rozciągania CNT są w stanie zwiększyć swoją długość nawet o 40% , czemu towarzyszy przewężenie, ale nie następuje pęknięcie włókna [432]. Nanorurki są jednocześnie bardzo lekkie i mają stosunkowo dużą powierzchnię właściwą (rzędu $900 \text{ m}^2/\text{g}$ węgla). Ich gęstość wynosi zaledwie $1,33-1,40 \text{ g/cm}^3$, czyli mniej niż aluminium ($2,7 \text{ g/cm}^3$) [426]. Warto również wspomnieć tutaj o termalnej odporności nanorurek. Pozostają one bowiem stabilne w temperaturze 750°C w powietrzu oraz 2800°C w próżni. Ich przewodnictwo cieplne natomiast sięga 6000 W/mK w temperaturze 27°C , co zdecydowanie przewyższa właściwości diamentu [440, 441].

Spośród wszystkich właściwości nanorurek, elektryczne i elektronowe wydają się być najbardziej interesujące. Pojedyncze nanorurki jednościenne mogą być zarówno przewodnikami, jak i półprzewodnikami, co istotnie zależy od ich średnicy i chiralności. Natomiast, wszystkie nanorurki wielościenne są przewodzące, co wynika z różnorodności morfologicznej warstw je tworzących [426, 432]. Symetria SWCNT ma olbrzymi wpływ na ich przewodnictwo elektryczne i nawet niewielka jej zmiana odbija się diametralnie na ich przewodności. Jedna trzecia nanorurek jednościennych wykazuje przewodnictwo metaliczne, a pozostałe półprzewodnikowe [426, 438, 441]. Ze względu na małe rozmiary CNT, transport elektronowy wzdłuż form metalicznych przypomina drut kwantowy, w którym przewodnictwo odbywa się przez ściśle zdefiniowane, dyskretne stany elektronowe i ma charakter balistyczny, czyli nie następuje strata energii w wyniku rozpraszania. Taki ruch elektronów jest niemal bezoporowy, co zdecydowanie odróżnia CNT od klasycznych przewodników metalicznych [426]. Dzięki takim właściwościom nanorurki

mogą przewodzić prąd o natężeniu 1mA, co w tym przypadku odpowiada gęstości prądu rzędu 10^9 A/cm². Gdyby nie balistyczny transport elektronowy, to takiemu przepływowi towarzyszyłoby rozpraszanie energii, powodujące wzrost temperatury do blisko 20000°C, czego nie wytrzymałby żaden klasyczny przewodnik, taki jak złoto czy miedź [426, 440]. Omawiając właściwości elektronowe nanorurek, nie można pominąć ich zdolności do emisji polowej, czyli efektywnego wyprowadzania elektronów z jej zakończenia pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, ale bez dodatkowego ogrzewania układu. Emisja polowa nanorurek jest bardzo wysoka i sięga kilku A/cm² przy polu elektrycznym o stosunkowo niskim natężeniu. Najlepszymi emiterami są MWCNT o zamkniętych, bezdefektowych zakończeniach [426].

Ze względu na swoje wyjątkowe właściwości nanorurki węglowe nazywane są „czarnymi diamentami XXI wieku” [426]. Otwierają one drogę do produkcji nowych, niezwykle wytrzymałych materiałów oraz rozwoju nowych technologii elektronicznych. Pewnym problemem pozostaje jednak nadal ich produkcja na dużą skalę, co jest niezbędne przy wykorzystaniu przemysłowym.

5.3. Preparatyka nanorurek węglowych

Synteza nanorurek nie jest zadaniem łatwym, gdyż wymaga specyficznych warunków i optymalizacji wielu parametrów. Od nich zależy efektywność całego procesu oraz jakość uzyskanego materiału. Niestety zawiera on wiele produktów ubocznych, spośród których należy wyodrębnić CNT i poddać odpowiedniej procedurze oczyszczania. Tego typu działania nie pozostają bez znaczenia dla struktury nanorurek, powodując często ich chemiczną modyfikację.

5.3.1. Synteza nanorurek węglowych

Obecnie istnieją różne metody otrzymywania nanorurek, lecz wszystkie one polegają na powolnej kondensacji gorących par atomów węgla, które łączą się ze sobą i tworzą płaskie, niestabilne układy, zawierające wysokoenergetyczne wiązania nienasycone na brzegach. Z tego też powodu przekształcają się one w struktury zamknięte, takie jak nanorurki czy fulereny, dzięki czemu nadmiar energii zostaje zniwelowany [440]. Wśród najbardziej popularnych metod otrzymywania CNT wymienić należy: syntezę elektrołukową, pirolizę katalityczną oraz metodę laserową. Ponadto nanorurki wytwarzane są w wyniku: syntezy w piecu słonecznym, wysokotemperaturowej syntezy elektrolitycznej, niskociśnieniowej kondensacji par węgla, syntezy płomieniowej, syntezy spaleniowej, syntezy w plazmie nietermicznej i wielu innych [426, 429, 430, 432, 439].

Synteza elektrołukowa polega na otrzymywaniu nanorurek w łuku węglowym, składającym się z dwóch elektrod grafitowych oddalonych od siebie o ok. 1 mm, zasilanych prądem stałym lub zmiennym. Po zapaleniu łuku materiał anodowy ulega odparowaniu, a powstająca para zawiera jednoatomowy gaz węglowy, rodniki, obiekty typu C_n oraz okruchy grafenowe. Składniki te wędrują do katody i kondensują się na niej, tworząc osad składający się między innymi z MWCNT. Warto jednak dodać, że produkt ten może osadzać się również w innych częściach reaktora. Komora, w której zachodzą te procesy, wypełniona jest gazem buforowym, wodorem, helem, azotem, argonem lub metanem, pod ciśnieniem rzędu 10⁴ Pa. Temperatura panująca w układzie nie jest jednorodna i w okolicy katody wynosi ok. 2500–3000°C, a anody ok. 5500–6000°C. Metodą tą można otrzymać także SWCNT, lecz wymaga to zastosowania katalizatora, umieszczonego wewnątrz anody. Jako katalizatorów używa się gadolinu, platynowców (np. Ru, Rh, Pd, Pt), żelazowców, manganu, niklu, kobaltu lub mieszanin dwóch metali (np. Fe/Ni, Co/Ni, Ni/Mg). Na ilość i jakość nanorurek zsyntetyzowanych w łuku elektrycznym wpływa wiele czynników takich, jak rodzaj i ciśnienie gazu buforowego, natężenie i napięcie prądu, geometria generatora

plazmowego, a w przypadku SWCNT także rodzaj i stężenie katalizatora. Nanorurki uzyskane tą metodą nie są jednorodne i zawierają liczne zanieczyszczenia, sadzę, grafit turbostratyczny, węgiel bezpostaciowy, klastery metali [429, 430, 432].

Produkcja nanorurek metodą pirolizy katalitycznej (CVD, ang. Chemical Vapour Deposition) polega na termicznym rozkładzie gazowych substancji zawierających węgiel (np. acetyleny, tlenku węgla, benzenu, metanu, etenu, propenu) w obecności katalizatora (np. Fe, Co, Ni, Cu, Co) osadzonego na nośniku (np. SiO₂, Al₂O₃) lub stanowiącego składnik reagentów w fazie gazowej. Przebiega ona pod ciśnieniem atmosferycznym w piecu, przez który przetłaczana jest mieszanina danego substratu z gazem buforowym. W wyniku pirolizy tworzone są gazowe indywidua węglowe lub węglowodorowe, które gromadzą się na powierzchni drobin katalizatora i ulegają dalszemu przekształceniu w CNT. Wraz z węglem amorficznym i cząstkami metali pokrytymi warstwami grafenowymi osadzają się one na ściankach pieca oraz podłożu. Temperatura, w której prowadzony jest proces zależy od użytego substratu i przykładowo dla acetyleny wynosi 700°C, dla metanu 900°C, a dla benzenu 1100–1400°C. Po skończonej pirolizie układ jest chłodzony do temperatury pokojowej. Metoda CVD umożliwia wydajną syntezę wysokiej jakości nanorurek o różnorodnych kształtach, lecz zależy to od użytych substratów, rodzaju i stopnia rozdrobnienia katalizatora, rodzaju nośnika, temperatury pieca i szybkości przepływu. Stała się ona najczęściej stosowaną techniką produkcji nanorurek ze względu na prostotę układu eksperymentalnego, dostępność reagentów, wydajność, możliwość powiększenia skali i pracy w reżimie ciągłym [426, 429, 430, 432].

Metoda laserowa syntezy nanorurek opiera się na odparowywaniu grafitu przy użyciu lasera. W piecu rozgrzanym do temperatury ok. 1500°C umieszczana jest rurka kwarcowa z prętem grafitowym w środku. Po odpompowaniu powietrza pręt oświetlany jest impulsami światła laserowego (np. neodymowego, CO₂). Jego energia generuje powstawanie pyłu grafitowego, usuwanego ze strefy wysokotemperaturowej pieca wraz ze strumieniem gazu (np. argonu), przepuszczanego przez układ i obmywającego pręt. Pył ten przenoszony jest do miedzianego kolektora chłodzonego wodą, na którego ściankach kondensuje się w postaci sadzy. W osadzie zebranym z pręta i kolektora znajdują się nanorurki wielościennie. Synteza SWCNT wymaga wprowadzenia do układu odpowiedniego katalizatora metalicznego (np. Co, Ni, Pt lub ich binarne mieszaniny). Zastosowanie odpowiednich warunków procesu, optymalnej temperatury, niezbyt długiego czasu pomiędzy pulsami lasera, dobrze dobranego katalizatora, daje możliwość syntezy nanorurek z dużą wydajnością [426, 430, 432].

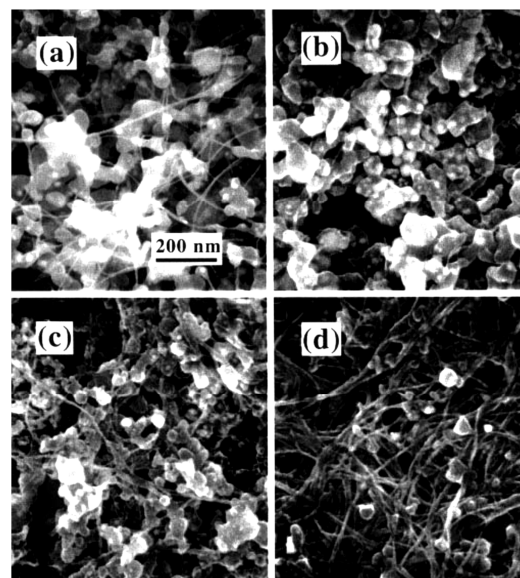
Poszukując idealnej metody syntezy nanorurek węglowych, dąży się przede wszystkim do otrzymania jednorodnego materiału z jak najmniejszą liczbą defektów i zanieczyszczeń. Pewnym wyzwaniem jest prowadzenie procesu w sposób kontrolowany, pozwalający na selektywną produkcję SWCNT lub MWCNT, wpływ na ich morfologię (skrętność, długość, średnicę) i konfigurację przestrzenną. Istotną kwestią jest także zwiększenie wydajności procesu, obniżenie kosztów, możliwość produkcji na skalę przemysłową oraz praca układu w reżimie ciągłym [426].

5.3.2. Oczyszczanie i izolacja nanorurek węglowych

Jak już zostało wspomniane w poprzednim podrozdziale, zsyntetyzowane nanorurki zawierają zwykle duże ilości rozmaitych zanieczyszczeń, a wśród nich: węgiel amorficzny, nanokrystaliny grafitu turbostratycznego, sadzę, fulereny, resztki katalizatorów metalicznych [426, 432, 439]. Dlatego też konieczne jest oczyszczanie ich różnymi metodami fizykochemicznymi. Procesy te są niestety bardzo czasochłonne i pracochłonne, a ich wydajność niewielka [426].

W większości procedur usuwania zanieczyszczeń z próbek nanorurek wyodrębnić można jeden lub kilka z następujących procesów: wysokotemperaturowe utlenianie zanieczyszczeń w powietrzu, trawienie ich roztworami kwasów nieorganicznych, odwirowywanie, filtrację. Jednak

skuteczne, całkowite oczyszczenie CNT można osiągnąć jedynie, stosując kombinację tych metod [439, 442] (RYS. 111) [442]. Istnieje na przykład wielostopniowa procedura, umożliwiająca usunięcie większości zanieczyszczeń. Rozpoczyna się ona od eliminacji mikrocząstek grafitu i węgla amorficznego poprzez wielogodzinne płukanie sadzy z reaktora w wodzie destylowanej, zakończone filtrowaniem i suszeniem. Następnie na drodze ekstrakcji toluenowej wymyciu ulegają fulereny. Kolejny krok to utlenianie sadzy w powietrzu w temperaturze kilkuset stopni Celsjusza w celu usunięcia węgla amorficznego i grafitowych otoczek wokół cząstek katalizatora. W ostatnim etapie zaś ma miejsce wymycie stężonym kwasem solnym metalicznego katalizatora z próbki [426]. W innej skutecznej procedurze oczyszczania CNT pierwszy etap stanowi wygrzewanie produktu syntezy w 2–3 M roztworze kwasu azotowego (V) przez kilkadziesiąt godzin. Otrzymany roztwór poddaje się wirowaniu, a powstały czarny osad kilkakrotnemu przemywaniu wodą dejonizowaną. Tak przygotowany osad dysperguje się w roztworze wodorotlenku sodu z dodatkiem środka czynnego powierzchniowo. Następnie taki roztwór poddaje się filtracji próżniowej, co ma na celu usunięcie węglowych produktów utleniania kwasem [432].



RYS. 111 – Mikrografie SEM ukazujące SWCNT na różnych etapach oczyszczania przez odwirowywanie: a – sadza zawierająca SWCNT otrzymana podczas syntezy elektrołukowej katalizowanej Fe i Ni, b – osad otrzymany w wyniku odwirowania przy 5000 rpm zawiesiny sadzy sporządzonej w wodzie w obecności kationowego surfaktanta, c – osad i d – zawiesina uzyskane w wyniku wirowania przy 15000 rpm cieczy z nad osadu b [442].

W zasadzie każda metoda oczyszczania nanorurek nie pozostaje bez znaczenia dla nich samych. Powoduje bowiem liczne zmiany w ich morfologii, zwiększając liczbę defektów i powodując otwieranie ich zakończeń, co wpływa znacząco na ich właściwości elektronowe i emisyjne. Szczególnie niszczące działania wykazują warunki silnie utleniające (np. gorąca mieszanina kwasów H_2SO_4/HNO_3) [426, 438, 439]. Dlatego też próbowano oczyszczać nanorurki mniej destrukcyjnymi metodami, wśród których wymienić można: elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym, chromatografię ekskluzyjną, czy filtrację po dodatku substancji powierzchniowo czynnej [426, 441, 442].

Nawet jeśli nanorurki zostaną już oczyszczone, to stanowią one mieszaninę wielu form o różnych właściwościach. Znaczenie aplikacyjne zyskują dopiero po ich rozdzieleniu i uporządkowaniu. Przykładowo, chcąc uzyskać nanorurki jednościenne o ujednocionej długości, do ich rozdziału stosuje się techniki chromatograficzne, czy też elektroforezę kapilarną [439]. Innym ważnym kryterium rozdzielenia SWCNT są ich właściwości przewodzące. W celu odseparowania form przewodzących od półprzewodnikowych wykorzystywane jest większe powinowactwo tych drugich do oktadecyloaminy, tendencję tych pierwszych do przechodzenia do osadu w czasie wirowania w obecności surfaktanta oraz różnice w ich stałych dielektrycznych umożliwiające rozdział metodą dielektroforezy zmiennoprądowej [430, 439].

5.3.3. Modyfikowanie nanorurek węglowych

Często już sama procedura oczyszczania nanorurek powoduje ich modyfikację, a najpopularniejszą z nich jest otwarcie i utlenienie ich końców w warunkach silnie utleniających, skutkujące wprowadzeniem grup karboksylowych czy chinonowych. Istnieje możliwość utlenienia również bocznych powierzchni nanorurek i wprowadzenie na nich grup $-COOH$, $-C=O$, $-OH$. Każda

zmiana tego typu otwiera drogę do dalszych modyfikacji CNT poprzez przyłączenie innych ugrupowań chemicznych [432, 438, 439].

Praca z nanorurkami jest wyjątkowo trudna ze względu na ich nierozpuszczalność. Pewne wyzwanie stanowi znalezienie sposobu na sporządzenie ich stabilnej, jednorodnej zawiesiny, gdyż w roztworach wodnych i rozpuszczalnikach polarnych ulegają szybkiej koagulacji. Co prawda, by temu zapobiec, stosuje się sonikację w rozpuszczalnikach aprotycznych (np. DMF) albo w obecności surfaktantów lub polimerów (np. pirolidyna poliwinylowa, sulfonian polisterynowy [426], amyloza [438], ssDNA [439]), lecz równie popularna jest kowalencyjna funkcjonalizacja ich ścianek i zakończeń [426, 430, 439]. Jedną z metod na spreparowanie formy rozpuszczalnej jest działanie na krótkie, utlenione SWCNT chlorkiem tionyłu, a następnie oktadecyloaminą lub tetradecyloaniliną. Powstające wówczas zakończenia nanorurek sprawiają, że stają się rozpuszczalne w chlorowanych i aromatycznych węglowodorach, THF oraz dwusiarczku węgla [432, 439]. Innym sposobem otrzymania rozpuszczalnych form SWCNT jest modyfikacja ich ścianek. W tym celu przeprowadza się na przykład addycję nitrenów, arylowanie czy alkilowanie [439]. Ciekawą procedurą jest także fluorowanie. Gazowy fluor tworzy wiązania kowalencyjne z atomami węgla na ściankach cylindrów nanorurkowych, a w temperaturze 400°C reaguje z atomami węgla na ich krawędziach, niszcząc je i powodując utratę zdolności nanorurek do przewodzenia prądu elektrycznego [426, 432, 436]. Fluorowane nanorurki są z kolei rozpuszczalne w alkoholach [439].

Oprócz braku rozpuszczalności jeszcze jeden problem z formą zsyntetyzowanych nanorurek jednościennych wymaga rozwiązania. Otóż zwykle mają one postać długich skłębionych nanowłókien, które należy uporządkować przed zastosowaniem. Opracowana została metoda pozwalająca na cięcie SWCNT na krótsze fragmenty o długości 50–300 nm. Oczyszczone nanorurki znajdujące się w utleniającej mieszaninie stężonych kwasów H_2SO_4 i HNO_3 poddaje się działaniu ultradźwięków, które powodują wybijanie drobnych otworów w ich powierzchni. Wówczas miejsca te są atakowane przez kwasy, co skutkuje rozbiciem nitkowych agregatów oraz rozcięciem cieńszych fragmentów na krótsze rurki. Nowo utworzone zakończenia są podatne na utlenienie i wprowadzenie grup karboksylowych, a tym samym na dalsze modyfikacje opisane już powyżej [432]. Ponadto, pewnego rodzaju uporządkowanie struktur nanorurkowych może zostać osiągnięte przez działanie na ich fragmenty zmodyfikowane grupami karboksylowymi, chlorkiem tionyłu i przyłączenie krótkich łańcuchów węglowodorowych zakończonych grupą tiolową, która z kolei może łączyć się ze złotem. Daje to możliwość utworzenia na powierzchni złotej samoorganizujących się, stabilnych warstw uporządkowanych nanorurek lub wiązania ze sobą za pośrednictwem nanocząstek złota różnych fragmentów nanorurkowych i tworzenia złożonych układów [432, 439].

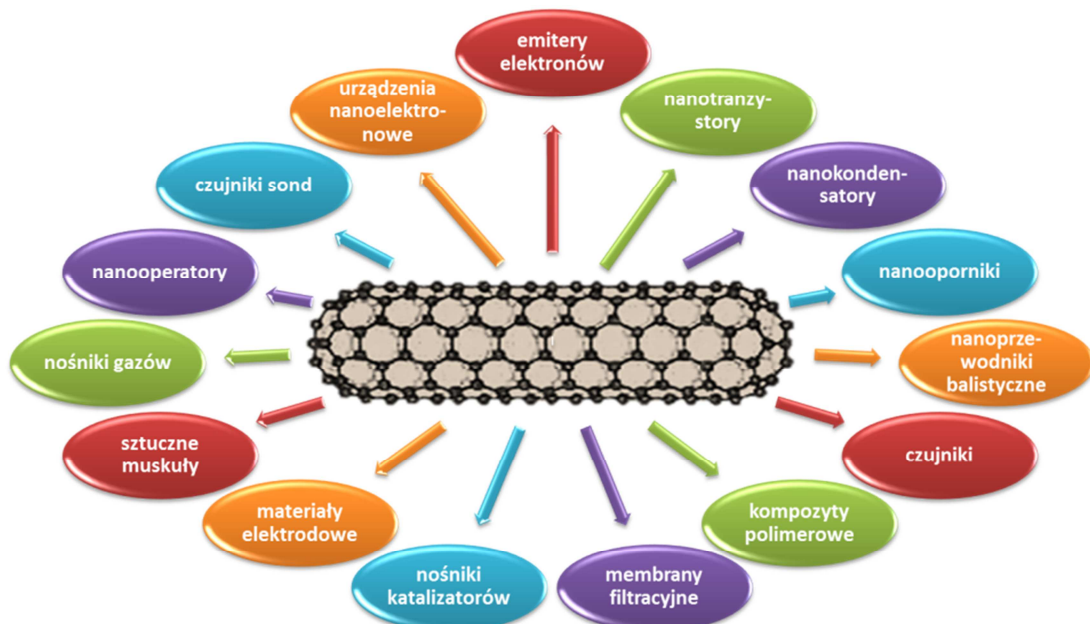
Wraz z rozwojem badań nad nanorurkami zaczęły pojawiać się coraz to nowsze i bardziej zaawansowane pomysły ich modyfikacji, mające na celu poprawę lub zmianę ich właściwości. Jedną z propozycji jest zastąpienie części atomów węgla w strukturze CNT borem lub azotem. Jako że atomy tych pierwiastków zawierają odpowiednio jeden elektron mniej lub więcej niż atomy węgla, włączenie ich do danej nanorurki daje możliwość utworzenia przewodników typu p lub n [430, 439]. Alternatywnym rozwiązaniem jest domieszkowanie CNT obcymi atomami, polegające na wnikaniiu ich w wolne przestrzenie struktur węglowych. Substancjami domieszkującymi są między innymi metale alkaliczne (potas, rubid, cez) i chlorowce (brom, jod), wpływające na przewodnictwo elektryczne CNT oraz wodór i neon, zmieniające ich własności sorpcyjne [432, 439]. Innym pomysłem jest napełnianie pustego rdzenia nanorurek obcymi atomami lub cząsteczkami. Może mieć to miejsce już podczas syntezy SWCNT, kiedy metaliczny katalizator (Fe, Ni, Co) wnika do ich wnętrza lub później, gdy metodami fizycznymi napełnia się je azotanami metali, tlenkiem kobaltu, tlenkiem ołowiu, a nawet czystymi rozpuszczalnikami. Wewnątrz nanorurki indywidualne cząsteczki mogą być rozmieszczone w postaci oddzielnych cząsteczek lub tworzyć ciągłe nanodruty [430, 432,

439]. We wnętrzu nanorurek udawało się umieścić również molekuly ważne biologicznie, np. cytochrom c_3 , β -laktamazę I, Zn_2Cd_5 -metalotioneinę, bez utraty ich aktywności [426].

Nieustające prace nad różnymi wariantami ingerencji chemicznej w strukturę nanorurek przybliżają naukę do syntezy z ich udziałem nowych materiałów o niespotykanych dotychczas właściwościach. Powstałe w ten sposób polimery, kopolimery, kompozyty, kompleksy z metalami mogą znaleźć szerokie zastosowania przemysłowe i sprostać wielu wyzwaniom technologicznym [432].

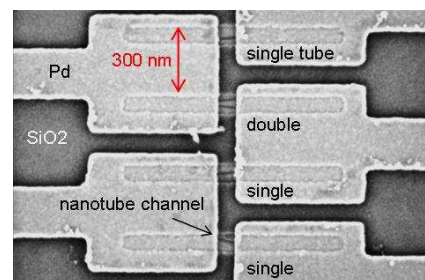
5.4. Zastosowanie nanorurek węglowych

Specyficzne przewodnictwo elektryczne i elektronowe, bardzo wysoka wytrzymałość mechaniczna oraz duża powierzchnia właściwa to cechy nanorurek węglowych, które sprawiają, iż budzą one ogromne zainteresowanie nowoczesnej technologii elektronicznej i materiałowej [426]. Perspektywy ich zastosowań w tych dziedzinach są ogromne (RYS. 112) [426]. Część pomysłów udało się już zrealizować, a inne pozostają jeszcze na etapie badań.



RYS. 112 – Perspektywiczne zastosowania nanorurek węglowych. Opracowano na podstawie [426].

Dziedziną, w której rurkowe nanostruktury węglowe zaczynają odgrywać coraz większą rolę, jest mikroelektronika [426, 432, 439, 441]. Pozwalają one na zmniejszenie rozmiarów aktywnych elementów układów, gęściejsze ich upakowanie oraz wzrost szybkości i sprawności ich działania [440]. Dotychczas z użyciem CNT udało się skonstruować między innymi tranzystor polowy (FET, ang. field-effect transistor), w którym półprzewodząca nanorurka, stanowiąca medium dla przepływających elektronów, umieszczona została pomiędzy dwoma elektrodami metalicznymi, a jej przewodnictwo regulowane było przez napięcie przykładane do innej elektrody w jej pobliżu [432, 439, 441]. Tego typu tranzystory odznaczają się najwyższą czułością i niską emisją ciepła [440]. Kolejnym krokiem była konstrukcja całych obwodów logicznych z CNT [426], a następnie chipów (RYS. 113) [443] i procesorów. Opracowano nawet projekt komputera, w którym wszystkie elementy (tranzystory, złącza, układy logiczne, rejestry, diody i prostowniki) miałyby być zbudowane z nanorurek [440]. Ponadto, dzięki występowaniu mikro- i mezoporów nanorurki mogą być stosowane jako



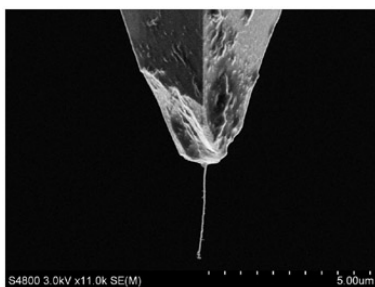
RYS. 113 – Fragment chipu skonstruowanego przy użyciu CNT [443].

superkondensatory, a ich właściwości pojemnościowe mogą być wzmocnione przez wypełnienie odpowiednimi polimerami [426, 439].

Nie można pominąć tu również zastosowań CNT wykorzystujących ich emisję połową elektronów. Właściwość ta wykorzystywana jest przy konstrukcji nanorurkowych płaskich wyświetlaczy, które dzięki lepszym parametrom stanowią alternatywę dla wyświetlaczy ciekłokrystalicznych [426]. Ostatnio przy ich użyciu udało się stworzyć również panel dotykowy (RYS. 114) [444]. Emisja połowa CNT może zostać wykorzystana też w próżniowych mikrofalowych wzmacniaczach mocy, działach elektronowych w litografii, holografii, czy urządzeniach oświetlających [426]. Stworzony został prototyp sześciokolorowej lampy z nanorurkowego kompozytu, która świeciła dłużej i jaśniej niż standardowe żarówki i była bardziej wydajna od nich [426, 440, 441].



RYS. 114 – Panel dotykowy z CNT skonstruowany przez firmę Chi Mei Optoelectronics [444].



RYS. 115 – Nanorurka węglowa przeczepiona do konwencjonalnego ostrza AFM [445].

Nanorurki węglowe są też idealnym materiałem do konstrukcji ostrzy (tipów) w mikroskopie sił atomowych (AFM) (RYS. 115) [445]. Wykonane z nich ostrza pozwalają na wykonanie pomiarów z dużą rozdzielczością oraz odwzorowanie nagłych nierówności i zagłębień w analizowanych próbkach. Są one smukłe i elastyczne, co chroni je przed uszkodzeniem w czasie kontaktu z podłożem. Istnieje także możliwość chemicznej modyfikacji nanorurki znajdującej się na ostrzu, a wówczas mikroskop sił atomowych zmienia się w mikroskop sił chemicznych (CFM, ang. Chemical Force Microscopy), co umożliwia badanie oddziaływań pomiędzy

różnymi molekułami [426, 432, 439, 440]. Innym elektromechanicznym zastosowaniem CNT jest konstrukcja nanopęsety, umożliwiająca manipulowanie materią na poziomie nanoskali. Przyłożenie napięcia do dwóch MWCNT, przymocowanych do końcówki szklanej mikropipety, powoduje zbliżenie ramion aż do ich zetknięcia [426].

Jak już zostało wcześniej wspomniane nanorurki w połączeniu z różnymi polimerami mogą tworzyć nanokompozyty, odznaczające się szczególnymi właściwościami – wysoką wytrzymałością, odpornością na odkształcenia, ciągliwością, niską masą [426, 432, 441]. Zostały one wykorzystane między innymi przy konstrukcji samochodów, samolotów i statków kosmicznych oraz produkcji różnych przyrządów sportowych (raket tenisowych, kijów baseballowych i hokejowych) (RYS. 116) [446], które dzięki wzmocnieniu kompozytami z CNT stały się bardziej odporne na pęknięcia i deformacje [432, 441]. Fakt, że dzięki nanorurkom przewodnictwo elektryczne kompozytów polimerowych znacznie wzrasta, został wykorzystany między innymi w motoryzacji w procesie lakierowania kompresowego samochodów. Zamiana zwykłego materiału syntetycznego, który coraz częściej zastępuje stal w karoseriach samochodowych, umożliwi lakierowanie nadwozia tymi samymi środkami, zawierającymi na powierzchni ładunek elektrostatyczny [426, 432].



RYS. 116 – Przyrządy sportowe wykonane z kompozytów CNT [446].

Zostały one wykorzystane między innymi przy konstrukcji samochodów, samolotów i statków kosmicznych oraz produkcji różnych przyrządów sportowych (raket tenisowych, kijów baseballowych i hokejowych) (RYS. 116) [446], które dzięki wzmocnieniu kompozytami z CNT stały się bardziej odporne na pęknięcia i deformacje [432, 441]. Fakt, że dzięki nanorurkom przewodnictwo elektryczne kompozytów polimerowych znacznie wzrasta, został wykorzystany między innymi w motoryzacji w procesie lakierowania kompresowego samochodów. Zamiana zwykłego materiału syntetycznego, który coraz częściej zastępuje stal w karoseriach samochodowych, umożliwi lakierowanie nadwozia tymi samymi środkami, zawierającymi na powierzchni ładunek elektrostatyczny [426, 432].

Ze względu na pusty rdzeń i możliwość wnikania do niego różnych substancji CNT wykorzystywane są także jako nanokontenery. Największym zainteresowaniem cieszy się pomysł na utworzenie nanorurkowego zbiornika do magazynowania wodoru, potencjalnego paliwa przyszłości. Gaz ten ulega kondensacji wewnątrz rurki, dzięki czemu CNT są w stanie zaabsorbować większą ilość wodoru niż inne przebadane dotychczas materiały (np. węgiel aktywowany, fulereny)

[426, 432, 439]. Nanorurki absorbują również inne gazy (w tym toksyczne, np. amoniak, dwutlenek azotu, tlenek węgla), dzięki czemu znajdują zastosowanie w ochronie środowiska. Pochłonięcie tych gazów wywołuje bardzo istotne zmiany w ich oporności, co stanowi sygnał analityczny detektora [426, 430, 439, 447]. CNT wykazują także właściwości sorpcyjne wobec substancji takich jak dioksyny, bisfenol A, chlorobenzen, czy 4-tert-oktylofenol, co sprawia, że są one dobrym narzędziem do oznaczania ich ilości śladowych [447]. Wiązki nanorurek bardzo efektywnie absorbują również metale alkaliczne. Stwarza to możliwość zastosowania ich do konstrukcji wydajnych baterii o długim czasie działania [426, 439, 440]. Wnętrze CNT może zostać wypełnione również roztworami leków. Wówczas takie nanorurki stanowią swoisty dozownik substancji farmakologicznych, umożliwiając jednocześnie dostarczenie ich do ściśle określonego miejsca (komórki, membrany) [432, 441, 448]. Nanorurki mogłyby posłużyć także do transportu cząstek elementarnych (neutronów, promieniowania γ , strumienia jonów), co w radioterapii umożliwiałyby selektywne działanie na komórki rakowe bez uszkodzania sąsiednich tkanek [426].

5.4.1. Nanorurki węglowe w czujnikach elektrochemicznych

Elektryczne i elektrokatalityczne właściwości nanorurek węglowych sprawiają, że coraz częściej są one stosowane w różnego typu elektrochemicznych oznaczeniach analitycznych. Okazały się one niemal idealnym materiałem do utworzenia nowego rodzaju elektrod, jak i do modyfikowania elektrod konwencjonalnych. Możliwość przyłączania do nanorurek różnych grup funkcyjnych i ich zdolność do oddziaływań niekowalencyjnych z innymi substancjami daje dodatkowo możliwość stosunkowo prostego unieruchamiania na ich powierzchni różnych biomolekuł, co jest prostą drogą do konstrukcji bioczujników [430, 431].

Nanorurki węglowe mogą być wykorzystywane jako materiał elektrodowy przy konstrukcji elektrod pastowych i kompozytowych [430, 438, 447]. Wówczas sporządza się ich mieszaninę z inną substancją, pełniącą funkcję spoiwa, np. olejem mineralnym, żywicą epoksydową czy teflonem. Tego typu elektrody były wykorzystywane między innymi przy oznaczeniach katecholu, dopaminy, kwasu moczowego, kwasu askorbinowego, nadtlenu wodoru, NADH [430, 431, 449, 450]. Ciekawym pomysłem jest również przygotowywanie tuszów zawierających CNT i nadruk przy ich użyciu elektrod sitodrukowanych [431, 438, 451]. Trwają też prace nad konstrukcją nanoelektrody tworzonej przez pojedynczą nanorurkę jednościenną [430, 447].

CNT mogą być używane także do modyfikowania konwencjonalnych elektrod [430, 447]. W zależności od metody ich naniesienia, zorganizowane są na powierzchni przetwornika w sposób przypadkowy lub uporządkowany. Najprostszym sposobem modyfikacji, skutkującym nieukierunkowanym ułożeniem nanorurek, jest nakroplenie ich zawiesiny w kwasie siarkowym, azotowym, etanolu, bromoformie, DMF, polilizynie, czy Nafionie na elektrodę (głównie z węgla szklatego, a także grafitową, sitodrukowaną) i odparowanie rozpuszczalnika w temperaturze pokojowej lub przez ogrzewanie. Możliwa jest także inkorporacja CNT w żelu lub warstwie elektropolimeru. Takie elektrody stosowane są do oznaczania np. NADH, glukozy, noradrenaliny, homocysteiny [430, 431, 438, 447, 452-454]. Aby nanorurki na powierzchni elektrody miały postać uporządkowanej struktury, w której poszczególne rurki nie są poskręcane i leżą obok siebie, należy zastosować nieco bardziej skomplikowane procedury. Część z nich opiera się na syntezie CVD nanorurek bezpośrednio na elektrodach (np. wolframowej, platynowej, złotej). Inne wykorzystują proces samoorganizacji na elektrodzie złotej skróconych SWCNT, modyfikowanych na końcach grupami tiolowymi. Skutkuje to wertykalnym ułożeniem nanorurek w stosunku do powierzchni przetwornika [430, 431, 438, 455].

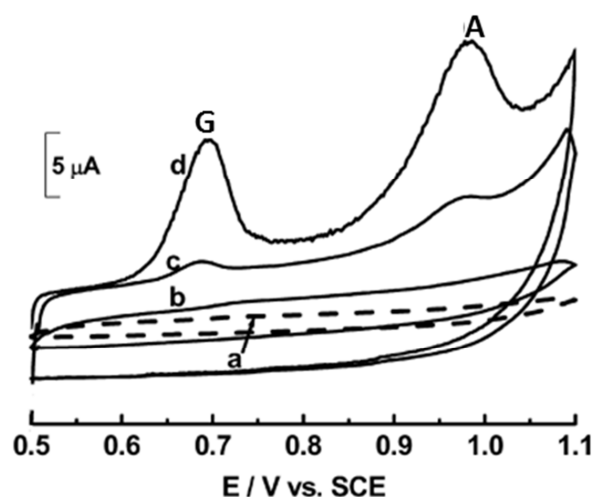
Każdy typ elektrod skonstruowanych przy pomocy nanorurek charakteryzuje się znaczącą poprawą parametrów pomiarowych w porównaniu z elektrodami konwencjonalnymi. Elektrody te odznaczają się doskonałą odtwarzalnością, stabilnością w różnych rozpuszczalnikach oraz wysoką

czułością oznaczeń. Naukowcy zgodnie donoszą o wielokrotnym (nawet 35-krotnym) podwyższeniu prądowych sygnałów redoks oznaczanych substancji oraz obniżeniu wartości nadpotencjału, dzięki czemu ich reakcje elektrotlenienia i elektroredukcji następują przy niższych potencjałach [430, 431, 447]. Branych jest pod uwagę kilka przyczyn takiego działania. Wzmocnienie sygnałów może wynikać ze wzmożonej adsorpcji analitu ze względu na dużą powierzchnię właściwą nanorurek lub też bardziej wydajnego transferu elektronów, będącego rezultatem obecności defektów w strukturze rurek oraz licznych grup funkcyjnych zawierających tlen na ich zakończeniach [430, 431, 438, 447]. Z pewnością nie bez znaczenia są także elektrokatalityczne właściwości CNT, które zależą również od metody ich syntezy [430].

Elektrody utworzone z CNT i modyfikowane nimi stanowią bardzo dobre podłoże do konstrukcji różnego typu bioczuJNIKÓW. Kluczową kwestią jest tutaj sposób immobilizacji danych biomolekuł (enzymów, DNA, przeciwciał) na powierzchni przetwornika. Nanorurki węglowe są zdolne do realizowania oddziaływań niekowalencyjnych, takich jak wiązanie wodorowe, oddziaływanie spiętrzające elektrony π , siły van der Waalsa, oddziaływanie elektrostatyczne i hydrofobowe, oraz tworzenia połączeń kowalencyjnych, jeśli zawierają w swej strukturze grupy $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ lub $-\text{C}=\text{O}$ [447].

W przypadku bioczuJNIKÓW enzymatycznych szczególną uwagę zwraca się na zapewnienie możliwie szybkiego przepływu elektronów pomiędzy miejscem aktywnym danego enzymu a przetwornikiem [430]. Niekowalencyjnie enzymy unieruchamia się na elektrodach nanorurkowych w warstwach polimerów (np. oksydazę glukozową, dehydrogenazę fruktozową, oksydazę mleczanową), na drodze procesów zol-żel (np. oksydazę L-aminokwasów, ureazę, acetylocholinoesterazę), przez fizyczną adsorpcję (hydrolazę organofosforową). Wśród metod kowalencyjnych wymienić można: przyłączenie do warstwy CNT-chitosan przy użyciu dialdehydu glutarowego (np. dehydrogenaza glukozowa, oksydaza cholesterolowa), czy też związanie ze zmodyfikowanymi zakończeniami nanorurek (np. peroksydaza chrzanowa) [421, 430, 431, 447].

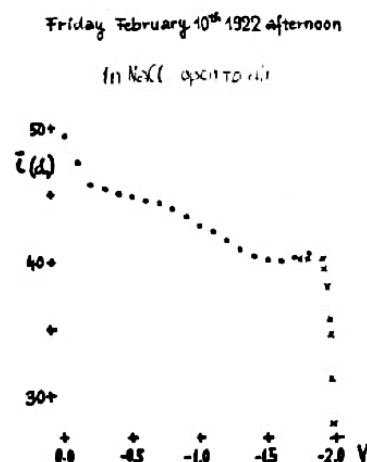
W bioczuJNIKACH DNA nanorurki węglowe pełnią podwójną rolę – stanowią dobre podłoże do unieruchomienia kwasu nukleinowego oraz powodują wzmocnienie rejestrowanych sygnałów [375, 430, 448, 456, 457]. Podobnie jak enzymy, DNA także może zostać przyłączone do CNT na drodze procesów fizycznych (np. adsorpcji hydrofobowej, elektropolimeryzacji pirołu) [431, 448, 458-460] lub kowalencyjnie – najpopularniejszą metodą jest tworzenie wiązań pomiędzy grupami karboksylowymi lub aminowymi modyfikującymi zakończenia łańcuchów DNA a odpowiednio grupami aminowymi lub karboksylowymi modyfikującymi CNT [337, 375, 430, 431, 436, 438, 448]. Przy użyciu tego typu bioczuJNIKÓW monitoruje się sygnały elektrotlenienia zasad azotowych (RYS. 117) [456] oraz sygnały redoks ligandów oddziałujących z DNA, które zostają znacząco wzmocnione dzięki elektrokatalitycznym właściwościom CNT. Stosowane są one zarówno do badania hybrydyzacji DNA [337, 431, 448, 455, 461], jak i oddziaływań z różnymi substancjami [459, 460]. Mogą także stanowić nośnik dla nowatorskich znaczników (nanocząstki metali, enzymy), pozwalających na bardziej czułą detekcję DNA [448, 462].



RYS. 117 – Woltamperogramy CV 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA calf thymus zarejestrowane w buforze fosforanowym o pH 7,0 na: a – czystej elektrodzie GCE, b – elektrodzie GCE modyfikowanej DHP, c – elektrodzie GCE modyfikowanej zawiesiną MWCNT-DHP, d – elektrodzie GCE modyfikowanej zawiesiną MWCNT-DHP po 2-minutowej akumulacji [456].

6. Woltamperometria

Woltamperometria to grupa metod elektroanalitycznych, polegających na elektrolizie warstwy dyfuzyjnej i rejestrowaniu zależności prądu, przepływającego przez daną elektrodę, od przyłożonego do niej napięcia [463, 464]. Pierwsza krzywa tego typu zarejestrowana została w roku 1922 przez Jaroslava Heyrovskyego, lecz dokonał on tego z wykorzystaniem kapiącej elektrody rtęciowej, wykonując tym samym pomiar polarograficzny (RYS. 118) [465]. Dopiero blisko 20 lat później wprowadzono termin woltamperometria, określający analogiczne pomiary, ale wykonywane przy użyciu elektrod stacjonarnych. W kolejnych latach nastąpił prężny rozwój nowej techniki pomiarowej, do którego przyczynili się między innymi J.E.B. Randles, który rozwinął woltamperometrię z liniową zmianą potencjału oraz niezależnie od A. Sevcika opracował równanie pozwalające określić natężenie rejestrowanego sygnału prądowego, G.C. Barker, który z I.L. Jenkinsem wprowadził polarografię zmiennoprądową prostokątną, a z A.W. Gardnerem technikę pulsową, czy też W. Kemula i Z. Kublik, którzy opracowali anodową woltamperometrię inwersyjną [466]. Z biegiem lat woltamperometria zaczęła cieszyć się ogromną popularnością i stała się użytecznym narzędziem badawczym w rozmaitych oznaczeniach analitycznych, np. detekcji śladowych ilości metali ciężkich w środowisku, oznaczania substancji farmakologicznych, detekcji przy miareczkowaniach. Stosowana jest ona także do badania różnych procesów chemicznych, takich jak utlenianie i redukcja, przeniesienie elektronów, adsorpcja na powierzchni [463].



RYS. 118 – Krzywa zależności prądu od przyłożonego napięcia wykreślona przez Heyrovskyego [465].

6.1. Podstawy pomiarów woltamperometrycznych

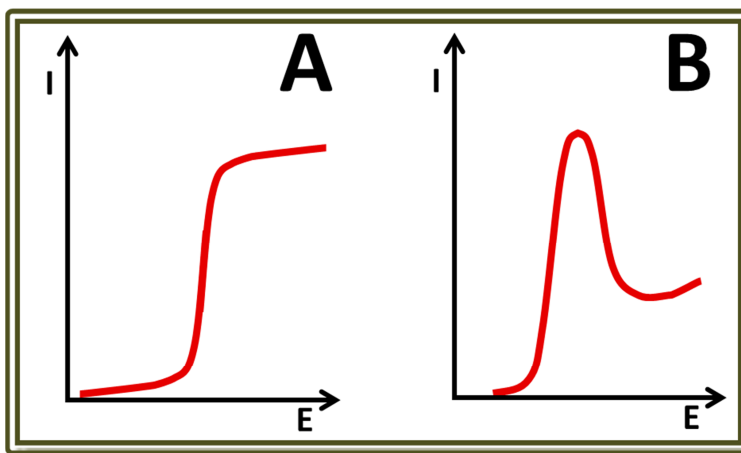
Woltamperometria to metoda, w której podstawą pomiaru jest badanie zależności pomiędzy natężeniem prądu płynącego przez stacjonarną elektrodę wskaźnikową a wymuszoną, określoną zmianą potencjału. Napięcie przykładane do elektrod zmienia się podczas pomiaru według ściśle zaprogramowanej zależności potencjału od czasu, która może przyjmować różnorodne formy (np. liniową, pulsową, trójkątną) zależnie od zastosowanej techniki woltamperometrycznej [463, 464].

Substancja oznaczana za pomocą metod woltamperometrycznych nazywana jest depolaryzatorem i musi wykazywać ona elektroaktywność, bowiem ściśle określone wartości przykładanego napięcia wywołują jej reakcje redoks na elektrodzie pracującej – utlenianie, gdy potencjał rośnie lub redukcję, gdy potencjał maleje. Następstwem tych procesów jest zmiana natężenia przepływającego prądu, zwanego prądem faradajowskim. Natężenie tego prądu jest proporcjonalne do szybkości reakcji elektrodowej. Jest to jednak proces dość złożony, o którym decyduje zarówno szybkość transportu reagentów do elektrody, jak i szybkość przeniesienia elektronów. Gdy przeniesienie elektronów zachodzi zdecydowanie szybciej niż transport reagentów, proces determinowany jest wyłącznie szybkością transportu. Depolaryzator może być transportowany do elektrody na drodze migracji pod wpływem pola elektrycznego, konwekcji wywołanej mieszaniem lub drganiem roztworu oraz dyfuzji spowodowanej różnicą jego stężenia na powierzchni elektrody i w głębi roztworu. Transport migracyjny niweluje się przez zastosowanie nadmiaru elektrolitu podstawowego, który przyjmuje na siebie wpływ wytworzonego pola elektrycznego, a konwekcyjny przez niestosowanie mieszania roztworu

podczas pomiaru. Monitorowanie natężenia prądu powinno odbywać się w warunkach całkowitej polaryzacji stężeniowej, a wówczas szybkość reakcji elektrodowej limitowana jest wyłącznie dyfuzją analitu do powierzchni elektrody [463, 464]. Wówczas rejestrowany prąd jest proporcjonalny do różnicy stężeń substancji na powierzchni elektrody i w głębi roztworu. Maksymalny gradient osiągany jest w momencie, gdy powierzchniowe stężenie depolaryzatora, ulegającego reakcji elektrodowej, staje się równe zero, a szybkość transportu i natężenie prądu są wówczas proporcjonalne do stężenia składnika w głębi roztworu. Natężenie prądu kontrolowane szybkością dyfuzji (tzw. graniczne natężenie prądu faradajowskiego) odpowiada wartości prądu pikowego i jest podstawą oznaczenia ilościowego [94].

Podczas pomiaru oprócz prądu faradajowskiego w obwodzie przepływają także tak zwane prądy szcztkowe [463]. W ich skład wchodzi prąd dyfuzyjny, którego źródłem są reakcje redoks zanieczyszczeń znajdujących się w roztworze oraz niefaradajowski prąd pojemnościowy, związany z ładowaniem i rozładowywaniem podwójnej warstwy elektrycznej, która tworzy się na granicy faz elektroda-roztwór [464]. Prąd ten stanowi addytywne tło dla prądów faradajowskich, a jego natężenie nie zależy praktycznie od stężenia depolaryzatora, lecz od szybkości, z jaką zmienia się napięcie polaryzujące, ładunek elektryczny zgromadzony w podwójnej warstwie elektrycznej, powierzchnia elektrody [464]. Stosunek natężenia prądu faradajowskiego do prądu pojemnościowego traktuje się jako stosunek sygnału do szumu i wyznacza on limit detekcji stosowanej techniki pomiarowej. Można go jednak wyeliminować na przykład przez stosowanie techniki pomiarowej z próbkowanym pomiarem prądu. Przy opracowywaniu metod analitycznych zwraca się szczególną uwagę na ograniczenie prądu pojemnościowego.

Wynik pomiaru woltamperometrycznego prezentowany jest w postaci krzywej, zwanej woltamperogramem. Obrazuje ona zależność prądu płynącego przez elektrodę pracującą i przyłożonego do niej napięcia, które mierzone są w równych odstępach czasu [463]. W zależności od programu i szybkości zmiany potencjału woltamperogramy mogą przyjmować postać fali (RYS. 119A) lub pików (RYS. 119B). Fala jest charakterystyczna dla pomiarów z powolną, liniową zmianą potencjału i szybkim transportem masy w roztworze, prowadzącym do utworzenia stanu stacjonarnego na elektrodzie pracującej. Jeżeli natomiast liniowe zmiany potencjału następują szybko a roztwór nie jest mieszany lub ma miejsce pulsowa zmiana potencjału z dwukrotnym próbkowaniem prądu, krzywa woltamperometryczna przybiera postać pikową [94, 463]. Krzywa taka dostarcza informacji o składzie jakościowym i ilościowym analizowanej próbki [464].



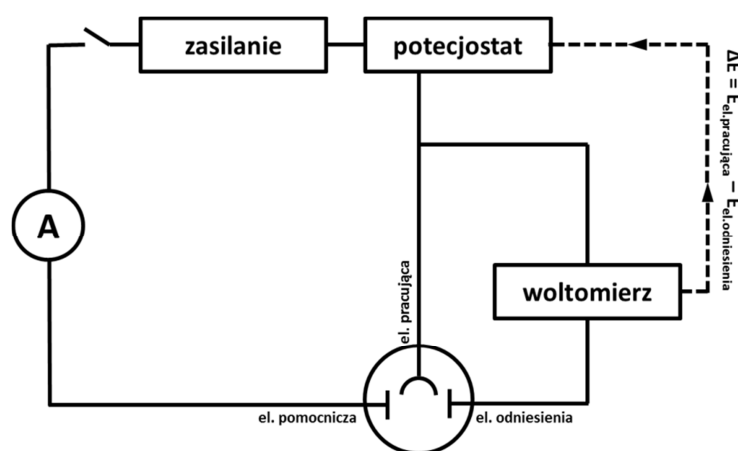
RYS. 119 – Formy woltamperometrycznej odpowiedzi prądowej: A – fala, B – pik. Opracowano na podstawie [94].

Informację jakościową o analitach uzyskuje się na podstawie położenia pików lub fali na osi potencjałów. Potencjał półfali lub pików jest charakterystyczny dla danego depolaryzatora. Na wartość potencjału nie ma wpływu stężenie depolaryzatora, lecz zależy ona od wielu innych czynników takich, jak: zastosowane elektrody, rodzaj i stężenie elektrolitu podstawowego, obecność substancji kompleksujących, pH, temperatura, parametry pomiarowe (szybkość polaryzacji czy amplituda pulsu) [94, 464]. Często zdarza się, że ten sam depolaryzator daje sygnał przy innych wartościach potencjału w różnych warunkach. Czasem również kilka substancji może wykazywać zbliżone potencjały charakterystyczne, co zdecydowanie utrudnia ich identyfikację [94].

Analiza ilościowa woltamperogramu opiera się na określeniu wielkości prądu przepływającego podczas procesu elektrodowego, któremu ulega depolaryzator. Informacji o tym dostarcza wysokość piku lub fali. Czasem w celu prawidłowej interpretacji wyników należy usunąć szumy, odjąć tło czy zrobić korektę linii podstawowej. Operacje te umożliwia nowoczesna aparatura komputerowa [94].

6.2. Układ pomiarowy w analizie woltamperometrycznej

Pomiary woltamperometryczne wymagają zastosowania aparatury, umożliwiającej jednocześnie doprowadzenie do układu zaprogramowanych zmian napięcia polaryzującego, pomiar płynącego prądu i rejestrowanie krzywej woltamperometrycznej. Z tego też względu musi składać się ona z kilku podstawowych elementów odpowiednio ze sobą połączonych (RYS. 120) [165]. Wśród nich znajdują się: generator napięcia, którego zadaniem jest przykładanie do elektrod

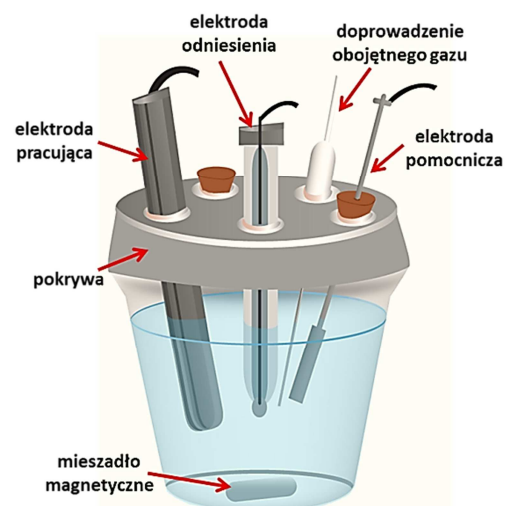


RYS. 120 – Schemat analizatora woltamperometrycznego. Opracowano na podstawie [165].

połączona jest przeważnie z układem komputerowym wyposażonym w odpowiednie oprogramowanie, pozwalające na graficzne przedstawienie zarejestrowanych wyników i ich dalsze opracowanie.

Centralnym elementem całego układu do pomiarów woltamperometrycznych jest system trzech elektrod umieszczonych w naczyniu elektrolitycznym, stanowiącym pojemnik wykonany ze szkła, kwarcu lub plastiku (RYS. 121). Oprócz elektrod naczynko może być wyposażone też w pokrywę, służącą do zamocowania elektrod i chroniącą przed zanieczyszczeniem badanego roztworu, mieszadło magnetyczne, intensyfikujące transport depolaryzatora do elektrody i zapewniające szybkie wymieszanie roztworu po dodatku danej substancji, oraz doprowadzenie gazu obojętnego, umożliwiającego odtlenienie roztworu. Jednak nie zawsze obecność wszystkich tych elementów jest niezbędna do wykonania pomiarów [94].

Układ elektrod stosowany w pomiarach woltamperometrycznych składa się z: elektrody pracującej (ang. working electrode), elektrody odniesienia (ang. reference electrode) i elektrody pomocniczej (ang. counter electrode), przy czym każda z nich spełnia ściśle określoną rolę.



RYS. 121 – Schemat naczynka elektrolitycznego. Opracowano na podstawie [94].

Na elektrodzie pracującej (zwanej też wskaźnikową) przebiegają procesy redoks analizowanej substancji. Jest ona polaryzowalna, co oznacza, iż przyjmuje potencjał zewnętrznego źródła napięcia, gdy depolaryzator nie jest obecny w roztworze. Zwykle elektrody pracujące mają stosunkowo małą powierzchnię (rzędu kilku milimetrów kwadratowych, a czasem nawet mikrometrów kwadratowych), co pozwala zwiększyć skuteczność ich polaryzacji oraz zminimalizować ilość zużywanego analitu, dzięki czemu nawet pomiary wielokrotne nie powodują istotnej zmiany jego stężenia [94, 463]. Elektrody stosowane jako pracujące mogą przyjmować różne kształty i być zrobione z różnych materiałów [463]. Wśród nich znaleźć można: różnego typu elektrody rtęciowe (wisząca kroplowa, statyczna kroplowa, błonkowa), elektrody metaliczne (platynowa, złota, srebrna, irydowa) oraz różnorodne elektrody węglowe (z węgla szklanego, pastowa, grafitowa) [94, 464]. Przy wyborze elektrody pracującej do danego eksperymentu należy przede wszystkim mieć na uwadze jej potencjałowy zakres pracy oraz właściwości i stopień rozwinięcia powierzchni [464, 467].

Pomiar nie mógłby zostać przeprowadzony bez elektrody odniesienia, względem której mierzony jest potencjał elektrody pracującej. Powinna być ona niepodatna na polaryzowanie, a więc gwarantować niezmiennosc potencjału w wyniku przepływu przez nią prądu. Obecnie konstruowane są jednak takie układy, w których przez elektrodę odniesienia prąd nie przepływa wcale [463]. Ponadto potencjał tej elektrody nie może ulegać zmianom w zależności od składu elektrolitu podstawowego. Do najczęściej stosowanych elektrod odniesienia należą chlorosrebrowa, kalomelowa oraz siarczanowa.

W układach trójelektrodowych nie może zabraknąć również elektrody pomocniczej. Pomiedzy nią a elektrodą pracującą następuje przepływ prądu [463]. Najczęściej funkcję tą pełni platynowy drucik lub blaszka, ale czasem stosowane są również elektrody z innych materiałów, np. grafitowe.

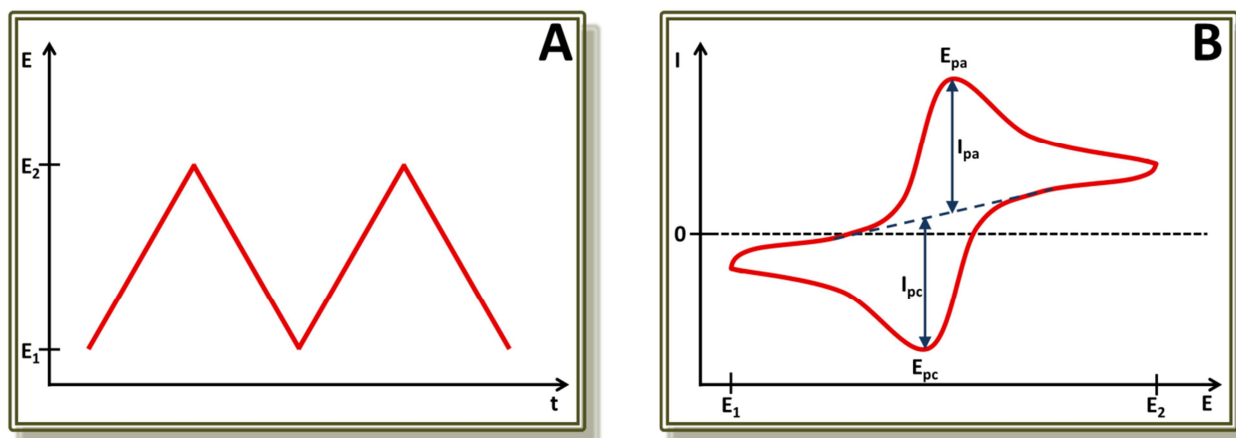
Aby elektrody mogły prawidłowo pełnić swoje funkcje, muszą zostać zanurzone w roztworze, wypełniającym naczynko elektrolityczne, który zawiera oznaczaną substancję oraz elektrolit podstawowy. Do zadań elektrolitu należy zapewnienie odpowiedniego przewodnictwa elektrycznego w roztworze, a ponadto obniżenie jego oporności i ograniczenie transportu migracyjnego. By migracja analitu została efektywnie wyeliminowana stężenie elektrolitu powinno być 100–1000-krotnie wyższe niż stężenie substancji oznaczanej. Jako elektrolity podstawowe stosowane są substancje dobrze rozpuszczalne, które wykazują wysoki stopień dysocjacji i nie ulegają reakcjom redoks w szerokim zakresie potencjałów, a w szczególności przy wartościach potencjałów obejmujących dany przedział pomiarowy [463]. W tej roli świetnie sprawdzają się roztwory soli (KCl, LiCl, KNO₃), kwasów (HCl), zasad (NaOH), bufony (amonowy, fosforanowy, octanowy). Odpowiedni dobór elektrolitu podstawowego umożliwia odseparowanie potencjałów pików poszczególnych składników, gdy są one obecne jednocześnie w badanej próbce [94, 165].

6.3. Metody woltamperometryczne

Długo lata udoskonalania metod woltamperometrycznych zaowocowały opracowaniem rozmaitych technik pomiarowych, w których dąży się do poprawy stosunku sygnału do szumu, a tym samym do zwiększenia czułości i obniżenia granicy oznaczalności. Obecnie w analizie stosowanych jest wiele rozmaitych technik woltamperometrycznych, które różnią się między sobą programem zmian napięcia oraz sposobem pomiaru prądu [94]. W mojej pracy doświadczalnej stosowałam dwie z nich i pokrótce zostaną one przedstawione poniżej.

6.3.1. Woltamperometria cykliczna

Metodą bardzo często i szeroko stosowaną do badania procesów elektrodowych jest woltamperometria cykliczna (CV, ang. Cyclic Voltammetry). Charakteryzuje się ona liniową zmianą przyłożonego napięcia w określonym przedziale potencjałów, która ma kształt fali trójkątnej [467] (RYS. 122A). Elektroda pracująca podczas przebiegu pierwotnego polaryzowana jest w kierunku katodowym lub anodowym, po czym kierunek polaryzacji jest zawracany w przebiegu powrotnym. Towarzyszy temu rejestrowanie cyklicznych krzywych woltamperometrycznych, zwanych skanami (RYS. 122B). Cały eksperyment może obejmować tylko jeden cykl potencjałowy lub wiele powtarzanych cykli [463, 464].



RYS. 122 – Woltamperometria cykliczna: A – schemat zmiany napięcia polaryzującego w czasie, B – woltamperogram cykliczny (E_1 – potencjał początkowy, E_2 – potencjał zawracania, E_{pa} – potencjał piku anodowego, E_{pc} – potencjał piku katodowego, I_{pa} – prąd piku anodowego, I_{pc} – prąd piku katodowego). Opracowano na podstawie [463].

Potencjał elektrody pracującej zmienia się z ustaloną prędkością między dwiema wartościami (między E_1 a E_2 na RYS. 122A). Napięcie początkowe o wartości E_1 wzrasta w czasie aż do wartości E_2 . Wówczas ma miejsce pierwotna część cyklu i w przypadku polaryzacji w kierunku anodowym następuje utlenienie oznaczanej substancji. Następnie po osiągnięciu wartości E_2 potencjał zostaje zawrócony i w ramach przebiegu powrotnego ponownie osiąga wartość E_1 [463, 467]. W rozpatrywanym przypadku przebieg ten odbywa się w kierunku ujemnych potencjałów, a więc zachodzi proces redukcji depolaryzatora, który uprzednio został utleniony. Eksperyment może być prowadzony także przy odwrotnej kolejności kierunków polaryzacji elektrody. Wówczas wpierw redukuje się substancję przy malejącym potencjale, a następnie utlenia się ją, przykładając potencjał wzrastający liniowo [464]. Czas potrzebny na zrealizowanie jednego cyklu pomiarowego zwykle mieści się w przedziale od 1 ms do 100 s, w zależności od wybranego zakresu potencjałowego i prędkości polaryzacji. Jednak cały eksperyment może obejmować wiele następujących po sobie cykli, co dodatkowo wydłuża czas jego realizacji [463].

Jak zostało przedstawione powyżej, cyklicznym zmianom napięcia polaryzującego towarzyszą procesy elektrodowe, podczas których depolaryzator ulega kolejno utlenieniu i redukcji (lub na odwrót). Objawia się to wzrostem natężenia prądu przepływającego przez układ (odpowiednio I_{pa} i I_{pc}), co na woltamperogramie widoczne jest w postaci pików, pojawiających się przy charakterystycznych dla danej substancji potencjałach (odpowiednio E_{pa} i E_{pc}) [463] (RYS. 122B). W woltamperometrii cyklicznej wielkość prądu danego piku zależy od: stężenia analitu, ilości elektronów biorących udział w procesie elektrodowym, prędkości polaryzacji, powierzchni elektrody, współczynnika dyfuzji formy utlenionej/zredukowanej depolaryzatora oraz temperatury. Wysokość piku określana jest równaniem Randlesa-Sevčika (1) [165]:

$$I_p = kn^{3/2} AD^{1/2} v^{1/2} c \qquad k = 0,452 \frac{F^{3/2}}{R^{1/2} T^{1/2}} \quad (1)$$

w którym:

I_p – natężenie prądu pikowego

n – ilość elektronów biorących udział w procesie elektrodowym

A – powierzchnia elektrody [cm^2]

D – współczynnik dyfuzji depolaryzatora [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]

v – szybkość polaryzacji [V/s]

c – stężenie depolaryzatora [mol/cm^3]

k – stała Randlesa-Sevčika

F – stała Faradaya ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

R – stała gazowa ($8,31441 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T – temperatura bezwzględna [K]

Na wygląd rejestrowanej krzywej woltamperometrycznej olbrzymi wpływ ma odwracalność rejestrowanych procesów redoks. Układy w pełni odwracalne znajdują się w równowadze, dla której stosunek stężeń formy utlenionej i zredukowanej analitu określony jest równaniem Nernsta. O odwracalności procesów elektrodowych można wnioskować na podstawie różnicy potencjałów (ΔE_{pot}) pomiędzy pikiem utlenienia (E_{pa}) i redukcji (E_{pc}) depolaryzatora. Dla procesów odwracalnych monitorowanych w temperaturze 25°C wartość ta powinna być równa $0,059/n$ zgodnie z poniższym równaniem (2) [463, 464]:

$$\Delta E_{\text{pot}} = |E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}}| = \frac{0,059}{n} \quad (2)$$

w którym:

ΔE_{pot} – różnica potencjałów pików anodowego i katodowego

E_{pa} – potencjał pików anodowego

E_{pc} – potencjał pików katodowego

Wartość liczbowa w liczniku zmienia się w zależności od temperatury i przykładowo może wynosić 0,058 lub 0,060 odpowiednio dla temperatury 20°C i 30°C . Ponadto, procesy odwracalne charakteryzują się w przybliżeniu jednakowymi wartościami prądów utlenienia i redukcji niezależnie od szybkości polaryzacji elektrody [463].

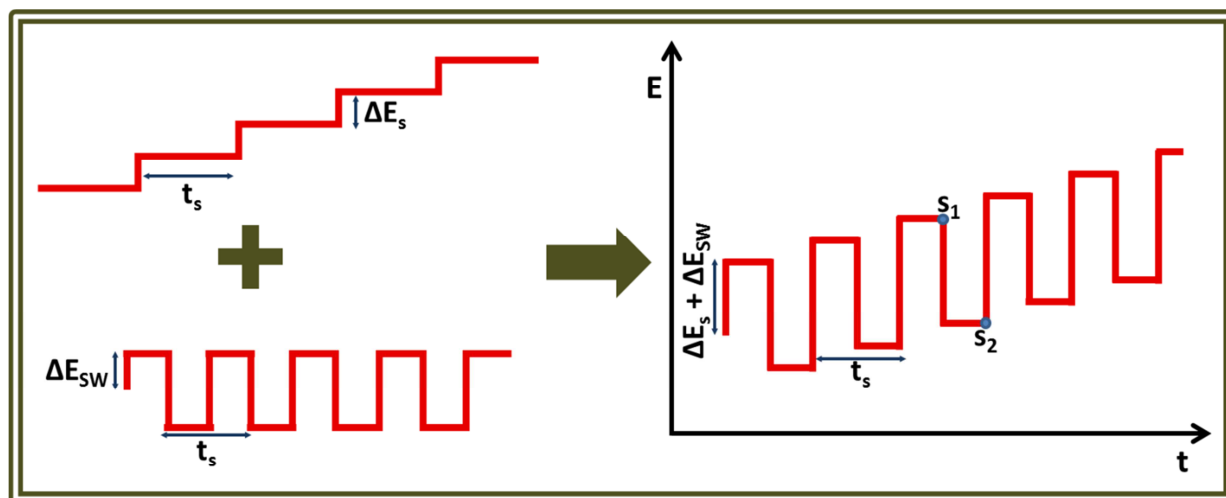
Woltamperogramy cykliczne nie mają jednak tak symetrycznych i charakterystycznych kształtów, jeśli procesy elektrodowe nie są w pełni odwracalne. Wówczas różnica potencjałów pików jest większa niż wynikałoby to z powyższego równania (2), a prądy pików utlenienia i redukcji nie są jednakowe [463]. Dzieje się tak przykładowo, gdy ma miejsce dodatkowa reakcja chemiczna lub gdy oznaczana substancja ulega adsorpcji na powierzchni elektrody.

Woltamperometria cykliczna znalazła szerokie zastosowanie w analizie chemicznej, lecz rzadko przy jej użyciu wykonywane są oznaczenia ilościowe. Stosuje się ją do analizy mechanizmu reakcji redoks związków organicznych i nieorganicznych, badania kinetyki reakcji elektrodowych, wykrywania ich produktów pośrednich oraz badania reakcji następczych zachodzących po pierwotnym procesie elektrodowym [463, 464].

6.3.2. Woltamperometria fali prostokątnej

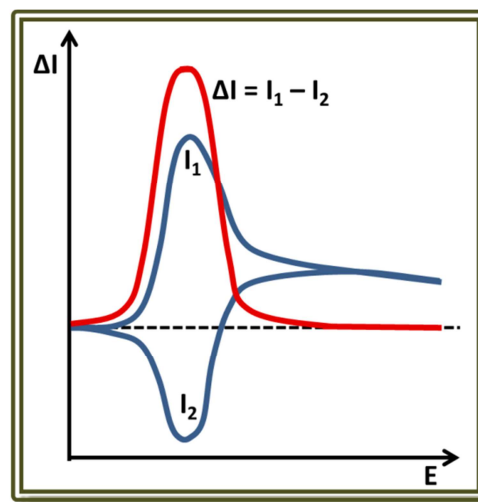
Oprócz metod, w których przykładane napięcie zmienia się w sposób liniowy, stosowane są również takie, w których napięcie polaryzujące zmienia się pulsowo w sposób schodkowy. Prąd mierzony jest wówczas jedynie przez krótki czas trwania pulsu, co zapewnia stałość potencjału elektrody podczas próbkowania prądu. Przyłożenie takiego impulsu powoduje gwałtowny wzrost prądu, w tym także pojemnościowego, gdyż musi nastąpić odpowiednia zmiana ładunku na

powierzchni elektrody. Jednak w normalnych warunkach pomiarowych prąd ładowania podwójnej warstwy elektrycznej maleje dużo szybciej niż faradajowski i już po kilku milisekundach staje się pomijalny. Jest to idealny moment na analityczne próbkowanie prądu przepływającego przez elektrodę, gdyż wówczas stosunek prądu faradajowskiego do prądu pojemnościowego staje się bardzo korzystny. Stosowanie technik pulsowych pozwala ograniczyć wpływ szumu na wynik pomiaru [94, 463, 464, 467].



RYS. 123 – Schemat zmiany napięcia polaryzującego w voltamperometrii fali prostokątnej (ΔE_s – wysokość schodka potencjału, ΔE_{SW} – połowa wysokości impulsu fali prostokątnej, t_s – czas trwania fali schodkowej, s_1, s_2 – miejsca próbkowania natężenia prądu. Opracowano na podstawie [463].

Jedną z voltamperometrycznych metod pulsowych jest voltamperometria fali prostokątnej (SWV, ang. Square-Wave Voltammetry). Program zmiany przyłożonego napięcia w czasie realizowany jest tutaj przez nałożenie impulsów fali prostokątnej na falę schodkową [463, 464, 467, 468] (RYS. 123). Dany okres pulsowania musi pokrywać się z długością schodka potencjału (t_s) i zwykle wynosi 5 ms. Ponadto wysokość schodków (ΔE_s) najczęściej równa jest 10 mV, a wysokość impulsów fali prostokątnej ($\Delta E_p = 2 \cdot \Delta E_{SW}$) 50 mV [463, 469]. W technice tej prąd próbkowany jest dwukrotnie (RYS. 123) – tuż przed rozpoczęciem cyklu powrotnego (s_1 na odcinku po wzroście potencjału) oraz tuż przed rozpoczęciem kolejnego cyklu pierwotnego (s_2 na odcinku po spadku potencjału). Jeśli reakcja elektrodowa depolaryzatora jest odwracalna, to wysokość impulsu jest wystarczająca, by produkt reakcji redoks powstający w pierwotnym cyklu uległ reakcji odwrotnej w cyklu powrotnym [463, 467, 469]. Może być to źródłem wzmocnienia rejestrowanego sygnału, który stanowi różnica pomiędzy próbkowanymi prądami. Wynik pomiaru przedstawiony jest w postaci krzywej zależności różnicy prądów i przyłożonego napięcia [463, 467, 469] (RYS. 124).



RYS. 124 – Sygnał prądowy rejestrowany podczas pomiaru z zastosowaniem voltamperometrii fali prostokątnej (krzywa czerwona) oraz prądy rejestrowane podczas pierwotnego i powrotnego przebiegu potencjału (krzywe niebieskie). Opracowano na podstawie [463].

Obecność danego elektroaktywnego analitu, ujawnia się na voltamperogramie w postaci piku (RYS. 124), którego wysokość jest proporcjonalna do stężenia depolaryzatora oraz amplitudy impulsu [464]. Zależność tę obrazuje równanie Barker'a (3) [470]:

$$I_p = k \cdot n^2 \cdot \Delta E_p^{1/2} \cdot c \quad (3)$$

w którym:

k – stała charakteryzująca układ elektrod

Woltamperometria fali prostokątnej odznacza się wieloma zaletami w porównaniu z innymi technikami. Jest to metoda pozwalająca na wykonywanie szybkich i precyzyjnych pomiarów [463]. Sygnały uzyskiwane za pomocą SWV są wyższe niż dla innych technik pulsowych, gdyż zostają one wzmacnione przez częściową odwrotną reakcję redoks depolaryzatora. Ponadto SWV charakteryzuje się dużą powtarzalnością i czułością, gdyż dla układów odwracalnych mierzony prąd to aż w 93% prąd graniczny kontrolowany szybkością dyfuzji [469]. Ze względu na te walory znalazła ona zastosowanie w badaniu kinetyki rozmaitych reakcji chemicznych, oznaczaniu substancji w ilościach śladowych oraz w układach przepływowych.

7. Spektrofotometria UV-Vis

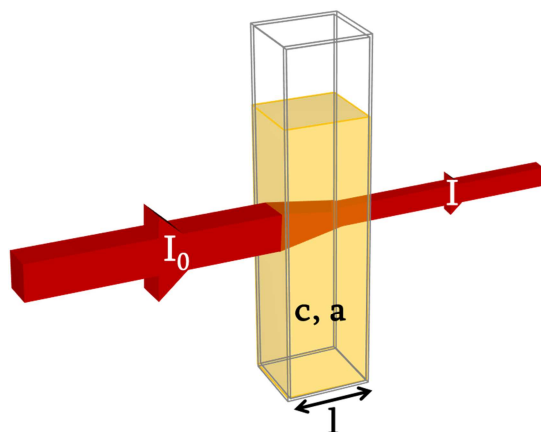
Spektrofotometria należy do grupy technik spektroskopowych i jest jedną z najstarszych metod instrumentalnych w analizie chemicznej. Wywodzi się ona z kolorymetrii, w której podstawą oznaczenia danej substancji jest wizualne porównanie intensywności barwy badanego roztworu z barwą roztworu wzorcowego. Z czasem detekcja wizualna została zastąpiona pomiarem fotometrycznym, co w rezultacie doprowadziło do skonstruowania specjalnych urządzeń – spektrofotometrów, umożliwiających rozszerzenie użytecznego zakresu promieniowania poza obszar widzialny [165, 471].

7.1. Podstawy pomiarów spektrofotometrycznych

Podstawą pomiaru w spektrofotometrii jest monitorowanie absorpcji przez daną substancję monochromatycznego promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu (UV), czyli o długości fali 200–380 nm, i widzialnego (Vis), czyli o długości fali 380–780 nm. Promieniowanie to powoduje zmiany stanów energetycznych elektronów zaangażowanych w tworzenie wiązań pojedynczych, wiązań wielokrotnych oraz wolnych par elektronowych. Pochłonięcie promieniowania skutkuje przejściami elektronów z orbitali wiążących σ , π i niewiązących n na wyższe energetycznie orbitale antywiązące σ^* i π^* (Tabela 6) [471]. O tym, czy dane przejście będzie miało miejsce decyduje jego prawdopodobieństwo, odległość poziomów energetycznych w danej cząsteczce i energia promieniowania. Największą intensywnością odznaczają się przejścia typu $\pi \rightarrow \pi^*$, a ich prawdopodobieństwo wzrasta wraz ze zwiększeniem liczby wiązań sprzężonych w cząsteczce [471].

TABELA 6 – Rodzaje przejść elektronowych wywoływanych przez promieniowanie o różnej długości [471].

Rodzaj promieniowania	Długość promieniowania [nm]	Przejście elektronowe
daleki ultrafiolet	122-200	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
bliski nadfiolet światło widzialne	300-780	$n \rightarrow \sigma^*$
		$\pi \rightarrow \pi^*$
		$n \rightarrow \pi^*$



RYS. 125 – Schemat częściowej absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu I_0 przez próbkę o stężeniu c i współczynniku absorpcji a , znajdującą się w kuwecie o grubości l , I oznacza część promieniowania, które nie zostało pochłonięte.

Promieniowanie elektromagnetyczne padające (I_0) na dany ośrodek zawierający analit, absorbujący promieniowanie o określonej długości fali, powoduje wzbudzenie jego cząsteczek i zostaje pochłonięte, ale tylko częściowo. Pozostała jego część (I) przechodzi zaś przez roztwór (RYS. 125) i nazywana jest transmitancją [463], wyrażoną poniższym równaniem (4):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

w którym:

T – transmitancja

I – promieniowanie przechodzące przez próbkę

I_0 – promieniowanie padające na próbkę

Ilość zaabsorbowanego promieniowania ściśle zależy od stężenia roztworu i grubości warstwy absorbującej. Zależność ta została ujęta w prawie absorpcji Lamberta-Beera, zgodnie z którym absorpcja promieniowania zależy od całkowitej liczby absorbujących cząsteczek, a tym samym od iloczynu stężenia roztworu (c) i grubości warstwy (l) [165, 463]. Gdy stężenie lub grubość warstwy wzrasta, na drodze promieniowania obecna jest większa liczba absorbujących cząsteczek, więc ilość pochłoniętego promieniowania również wrasta [471]. Zdolność danej substancji do pochłaniania promieniowania nazywana jest absorbancją, a jej wartość określa poniższe równanie (5):

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l \quad (5)$$

w którym:

A – absorbancja

ε – molowy współczynnik absorpcji

c – stężenie analitu

l – grubość warstwy absorbującej

Jeśli analizowana próbka zawiera kilka nieoddziałujących ze sobą substancji, pochłaniających promieniowanie, to całkowita absorbancja roztworu równa jest sumie absorbancji poszczególnych jego składników [165, 463, 471]. Zależność tą określa prawo addytywności absorpcji wyrażone poniższym wzorem (6):

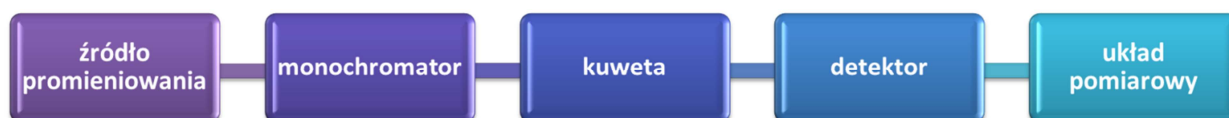
$$A_{\text{cata}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = (\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \varepsilon_3 c_3 + \dots + \varepsilon_n c_n) \cdot l \quad (6)$$

Niestety analizowane układy nie zawsze spełniają prawa absorpcji. Odchylenia od nich wywoływane są zarówno ograniczeniami stosowalności praw, jak i przyczynami chemicznymi, związanymi z właściwościami próbki, oraz fizycznymi, związanymi z aparaturą pomiarową. Prawa absorpcji spełniają jedynie roztwory rozcieńczone, których stężenie nie przekracza 10^{-2} M [165]. Przy stężeniach wyższych odległość pomiędzy absorbującymi molekułami lub jonami staje się na tyle mała, że sąsiadujące indywidua wpływają wzajemnie na rozkład ładunku w ich obrębie. Podobny efekt może występować przy zbyt wysokim stężeniu rozpuszczalnika [463]. Zaburzenia chemiczne mogą wynikać z reakcji, jakim podlega analit w roztworze (hydrolizy, solwatacji, asocjacji, polimeryzacji, kompleksowania), lub zmętnienia próbki. Zaburzenia fizyczne z kolei mają swe źródło w braku pełnej monochromatyczności promieniowania, nieodpowiedniej szerokości wiązki spektralnej, czy też rozproszeniu promieniowania [471].

Obrazem absorpcji promieniowania przez daną substancję jest rejestrowane widmo, mające postać zależności absorbancji lub transmitancji od długości fali, częstości lub liczby falowej pochłanianego promieniowania. Liczba widniejących na nim pasm absorpcji, ich intensywność, położenie i kształt są podstawą analizy jakościowej i ilościowej. Informacje jakościowe uzyskuje się, analizując długość fali, przy której pojawia się dane pasmo, gdyż każda substancja pochłania promieniowanie o charakterystycznej dla siebie częstości [463]. Intensywność pasma z kolei dostarcza informacji na temat stężenia oznaczanego analitu. Na wygląd widma ogromny wpływ ma rozpuszczalnik, pH oraz obecność w cząsteczce ugrupowań, zwanych chromoforami i auksochromami. Pierwsze z nich zawierają w swej strukturze łatwo wzbudalne elektrony π , tworzące układy sprzężonych wiązań wielokrotnych, zaś drugie wolne pary elektronowe. Czynniki wywołujące zmiany w wyglądzie widma mogą powodować przesunięcie pasm absorpcji wzdłuż osi długości fali oraz zmianę ich intensywności. Jeżeli pasmo przesuwają się w stronę wyższych długości fali, to mamy do czynienia z efektem batochromowym, jeśli zaś w kierunku fali o mniejszej długości, z efektem hipsochromowym. Natomiast zmniejszenie lub zwiększenie intensywności pasma nosi nazwę efektu odpowiednio hipochromowego lub hiperchromowego [471].

7.2. Układ pomiarowy w analizie spektrofotometrycznej

Pomiar spektrofotometryczny polega na umieszczeniu roztworu zawierającego badaną próbkę w specjalnym naczynku i skierowaniu na nie monochromatycznego promieniowania o określonej długości fali. Mimo iż wydaje się być to bardzo prostym zadaniem, wymaga ono zastosowania specjalnej aparatury – spektrofotometru, złożonego z kilku połączonych ze sobą elementów (RYS. 126): źródła promieniowania, monochromatora, kuwety z próbką, detektora i układu pomiarowego [165, 471].



RYS. 126 – Schemat blokowy spektrofotometru. Opracowano na podstawie [471].

Jako że spektrofotometria obejmuje dwa zakresy promieniowania, zwykle spektrofotometr wyposażony jest w dwa niezależne jego źródła. Emiterami promieniowania UV są zwykle lampy wolframowe i halogenowe, zaś światła widzialnego deuterowe i ksenonowe. Również lasery znajdują tutaj zastosowanie, emitując wiązki promieniowania o wysokim stopniu monochromatyczności i dużej intensywności [471].

Zadaniem monochromatora jest rozszczepienie emitowanego przez źródło promieniowania i wyodrębnienie z widma ciągłego wąskiego pasma o określonej długości fali. Składa się on z układu szczelin, kolimatora, elementu rozszczepiającego oraz układu soczewek lub zwierciadeł. Jako element rozszczepiający stosowane są filtry, pryzmaty i siatki dyfrakcyjne, które charakteryzują się najlepszymi parametrami [471].

Kuwety pomiarowe to niewielkie naczynka, w których umieszcza się badane próbki i poddaje działaniu promieniowania. Ich szerokość wynosi od 5 μm do 10 cm, lecz najpopularniejsze są kuwety centymetrowe. Materiał, z którego są one wykonane, powinien być odporny na działanie odczynników chemicznych i zapewniać maksymalne przenikanie promieniowania. Ponadto, determinuje on zakres stosowanego promieniowania. W zakresie Vis używa się kuwet kwarcowych, szklanych i plastikowych, zaś w UV jedynie kwarcowych [165].

Po przejściu przez kuwetę niezaabsorbowane promieniowanie trafia do detektora, którego zadaniem jest przetworzenie energii padającej wiązki na energię elektryczną. W tym celu stosowane są: fotokomórki, działające w oparciu o zewnętrzne zjawisko fotoelektryczne, fotopowielacze, wykorzystujące zjawisko wtórnej emisji elektronów, oraz fotooporniki i fotodiody, działające w oparciu o wewnętrzne zjawisko fotoelektryczne i specyficzne właściwości materiałów półprzewodnikowych [165, 471].

Ostatnim elementem spektrofotometru jest rejestrator, który zapisuje uzyskane wyniki i w odpowiedni sposób je przetwarza. W obecnie stosowanych urządzeniach funkcje te spełnia zwykle komputer wyposażony w odpowiednie oprogramowanie, dające szerokie możliwości opracowania wyników, między innymi automatycznego odjęcia od widma analitu widma zarejestrowanego dla ślepej próby. Jest to niezmiernie ważne, gdyż podczas wykonywania pomiaru część promieniowania ulega odbiciu od ścianek naczynka i rozproszeniu. Wpływ tych zjawisk na dokładność pomiaru niweluje się poprzez wykonanie pomiaru porównawczego przy użyciu roztworu odniesienia umieszczonego w dokładnie takiej samej kuwecie jak próbka. Widmo zarejestrowane dla ślepej próby jest następnie odejmowane automatycznie od widma badanej substancji i na koniec jako wynik pomiaru otrzymujemy już widmo niezaburzone [463, 471].

7.3. Zastosowanie spektrofotometrii

Analiza spektrofotometryczna odznacza się wieloma zaletami. Jest ona uniwersalna, prosta do przeprowadzenia i łatwo dostępna, choć wysokiej klasy aparatura jest dość kosztowna. Charakteryzuje się stosunkowo dużą czułością (granice wykrywalności rzędu 10^{-4} – 10^{-5} M) [463] i precyzją, która zawiera się w przedziale 0,5–2% [471]. Kuwety stosowane w pomiarach są małe, więc do wykonania eksperymentu potrzebne są niewielkie ilości próbek.

Stosując metody spektrofotometryczne, trudno jest dokonać jednoznacznej identyfikacji badanej substancji, ponieważ widma absorpcyjne wielu substancji są do siebie podobne. Spektrofotometria jest jednak świetnym narzędziem do wstępnej i uzupełniającej analizy jakościowej, szczególnie przy zastosowaniu łącznie z innymi metodami analitycznymi. Doskonale sprawdza się również w analizie ilościowej. Przy jej użyciu można na przykład oznaczać kationy metali związane w barwnych kompleksach, aniony nieorganiczne oraz liczne substancje organiczne. Ponadto, spektrofotometria doskonale sprawdza się w badaniu czystości różnych substancji, na przykład rozpuszczalników, wyznaczeniu stałych dysocjacji kwasów i zasad, czy stałych trwałości kompleksów. Obecnie jest ona najczęściej stosowaną metodą detekcji w analizie przepływowej [165, 471].

Metody spektrofotometryczne z biegiem czasu i rozwojem technologicznym uległy wielu udoskonaleniom, polegającym na wprowadzeniu nowoczesnych przyrządów optycznych i pomiarowych sprzężonych z mikroprocesorami. Dało to możliwość łatwej automatyzacji pomiarów i ułatwiło opracowywanie uzyskanych wyników [471].

II. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

*„Zadanie nauki polega na tym, by zastąpić
wizję faktami, a wrażenia dowodami.”*

John Ruskin

1. Cel pracy

Nadrzędnym celem mojej pracy badawczej było zastosowanie trójelektrodowych układów sitodrukowanych do konstrukcji elektrochemicznych biocujników DNA oraz wykorzystanie ich do badania oddziaływań wybranych związków chemicznych z różnymi rodzajami DNA. Osiągnięcie celu wymagało wielu kroków pośrednich, które obejmowały optymalizację procedury czyszczenia elektrody pracującej oraz próby zwiększenia jej przewodnictwa i powierzchni aktywnej na drodze modyfikacji mechanicznych oraz przy użyciu nanorurek węglowych. Efektywność poszczególnych procedur modyfikacyjnych była weryfikowana poprzez badanie adsorpcji kwasu deoksyrybonukleinowego na powierzchni elektrody oraz monitorowanie procesów utleniania zasad nukleinowych w nim zawartych. Tak przygotowane i zoptymalizowane biocujniki DNA zostały przeze mnie wykorzystane do badania oddziaływań różnych rodzajów kwasu deoksyrybonukleinowego z błękitem metylenowym oraz z daunorubicyną, doksorubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi, wykazującymi podobnie jak związki macierzyste właściwości antynowotworowe.

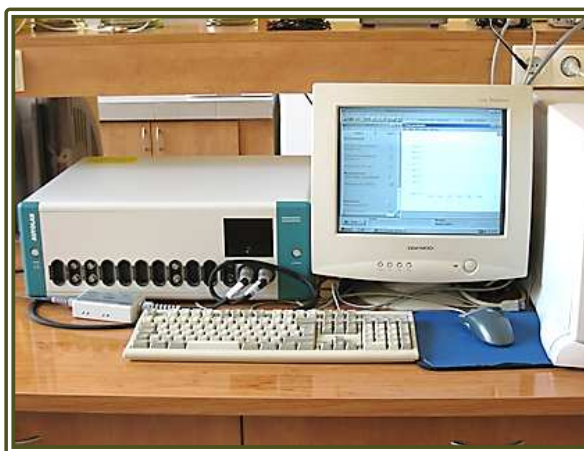
2. Aparatura pomiarowa

Podczas wykonywanych przeze mnie pomiarów wykorzystywane były różnorodne zestawy aparaturowe, co było uzależnione od zastosowanej metody pomiarowej.

2.1. Aparatura stosowana w pomiarach woltamperometrycznych

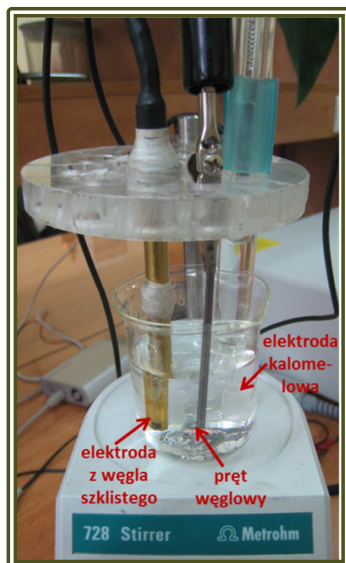
Wszystkie pomiary woltamperometryczne wykonane zostały przy użyciu następujących urządzeń:

- potencjostatu/galwanostatu AUTOLAB PGSTAT 12 Differential Electrometer/Amplifier (Eco Chemie B.V., Holandia) (RYS. 127)
- mieszkadła magnetycznego (Metrohm, Szwajcaria)
- komputera stacjonarnego PC z oprogramowaniem GPES 4.5



RYS. 127 – AUTOLAB sprzężony z komputerem.

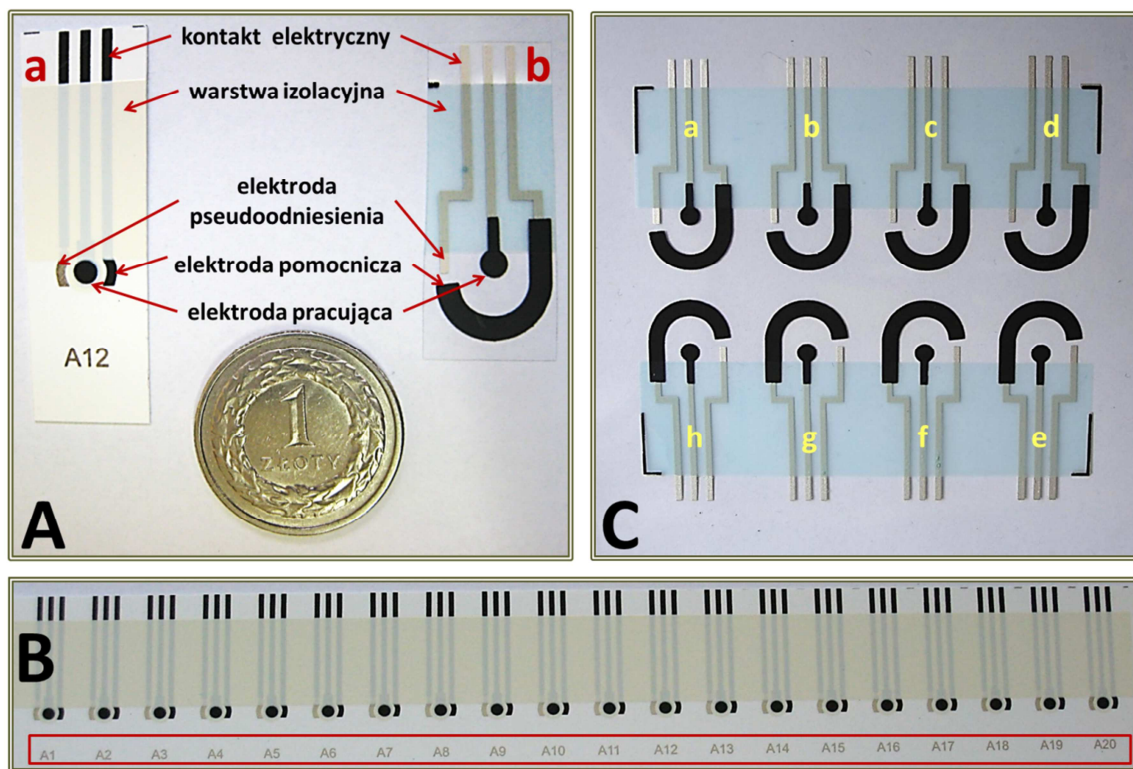
Stosowany w pomiarach układ elektrodowy był dobierany w zależności od rodzaju prowadzonego eksperymentu. Zdecydowana większość analiz prowadzona była z zastosowaniem trójelektrodowych układów sitodrukowanych, a jedynie niektóre z nich z użyciem klasycznego układu trójelektrodowego, składającego się z: elektrody pracującej z węgla szklanego (GCE) o średnicy 5 mm, nasyconej kalomelowej elektrody (NEK) odniesienia oraz elektrody pomocniczej w formie węglowego pręta (RYS. 128). W pomiarach stosowane były dwa rodzaje elektrod



RYS. 128 – Klasyczny trójelektrodowy układ pomiarowy.

sitodrukowanych: komercyjnie dostępne układy produkcji włoskiej (SPE-IT) (Palmsens, Holandia) (RYS. 129A-a) oraz układy wytwarzane przez dr Elżbietę Zwierkowską i dr Selima Achmatowicza w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie (SPE-PL) (RYS. 129A-b). W obu przypadkach czujnik miał postać zintegrowanego układu sitodrukowanego, składającego się z naniesionych na nieprzewodzące podłoże polimerowe: grafitowej elektrody pracującej o średnicy 3 mm, srebrowej elektrody pseudoodniesienia, grafitowej elektrody pomocniczej, kontaktu elektrycznego oraz warstwy izolacyjnej. Włoskie elektrody nadrukowywane są na podłużnych arkuszach plastiku o wymiarach około 28 x 4,5 cm w postaci zestawów złożonych z 20 sztuk ponumerowanych układów trójelektrodowych (RYS. 129B), polskie zaś na kwadratowej folii o wymiarach 10 x 10 cm w postaci zestawów złożonych z 8 sztuk układów, oznaczanych podczas wykonywania pomiarów symbolami literowymi zawsze w jeden ustalony sposób (RYS. 129C). Konstrukcja polskich oraz

włoskich układów trójelektrodowych jest bardzo podobna. Różnicę stanowi rozmieszczenie trzech elektrod. W układach włoskich elektrody położone są blisko siebie, a w polskich odległości te są nieco większe. Ponadto, w tych pierwszych elektrody pomocnicza charakteryzuje się niewielkimi rozmiarami, podczas gdy w tych drugich ma postać dość dużej „fajki”, otaczającej elektrodę pracującą. Ze względu na różnicę w wielkości stosunek powierzchni elektrody pomocniczej do pracującej jest zdecydowanie większy w przypadku elektrod polskich.



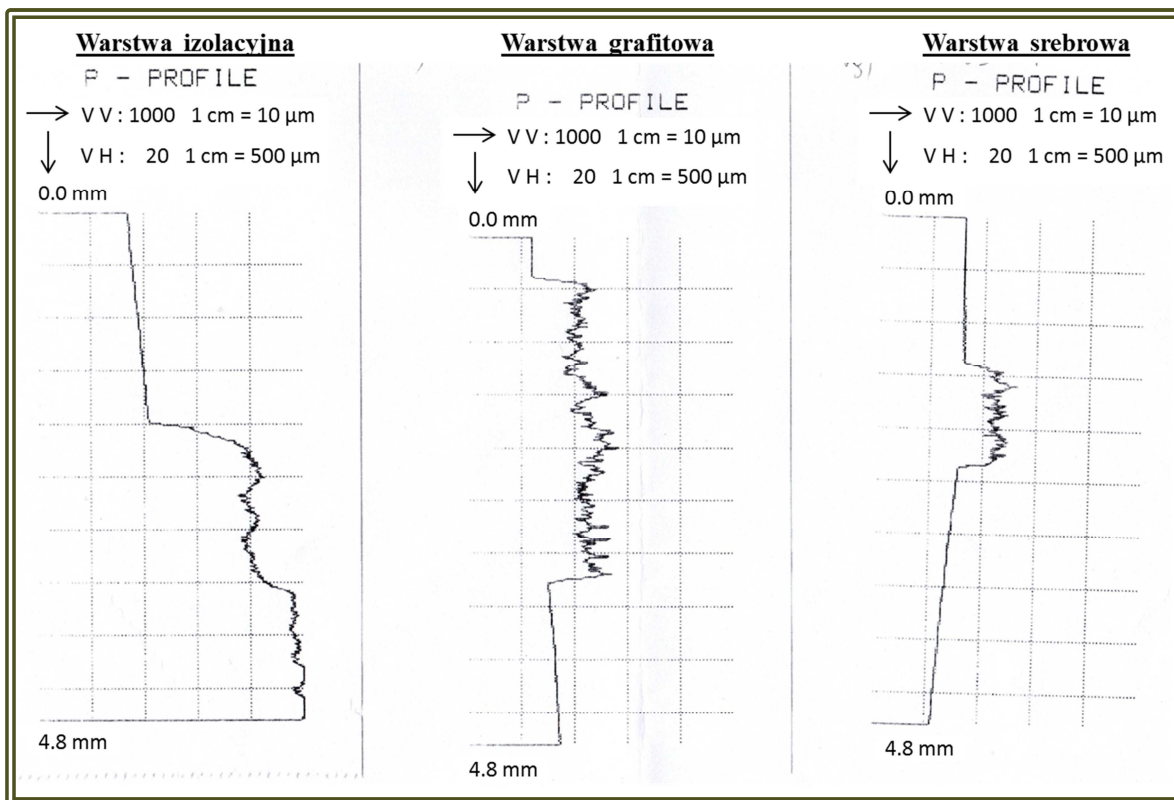
RYS. 129 – Sitodrukowane układy pomiarowe: A – pojedyncze układy trójelektrodowe: a – włoskie firmy PalmSens, b – polskie wytwarzane w ITME w Warszawie, B – zestaw nadrukowanych włoskich układów sitodrukowanych, C – zestaw nadrukowanych polskich układów sitodrukowanych.

Z punktu widzenia założeń mojej pracy doświadczalnej, najistotniejszy układ pomiarowy stanowiły polskie elektrody sitodrukowane, dlatego też poddane zostaną one szerszej charakterystyce. Ich nadruk wykonywany był przy użyciu sitodrukarki półautomatycznej (Presco, Polska). Jako podłoże drukowe stosowana była folia poliestrowa Autostat CT-5 o grubości 125 μm (Autotype, Wielka Brytania). Do nadruku elektrody pseudoodniesienia i kontaktów elektrycznych stosowana była pasta srebrna Electrodag 725A-6S-54 (Acheson, Holandia), elektrody pracującej i pomocniczej pasta grafitowa Electrodag PF-407A (Acheson, Holandia), a nieprzewodzącej warstwy izolacyjnej pasta UV DP 5018 (Du Pont, Szwajcaria). Pasty srebrna i grafitowa po nadruku wymagały 15-minutowego suszenia w temperaturze 120°C, zaś izolacyjna 30-sekundowego naświetlania promieniowaniem ultrafioletowym. Szczegółowy opis procesu sitodruku tych układów elektrod oraz zdjęcia obrazujące go zostały przedstawione w jednym z rozdziałów części literaturowej niniejszej pracy (I.4.3.1). Po wydrukowaniu danej partii układów elektrodowych, jeden z nich poddawany był analizie za pomocą profilografometru Hommel Tester T 2000 (Hommelwerke, Niemcy), co pozwalało określić grubość, strukturę oraz chropowatość



RYS. 130 – Analiza elektrod sitodrukowanych za pomocą profilografometru. Zdjęcie wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie dzięki uprzejmości dr Elżbiety Zwierkowskiej i dr Selima Achmatowicza.

nadrukowanych warstw (RYS. 130). Pomiar odbywał się za pomocą obciążonej igły szafirowej wędrującej po badanej powierzchni, a odpowiedni czujnik rejestrował zmiany jej położenia. Grubość warstw osadzanych tuszów wynosiła około $15\ \mu\text{m}$. Graficzne przedstawienie profili poszczególnych warstw przedstawione zostało w postaci diagramów (RYS. 131).



RYS. 131 – Profile struktury i grubości poszczególnych warstw tworzących sitodrukowane układy elektrod.

2.2. Aparatura stosowana w pomiarach spektrofotometrycznych

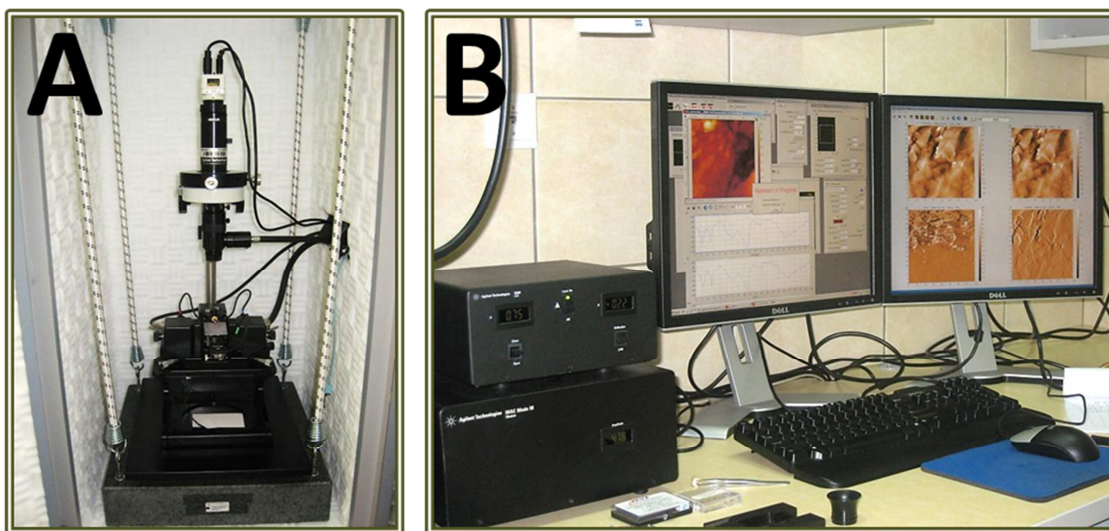
Woltamperometryczne badania oddziaływań DNA z błękitem metylenowym oraz daunorubicyną, dokсорubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi zostały poszerzone o analizę spektrofotometryczną UV-Vis. Pomiaru te zostały wykonane przy użyciu spektrofotometru UV/Vis Lambda 25 (Perkin Elmer, USA), sprzężonego z komputerem stacjonarnym PC wyposażonym w oprogramowanie UV WinLab 2.85 (RYS. 132). Badane próbki umieszczane były w polisterynowych kuwetach spektrofotometrycznych o szerokości 10 mm i pojemności 4 ml (Sarstedt, Niemcy).



RYS. 132 – Spektrofotometr UV-Vis Perkin Elmer sprzężony z komputerem.

2.3. Aparatura stosowana w obrazowaniu AFM

Do obrazowania powierzchni elektrod sitodrukowanych na różnych etapach eksperymentów stosowano mikroskopię sił atomowych (AFM). Pomiary te wykonane zostały przez dr Joannę Grzyb i dr Annę Wałkiewicz w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Do ich realizacji użyty został mikroskop 5500 AFM (RYS. 133A) wyposażony w moduł MAC Mode III oraz moduł Video Microscope (Agilent Technologies, USA). Cały układ pomiarowy sprzężony był z komputerem stacjonarnym PC, zawierającym oprogramowanie PicoView 1.8.2 (RYS. 133B). Pomiary zrealizowane zostały w bezkontaktowym trybie Acoustic AC Mode, który odznacza się mniejszą czułością, ale nie jest destrukcyjny dla badanej próbki. Przy obrazowaniu danej powierzchni czujnik mikroskopu stanowiła końcówka krzemowa MAC Levers Type II (Agilent Technologies, USA).



RYS. 133 – Mikroskop AFM (A) sprzężony z komputerem (B). Zdjęcia wykonane w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie dzięki uprzejmości dr Joanny Grzyb.

3. Odczynniki chemiczne i roztwory podstawowe

Do realizacji mojej pracy badawczej wykorzystane zostały następujące odczynniki chemiczne:

- trójwodny octan sodu cz.d.a. – **CH₃COONa · 3H₂O** (POCh, Gliwice)
- lodowaty kwas octowy cz.d.a. – **CH₃COOH** (POCh, Gliwice)
- chlorek potasu cz.d.a. – **KCl** (POCh, Gliwice)
- sześciowodny chlorek magnezu cz.d.a. – **MgCl₂ · 6H₂O** (POCh, Gliwice)
- wodorotlenek sodu cz.d.a. – **NaOH** (POCh S.A., Gliwice)
- nadtlenek wodoru, roztwór 30% cz.d.a. – **H₂O₂** (POCh S.A., Gliwice)
- wielościennie nanorurki węglowe o średnicy zewnętrznej 40-60 nm, średnicy wewnętrznej 5-10 nm i długości 0,5-500 μm – **MWCNT** (Sigma-Aldrich, Poznań)
- N,N-dimetyloformamid – **DMF** (POCh S.A., Gliwice)
- cellosolv butylowy – inaczej 2-butoksyetanol (Zakład Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie)
- toluen (Zakład Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie)
- octan n-butylu (Zakład Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie)
- octan karbitolu butylowego (Zakład Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie)
- DNA chromosomalny ze spermy łosia – **dsDNA-ss** (Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Wydział Towaroznawstwa Akademii Ekonomicznej w Poznaniu)
- DNA chromosomalny z grasicy cielęcej, *calf thymus* dsDNA typ XV liofilizowany – **dsDNA-ct** (Sigma-Aldrich, Poznań)
- DNA oligonukleotydowe o sekwencji 5'GCGCGCGC3' – **d(GC)₄** (Genomed, Warszawa)
- DNA oligonukleotydowe o sekwencji 5'ATATATAT3' – **d(AT)₄** (Genomed, Warszawa)
- DNA oligonukleotydowe o sekwencji 5'AAAAAAAA3' – **(A)₈** (Genomed, Warszawa)
- plazmidy pUC19 w formie superhelikalnej – **scpUC19** i liniowej – **linpUC19** (Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego)
- plazmidy **pGEX-4T-2** w formie superhelikalnej – **scpGEX-4T-2** i liniowej – **linpGEX-4T-2** (Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego)
- błękit metylenowy – **MB** (Sigma-Aldrich, Poznań)
- ryboflawina – **RF** (Sigma-Aldrich, Poznań)
- chlorowoderek daunorubicyny – **DAU** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)
- chlorowoderek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-daunorubicyny – **DAU-Fmor** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)
- chlorowoderek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-daunorubicyny – **DAU-Fhex** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)
- chlorowoderek doksorubicyny – **DOX** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)
- chlorowoderek 3'-deamino-3'-(N,N-3''-oksa-1'',5''-pentametylenoformamidyno)-doksorubicyny – **DOX-Fmor** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)

- chlorowodorek 3'-deamino-3'-(N,N-1''-6''-heksametylenoformamidyno)-doksorubicyny – **DOX-Fhex** (Zakład Antybiotyków Modyfikowanych I Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie)
- woda podwójnie destylowana i dejonizowana Mili Q plus, $R \geq 18M\Omega$ (Milipore, Austria)

Odczynniki te zostały wykorzystane do sporządzenia szeregu roztworów podstawowych, które następnie posłużyły do przygotowania roztworów i próbek na poszczególnych etapach eksperymentów. Roztwory te to:

- **bufor octanowy** o stężeniu 0,25 M i pH 4,75, zawierający 10 mM KCl (**AcB-K**) – w celu jego przygotowania należy umieścić w kolbie miarowej o pojemności 1 litra 17,00 g trójwodnego octanu sodu, 0,74 g chlorku potasu i 7,08 ml lodowatego kwasu octowego, a następnie uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną, podwójnie destylowaną, gotowy roztwór przechowywano w temperaturze ok. 4°C;
- **bufor octanowy** o stężeniu 0,25 M i pH 4,75, zawierający 18 mM $MgCl_2$ (**AcB-Mg**) – w celu jego przygotowania należy umieścić w kolbie miarowej o pojemności 1 litra 17,00 g trójwodnego octanu sodu, 3,66 g sześciowodnego chlorku magnezu i 7,08 ml lodowatego kwasu octowego, a następnie uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną, podwójnie destylowaną, gotowy roztwór przechowywano w temperaturze ok. 4°C;
- **roztwór NaOH** o stężeniu 2 M – w celu jego przygotowania należy umieścić w kolbie o pojemności 10,00 ml 0,80 g stałego wodorotlenku sodu i dopełnić do kreski wodą dejonizowaną, podwójnie destylowaną;
- **dsDNA-ss** o stężeniu 500 ppm – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 7,50 mg sproszkowanego DNA w 15,00 ml buforu octanowego AcB-K i przechowywano w temperaturze ok. -20°C, docelowy roztwór o stężeniu 20 ppm otrzymywano poprzez rozcieńczenie 0,20 ml stężonego roztworu DNA 4,80 ml AcB-K i przechowywano go w temperaturze ok. 4°C;
- **dsDNA-ct** o stężeniu 1000 ppm – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 5,00 mg liofilizowanego DNA w 5,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze ok. -20°C, docelowy roztwór o stężeniu 20 ppm otrzymywano poprzez rozcieńczenie 0,10 ml stężonego roztworu DNA 4,90 ml AcB-K i przechowywano go w temperaturze ok. 4°C;
- **d(GC)₄** o stężeniu 100 pmol/ μ l (246,5 ppm) – w celu otrzymania roztworu do dostarczonej przez producenta fiołki z określoną ilością (zależną od wydajności syntezy, zwykle w granicach 500-1000 μ g) liofilizowanego preparatu dodawano podaną przez producenta objętość (zwykle ok. 2-4 ml) buforu AcB-K, dokładnie mieszano i przechowywano w temperaturze ok. -20°C, docelowy roztwór o stężeniu 20 ppm przygotowywano poprzez rozcieńczenie 0,41 ml stężonego roztworu DNA 4,59 ml AcB-K i przechowywano go w temperaturze ok. 4°C, roztwór d(GC)₄ zawiera wzajemnie komplementarne łańcuchy nukleotydowe, a jego T_m wynosi 32°C, więc w temperaturze pokojowej (ok. 22°C) występuje w postaci dwuniciowej helisy [16];
- **d(AT)₄** o stężeniu 100 pmol/ μ l (246,2 ppm) – w celu otrzymania roztworu do dostarczonej przez producenta fiołki z określoną ilością (zależną od wydajności syntezy, zwykle w granicach 600-800 μ g) liofilizowanego preparatu dodawano podaną przez producenta objętość (zwykle ok. 2,5-3,5 ml) buforu AcB-K, dokładnie mieszano i przechowywano w temperaturze ok. -20°C, docelowy roztwór o stężeniu 20 ppm przygotowywano poprzez rozcieńczenie 0,41 ml stężonego roztworu DNA 4,59 ml AcB-K i przechowywano go w temperaturze ok. 4°C, roztwór d(AT)₄ zawiera wzajemnie komplementarne łańcuchy nukleotydowe, a jego T_m wynosi 16°C, więc w temperaturze pokojowej (ok. 22°C) występuje w postaci pojedynczych nici [16];

- **(A)₈** o stężeniu 100 pmol/μl (249,8 ppm) – w celu otrzymania roztworu do dostarczonej przez producenta fiołki z określoną ilością (zależną od wydajności syntezy, zwykle w granicach 500-600 μg) liofilizowanego preparatu dodawano podaną przez producenta objętość (zwykle ok. 2-2,5 ml) buforu AcB-K, dokładnie mieszano i przechowywano w temperaturze ok. -20°C, docelowy roztwór o stężeniu 20 ppm przygotowywano poprzez rozcieńczenie 0,40 ml stężonego roztworu DNA 4,60 ml AcB-K i przechowywano go w temperaturze ok. 4°C;
- **scpUC19** o stężeniu 86,5 ppm – plazmidy te, zawierające 2686 par zasad, zostały wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' przy zastosowaniu standardowych procedur GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (Eurx, Polska), prowadzących finalnie do uzyskania preparatu plazmidów rozpuszczonych w buforze na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego (bufor Elution), ich czystość i stężenie zostało wyznaczone spektroskopowo, a stężony roztwór przechowywano w temperaturze ok. -20°C;
- **linpUC19** o stężeniu 11 ppm - plazmidy te, zawierające 2686 par zasad, zostały otrzymane z ich formy superhelikalnej (scpUC19) poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym HindIII przy zastosowaniu standardowych procedur podanych przez producenta (Thermo Fischer Scientific (dawniej: Fermentas), Litwa), a następnie wydzielenie ich z mieszaniny reakcyjnej na drodze elektroforezy w żelu agarozowym i oczyszczenie przy zastosowaniu standardowych procedur GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (Eurx, Polska), prowadzących finalnie do uzyskania preparatu plazmidów rozpuszczonych w buforze na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego (bufor Elution), ich czystość i stężenie zostało wyznaczone spektroskopowo, a stężony roztwór przechowywano w temperaturze ok. -20°C;
- **scpGEX-4T-2** o stężeniu 252 ppb – plazmidy te, zawierające 4970 par zasad, zostały wyizolowane ze szczepu bakterii *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' przy zastosowaniu standardowych procedur GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (Eurx, Polska), prowadzących finalnie do uzyskania preparatu plazmidów rozpuszczonych w buforze na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego (bufor Elution), ich czystość i stężenie zostało wyznaczone spektroskopowo, a stężony roztwór przechowywano w temperaturze ok. -20°C;
- **linpGEX-4T-2** o stężeniu 81 ppb – plazmidy te, zawierające 4970 par zasad, zostały otrzymane z ich formy superhelikalnej (scpGEX-4T-2) poprzez trawienie enzymem restrykcyjnym SmaI przy zastosowaniu standardowych procedur podanych przez producenta (Thermo Fischer Scientific (dawniej: Fermentas), Litwa), a następnie wydzielenie ich z mieszaniny reakcyjnej na drodze elektroforezy w żelu agarozowym i oczyszczenie przy zastosowaniu standardowych procedur GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (Eurx, Polska), prowadzących finalnie do uzyskania preparatu plazmidów rozpuszczonych w buforze na bazie ultra-czystej wody ze śladowym dodatkiem czynnika buforującego (bufor Elution), ich czystość i stężenie zostało wyznaczone spektroskopowo, a stężony roztwór przechowywano w temperaturze ok. -20°C;
- **MB** o stężeniu 20 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 7,4 mg sproszkowanego błękitu metylenowego w 1,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła (naczynie było szczelnie owinięte folią aluminiową);
- **RF** o stężeniu 0,2 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 0,3 mg ryboflawiny w 4 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C;

- **DAU** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 5,6 mg daunorubicyny w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła;
- **DAU-Fmor** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 6,6 mg formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej ugrupowanie morfolinowe w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła;
- **DAU-Fhex** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 6,7 mg formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej ugrupowanie heksametylenoiminowe w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła;
- **DOX** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 5,8 mg doksorubicyny w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła;
- **DOX-Fmor** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 6,8 mg formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej ugrupowanie morfolinowe w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła;
- **DOX-Fhex** o stężeniu 1 mM – w celu przygotowania roztworu rozpuszczono 6,9 mg formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej ugrupowanie heksametylenoiminowe w 10,00 ml wody dejonizowanej, podwójnie destylowanej i przechowywano w temperaturze 4°C bez dostępu światła.

4. Praca doświadczalna

Praca doświadczalna obejmowała kilka zagadnień eksperymentalnych, które omówiłam dokładnie w kolejnych podrozdziałach. Wszystkie pomiary elektrochemiczne wykonane zostały przy zastosowaniu technik woltamperometrycznych. Ich procedury składały się z kilku częściowo wspólnych etapów, które zostały tutaj przedstawione jako procedura podstawowa. W przypadku poszczególnych eksperymentów procedura ta ulegała różnym modyfikacjom, opisanym w kolejnych podrozdziałach pracy.

Procedura Podstawowa

1) Czyszczenie elektrochemiczne

metoda: CV

roztwór: AcB-K

mieszanie roztworu: tak

skanowanie CV:	potencjały kondycjonowania:	+1,6V przez 120 s +1,8V przez 60 s
	liczba skanów	5
	potencjał początkowy	E_{start} : -0,5 V
	pierwsze zawrócenie potencjału	E_1 : +1,6 V
	drugie zawrócenie potencjału	E_2 : -0,5 V
	krok potencjału	E_{krok} : 0,005 V
	szybkość polaryzacji	0,1 V/s

2) Rejestracja linii podstawowej

metoda: SWV

roztwór: AcB-K

mieszanie roztworu: nie

pomiar:	potencjał początkowy	E_{start} : +0,2 V
	potencjał końcowy	E_{stop} : +1,5 V
	krok potencjału	E_{krok} : 0,015 V
	amplituda potencjału	$E_{\text{amplituda}}$: 0,04 V
	częstotliwość	200 Hz

3) Adsorpcja DNA

roztwór: 20 ppm dsDNA-ss w AcB-K

mieszanie roztworu: tak

potencjał: +0,5 V

czas trwania: 300 s

4) Płukanie elektrody

roztwór: AcB-K

mieszanie roztworu: tak

potencjał: nieprzyłożony potencjał zewnętrzny

czas trwania: 10 s

5) Pomiar

metoda: SWV

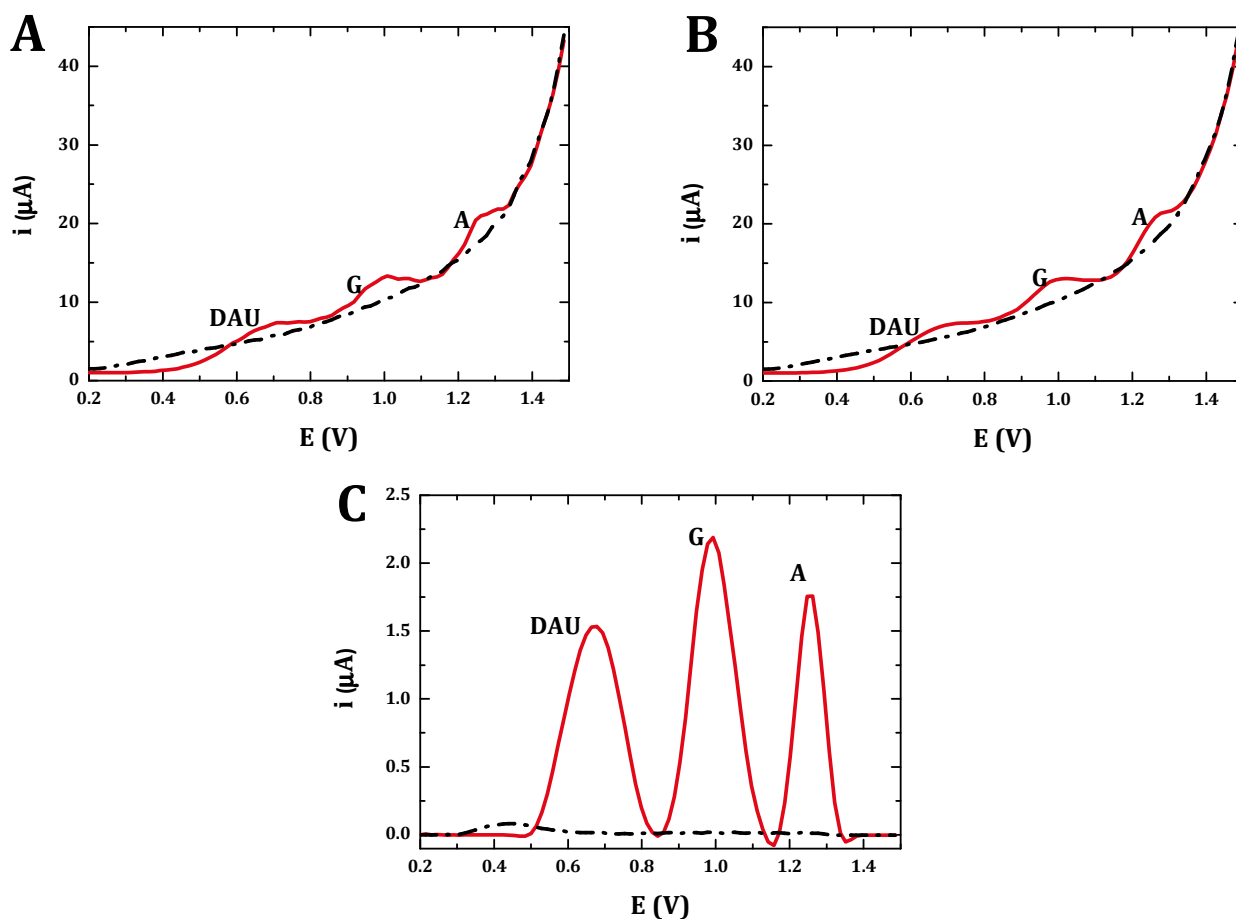
roztwór: AcB-K

mieszanie roztworu: nie

pomiar: parametry jak w pkt. 2)

W przypadku wszystkich pomiarów woltamperometrycznych przed wykonaniem właściwego pomiaru rejestrowano linię podstawową danej elektrody, w celu sprawdzenia jej przewodnictwa i czystości (przerwana linia na RYS. 134). Natomiast przed analizą zarejestrowanych krzywych pomiarowych (RYS. 134A) poddawane były one wygładzeniu (ang. smoothing) metodą Savitzky'ego i Golay'a, poziom 2 (RYS. 134B), co umożliwiło stosowane oprogramowanie GPES 4.5. Ponadto, w celu wyraźniejszego obrazowania otrzymanych sygnałów

prądowych oraz łatwiejszego określenia ich wysokości i pozycji na osi potencjałów, w niektórych eksperymentach voltamperogramy poddawane były korekcji linii podstawowej przy wykorzystaniu dostępnej w oprogramowaniu, funkcji średniej ruchomej (ang. 'moving average' function) przy zadanej szerokości pików 0,008 mV (RYS. 134C). Operacja ta jest często stosowana w analizach przy użyciu elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA, gdyż w znaczący sposób ułatwia obserwację sygnałów redoks zasad azotowych i ligandów, upraszczając jednocześnie interpretację uzyskanych wyników [239, 266, 335, 336, 383], jakkolwiek spotyka się też z krytyką ze względu na możliwość zmian prądu linii podstawowej w wykonywanych kolejno pomiarach.



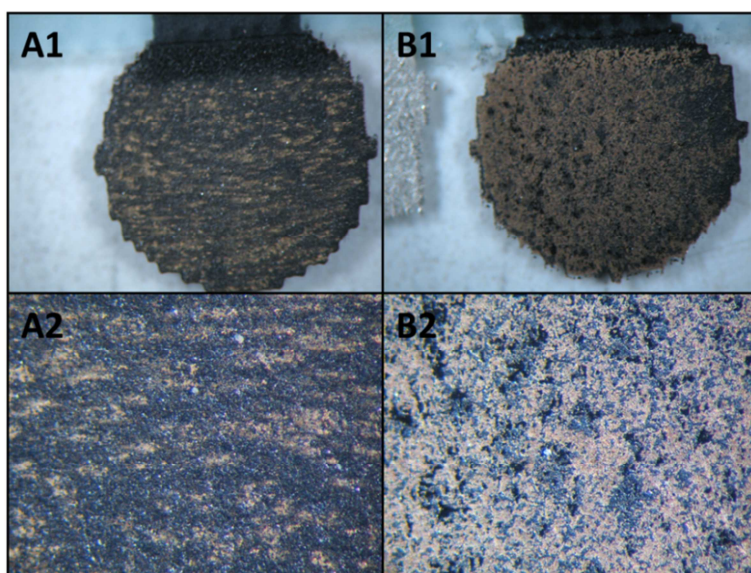
RYS. 134 – Obróbka przykładowych voltamperogramów zarejestrowanych metodą SWV prezentujących linię podstawową elektrody (linia przerywana) oraz sygnały utlenienia DNA calf thymus i daunorubicyny w AcB-K (linia ciągła): A – przed obróbką, B – po wygładzeniu, C – po korekcji linii podstawowej.

4.1. Optymalizacja przygotowania powierzchni elektrod sitodrukowanych

Konstrukcja czujników elektrochemicznych wymaga uprzedniego przygotowania elektrody, co ma na celu oczyszczenie jej powierzchni i usunięcie wszelkich substancji mogących zaburzać analizę. Ponadto, w przypadku sitodrukowanych elektrod grafitowych, stosując różnego rodzaju procedury, dąży się do usunięcia z ich powierzchni nieprzewodzących substancji polimerowych będących składnikiem tuszy sitodrukowych oraz utlenienia wierzchniej warstwy materiału elektrodowego, co ma prowadzić do zwiększenia i rozwinięcia powierzchni aktywnej przetwornika, a tym samym umożliwić bardziej czułe, dokładne i powtarzalne pomiary. Dlatego też pierwszym zagadnieniem, którym zajęłam się w swojej pracy doświadczalnej, była optymalizacja procesu przygotowania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej.

4.1.1. Sposoby przygotowania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej

Szczegółowe analizy powierzchni polskich elektrod sitodrukowanych, przeprowadzone w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie przez dr Selima Achmatowicza, pokazały, iż ich powierzchnia, podobnie jak elektrod sitodrukowanych innych producentów [399, 409, 411], nie zawiera wyłącznie przewodzącego grafitu, ale także znaczne obszary nieprzewodzące, stanowiące matrycę z polimeru organicznego, będącego składnikiem grafitowych past sitodrukarskich. Zagadnienie to zostało opisane szerzej w jednym z rozdziałów części literaturowej mojej pracy (I.4.3.2.). Wielkość elektroaktywnej powierzchni elektrody grafitowej SPE-PL zbadano na drodze elektrolitycznego osadzania na niej złota. Złocenie prowadzone było w takich warunkach, by rozrost ziaren złota występował wyłącznie w osi prostopadłej do powierzchni elektrody i by nie przykrywały one obszarów polimerowych. Elektroda grafitowa pokrywała się złotem bardzo nierównomiernie, a procentowy udział pokrytej powierzchni wahał się, zależnie od miejsca pomiaru, między 15 a 30%, zaś średnia wartość pozłoczonej warstwy wynosiła około 20-22% (RYS. 135A). Istotny wzrost wielkości pozłoczonej powierzchni, sięgającej nawet ponad 40%, uzyskano po zeszlifowaniu wierzchniej warstwy elektrody (RYS. 135B). Najprawdopodobniej taki zabieg skutkuje częściowym usunięciem polimeru z powierzchni, a tym samym powiększeniem przewodzących obszarów grafitu [411, 413]. Elektroaktywność powierzchni elektrody względem kationów złota nie powinna być jednak utożsamiana z elektroaktywnością względem rozbudowanego, wielowartościowego anionu, jaki



RYS. 135 – Zdjęcia spod mikroskopu stereoskopowego (STEMI 2000, Zeiss, Niemcy) złoczonej sitodrukowanej elektrody grafitowej produkcji polskiej: A – niemodyfikowanej, B – zeszlifowanej, wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie przez dr Selima Achmatowicza i udostępnione dzięki Jego uprzejmości. 1 – obraz całej powierzchni elektrody w 32-krotnym powiększeniu, 2 – obraz jej wycinka w 100-krotnym powiększeniu.

stanowią molekuly DNA. Po pierwsze oba indywidua chemiczne mogą zachowywać się w odmienny sposób podczas osadzania elektrolitycznego na elektrodzie, a po drugie procesy te prowadzone są w zupełnie odmiennych warunkach (różne natężenia i napięcia prądu, stężenia jonów, rodzaj elektrolitu). Dlatego też użyteczność elektrod o modyfikowanej mechanicznie powierzchni do konstrukcji bioczuJNIków DNA została sprawdzona przeze mnie, a szlifowanie w połączeniu z procedurą elektrochemiczną stanowiło jedną z metod przygotowania powierzchni elektrody sitodrukowanej do dalszych pomiarów.

Wspomniana powyżej procedura elektrochemiczna stanowi jeden z najpopularniejszych sposobów oczyszczania elektrod sitodrukowanych. Polega ona na elektROUTlenieniu ich powierzchni w wyniku przyłożenia stosunkowo wysokiego potencjału dodatniego, rzędu +1,6–+1,8 V, przez kilka minut [171, 239, 335, 336, 425]. Ma to głównie na celu usunięcie elektroaktywnych substancji zanieczyszczających powierzchnię elektrody oraz jej utlenienie, prowadzące do wytworzenia różnych tlenowych grup funkcyjnych ułatwiających późniejszą adsorpcję analitów [399, 409, 425]. W mojej pracy badawczej poszerzyłam tę procedurę o cykliczne utlenianie i redukcję powierzchni elektrody pracującej w dość szerokim zakresie potencjałów, co miało intensyfikować procesy redoks.

Inną metodą przygotowywania elektrod sitodrukowanych do pomiarów jest działanie na ich powierzchnię kwasem siarkowym (VI) [407] lub wodorotlenkiem sodu [414], połączone często z procedurą elektrochemiczną. Mając to na uwadze podczas poszukiwania najodpowiedniejszej metody oczyszczania elektrod sitodrukowanych produkcji polskiej, zbadałam wpływ na ich właściwości elektryczne roztworów nadtlenu wodoru i wodorotlenku sodu. Czasem powierzchnia SPE poddawana jest także działaniu ultradźwięków [399, 412], lecz w przypadku stosowanych przeze mnie SPE-PL skutkowało to często uszkodzeniem elektrod i odpryskiwaniem nadrukowanej warstwy grafitowej, więc zrezygnowałam z takiego sposobu oczyszczania.

4.1.2. Procedura pomiarowa

Zbadane zostały cztery procedury przygotowania powierzchni sitodrukowanych elektrod produkcji polskiej do konstrukcji bioczuJNIków DNA. Pierwsza z nich obejmowała oczyszczanie elektrochemiczne, polegające na kondycjonowaniu elektrody przy stałym potencjale, po czym następowało cykliczne utlenianie i redukcja jej powierzchni (procedura I). W pozostałych procedurach procesy elektrochemiczne zostały poprzedzone działaniem na elektrodę pracującą 2 M roztworem wodorotlenku sodu (procedura II) lub 30% roztworem nadtlenu wodoru (procedura III), bądź też zeszlifowaniem jej wierzchniej warstwy (procedura IV). W każdym przypadku skuteczność procesu oczyszczania sprawdzana była poprzez zarejestrowanie linii podstawowej. Następnie na elektrodzie osadzany był kwas deoksyrybonukleinowy, a po wypłukaniu niezaadsorbowanych cząsteczek kwasu, monitorowano sygnały utlenienia guaniny i adeniny. Ostatecznym kryterium oceny efektywności oczyszczania SPE-PL była wysokość zarejestrowanych sygnałów prądowych oraz powtarzalność oznaczenia.

Procedura I

Wszystkie etapy identyczne jak w **Procedurze Podstawowej**

Procedura II

- 1) Działanie na elektrodę wodorotlenkiem sodu
 - a) nakroplenie na powierzchnię elektrody pracującej roztworu 2 M NaOH
 - b) pozostawienie NaOH na 1 godzinę
 - c) spłukanie NaOH wodą destylowaną
 - d) osuszenie elektrody
- 2) Czyszczenie elektrochemiczne oraz dalsze etapy eksperymentu zgodnie z **Procedurą Podstawową**

Procedura III

- 1) Działanie na elektrodę nadtlenkiem wodoru
 - a) nakroplenie na powierzchnię elektrody pracującej roztworu 30% H₂O₂
 - b) pozostawienie H₂O₂ na 5 minut
 - c) spłukanie H₂O₂ wodą destylowaną
 - d) osuszenie elektrody
- 2) Czyszczenie elektrochemiczne oraz dalsze etapy eksperymentu zgodnie z **Procedurą Podstawową**

Procedura IV

- 1) Zeszlifowanie wierzchniej warstwy elektrody za pomocą papieru ściernego opartego na proszku diamentowym o średniej wielkości ziaren 1 μm
- 2) Czyszczenie elektrochemiczne oraz dalsze etapy eksperymentu zgodnie z **Procedurą Podstawową**

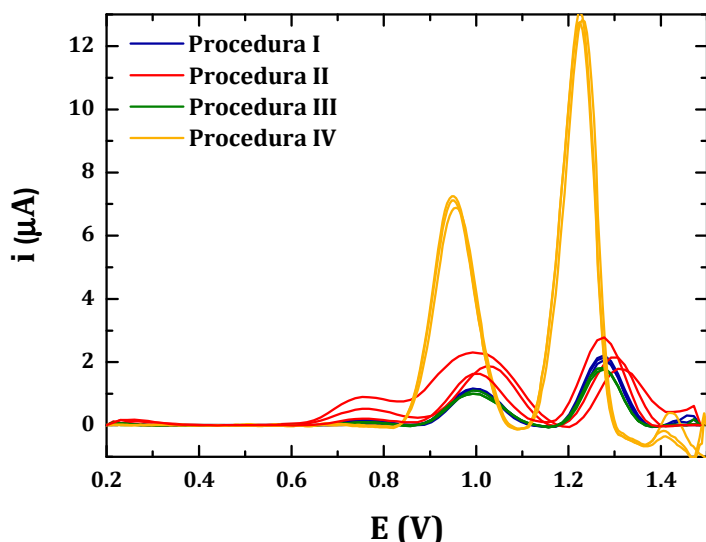
4.1.3. Wyniki

Wszystkie cztery procedury zastosowane do przygotowania powierzchni elektrody skutecznie usuwały z niej substancje zanieczyszczające. Objawiało się to zanikiem drobnych sygnałów prądowych pojawiających się na woltamperogramach zarejestrowanych jeszcze przed przystąpieniem do procedur oczyszczania. Najważniejszym kryterium oceny zastosowanych procedur oczyszczania elektrod była wysokość i powtarzalność, zarejestrowanych przy ich użyciu, sygnałów utlenienia osadzonego na nich DNA (Tabela 7). Te sygnały bowiem odgrywają kluczową rolę w pomiarach prowadzonych przy pomocy sitodrukowanych bioczuJNIKÓW DNA, do konstrukcji których testowane elektrody miały posłużyć.

TABELA 7 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny DNA ze spermy łososia zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej według czterech procedur.

		wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych po oczyszczeniu elektrody			
		Procedura I	Procedura II	Procedura III	Procedura IV
G	wartość średnia [μA]	1,154	1,997	1,093	7,173
	SD [μA]	0,1534	0,9483	0,1402	1,039
	RSD [%]	13,29	47,49	12,82	14,49
A	wartość średnia [μA]	2,145	2,239	1,875	13,42
	SD [μA]	0,1597	0,3706	0,2580	1,797
	RSD [%]	7,45	16,55	13,76	13,40

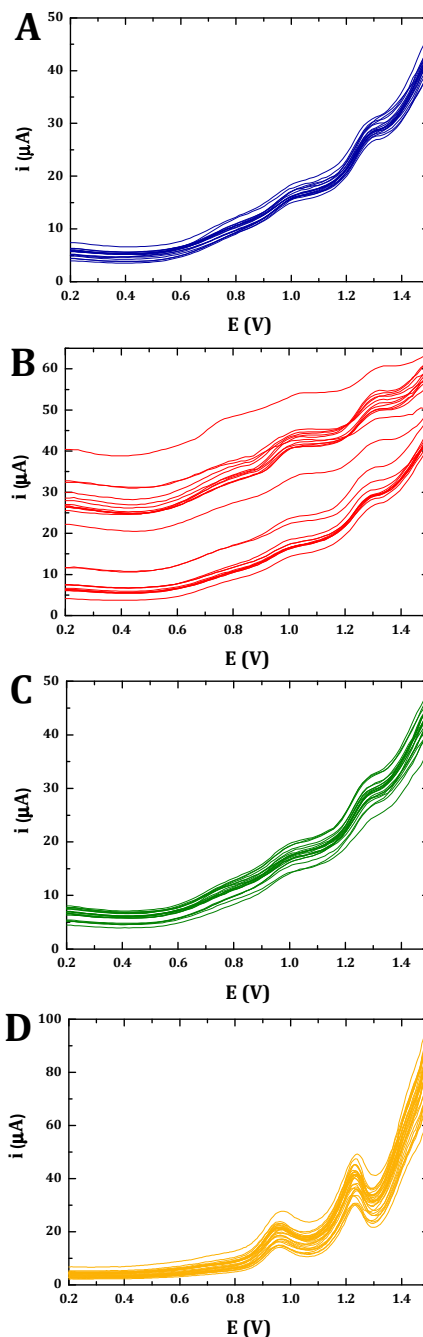
Na woltamperogramach zarejestrowanych dla dsDNA-ss osadzonego na powierzchni elektrod pojawiały się dwa główne piki: utleniania guaniny przy potencjale ok. +1,0 V i adeniny ok. +1,3 V, oraz niewielki pik przy potencjale ok. +0,75 V odpowiadający najprawdopodobniej utlenianiu 8-oksoguaniny (RYS. 136). Gdy elektroda czyszczona była zgodnie z procedurą I lub III, sygnały G i A występowały przy stałych, charakterystycznych potencjałach, odpowiednio +0,993 V i +1,277 V. Kiedy stosowano elektrody przygotowane według procedury IV, piki ulegały znacznemu przesunięciu w stronę potencjałów ujemnych do wartości odpowiednio +0,952 V i +1,225 V, przy czym ich pozycja była stabilna przy wielokrotnym powtarzaniu eksperymentu na osobnych elektrodach. Znaczne obniżenie potencjałów pików wskazuje na ułatwienie procesów redoks zasad azotowych, a jednocześnie może sugerować, że na skutek zeszlifowania wierzchniej warstwy z przetwornika nastąpiły znaczące zmiany materiału elektrodowego. W przypadku procedury II sygnały guaniny i adeniny ulegały przesunięciu o kilkadziesiąt miliwoltów w stronę potencjałów



RYS. 136 – Voltamperogramy po korekcji linii podstawowej zarejestrowane metodą SWV prezentujące utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss osadzonej na SPE-PL oczyszczonych: elektrochemicznie (Procedura I), NaOH i elektrochemicznie (Procedura II), H₂O₂ i elektrochemicznie (Procedura III), szlifowanych i oczyszczonych elektrochemicznie (Procedura IV). Dla każdej procedury czyszczenia przedstawiono po 3 reprezentacyjne krzywe zarejestrowane na osobnych elektrodach.

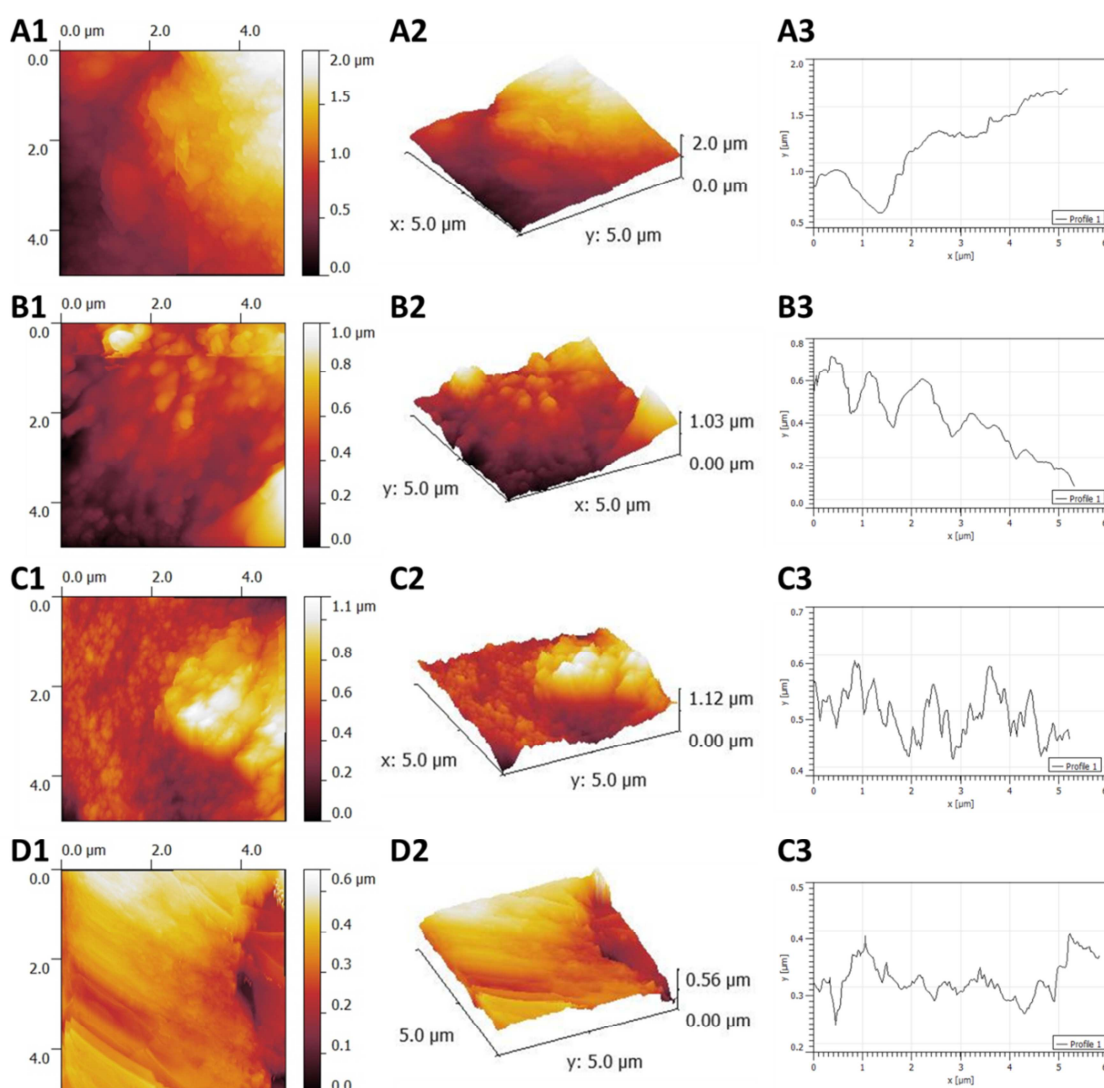
dotadnich. Ich pozycja na osi potencjałów nie była stała przy kolejnych powtórzeniach eksperymentu, a sygnał guaniny był w znacznym stopniu zakłócany przez sygnał 8-oxoG. Świadczyć może to o destrukcyjnym wpływie wodorotlenku sodu na grafitową elektrodę sitodrukowaną i jej destabilizacji. Doskonale ilustruje to RYS. 137, na którym zestawione zostały wszystkie voltamperogramy utleniania G i A, zarejestrowane dla poszczególnych procedur czyszczenia, bowiem eksperyment powtarzany był na osobnych elektrodach 17-krotnie dla procedury I, 25-krotnie dla II, 21-krotnie dla III oraz 30-krotnie dla IV. Zarówno samo czyszczenie elektrochemiczne, jak i w połączeniu z działaniem nadtlenu wodoru lub szlifowaniem, nie powoduje znacznych, niekontrolowanych zmian przewodnictwa elektrody oraz pojemności tworzącej się przy jej powierzchni podwójnej warstwy elektrycznej. Świadczy o tym praktycznie identyczny kształt i położenie wszystkich zarejestrowanych dla tych procedur krzywych, które w dużym stopniu nakładają się na siebie (RYS. 137A, C i D). Sytuacja wygląda inaczej, gdy elektroda czyszczona jest przy użyciu wodorotlenku sodu. Wówczas krzywe zarejestrowane dla poszczególnych elektrod różnią się i nie nakładają się na siebie (RYS. 137B). W sposób niekontrolowany zmienia się ich kształt, wzrasta pojemność dwuwarstwy elektrycznej oraz prąd przepływający przez elektrody. Sugeruje to silny wpływ NaOH na powierzchnię elektrody, co niestety powoduje pogorszenie parametrów pomiarowych.

Sposób przygotowania elektrod wpływał także znacząco na wysokości sygnałów prądowych utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na SPE-PL. W zależności od zastosowanej procedury osiągały one wartości w zakresie 0,8-15,0 μA (RYS. 136). Najwyższe sygnały, nawet



RYS. 137 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV w AcB-K prezentujące utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss osadzonej na SPE-PL oczyszczonych według: A – Procedury I, B – Procedury II, C – Procedury III, D – Procedury IV. Wszystkie przedstawione na diagramach krzywe voltamperometryczne zarejestrowane zostały na osobnych elektrodach – dla procedury I eksperyment powtarzany na 17 elektrodach, dla procedury II na 25, dla procedury III na 21, a dla procedury IV na 30.

siedmiokrotnie przewyższające te zarejestrowane w eksperymencie prowadzonym zgodnie z procedurą I, uzyskano dla elektrod szlifowanych. Świadczy to o istotnym wzroście ich przewodnictwa i zwiększeniu powierzchni aktywnej elektrycznie, co ponownie sugeruje, iż mechaniczna modyfikacja elektrody powoduje skuteczne usunięcie nieprzewodzącej matrycy polimerowej z jej powierzchni. Również procedura II prowadziła do uzyskania nieco wyższych sygnałów niż w przypadku wyłącznie czyszczenia elektrochemicznego. Jednak były one niestabilne i charakteryzował je brak powtarzalności. Niższe, lecz dużo bardziej powtarzalne i stabilne piki uzyskano, stosując procedurę I i III, przy czym samo czyszczenie elektrochemiczne skutkowało nieco wyższymi sygnałami niż w połączeniu z nakropieniem na elektrodę nadtlenu wodoru. Warto zwrócić także uwagę na sygnał 8-oxoG. Osiągał on najwyższe wartości (nawet do $1,0 \mu\text{A}$), gdy elektroda czyszczona była przy użyciu wodorotlenku sodu, zaś przy zastosowaniu czyszczenia według procedury I lub III był on dużo niższy (maksymalnie ok. $0,2 \mu\text{A}$), a przy procedurze IV nie występował w ogóle. Sugeruje to, że obecność roztworu NaOH w procesie przygotowywania elektrody, mimo iż jest on dokładnie spłukiwany przed osadzeniem DNA, wpływa destrukcyjnie na kwas nukleinowy, wywołując jego uszkodzenia oksydacyjne. Być może stężony wodorotlenek sodu nie oddziałuje bezpośrednio z DNA, lecz wchodzi w pewne reakcje ze składnikami tuszu grafitowego tworzącego elektrodę, przekształcając je w indywidualia chemiczne, wykazujące niszczące działanie na DNA. Jako że tusz do sitodruku jest produktem dostępnym komercyjnie, producent nie podaje jego szczegółowego składu, przez co nie wiadomo, jakie procesy mogą w nim zachodzić pod wpływem NaOH.



RYS. 138 – Powierzchnia polskiej elektrody pracującej: A – przed czyszczeniem, B – po czyszczeniu elektrochemicznym, C – po działaniu NaOH, D – po szlifowaniu, obrazowana za pomocą AFM: 1 – obraz w rzucie płaskim, 2 – obraz trójwymiarowy, 3 – profil powierzchni.

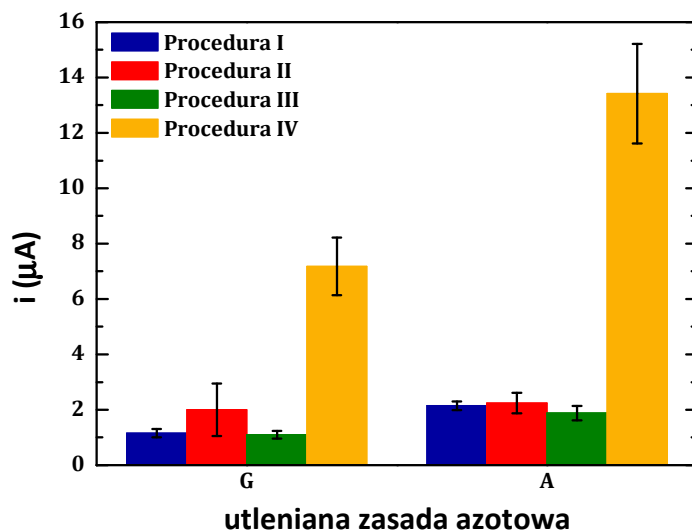
Wpływ szlifowania, czyszczenia elektrochemicznego i działania wodorotlenku sodu na powierzchnię elektrody monitorowany był także poprzez obrazowanie jej techniką AFM (RYS. 138). Przed jakimikolwiek procesami oczyszczania, warstwa grafitowa, tworząca sitodrukowaną elektrodę pracującą, nie jest jednorodna. Zawiera ona pewne nierówności, mogące stanowić obszary grafitu pokryte częściowo przez nieprzewodzące substancje polimerowe zawarte w tuszu [411] (RYS. 138A). W wyniku zeszlifowania wierzchniej warstwy elektrodowej owe nierówności w zasadzie zanikają, a powierzchnia staje się bardziej płaska i jednorodna (RYS. 138D). Może to sugerować, iż proces szlifowania eliminuje dużą część nieprzewodzącej matrycy polimerowej, odkrywając jednocześnie grafit. Wygląd powierzchni elektrody zmienia się istotnie po procesie czyszczenia elektrochemicznego. Wówczas staje się ona bardziej chropowata, a na jej obrazie pojawiają się ziarnistości, które jednak w mniejszym stopniu wystają ponad powierzchnię niż nierówności na niemodyfikowanej elektrodzie przed czyszczeniem (RYS. 138B). Być może warunki silnie utleniające również przyczyniają się do częściowego usunięcia warstewki polimerów pokrywających grafit, a tym samym zwiększenie powierzchni przewodzącej elektrody. W przypadku działania na elektrodę wodorotlenku sodu, na jej obrazie AFM widoczne są zarówno bardzo drobne ziarnistości, o średnicy istotnie mniejszej niż przy czyszczeniu elektrochemicznym, jak i większe obszary nierówności, które są jednak niższe niż na elektrodzie przed czyszczeniem (RYS. 138C). W związku z tym trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy substancje nieprzewodzące zostały skutecznie usunięte z powierzchni i czy warstwa elektrodowa nie uległa jeszcze dodatkowym przemianom.

4.1.4. Wnioski

Analiza zaprezentowanych wyników prowadzi do wniosku, iż najlepszą metodą przygotowywania elektrod sitodrukowanych produkcji polskiej do konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA jest ich oczyszczanie elektrochemiczne poprzedzone zeszlifowaniem wierzchniej warstwy. Prowadzi ona do zarejestrowania najwyższych sygnałów utlenienia zasad azotowych (RYS. 139), które według testów statystycznych różnią się istotnie od sygnałów otrzymanych w przypadku procedury I (Załącznik 1). Jednak sam proces szlifowania nie został jeszcze zautomatyzowany i w pełni zoptymalizowany przez producenta, co przejawia się między innymi w wartościach względnego odchylenia standardowego (RSD, ang. Relative Standard Deviation), sięgających blisko 15%. Dotychczas próbne listki elektrod szlifowane były ręcznie przy użyciu różnych materiałów ściernych lub polerujących, co nie może gwarantować pełnej powtarzalności tego procesu. Również rodzaj materiału ściernego oraz dokładność oczyszczenia elektrody po jego zastosowaniu wywołuje wpływ na efektywność szlifowania. Podczas przeprowadzonych eksperymentów zdarzało się, iż mimo dokładnego przemywania elektrod na ich powierzchni obecne były pozostałości materiału ściernego. Wielokrotnie okazywało się, że są one elektroaktywne i zakłócają monitorowanie procesów redoks zasad azotowych. Przytoczone powyżej fakty uniemożliwiają zastosowanie na tym etapie elektrod szlifowanych do konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA na większą skalę eksperymentalną. Jednak mechaniczna modyfikacja grafitowych elektrod sitodrukowanych produkcji polskiej jest doskonałą metodą poprawy ich parametrów pomiarowych i bez wątpienia powinna zostać poddana dalszej optymalizacji.

Mimo iż procedura II, obejmująca czyszczenie elektrochemiczne poprzedzone działaniem na elektrodę NaOH, prowadziła do zarejestrowania wyższych sygnałów utlenienia zasad azotowych niż procedura I (tylko czyszczenie elektrochemiczne) (RYS. 139), to jedynie w przypadku guaniny różnice te są istotne statystycznie (Załącznik 2). Ponadto, bardzo wysokie wartości odchylenia standardowego, otrzymane w przypadku procedury II, definitywnie dyskwalifikują ją jako potencjalną metodę przygotowywania elektrod.

Porównując z kolei efektywność procedury I i procedury III, obejmującej czyszczenie elektrochemiczne poprzedzone działaniem na elektrodę H_2O_2 , okazuje się, że wyższe sygnały utlenienia guaniny i adeniny uzyskano w pierwszym przypadku (RYS. 139). Jednak jedynie dla A są to różnice istotne ze statystycznego punktu widzenia (Załącznik 3). Procedura I charakteryzuje się również nieco lepszymi wartościami odchylenia standardowego.



RYS. 139 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia G i A zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na SPE-PL w zależności od zastosowanej procedury przygotowania elektrod. Wartości średnie wyznaczone na podstawie 17 elektrod (Procedura I), 25 elektrod (Procedura II), 21 elektrod (Procedura III) lub 30 elektrod (Procedura IV).

Biorąc pod uwagę powyższą ocenę parametrów charakteryzujących wyniki, uzyskane na elektrodach oczyszczonych według poszczególnych procedur, można stwierdzić, że najwłaściwszym sposobem przygotowania elektrody sitodrukowanej produkcji polskiej do konstrukcji bioczuJNIka DNA jest czyszczenie elektrochemiczne, składające się z kondycjonowania elektrody przy stałym dodatnim potencjale oraz cyklicznego utleniania i redukcji jej powierzchni w szerokim zakresie potencjałów. Z tego też względu procedura I była stosowana przeze mnie we wszystkich kolejnych eksperymentach jako metoda przygotowania elektrod. Do jej dodatkowych zalet należy prostota i łatwość wykonania, oszczędność czasu i odczynników oraz uniknięcie wprowadzenia do układu zbędnych substancji mogących wpływać na materiał biologiczny i zakłócać rejestrowane sygnały redoks.

4.2. Modyfikacja elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi

Jedną z metod poprawy parametrów pomiarowych elektrod sitodrukowanych jest ich modyfikacja nanorurkami węglowymi. Dzięki temu wzrasta ich przewodnictwo elektryczne, a powierzchnia elektroaktywna ulega znacznemu zwiększeniu. SPE modyfikowane nanorurkami węglowymi z powodzeniem mogą być stosowane do konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA, gdyż stanowią one dobre podłoże do unieruchamiania kwasu deoksyrybonukleinowego, a ponadto prowadzą do wzmocnienia rejestrowanych sygnałów redoks [456, 457, 472, 473]. Z tego powodu podjęta została próba modyfikacji elektrod sitodrukowanych wielościennymi nanorurkami węglowymi. Proces ten nie był jednak prosty i wymagał wielu, często żmudnych i czasochłonych etapów pośrednich.

4.2.1. Przygotowanie zawiesiny nanorurek węglowych

By móc modyfikować elektrody nanorurkami węglowymi, niezbędne jest sporządzenie ich stabilnej zawiesiny. Ze względu na właściwości CNT, ich nierozpuszczalność i tendencję do agregacji w rozpuszczalnikach wodnych i polarnych nie jest to łatwym zadaniem. Jednym z prostszych rozwiązań jest użycie surfaktantów [456, 460] lub polimerów [458, 474], a do rozbicia utworzonych agregatów ultradźwięków [337, 453, 456-458, 460, 475]. Ostatecznym celem mojego eksperymentu było zastosowanie elektrod sitodrukowanych modyfikowanych wielościennymi nanorurkami węglowymi do konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA, więc zależało mi na uniknięciu wprowadzania do układu dodatkowych substancji, mogących wpływać na materiał genetyczny lub z nim oddziaływać. Ostatecznie do przygotowania zawiesiny CNT zdecydowałam się użyć jedynie odpowiednio dobranych rozpuszczalników oraz zastosować sonikację.








4.2.1.1. Dobór rozpuszczalnika do sporządzenia zawiesiny nanorurek węglowych



Poszukując odpowiedniego rozpuszczalnika do utworzenia w nim zawiesiny nanorurek węglowych, należy kierować się przede wszystkim jednorodnością i stabilnością otrzymanej mieszaniny. Zwykle w tym celu stosowany jest DMF [337, 453, 457] lub jego mieszanina z wodą [475]. W moim eksperymencie do utworzenia zawiesiny wielościennych nanorurek węglowych oprócz DMF i jego mieszaniny z wodą w stosunku 1:1, zastosowane zostały również: woda, cellosolv butylowy, toluen, octan n-butyłu, octan karbitolu butylowego, alkohol benzylowy oraz alkohol izopropylowy. Dobór rozpuszczalników podyktowany był tym, że wykazują one pewną polarność, a ich cząsteczki zawierają jednocześnie łańcuchy/pierścienie węglowe (oprócz wody).

Mieszanki MWCNT i poszczególnych rozpuszczalników otrzymano przez odważenie odpowiedniej ilości nanorurek, umieszczenie ich w szklanych fiolkach/buteleczkach i dodanie do nich takiej ilości danego rozpuszczalnika, by uzyskać pożądane stężenie z zakresu 0,1–5 mg/ml (Tabela 8). Następnie mieszaniny poddawane były sonikacji w płuczce ultradźwiękowej Sonic 0,5 (Polsonic, Warszawa) przez czas 6-15 h.

Charakterystyka wyglądu poszczególnych zawiesin została przedstawiona w poniższej tabeli (Tabela 8). Na podstawie fotografii oraz krótkiego opisu łatwo stwierdzić, iż jednorodne i stabilne zawiesiny, w których agregacja MWCNT jest ograniczona, otrzymano dla DMF, mieszaniny DMF i H₂O w stosunku 1:1 i cellosolwu butylowego. W pozostałych przypadkach nanorurki szybko tworzyły agregaty i opadały na dno naczynia.

TABELA 8 – Przygotowanie zawiesin nanorurek węglowych w różnych rozpuszczalnikach.

Rozpuszczalnik	Stężenie MWCNT w zawieszynie [mg/ml]	Czas sonikacji	Wygląd zawiesiny	Zdjęcie zawiesiny
H₂O	1	8 h 30 min.	Zawiesina niestabilna, MWCNT silnie zagregowane	
DMF	5	15 h	Zawiesina stabilna, MWCNT rozproszone w miarę równomiernie w całej objętości	
DMF / H₂O	1	10 h	Zawiesina stabilna, MWCNT rozproszone w miarę równomiernie w całej objętości	
Cellosolw butylowy	0,1	7 h	Zawiesina stabilna tylko przez kilka godzin: w wyniku poruszenia buteleczki z roztworem tworzy się charakterystyczna smuga, MWCNT niezagregowane	
Toluen	1	9 h 30 min.	Zawiesina niestabilna, MWCNT zagregowane, opadają szybko na dno	
Octan n-butylu	1	6 h 30 min.	Zawiesina niestabilna, MWCNT silnie zagregowane	
Octan karbinolu butylowego	1	6h 30 min.	Zawiesina niestabilna, MWCNT silnie zagregowane, opadają na dno	

Alkohol benzyłowy	1	6 h 15 min.	Zawiesina średnio stabilna, MWCNT niezagregowane	
Alkohol izopropylowy	1	6 h 30 min.	Zawiesina niestabilna, MWCNT zagregowane, opadają na dno	

4.2.1.2. Badanie wpływu rozpuszczalników na elektrodę oraz właściwości elektrochemiczne kwasu deoksyrybonukleinowego

Przygotowane zawiesiny nanorurek węglowych docelowo miały posłużyć do modyfikacji elektrod sitodrukowanych produkcji polskiej, na których z kolei miały być konstruowane bioczuJNIKI DNA. Rozpuszczalnik użyty do sporządzenia zawiesiny MWCNT nie może powodować uszkodzenia warstwy izolacyjnej na układzie elektrod, która ochrania ścieżki srebrowe przed kontaktem z badanym roztworem, niszczyć powierzchni samych elektrod oraz wywoływać zmian aktywności i właściwości elektrochemicznych kwasu deoksyrybonukleinowego.

4.2.1.2.1. Procedura pomiarowa

Analizie poddano jedynie rozpuszczalniki, w których udało się wcześniej sporządzić stabilne i jednorodne zawiesiny nanorurek, tj. DMF, mieszaninę DMF i wody w stosunku 1:1 i cellosolv butylowy. Niewielkie ich porcje zostały nakropłone na uprzednio oczyszczone elektrochemicznie elektrody pracujące i odparowane poprzez naświetlanie żarówką o mocy 25 W. Następnie elektrody poddano ponownemu czyszczeniu elektrochemicznemu i zarejestrowano ich linie podstawowe, dzięki którym można było określić wpływ rozpuszczalników na właściwości elektrody. W kolejnym kroku na elektrody naniesiono roztwór DNA ze spermy łosia i pozostawiono do wyschnięcia w warunkach pokojowych. Po godzinie elektrody zostały wypłukane w celu eliminacji niezwiązanych z powierzchnią elektrody molekuł DNA oraz przeprowadzono proces ich elektroutlenienia. Dokładna procedura została przedstawiona poniżej (procedura V)

Procedura V

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne
 - 2) Rejestracja linii podstawowej
 - 3) Naniesienie rozpuszczalnika na powierzchnię elektrody pracującej
 - nakroplenie porcji rozpuszczalnika o objętości: 0,2 lub 1 μl w zależności od rodzaju substancji (Tabela 9)
 - suszenie poprzez naświetlanie żarówką o mocy 25 W przez 15 lub 30 min. w zależności od rodzaju rozpuszczalnika (Tabela 9)
 - 4) Czyszczenie elektrody modyfikowanej rozpuszczalnikiem
 - 5) Rejestracja linii podstawowej elektrody modyfikowanej rozpuszczalnikiem
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

- 6) Unieruchomienie DNA na powierzchni elektrody
- nakropienie 2 μl roztworu dsDNA-ss o stężeniu 20 ppm
 - pozostawienie na 1 h do wyschnięcia na powietrzu
- 7) Płukanie elektrody
- 8) Pomiar
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

4.2.1.2.2. Wyniki

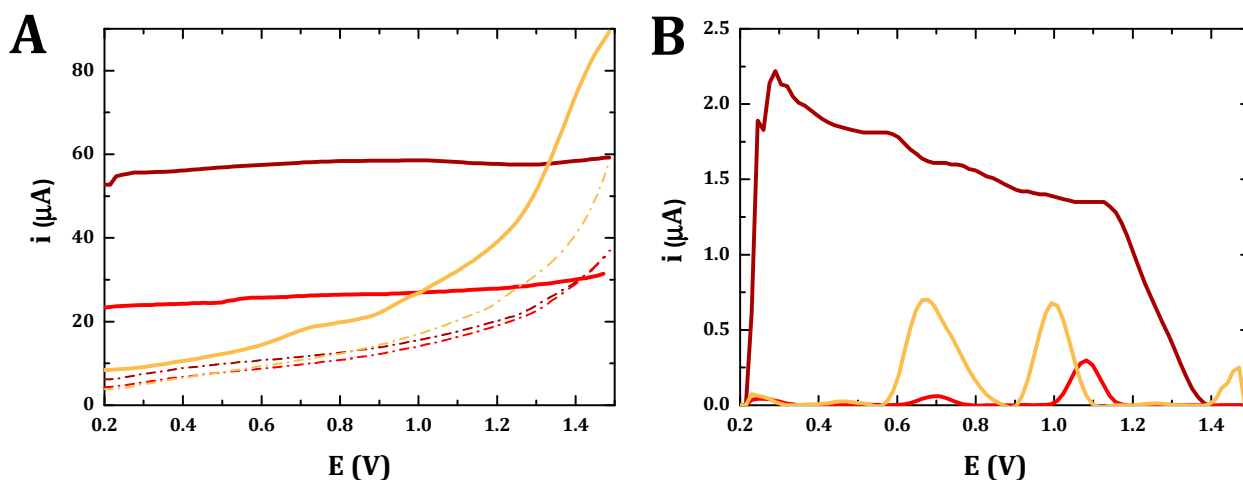
Pewnych informacji na temat wpływu rozpuszczalników na powierzchnię elektrod sitodrukowanych dostarczył już etap ich nakropienia. Jak pokazano w poniższej tabeli (Tabela 9), jedynie DMF nie sprawiał większych problemów. W przypadku jego mieszaniny z wodą oraz cellosolwu butylowego pewne trudności stanowiło utrzymanie rozpuszczalnika na powierzchni elektrody pracującej w postaci kropli. Zdarzało się, iż rozlewał się on nieco, czasem dochodząc do pozostałych elektrod i podmywając warstwę izolacyjną. Miało to poważny wpływ na użyteczność takich elektrod, gdyż wywoływało nagłe skoki natężenia prądu na rejestrowanych w kolejnym etapie woltamperogramach, co jednoznacznie uniemożliwiało pomiary. Dlatego też do dalszych badań zakwalifikowane zostały jedynie takie układy, w których rozpuszczalniki nie miały styczności z elektrodą odniesienia i pomocniczą oraz warstwą izolacyjną.

TABELA 9 – Sposób modyfikacji elektrody pracującej rozpuszczalnikami oraz rezultaty tego procesu.

Rozpuszczalnik	Objętość rozpuszczalnika nakropionego na powierzchnię elektrody pracującej [μl]	Czas suszenia poprzez naświetlanie żarówką o mocy 25 watów [min.]	Rezultat
DMF	1	15	Brak widocznych uszkodzeń elektrody w wyniku nakropienia rozpuszczalnika
DMF/ H ₂ O	0,2	15	Nie na wszystkich elektrodach mieszanina nakropionych rozpuszczalników utrzymuje się w postaci kropli; czasami rozplywa się, podmywając warstwę izolacyjną układu
cellosolw butylowy	0,2	30	Nakroplony rozpuszczalnik trudno utrzymać w postaci kropli; cellosolw butylowy wykazuje zdolność „pełzania” po powierzchni elektrody

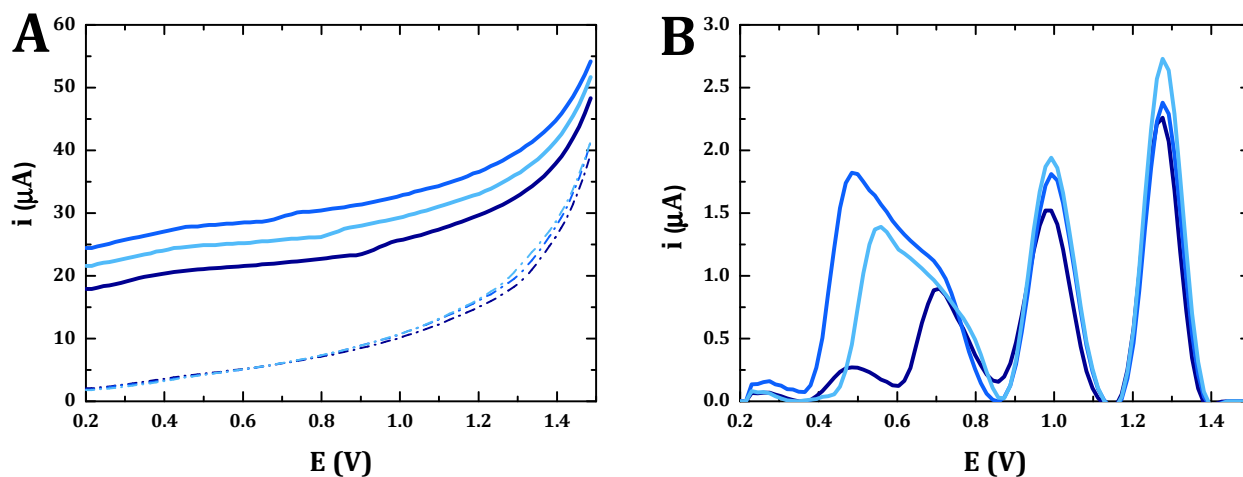
Mimo iż nakrapianie DMF na powierzchnię elektrody nie sprawiało większych problemów, miał on wpływ na właściwości elektryczne przetwornika. Linie podstawowe elektrod ulegały znacznym zniekształceniom w porównaniu z liniami podstawowymi zarejestrowanymi przed modyfikacją DMF (linie ciągłe vs. linie przerywane na RYS. 140A). Często ulegały one wypłaszczeniu i czasem pojawiały się na nich niezidentyfikowane sygnały prądowe/pojemnościowe. Ponadto, odznaczał je brak powtarzalności. Jednoznacznie wskazuje to na niszczące działanie tego rozpuszczalnika na powierzchnię stosowanych elektrod sitodrukowanych. Dodatkowym potwierdzeniem tego faktu są woltamperogramy utleniania DNA nakropionego na elektrody modyfikowane DMF (RYS. 140B). Piki pochodzące od utlenienia zasad azotowych są trudne do identyfikacji ze względu na ich niestabilne przesunięcia na osi potencjałów oraz bardzo niskie wysokości, rzędu dziesiątych i setnych części mikroampera. Czasem znaczne zniekształcenia

krzywych woltamperometrycznych zdecydowanie utrudniają wykonanie automatycznej korekcji linii podstawowej, co uniemożliwia obserwację sygnałów redoks guaniny i adeniny (brązowa krzywa na RYS. 140B), nawet jeśli procesy te miały miejsce na powierzchni elektrody.



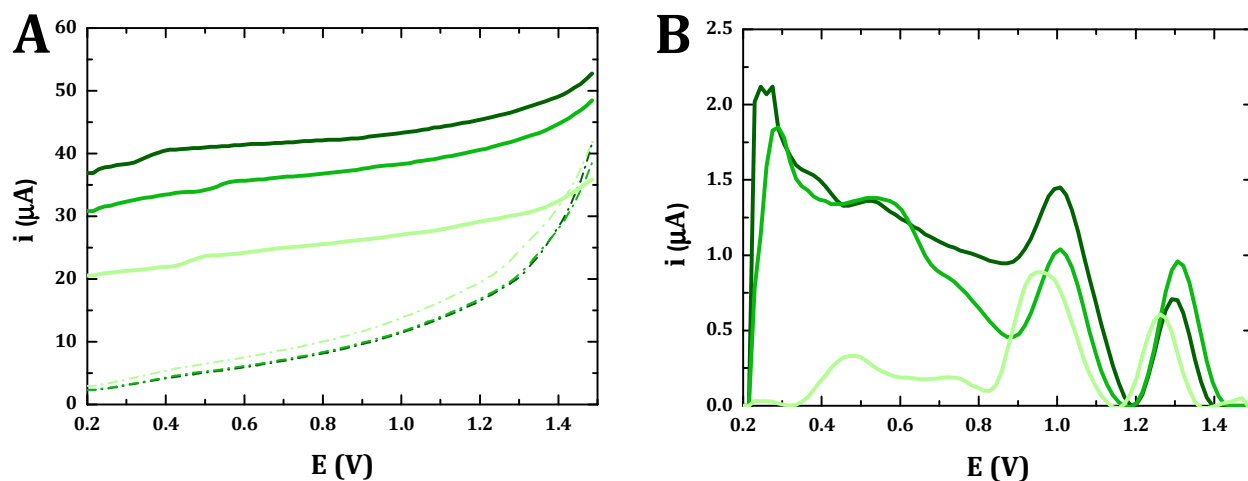
RYS. 140 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropleniu DMF (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakroplonego na elektrody po modyfikacji DMF (krzywe po korekcji linii podstawowej).

Pomimo, iż czysty DMF nie dał zadowalających rezultatów, to jednak ze względu na dość powszechne wykorzystywanie go do modyfikacji elektrod opisywane w wielu publikacjach naukowych [337, 453, 457], nie został on zupełnie zdyskwalifikowany. Zastosowanie jego mieszaniny z wodą w stosunku 1:1 znacząco poprawia wygląd rejestrowanych krzywych woltamperometrycznych. Linie podstawowe, w tym przypadku, zachowują swój pierwotny kształt, a jedynie wzrastają ich wartości prądowe (linie ciągłe vs. linie przerywane na RYS. 141A). Po nakropleniu na elektrody modyfikowane mieszaniną DMF-woda roztworu DNA i zarejestrowaniu woltamperogramów widoczne są na nich wyraźne, dobrze rozseparowane sygnały utlenienia guaniny i adeniny przy charakterystycznych dla siebie potencjałach, odpowiednio +0,993 V i +1,277 V (RYS. 141B). Ich wysokości natomiast osiągają wartości ok. 1,8 μA dla guaniny i ok. 2,5 μA dla adeniny, a tym samym są porównywalne z sygnałami rejestrowanymi dla elektrod niemodyfikowanych. Jedynym niepokojącym faktem jest pojawienie się na krzywych niestabilnych pików o nieznanym pochodzeniu w obszarze potencjałów +0,4-+0,8 V. W tym eksperymencie nie zakłócają one rejestrowanych sygnałów, lecz przy badaniu reakcji redoks innych substancji mogą stanowić poważne utrudnienie.



RYS. 141 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropleniu mieszaniny DMF i H_2O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakroplonego na elektrody po modyfikacji mieszaniną DMF i H_2O 1:1 (krzywe po korekcji linii podstawowej).

Ostatnim przebadanym rozpuszczalnikiem był cellosolw butylowy. Linie podstawowe modyfikowanych nim elektrod charakteryzowały się znacznym wzrostem prądu w porównaniu z elektrodami przed modyfikacją (linie ciągłe vs. linie przerywane na RYS. 142A). Ponadto, dostrzegalne były na nich zmiany w zakresie potencjałów około +0,4–+0,6 V. Niestety wpływają one na zniekształcenie sygnałów utlenienia zasad azotowych nakropłonego na elektrody DNA. Szczególnie widoczne jest to dla guaniny, której pik nakłada się częściowo z sygnałami pojemnościowymi (RYS. 142B). Potencjały, przy których pojawiają się piki guaniny i adeniny, nie są stabilne i ulegają niewielkim przesunięciom zarówno w stronę wartości ujemnych jak i dodatnich. Obniżeniu ulegają także prądy rejestrowanych procesów redoks i zwykle nie przekraczają one wartości 1 μA . Wszystkie te czynniki sprawiają, iż cellosolw butylowy nie jest idealnym rozpuszczalnikiem, gdyż jego działanie na elektrodę pracującą znajduje odzwierciedlenie w wynikach prowadzonych analiz.



RYS. 142 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu cellosolwu butylowego (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropłonego na elektrody po modyfikacji cellosolwem butylowym (krzywe po korekcji linii podstawowej).

4.2.1.3. Wnioski

Dobór rozpuszczalnika właściwego do sporządzenia zawiesiny nanorurek węglowych i następnie użycia jej do modyfikacji elektrod sitodrukowanych nie jest zadaniem prostym. Jak pokazują przeprowadzone eksperymenty, stabilne, jednorodne zawiesiny nanorurek węglowych uzyskano jedynie w przypadku DMF, jego mieszaniny z wodą oraz cellosolwu butylowego. W pozostałych zaproponowanych rozpuszczalnikach MWCNT ulegały silnej agregacji i sedymentacji, co uniemożliwiało równomierne pokrycie nimi elektrody pracującej SPE-PL.

Badając z kolei wpływ rozpuszczalników na elektrody sitodrukowane i kwas deoksyrybonukleinowy, odrzucono możliwość zastosowania DMF, gdyż powodował on zbyt poważne zniekształcenia voltamperogramów, uniemożliwiając monitorowanie sygnałów utlenienia zasad azotowych. Nieco lepsze wyniki dawał cellosolw butylowy, zaś modyfikacja elektrod mieszaniną DMF i H₂O w stosunku 1:1 wręcz poprawiała właściwości elektryczne przetwornika.

Ostatecznie zdecydowano, iż w kolejnych etapach eksperymentu do modyfikacji elektrod, na których następnie skonstruowane zostaną elektrochemiczne biocujniki DNA, użyte będą zawiesiny nanorurek w mieszaninie DMF-H₂O oraz cellosolwie butylowym. W pierwszym przypadku za takim wyborem przemawiała zarówno stabilność zawiesiny, jak i pozytywny wpływ rozpuszczalnika na przetwornik. Wybór cellosolwu butylowego natomiast podyktowany był przede wszystkim charakterystycznym rozproszeniem w nim nanorurek węglowych, które w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami w tym przypadku wykazywały najmniejszy stopień agregacji.

4.2.2. Modyfikacja nanorurkami węglowymi poprzez nakroplenie ich zawiesiny na elektrodę

Najpopularniejszym sposobem modyfikacji elektrod nanorurkami węglowymi jest nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię przetwornika i odparowanie rozpuszczalnika [337, 453, 456, 457, 460, 472, 475]. Jest to metoda prosta w realizacji i nie wymaga stosowania wielu dodatkowych odczynników chemicznych. Ze względu na duże trudności w sporządzeniu jednorodnej zawiesiny nanorurek w roztworach wodnych, stosowane są zwykle ich zawiesiny w rozpuszczalnikach organicznych, a dzięki temu unika się ich wypłukiwania z powierzchni elektrody podczas pracy czujnika w środowisku wodnym [438]. W swojej pracy badawczej nad poprawą parametrów pomiarowych elektrod sitodrukowanych na drodze modyfikacji nanorurkami węglowymi, również zdecydowałam się na osadzenie ich na powierzchni elektrody pracującej poprzez nakroplenie ich zawiesiny.

Stosując nakroplenie zawiesiny nanorurek węglowych jako formę modyfikacji elektrod, zbadałam użyteczność przygotowanych zawiesin do konstrukcji biocujników DNA na elektrodach sitodrukowanych nie tylko produkcji polskiej, ale także włoskiej. Sprawdziłam również, czy oczyszczanie nanorurek węglowych, mające na celu usunięcie pozostałych po syntezie resztek amorficznych struktur węglowych i katalizatorów metalicznych, ma wpływ na poprawę właściwości elektrycznych modyfikowanych nimi elektrod.

4.2.2.1. Procedura pomiarowa

Wszystkie eksperymenty oparte na nakrapianiu MWCNT na powierzchnię elektrody pracującej zostały przeprowadzone według tej samej procedury (procedura VI), w dużym stopniu podobnej do procedury V, stosowanej w badaniu wpływu rozpuszczalników na elektrody sitodrukowane. Sygnałami analitycznymi, które stanowiły kryterium oceny skuteczności modyfikacji elektrod MWCNT, były piki utlenienia guaniny i adeniny zawartej w DNA osadzonym na modyfikowanych czujnikach. Oczekiwano, iż obecność nanorurek na powierzchni elektrod spowoduje wzrost prądów zachodzących reakcji redoks oraz czułości i powtarzalności oznaczeń.

Procedura VI

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne
- 2) Rejestracja linii podstawowej
- 3) Naniesienie zawiesiny nanorurek węglowych na powierzchnię elektrody pracującej
 - nakroplenie 0,2 µl odpowiedniej zawiesiny MWCNT na elektrodę
 - suszenie poprzez naświetlanie żarówką o mocy 25 W przez 15–20 min.
- 4) Czyszczenie elektrochemiczne
- 5) Rejestracja linii podstawowej
- 6) Unieruchomienie DNA na powierzchni elektrody
 - nakroplenie 2 µl roztworu dsDNA-ss o stężeniu 20 ppm
 - pozostawienie na 1 h do wyschnięcia na powietrzu
- 7) Płukanie elektrody
- 8) Pomiar

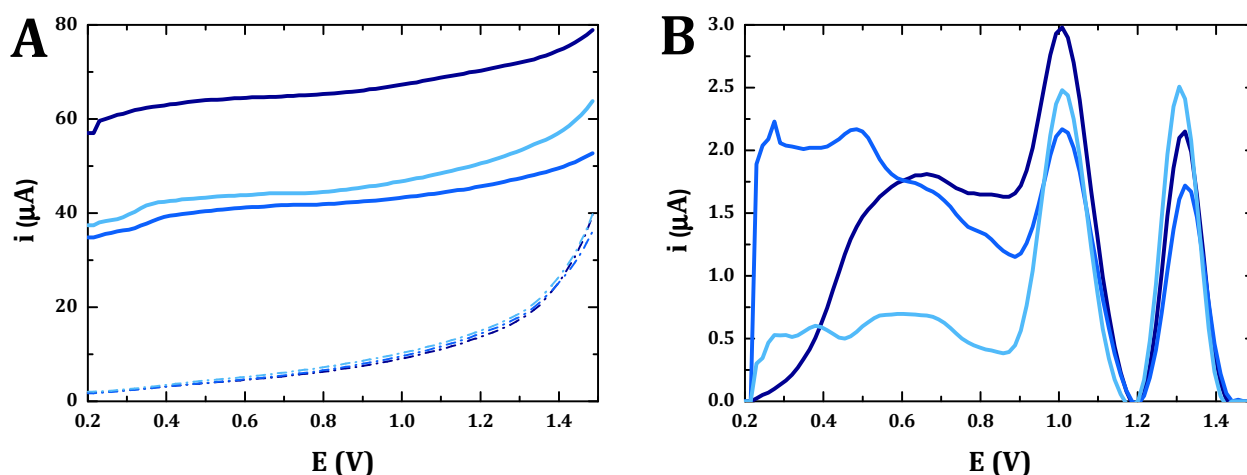
przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

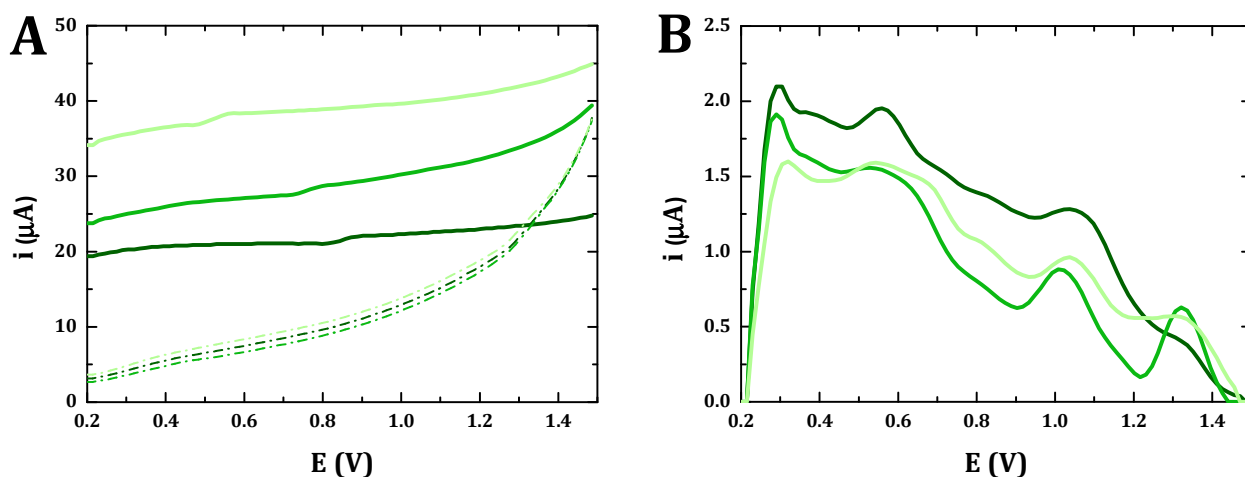
przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

4.2.2.2. Dobór zawiesiny nanorurek węglowych do konstrukcji bioczuJNIKA DNA

W poprzednim etapie eksperymentów wytypowano dwie zawiesiny wielościennych nanorurek węglowych, które mogą być stosowane do modyfikacji elektrod sitodrukowanych i konstrukcji bioczuJNIKÓW DNA. Jest to zawiesina MWCNT o stężeniu 0,1 mg/ml sporządzona w cellosolwie butylowym oraz o stężeniu 1 mg/ml sporządzona w mieszaninie DMF i wody w stosunku 1:1. W tej części pracy sprawdzono, która z tych zawiesin lepiej nadaje się do modyfikacji elektrod sitodrukowanych. Eksperyment przeprowadzono zgodnie z procedurą VI, modyfikując zawiesinami nanorurek elektrody sitodrukowane produkcji polskiej. Czas suszenia nakropionej warstwy nanorurkowej wynosił 15 minut dla zawiesiny w mieszaninie DMF-H₂O lub 20 minut dla zawiesiny w cellosolwie butylowym. Zarejestrowane sygnały utlenienia zasad azotowych porównano z wynikami uzyskanymi podczas analogicznego eksperymentu, przeprowadzonego na SPE-PL bez modyfikacji, w którym pomijane były punkty 3-5 procedury VI.



RYS. 143 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropione na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).

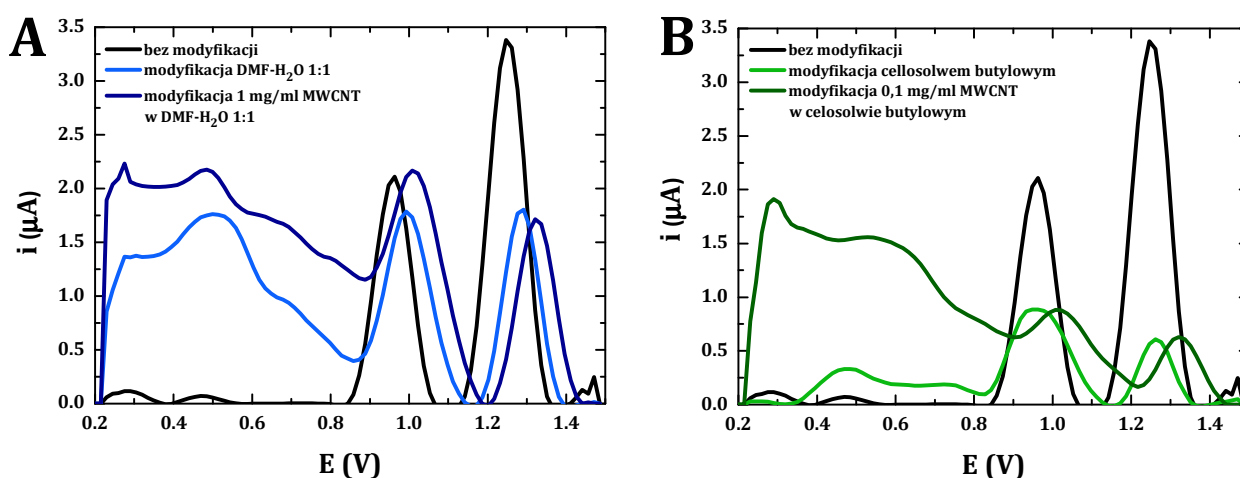


RYS. 144 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 0,1 mg/ml MWCNT w cellosolwie butylowym (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropione na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).

W przypadku modyfikacji elektrod zawiesiną 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF i wody w znaczący sposób wzrosła pojemność elektrod, a zmniejszyła się ich oporność, co objawia się wzrostem prądu ich linii podstawowych w porównaniu z elektrodami bez modyfikacji (linie ciągłe

vs. linie przerywane na RYS. 143A). W zakresie potencjałów $+0,4$ – $+0,8$ V widoczne są również szerokie sygnały pojemnościowe. Na voltamperogramach zarejestrowanych po osadzeniu na elektrodach DNA obecne są wyraźne piki utleniania guaniny i adeniny, występujące przy stałym potencjale odpowiednio $+1,007$ V i $+1,322$ V (RYS. 143B). Osiągają one wysokość rzędu 2–3 μ A. Niestety sygnały guaniny są nieco zmniejszone przez zmiany pojemnościowe wywołane modyfikacją MWCNT, a tym samym i ich wielkość może być zaburzona.

Sytuacja uległa pogorszeniu, gdy elektrody modyfikowane były zawiesiną 0,1 mg/ml nanorurek węglowych sporządzoną w cellosolwie butylowym. Prąd linii podstawowych ulegał podwyższeniu w mniejszym stopniu niż w poprzednim przypadku, lecz ze względu na zmiany pojemnościowe przybierały one odmienny kształt i ulegały znacznemu wypłaszczeniu (RYS. 144A). Rejestrowane sygnały utleniania zasad azotowych były niskie i bardzo niestabilne (RYS. 144B). Pod wpływem zmian pojemnościowych ulegały one silnym zaburzeniom, które uniemożliwiały odczytanie ich wysokości.



RYS. 145 – Porównanie voltamperogramów po korekcji linii podstawowej zarejestrowanych metodą SWV, prezentujących utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakroplonym na SPE-PL bez modyfikacji oraz modyfikowane: A – mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT, B – cellosolwem butylowym oraz sporządzoną w nim zawiesiną 0,1 mg/ml MWCNT.

Porównując sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej bez żadnych modyfikacji, modyfikowanych poszczególnymi rozpuszczalnikami oraz sporządzonymi w nich zawiesinami wielościennych nanorurek węglowych, można dostrzec, iż nakroplenie tych substancji na powierzchnię elektrody pracującej nie powoduje oczekiwanego wzrostu wysokości sygnałów oraz poprawy parametrów pomiarowych takich jak czułość czy precyzja (RYS. 145). Przy zastosowaniu mieszaniny DMF i wody w stosunku 1:1 oraz sporządzonej w niej zawiesiny MWCNT piki guaniny osiągają podobną wysokość, około 2 μ A, jak w przypadku pomiarów na elektrodach niemodyfikowanych (RYS. 145A). Najniższe sygnały G występują dla elektrod modyfikowanych samym rozpuszczalnikiem (Tabela 10), a spadek ten jest istotny ze statystycznego punktu widzenia (Załącznik 4). Najwyższe sygnały G, odznaczające się jednocześnie najmniejszym rozrzutem, zarejestrowano przy modyfikacji MWCNT, lecz różnice te nie są istotne statystycznie w porównaniu ze standardowymi czujnikami (Załącznik 5). Prąd utleniania adeniny dla elektrod niepoddanych procesom modyfikacyjnym, na których jego wartość przekracza 3 μ A, jest blisko półtora raza wyższy w stosunku do pozostałych czujników (RYS. 145A) i różnice te są istotne statystycznie (Załącznik 4 i Załącznik 5). Sygnały A zarejestrowane na elektrodach modyfikowanych odznaczają się również wyższym względnym odchyleniem standardowym, które w przypadku nakroplonych MWCNT przekracza nawet wartość 30% (Tabela 10). Warto zwrócić uwagę na przesunięcie sygnałów utlenienia zasad azotowych w stronę potencjałów dodatnich (RYS. 145A). W stosunku do elektrod wyjściowych pik G po modyfikacji nanorurkami przesuwa się o ok. 45 mV, zaś pik A o ok. 75 mV. W połączeniu z niższymi niż oczekiwane wartościami prądów

sugerowałyoby to gorszą adsorpcję DNA na elektrodach modyfikowanych i/lub utrudnienie samego procesu elektrotleniania kwasu.

TABELA 10 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.

		wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na elektrodach SPE-PL		
		bez modyfikacji	modyfikacja DMF-H ₂ O 1:1	modyfikacja 1 mg/ml MWCNT w DMF-H ₂ O 1:1
G	wartość średnia [μA]	2,248	1,892	2,416
	SD [μA]	0,288	0,236	0,280
	RSD [%]	12,81	12,50	11,61
A	wartość średnia [μA]	3,191	1,972	1,740
	SD [μA]	0,412	0,288	0,602
	RSD [%]	12,91	14,59	34,61

Kiedy do modyfikacji elektrody stosowany był cellosolv butylowy lub sporządzona w nim zawiesina MWCNT, rejestrowane sygnały utlenienia guaniny i adeniny były trudne do interpretacji ze względu na silne efekty pojemnościowe (RYS. 145B). Osiągały one odpowiednio dwa i siedem razy mniejsze wysokości w porównaniu z elektrodą niemodyfikowaną. Można dostrzec również ich przesunięcia na osi potencjału, lecz zmiany te sprawiają wrażenie przypadkowych. Cellosolv butylowy tak silnie wpływa na powierzchnię elektrod sitodrukowanych, wywołując efekty pojemnościowe, że praktycznie uniemożliwia to zarejestrowanie odseparowanych pików utlenienia zasad azotowych. W konsekwencji zupełnie wyklucza to stosowanie czujników modyfikowanych zawiesiną MWCNT w cellosolwie butylowym do pomiarów analitycznych.

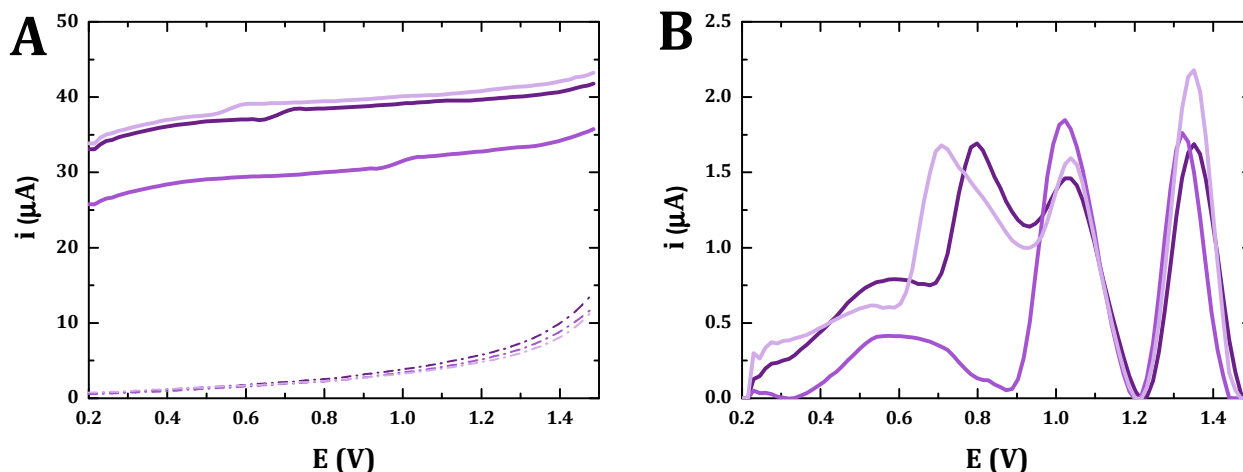
W związku z przedstawionymi powyżej wynikami pomiarów, w dalszych eksperymentach do modyfikacji SPE-PL używana była jedynie zawiesina 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF i wody w stosunku 1:1, mimo iż nie wykazała ona oczekiwanego wzmocnienia sygnałów prądowych. Spośród wszystkich przebadanych rozpuszczalników jedynie ten pozwalał na sporządzenie jednorodnej zawiesiny nanorurek i jednocześnie jego wpływ na elektrodę nie był na tyle duży, by uniemożliwić monitorowanie sygnałów redoks DNA.

4.2.2.3. Modyfikacja nanorurkami węglowymi różnych rodzajów elektrod sitodrukowanych

Ze względu na to, iż modyfikacja SPE-PL wielościennymi nanorurkami węglowymi nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, pojawiła się wątpliwość co do właściwości posiadanych MWCNT. W związku z tym postanowiłam sprawdzić, jaki wpływ wywołają one w przypadku innego typu elektrod sitodrukowanych. Wybór padł na dostępne komercyjnie trójelektrodowe układy sitodrukowane produkcji włoskiej (RYS. 129A-a i B). Zbadany został wpływ ich modyfikacji zawiesiną MWCNT o stężeniu 1 mg/ml sporządzoną w mieszaninie DMF-H₂O w stosunku 1:1 na sygnały utleniania osadzonego na nich dsDNA-ss. Pomiaru prowadzone były zgodnie z procedurą VI, a uzyskane wyniki porównano z sygnałami zarejestrowanymi na SPE-IT z pominięciem etapu modyfikacji (punkty 3-5 procedury pomiarowej).

Nakroplenie zawiesiny MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1 na elektrody włoskie, podobnie jak to miało miejsce dla elektrod polskich, spowodowało zdecydowany wzrost prądu ich

linii podstawowych (RYS. 146A). Pojawiły się na nich także niewielkie zmiany pojemnościowe, które miały negatywny wpływ na sygnał utlenienia guaniny zarejestrowany po osadzeniu DNA, powodując jego deformację (RYS. 146B). Piki utleniania zasad azotowych osiągały wysokość około 1,5–2 μA i pojawiały się przy potencjale +1,052 V w przypadku guaniny i +1,351 V w przypadku adeniny. W zakresie potencjałów od +0,4 do +0,9 V na voltamperogramach widoczne były niestabilne sygnały pojemnościowe.

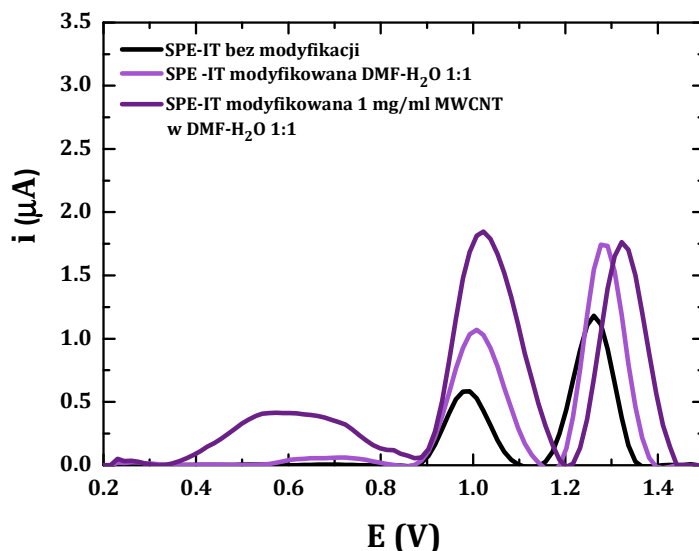


RYS. 146 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji włoskiej, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropleniu zawiesiny 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakroplonego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).

Sygnały zasad azotowych zarejestrowane na SPE-IT po ich modyfikacjach były wyższe niż dla czujników standardowych (RYS. 147) i wzrost ten był istotny statystycznie (Załącznik 6 i Załącznik 7). Zarówno w przypadku guaniny, jak i adeniny prądy ich utlenienia osiągały najwyższe wartości, bliskie 2 μA , gdy w układzie obecne były nanorurki węglowe. Niestety jednocześnie odznaczały się one stosunkowo wysokim względnym odchyleniem standardowym, sięgającym nawet 20% (Tabela 11). Modyfikacja elektrod mieszaniną DMF i wody oraz sporządzoną w niej zawiesiną MWCNT wpływała na potencjał utleniania zasad azotowych, który ulegał przesunięciu w stronę wartości dodatnich (RYS. 147). W obecności nanorurek pik guaniny przesunął się o około 74 mV, a adeniny o około 100 mV. Przyczyny tego można doszukiwać się w zmianie właściwości materiału elektrodowego lub oddziaływaniu DNA ze strukturami węglowymi.

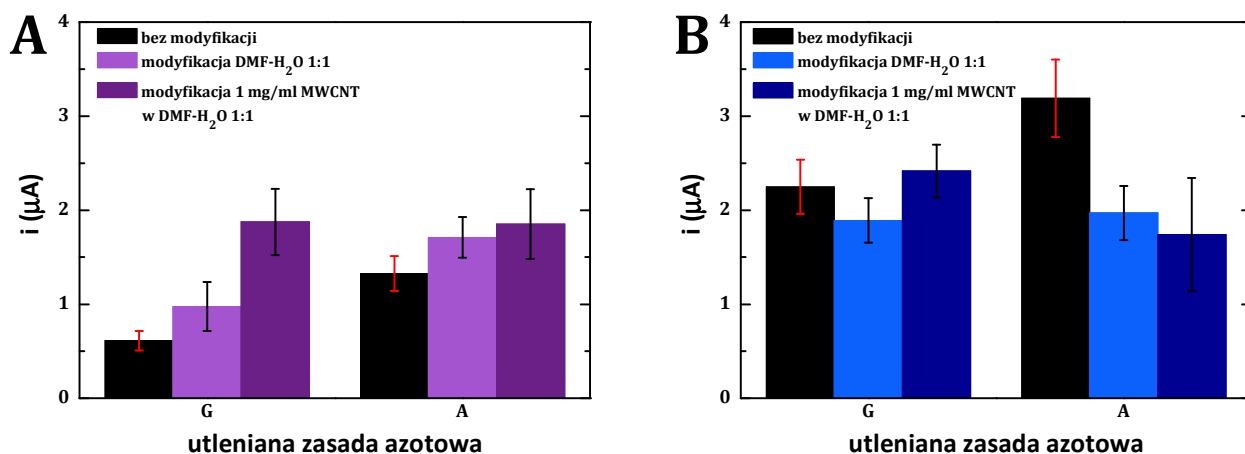
TABELA 11 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji włoskiej bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.

wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na elektrodach SPE-IT				
		bez modyfikacji	modyfikacja DMF-H ₂ O 1:1	modyfikacja 1 mg/ml MWCNT w DMF-H ₂ O 1:1
G	wartość średnia [μA]	0,612	0,975	1,874
	SD [μA]	0,105	0,261	0,353
	RSD [%]	17,09	26,79	18,84
A	wartość średnia [μA]	1,326	1,710	1,852
	SD [μA]	0,187	0,217	0,372
	RSD [%]	14,07	12,69	20,06



RYS. 147 – Porównanie voltamperogramów po korekcji linii podstawowej zarejestrowanych metodą SWV, prezentujących utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakroplonym na SPE-IT bez modyfikacji, modyfikowane mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.

Porównując dwa modele elektrod, SPE-IT i SPE-PL, modyfikowanych wielościennymi nanorurkami węglowymi, oczekiwany wynik poprawy wysokości sygnałów prądowych w stosunku do czujników bez modyfikacji uzyskano dla układów produkcji włoskiej (RYS. 148A). Na podstawie diagramu można zauważyć, iż już modyfikacja samą mieszaniną DMF i wody powoduje wzrost prądów utlenienia guaniny i adeniny, a efekt ten zostaje jeszcze wzmocniony w obecności MWCNT. Z żadnym z tych efektów nie mamy do czynienia w przypadku modyfikacji elektrod polskich. Tutaj rezultat jest odwrotny i to czujniki niemodyfikowane gwarantują rejestrację najwyższych sygnałów (RYS. 148B). Co więcej pozbawione modyfikacji SPE-PL pozwalają uzyskać piki zdecydowanie wyższe niż SPE-IT z naniesioną warstwą nanorurek węglowych. Jest to dość zaskakujący wynik, gdyż wydawałoby się, że ze względu na taki sam materiał elektrodowy oba układy powinny zachowywać się podobnie. Zaistniała sytuacja pozwala przypuszczać, że jednak pasty grafitowe tworzące obie elektrody pracujące mogą różnić się składem i właściwościami. Pomijając fakt, że układy polskie charakteryzuje dużo większe przewodnictwo i/lub powierzchnia aktywna elektrycznie, być może powierzchnia SPE-IT jest bardziej podatna na osadzanie na niej nanorurek węglowych i stąd polepszenie parametrów pomiarowych. Uzyskane wyniki eksperymentów rozwiązały jednak wątpliwości dotyczące właściwości stosowanych nanorurek węglowych, pokazując jednoznacznie, iż zastosowanie ich do modyfikacji elektrody może prowadzić do wzrostu jej przewodnictwa i powierzchni aktywnej.



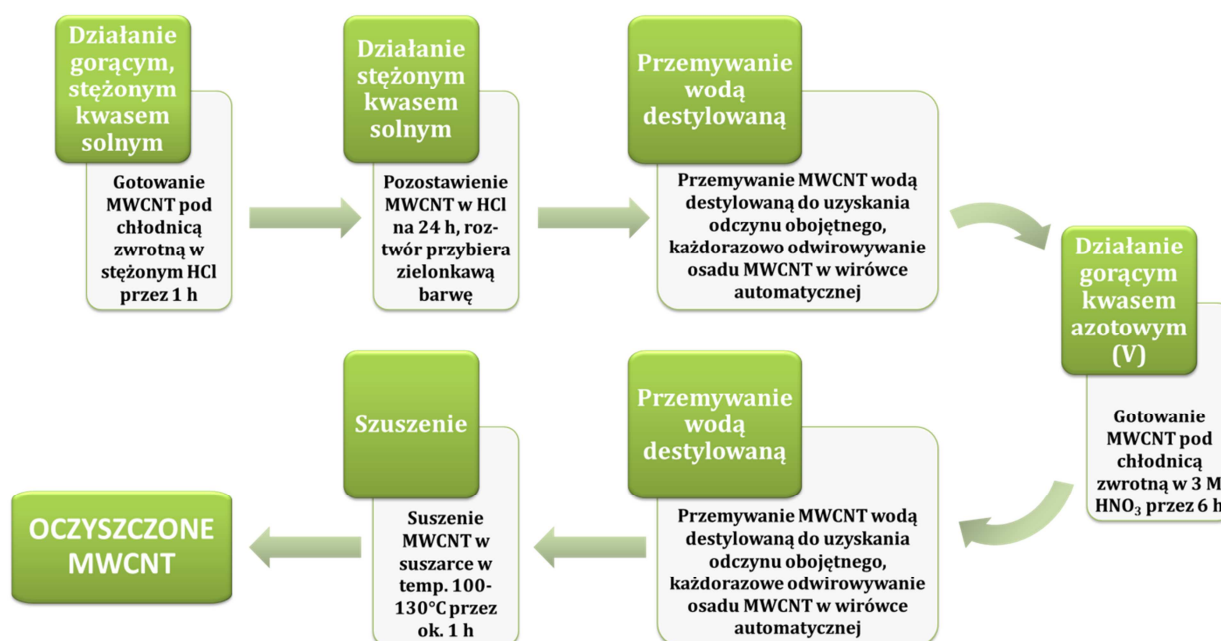
RYS. 148 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia G i A zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na: A – SPE-IT, B – SPE-PL, bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.

4.2.2.4. Wpływ czyszczenia nanorurek węglowych na ich właściwości elektryczne

Po uzyskaniu dowodu, że stosowane nanorurki węglowe wykazują właściwości wpływające na poprawę parametrów pomiarowych elektrod sitodrukowanych, podjęta została próba oczyszczenia struktur węglowych. Nadzieje wiązane były głównie z wyeliminowaniem efektów pojemnościowych i niezidentyfikowanych sygnałów zakłócających monitorowane prądy utleniania DNA.

Mimo iż według danych producenta czystość stosowanych nanorurek węglowych wynosiła 95%, mogą one zawierać liczne substancje zanieczyszczające, a wśród nich między innymi węgiel amorficzny, fulereny, resztki katalizatorów metalicznych, stanowiące pozostałości po procesie syntezy [426, 432, 439]. Obecność tych substancji może znacząco wpływać na właściwości MWCNT, a tym samym ograniczać ich wpływ na poprawę parametrów pomiarowych modyfikowanych elektrod. Dlatego też dąży się do eliminacji tych pozostałości, stosując metody czyszczenia oparte głównie na długotrwałym gotowaniu nanorurek w gorących, stężonych kwasach (azotowym (V) lub solnym) [337, 375, 450, 456, 459]. Takie działanie prowadzi także do utworzenia wielu tlenowych grup funkcyjnych na strukturach węglowych, a to może wpływać na zmianę ich właściwości przewodzących i sprzyjać lepszej adsorpcji DNA na ich powierzchni.

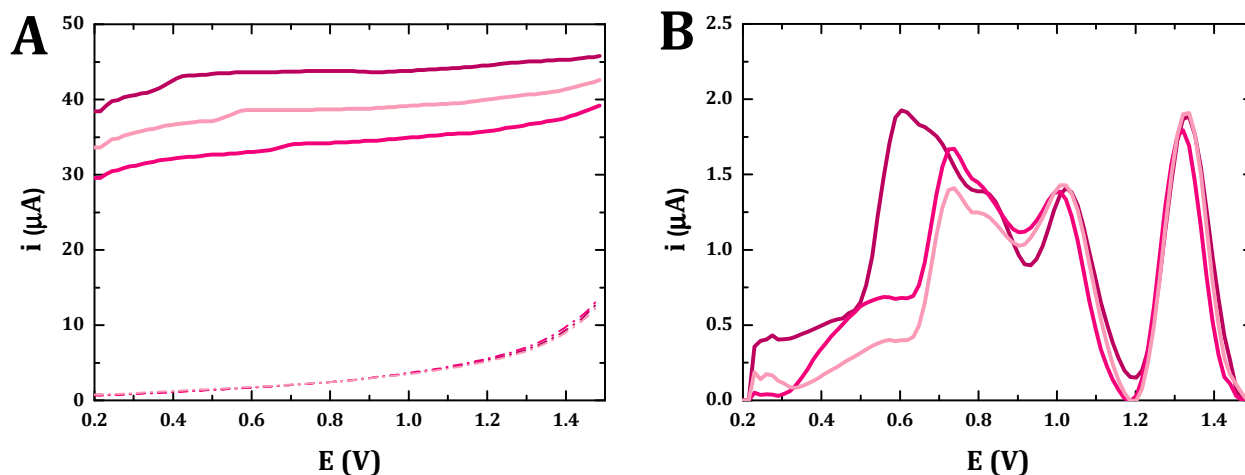
Zastosowana przeze mnie procedura oczyszczania nanorurek węglowych polegała na poddawaniu ich działaniu gorącego, stężonego kwasu solnego i azotowego (V). Składała się z kilku czasochłonnych etapów, a jej szczegółowy przebieg przedstawiony został na poniższym schemacie (RYS. 149). Po oczyszczeniu i dokładnym wysuszeniu MWCNT, sporządzona została ich zawiesina o stężeniu 1 mg/ml w mieszaninie DMF i wody w stosunku 1:1. Podobnie jak w przypadku nanorurek nieoczyszczonych, tak i tutaj struktury węglowe ulegały jednorodnemu rozproszeniu. Kluczowym punktem tej części eksperymentów była modyfikacja elektrod sitodrukowanych produkcji włoskiej zawiesiną oczyszczonych MWCNT i zbadanie wpływu oczyszczania na wysokość rejestrowanych na nich sygnałów prądowych utleniania zasad azotowych. Pomiar prowadzone były zgodnie z procedurą VI, a uzyskane wyniki porównano z sygnałami zarejestrowanymi na SPE-IT modyfikowanymi nanorurkami nieoczyszczonymi.



RYS. 149 – Schemat procedury oczyszczania wielościennych nanorurek węglowych.

Elektrody produkcji włoskiej modyfikowane zawiesiną oczyszczonych nanorurek węglowych charakteryzowały się liniami podstawowymi o zdecydowanie podwyższonym prądzie w porównaniu z elektrodami w formie wyjściowej (linie ciągłe vs. linie przerywane na RYS. 150A).

Efekt ten był analogiczny do zarejestrowanego na SPE-IT i SPE-PL modyfikowanych nieoczyszczonymi MWCNT, lecz tutaj pojawiały się wyższe nierówności na krzywych, prawdopodobnie związane ze zmianami pojemnościowymi. Monitorowane sygnały utlenienia DNA osadzonego na elektrodach występowały przy potencjałach +1,022 V oraz +1,337 V i osiągały wysokość około 1,3 μA oraz 1,8 μA , odpowiednio dla guaniny i adeniny (RYS. 150B). O ile pik A był smukły i jego interpretacja nie stanowiła najmniejszego problemu, o tyle pik G był mocno zniekształcony od strony potencjałów ujemnych ze względu na pojawianie się na woltamperogramach szerokich sygnałów o nieznanym do końca pochodzeniu w zakresie potencjałów +0,3–+0,9 V.



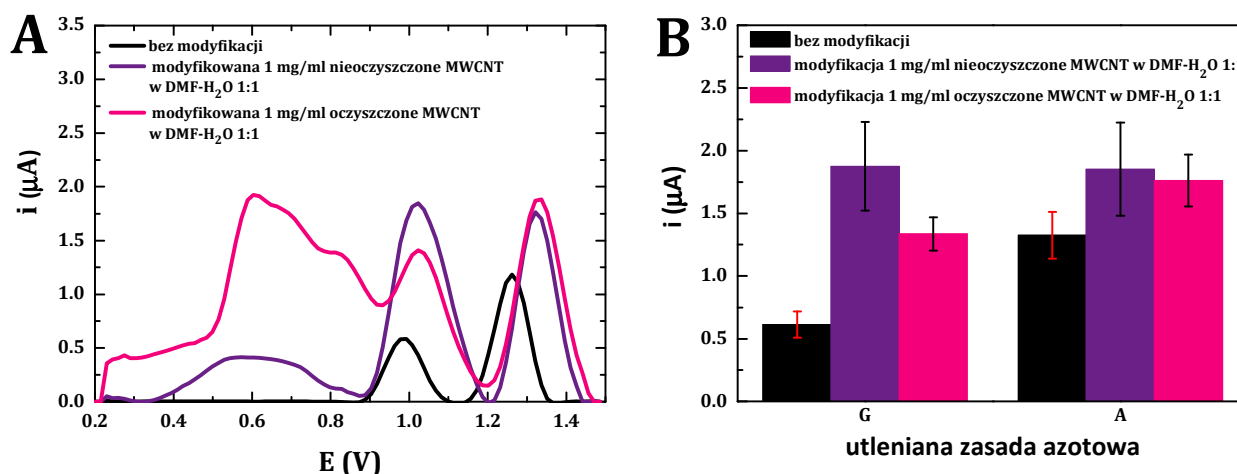
RYS. 150 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji włoskiej, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropleniu zawiesiny 1 mg/ml oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakroplonego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).

TABELA 12 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji włoskiej bez modyfikacji oraz modyfikowanych zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych lub oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1.

wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na elektrodach SPE-IT				
		bez modyfikacji	modyfikacja 1 mg/ml nieoczyszczonych MWCNT w DMF-H ₂ O 1:1	modyfikacja 1 mg/ml oczyszczonych MWCNT w DMF-H ₂ O 1:1
G	wartość średnia [μA]	0,612	1,874	1,335
	SD [μA]	0,105	0,353	0,133
	RSD [%]	17,09	18,84	9,98
A	wartość średnia [μA]	1,326	1,852	1,763
	SD [μA]	0,187	0,372	0,207
	RSD [%]	14,07	20,06	11,74

Sygnały utlenienia zasad azotowych zarejestrowane na elektrodach modyfikowanych nanorurkami oczyszczonymi były wyższe niż na elektrodach bez modyfikacji (Tabela 12 i RYS. 151). Porównując je jednak z wynikami dla elektrod z osadzonymi nanorurkami nieoczyszczonymi, widać, iż w przypadku adeniny sygnały te są porównywalne, a dla guaniny MWCNT nieoczyszczone zapewniają przepływ wyższego prądu podczas jej utlenienia, przy czym różnica ta jest istotna statystycznie (Załącznik 8). Mimo braku poprawy wielkości sygnałów rejestrowanych w obecności nanorurek oczyszczonych, pomiary wykonane na modyfikowanych nimi elektrodach są bardziej

powtarzalne, a tym samym odznaczają się zdecydowanie niższymi wartościami względnego odchylenia standardowego zarówno w stosunku do elektrod pokrytych nieoczyszczonymi MWCNT, jak i czujników niemodyfikowanych (Tabela 12). Warto zwrócić również uwagę, iż oczyszczone struktury węglowe powodują mniejsze przesunięcie pików G i A w stronę potencjałów dodatnich niż struktury nieoczyszczone, a sygnały pojawiają się przy potencjałach niższych o około 25–30 mV.



RYS. 151 – A – porównanie voltamperogramów po korekcji linii podstawowej, B – wykres zależności średnich sygnałów prądowych, zarejestrowanych metodą SWV dla utleniania guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakroplonym na SPE-IT bez modyfikacji oraz modyfikowane zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych lub oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1.

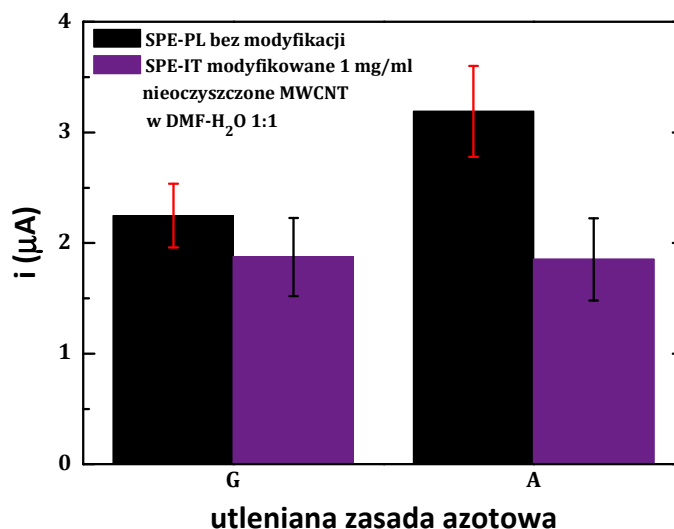
Podsumowując tę część eksperymentów, należy stwierdzić, że oczyszczanie wielościennych nanorurek węglowych nie przyniosło spodziewanych efektów poprawy ich właściwości elektrycznych, prowadzących do zwiększenia sygnałów prądowych DNA rejestrowanych na modyfikowanych nimi elektrodach sitodrukowanych produkcji włoskiej. Dużo lepszy efekt uzyskano przy zastosowaniu zawiesiny MWCNT nieoczyszczonych, które mogą zawierać pozostałości węgla amorficznego oraz katalizatorów metalicznych stosowanych w procesie syntezy. Być może to właśnie obecność metali jest odpowiedzialna za lepsze właściwości nanorurek nieoczyszczonych w porównaniu z oczyszczonymi, gdyż mogą one wykazywać działanie katalityczne wobec procesu utleniania zasad azotowych DNA.

4.2.2.5. Wnioski

Modyfikacja nanorurkami węglowymi elektrod sitodrukowanych przez nakropienie jest skuteczną metodą osadzania struktur węglowych na ich powierzchni. Wymaga jednak dobrania zawiesiny CNT sporządzonej w takim rozpuszczalniku, który będzie wywierał jak najmniejszy wpływ na powierzchnię elektrody pracującej i nie będzie wywoływał poważnych zmian pojemnościowych. Warunki te spełnia zawiesina MWCNT o stężeniu 1 mg/ml sporządzona w mieszaninie DMF i wody w stosunku 1:1. W jej obecności rejestrowane są wyraźne sygnały utlenienia guaniny i adeniny, których identyfikacja nie następuje większych problemów, choć sygnał guaniny jest często zniekształcony przez niezidentyfikowane sygnały pojawiające się przy niższych potencjałach.

Wpływ modyfikacji elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi zależny był od typu użytych elektrod sitodrukowanych. Choć oba zastosowane układy były skonstruowane w podobny sposób i tworzone przez analogiczne materiały elektrodowe, to modyfikacja MWCNT poprawiała właściwości pomiarowe jedynie układów produkcji włoskiej, prowadząc do podwyższenia sygnałów utlenienia DNA. Wpływ na elektrody polskie był odwrotny. Dalszego wzrostu wysokości pików G i A, rejestrowanych na SPE-IT modyfikowanych strukturami

węglowymi nie spowodowało zastosowanie nanorurek oczyszczonych chemicznie, co świadczy o tym, że nie jest to dobra metoda poprawy ich właściwości elektrycznych. Ponadto, w większości przypadków sygnały zasad azotowych rejestrowane na elektrodach modyfikowanych MWCNT charakteryzowały się słabą powtarzalnością. Odpowiedzialna za to może być niedostateczna jednorodność zawiesiny nanorurek węglowych. Nakroplenie takiej zawiesiny prowadzi do osadzenia różnej ilości MWCNT na poszczególnych elektrodach, przez co wzrost ich przewodnictwa nie jest jednakowy.



RYS. 152 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na SPE-PL, bez modyfikacji oraz SPE-IT modyfikowanych zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1.

Podsumowując, najwyższe sygnały utlenienia zasad azotowych udało się zarejestrować dla układów SPE-IT w przypadku modyfikacji zawiesiną nieoczyszczonych nanorurek węglowych, a dla układów SPE-PL bez modyfikacji. Porównując wielkości pików, widać, iż znacznie wyższe wartości natężenia prądu, obciążone mniejszym błędem, rejestrowane są dla niemodyfikowanych układów produkcji polskiej (RYS. 152). Różnice te są istotne ze statystycznego punktu widzenia dla sygnałów utlenienia obu zasad (Załącznik 9). Prowadzi to do jednoznacznego wniosku, że najlepszym z dotychczas przebadanych narzędziem do konstrukcji elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA są polskie układy sitodrukowane niemodyfikowane wielościennymi nanorurkami węglowymi.

4.2.3. Nanorurki węglowe jako składnik pasty grafitowej do sitodruku

Inną metodą modyfikowania elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi jest wzbogacanie nimi tuszów grafitowych stosowanych do sitodruku. Jest to procedura bardziej skomplikowana, bo wymaga wprowadzenia CNT do materiału elektrodowego już na etapie wytwarzania elektrod. Z tego względu niewiele jest doniesień literaturowych o samodzielnym przygotowywaniu takich czujników [451], a stosunkowo niedawno pojawiły się komercyjnie dostępne układy sitodrukowane, w których elektroda pracująca jest od razu modyfikowana przez producenta nanorurkami węglowymi [473, 476].

Ze względu na ścisłą współpracę z dr Selimem Achmatowiczem z Zakładu Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie, który wraz ze współpracownikami zajmuje się wytwarzaniem polskich układów sitodrukowanych a wspólnie staramy się je udoskonalać, możliwe było skonstruowanie SPE-PL, w których do nadruku warstwy grafitowej stosowana była pasta z dodatkiem zawiesiny nanorurek węglowych. Mimo iż wyniki poprzednich eksperymentów wskazywały, że cellosolv butylowy jest rozpuszczalnikiem

wywołującym negatywny wpływ na powierzchnię elektrod przy bezpośrednim nakropieniu, to zawiesina MWCNT w tym rozpuszczalniku została wybrana jako dodatek do tuszu sitodrukowego. Przemawiał za tym najmniejszy stopień agregacji w nim nanorurek oraz możliwość wykorzystania go w połączeniu z żywicami stosowanymi przy produkcji elektrod, gdzie jest on stosowany jako rozpuszczalnik.

4.2.3.1. Procedura pomiarowa

Zawiesina, która miała być dodana do sitodrukowej pasty grafitowej, musiała zawierać możliwie dużą ilość nanorurek węglowych, a jednocześnie charakteryzować się odpowiednią, nie za gęstą konsystencją. Należało przy jak najmniejszym dodatku wprowadzić do układu jak największą ilość nanorurek, nie pogarszając jednocześnie warunków nadrukowywania warstwy i przyczepności tuszu do podłoża. Przygotowanie docelowej zawiesiny odbywało się etapami, poprzez stopniowe dodawanie rozpuszczalnika i sonikację:

- 1) do 100 mg MWCNT dodano 1 ml cellosolwu butylowego, otrzymując mieszaninę o stężeniu 100 mg/ml w postaci „papki”, którą poddawano działaniu ultradźwięków przez 2 godziny 10 minut,
- 2) otrzymaną mieszaninę rozcieńczono 1 ml cellosolwu butylowego do stężenia 50 mg/ml i poddano sonikacji przez 4 godziny,
- 3) dodano kolejną porcję 2 ml rozpuszczalnika i zastosowano 3-godziną sonikację, co w rezultacie doprowadziło do uzyskania jednorodnej zawiesiny 25 mg/ml MWCNT w cellosolwie butylowym.

Tak sporządzona zawiesina przekazana została do Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie, gdzie została następnie dodana w odpowiedniej proporcji do tuszu grafitowego i użyta do nadruku elektrod sitodrukowanych. W rezultacie przygotowane zostały układy sitodrukowane zawierające w warstwie grafitu 1% wielościennych nanorurek węglowych. Ich wygląd nie różnił się od standardowych SPE-PL.

Właściwości elektrod produkcji polskiej z MWCNT w warstwie grafitowej sprawdzana była standardowo poprzez monitorowanie sygnałów utlenienia osadzonego na nich DNA. Proces ten rozpoczynał się od elektrochemicznego oczyszczenia elektrod i zarejestrowania linii podstawowej. Następnie na elektrodzie unieruchamiany był kwas deoksyrybonukleinowy na drodze nakropienia (procedura VIIa) lub adsorpcji z roztworu przy stałym potencjale (procedura VIIb). Po wypłukaniu niezaadsorbowanych molekuł kwasu rejestrowano sygnały utlenienia guaniny i adeniny. Poszczególne etapy całej procedury przedstawione zostały poniżej (procedura VII). W celu oceny efektywności modyfikacji nanorurkami węglowymi prądy utlenienia zasad azotowych porównywane były z analogicznymi sygnałami zarejestrowanymi przy użyciu niemodyfikowanych SPE-PL.

Procedura VII

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne
 - 2) Rejestracja linii podstawowej
 - 3) Unieruchomienie DNA na powierzchni elektrody
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

Procedura VIIa

- nakropienie 2 μ l roztworu dsDNA-ss o stężeniu 20 ppm
- pozostawienie na 1 h do wyschnięcia na powietrzu

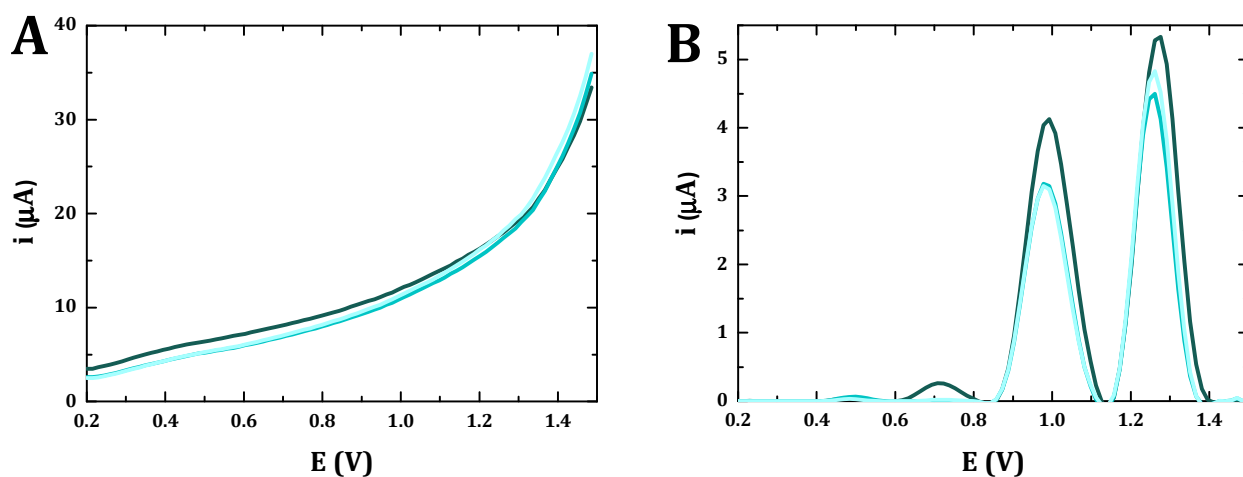
Procedura VIIb

- zanurzenie elektrody w roztworze 20 ppm dsDNA-ss w AcB-K
- przyłożenie potencjału +0,5 V przez 300s w warunkach mieszania roztworu

- 4) Płukanie elektrody }
 5) Pomiar } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

4.2.3.2. Wyniki

Linie podstawowe polskich elektrod sitodrukowanych z warstwą grafitową wzbogaconą 1% MWCNT charakteryzowały się kształtem i natężeniem prądu zbliżonym do zarejestrowanych dla elektrod bez modyfikacji. Były one gładkie, bez widocznych zmian pojemnościowych przetwornika, które występowały w przypadku wszystkich poprzednich procedur modyfikacji elektrod nanorurkami węglowymi (RYS. 153A). Sprawiało to, iż bez względu na sposób immobilizacji DNA na powierzchni elektrod zarejestrowane sygnały utlenienia zasad azotowych były dobrze wykształcone, miały symetryczny kształt i nie zakłócały ich żadne niezidentyfikowane zaburzenia (RYS. 153B). Piki guaniny występowały przy potencjale +0,993 V w przypadku nakroplenia kwasu nukleinowego lub +0,978 V, gdy był on adsorbowany z roztworu przy stałym potencjale. Podobną różnicę w potencjałach pików można było zauważyć dla adeniny, której utlenianie zachodziło odpowiednio przy +1,262 V i +1,247 V. Wysokości omawianych sygnałów również zależały od sposobu unieruchamiania DNA na powierzchni elektrody. Wyższe wartości natężenia prądu reakcji redoks rejestrowane były przy nakropleniu materiału biologicznego. Przewyższały one piki pochodzące od zaadsorbowanego kwasu o 1 μA dla G i ok. 0,6 μA dla A (Tabela 13).



RYS. 153 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji polskiej zawierających 1% MWCNT w graficie, prezentujące: A – ich linie podstawowe (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie nakroplonego na nie dsDNA-ss (krzywe po korekcji linii podstawowej).

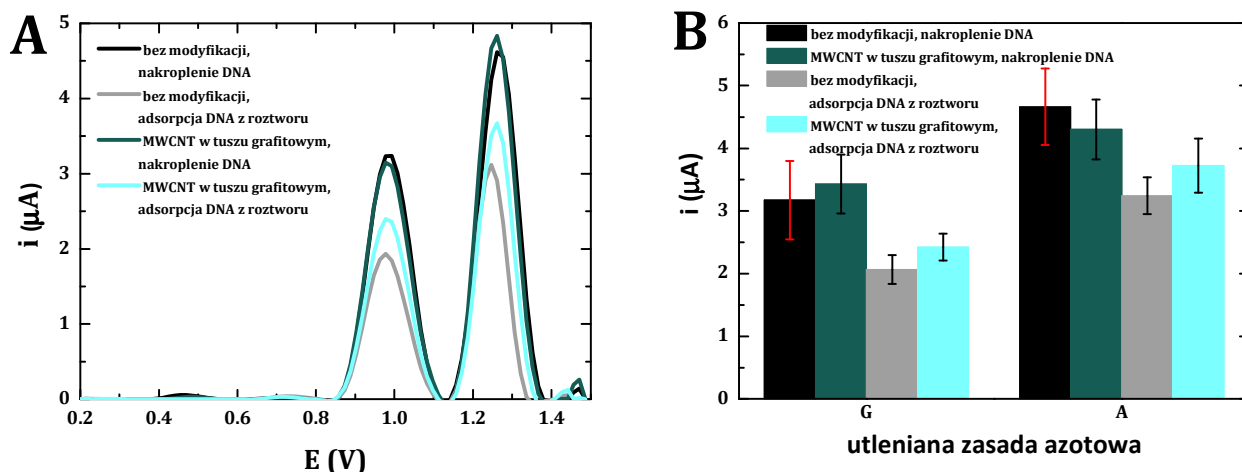
Sprawdzając, na ile dodanie MWCNT do pasty grafitowej wpływa na zmianę sygnałów utleniania zasad azotowych, porównano je z analogicznymi sygnałami zarejestrowanymi dla elektrod niemodyfikowanych. W przypadku poprzednich modyfikacji elektrod nanorurkami zawsze miało miejsce przesunięcie pików G i A w stronę bardziej dodatnich potencjałów, tutaj takie zjawisko nie wystąpiło. Obecność MWCNT w materiale elektrodowym nie spowodowała zmian pozycji sygnałów na osi potencjałów w przypadku obu metod unieruchomienia DNA (RYS. 154A). Bardzo wyraźnie widać jednak, że to, czy nanorurki wpływają na wielkość prądów utlenienia guaniny i adeniny, czy też nie, ściśle zależy od sposobu osadzenia DNA na powierzchni elektrody. W przypadku nakroplenia kwasu deoksyrybonukleinowego różnica ta była znikoma. Średnia wysokość sygnału guaniny była nieznacznie wyższa dla elektrod modyfikowanych, a w przypadku adeniny efekt ten był odwrotny (RYS. 154B i Tabela 13). Dla obu zasad różnice te nie były jednak istotne ze statystycznego punktu widzenia (Załącznik 10). Inaczej było, gdy DNA immobilizowane było na przetworniku na drodze adsorpcji z roztworu przy stałym potencjale. Wówczas

rejestrowane piki G i A były zdecydowanie niższe, ale ich wysokość zależała od obecności nanorurek w układzie. Oba sygnały ulegały wzrostowi, gdy były rejestrowane na elektrodach zawierających MWCNT w warstwie grafitowej (RYS. 154B i Tabela 13), lecz jedynie dla guaniny była to zmiana istotna statystycznie (Załącznik 11).

Sposób unieruchamiania DNA na elektrodzie miał także wpływ na powtarzalność rejestrowanych sygnałów. Wartości względnego odchylenia standardowego były wyższe przy nakrapianiu kwasu nukleinowego na przetwornik niż przy adsorpcji z roztworu. Przy unieruchamianiu DNA na drodze adsorpcji z roztworu wartości RSD dla obu typów elektrod były porównywalne i wynosiły około 10% (Tabela 13).

TABELA 13 - Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss nakropionego lub zaadsorbowanego z roztworu na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej bez modyfikacji oraz zawierających 1% MWCNT w warstwie grafitowej.

		wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na elektrodach SPE-PL zawierających 1% MWCNT w tuszu grafitowym		wysokość sygnałów utlenienia zasad azotowych zarejestrowanych na elektrodach SPE-PL niemodyfikowanych	
		nakropienie DNA na elektrodę	adsorpcja DNA z roztworu	nakropienie DNA na elektrodę	adsorpcja DNA z roztworu
G	wartość średnia [μA]	3.432	2.423	3.172	2.068
	SD [μA]	0.471	0.215	0.627	0.228
	RSD [%]	13.73	8.86	19.76	11.04
A	wartość średnia [μA]	4.303	3.723	4.660	3.244
	SD [μA]	0.476	0.431	0.610	0.294
	RSD [%]	11.07	11.59	13.09	9.05



RYS. 154 - A - porównanie voltamperogramów po korekcji linii podstawowej, B - wykres zależności średnich sygnałów prądowych, zarejestrowanych metodą SWV dla utleniania guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakropionym lub zaadsorbowanym z roztworu na SPE-PL bez modyfikacji oraz zawierających 1% MWCNT w warstwie grafitowej.

4.2.3.3. Wnioski

Wzbogacenie wielościennymi nanorurkami węglowymi pasty grafitowej, przy użyciu której nadrukowane zostały układy sitodrukowane, okazało się skuteczną metodą modyfikacji elektrod. Tego typu modyfikacja nie powoduje zniekształcenia linii podstawowych elektrod i pozwala na rejestrację wyraźnych sygnałów utleniania zasad azotowych, a przy zastosowaniu unieruchomienia

DNA na drodze adsorpcji z roztworu przy stałym potencjale powoduje ich podwyższenie. Wpływ nanorurek węglowych na wielkość prądów utleniania DNA jest zależny od sposobu immobilizacji materiału biologicznego i występuje jedynie w przypadku adsorpcji z roztworu. Sugeruje to, iż nanorurki węglowe nie wywierają efektu katalitycznego na sam proces redoks DNA, gdyż występowałyby on wówczas dla obu metod unieruchamiania. MWCNT intensyfikują elektroadsorpcję DNA, co wskazywałoby, że usprawniają one towarzyszący im przepływ elektronów i zwiększają powierzchnię aktywną elektrody. Dzięki temu więcej molekuł kwasu może zostać osadzona na przetworniku, a tym samym więcej molekuł ulega utlenieniu w kolejnym etapie, czego rezultatem jest wzrost sygnałów prądowych. Taki efekt nie występuje w przypadku nakroplenia DNA na elektrodę, ponieważ osadzanie kwasu nie jest związane tu z procesem elektrolizy i przepływem elektronów. W związku z tym bez względu na to, czy w warstwie grafitowej obecne są nanorurki węglowe, czy też nie, piki utlenienia guaniny i adeniny osiągają podobne wysokości.

Chociaż prąd utlenienia zasad azotowych rejestrowany na elektrodach wzbogaconych MWCNT jest wyższy niż w przypadku elektrod bez modyfikacji, to różnice te są niewielkie. Jak powszechnie wiadomo, nanorurki węglowe o dużej czystości są dość drogie. Dokonując więc bilansu zysków i kosztów, okazuje się, że inwestowanie znacznych środków finansowych nie ma przełożenia na wymierne korzyści analityczne. Z tego też względu podjęta została decyzja o stosowaniu w dalszych pomiarach polskich elektrod sitodrukowanych w formie standardowej.

Mogłoby się wydawać, iż lepszą metodą unieruchomienia DNA na powierzchni elektrody jest nakroplenie niż adsorpcja z roztworu, ponieważ prowadzi ona do zarejestrowania wyższych sygnałów utlenienia zasad azotowych, co świadczy o osadzeniu większej liczby cząsteczek kwasu. Jednocześnie jednak wyniki te odznaczają się większym rozrzutem. Czas adsorpcji z roztworu (5 minut) jest nieporównywalnie krótszy od procedury nakroplenia i suszenia elektrody (60 minut). W związku z tym lepszą metodą immobilizacji DNA na elektrodzie sitodrukowanej jest adsorpcja z roztworu przy stałym potencjale i ta metoda została wykorzystana w pozostałych eksperymentach. Jakkolwiek posiadając ograniczoną ilość materiału biologicznego, należy rozważyć metodę nakroplenia.

4.2.4. Podsumowanie

Na podstawie licznych publikacji w czasopismach naukowych można by sądzić, iż modyfikacja elektrod nanorurkami węglowymi jest zadaniem bardzo prostym. Jednak przeprowadzone przeze mnie eksperymenty pokazały, że wiąże się ono z pokonaniem wielu trudności, które rozpoczynają się już na etapie przygotowania jednorodnej zawiesiny nierozpuszczalnych, wykazujących skłonności do agregowania CNT. Dobierając odpowiedni rozpuszczalnik, trzeba mieć na uwadze także jego wpływ na powierzchnię elektrody pracującej oraz przy konstrukcji biocujników na osadzany na niej materiał biologiczny. Spośród przebadanych przeze mnie rozpuszczalników do sporządzenia zawiesiny wielościennych nanorurek węglowych wybrany został cellosolv butylowy oraz mieszanina DMF z wodą w stosunku 1:1.

Pierwszym zastosowanym przeze mnie sposobem modyfikacji elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi było nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię elektrody pracującej. Zawiesina MWCNT w cellosolwie butylowym okazała się nieużyteczna, gdyż powodowała poważne zmiany pojemnościowe elektrody, uniemożliwiając jednocześnie właściwą identyfikację pików utlenienia osadzonego na niej DNA. Lepsze rezultaty uzyskano w przypadku zawiesiny nanorurek w mieszaninie DMF-H₂O. Wówczas rejestrowane sygnały utlenienia guaniny i adeniny były wyraźne, lecz ich wzmocnienie w porównaniu z elektrodami niemodyfikowanymi miało miejsce jedynie dla elektrod produkcji włoskiej, podczas gdy na elektrodach produkcji polskiej ulegały one

obniżeniu. Warto zwrócić także uwagę, iż mimo wzrostu pików na SPE-IT modyfikowanych MWCNT i tak pozostawały one niższe niż na SPE-PL niemodyfikowanych oraz charakteryzowały się mniejszą powtarzalnością.

Alternatywną metodą modyfikacji elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi jest wzbogacenie nimi grafitowej pasty sitodrukowej i wykorzystanie jej do nadruku układów elektrodowych. Procedura taka została zastosowana przy wytwarzaniu elektrod produkcji polskiej. Do tuszu grafitowego dodano 1% MWCNT. Pozwoliło to wyeliminować, występujące przy nakropleniu zawiesiny nanorurek, pojemnościowe zmiany podwójnej warstwy elektrycznej wokół elektrody i zakłócenia na rejestrowanych woltamperogramach. Wpływ nanorurek węglowych na sygnały utlenienia zasad azotowych zależał od sposobu osadzania DNA. Przy nakropleniu modyfikacja nie powodowała wzrostu pików w porównaniu z elektrodami niemodyfikowanymi, zaś przy adsorpcji z roztworu przy stałym potencjale ulegały one niewielkiemu podwyższeniu i odznaczały się dużo mniejszym rozrzutem. Świadczy to o wpływie nanorurek węglowych na intensyfikację przepływu elektronów, towarzyszących procesom elektrolitycznym zachodzącym podczas adsorpcji DNA, a nie o ich katalitycznym działaniu na samą reakcję redoks.

Biorąc pod uwagę wyniki wszystkich przeprowadzonych eksperymentów, można stwierdzić, iż modyfikacja elektrod sitodrukowanych wielościennymi nanorurkami węglowymi poprzez ich dodatek do warstwy grafitowej jest bardziej efektywna niż nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię elektrody pracującej. W przypadku elektrod produkcji polskiej obecność MWCNT w warstwie elektrodowej skutkowała niezbyt dużym wzrostem prądu utlenienia osadzonego na nich DNA. Ostatecznie do dalszych eksperymentów wybrano elektrody produkcji polskiej bez modyfikacji ze względu na dość duży koszt zakupu MWCNT, nie przekładający się na znaczną poprawę parametrów pomiarowych elektrod modyfikowanych.

4.3. Badanie oddziaływań różnych rodzajów DNA z błękitem metylenowym (MB)

Choć błękit metylenowy jest dobrze znanym związkiem chemicznym, będącym przedmiotem wielu różnorodnych eksperymentów naukowych, to sposób jego oddziaływania z kwasem deoksyrybonukleinowym wciąż kryje wiele tajemnic. Wśród sposobów jego wiązania z DNA wymienia się oddziaływanie elektrostatyczne ze szkieletem cukrowo-fosforanowym helisy, interkalację, czy też wiązanie w rowkach [266, 267, 270]. Dokładniejsze poznanie natury tych interakcji jest bardzo istotne ze względu na liczne zastosowania analityczne MB, w tym do badania komplementarności dwóch łańcuchów DNA podczas procesu hybrydyzacji, wykrywania błędnie sparowanych zasad nukleinowych stanowiących mutacje genetyczne [274, 279, 293, 294, 299], detekcji sekwencji nukleotydowych określonych genów, np. *Microcystis* species [297] czy wirusa HBV [272, 477], oznaczania trombiny [478] i adenozyiny [479] za pomocą bioczuJNIKÓW DNA oraz określania niszczącego wpływu tlenu styrenu [268] i reaktywnych form tlenu [480] na DNA.

Mając na uwadze istotność zagadnienia, podjęłam próbę kompleksowej analizy elektrochemicznej oddziaływania błękitu metylenowego z DNA. Przedmiotem moich badań były różne rodzaje kwasu deoksyrybonukleinowego, w tym także plazmidy o różnych formach, które są rzadko spotykane w eksperymentach woltamperometrycznych. Zastosowane przeze mnie procedury pomiarowe również zawierały pewne elementy innowacyjne w porównaniu ze stosowanymi powszechnie.

4.3.1. Badanie trwałości błękitu metylenowego w roztworze

Molekuły błękitu metylenowego obdarzone są ładunkiem dodatnim, więc zmiana pH roztworu, w którym się one znajdują, ma wpływ na ich strukturę. Procedura zastosowana przeze mnie podczas badania oddziaływania błękitu metylenowego z DNA za pomocą sitodrukowanych układów elektrodowych wymagała długotrwałego przebywania MB w roztworze buforu octanowego o pH 4,75, więc należało sprawdzić, na ile stabilnie zachowują się w takich warunkach jego cząsteczki. Każda zmiana w ich strukturze może bowiem wywierać ogromny wpływ na sposób oddziaływania z łańcuchami DNA.

W celu sprawdzenia trwałości błękitu metylenowego w AcB-K zastosowałam technikę spektrofotometrii UV-Vis. W części literaturowej mojej pracy (rozdział I.2.1.1.3) opisane zostały właściwości spektralne MB, które objawiają się szerokim pasmem absorpcji w zakresie długości fali ok. 550–700 nm o wyraźnym maksimum przy ok. 663–665 nm i „ramieniu” ok. 610–640 nm oraz mniej intensywnymi sygnałami w zakresie od 240 do 350 nm. Warto przypomnieć również, iż spadek intensywności pasma przy długości fali ok. 663–665 nm i jednoczesny wzrost wysokości „ramienia” przy ok. 615 nm w obecności wyższych stężeń MB świadczy o występowaniu w układzie form dimerycznych i wyższych. Analizując zmiany w czasie intensywności pasma absorpcji różnych stężeń błękitu metylenowego w zakresie 550–700 nm, sprawdzono stabilność jego molekuł w roztworze AcB-K o pH 4,75. Sporządzone zostały także krzywe kalibracyjne, pozwalające określić zakres stężeń, w którym MB spełnia prawo Lamberta-Beera o proporcjonalności absorbancji do stężenia substancji absorbującej promieniowanie.

4.3.1.1. Procedura pomiarowa

Badanie trwałości błękitu metylenowego w roztworze o odczynie kwaśnym polegało na rejestrowaniu przez 2 godziny jego kolejnych widm absorpcyjnych w zakresie długości fali od 500 do 800 nm. Analizie poddano szeroki zakres stężeń MB, od 0,1 do 20 μM . Pomiar rozpoczynał się od

rejestracji widma ślepej próby, podczas której kuweta wypełniona była czystym AcB-K. Widmo to traktowane było jako tło i następnie odejmowane automatycznie od widm właściwych. W kolejnym etapie w celce pomiarowej umieszczana była kuweta wypełniona roztworem MB o danym stężeniu sporządzonym w AcB-K i co 10 minut rejestrowano kolejno 13 jego widm absorpcyjnych. Pomiaru prowadzone były zgodnie z następującymi parametrami:

- zakres długości fali: 500–800 nm
- interwał: 1,0 nm
- prędkość zmiany długości fali: 480 nm/min
- ilość cykli: 13
- czas cyklu pomiarowego: 600 s

Przygotowanie poszczególnych roztworów pomiarowych MB o określonym stężeniu i objętości 3 ml polegało na zmieszaniu w odpowiednich proporcjach przygotowanego wcześniej wodnego roztworu wyjściowego MB o stężeniu 1 mM i AcB-K zgodnie z poniższą tabelą (Tabela 20). Próbki przygotowywane były bezpośrednio przed każdym pomiarem i umieszczane w plastikowej kuwecie.

TABELA 14 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów błękitu metylenowego o określonym stężeniu.

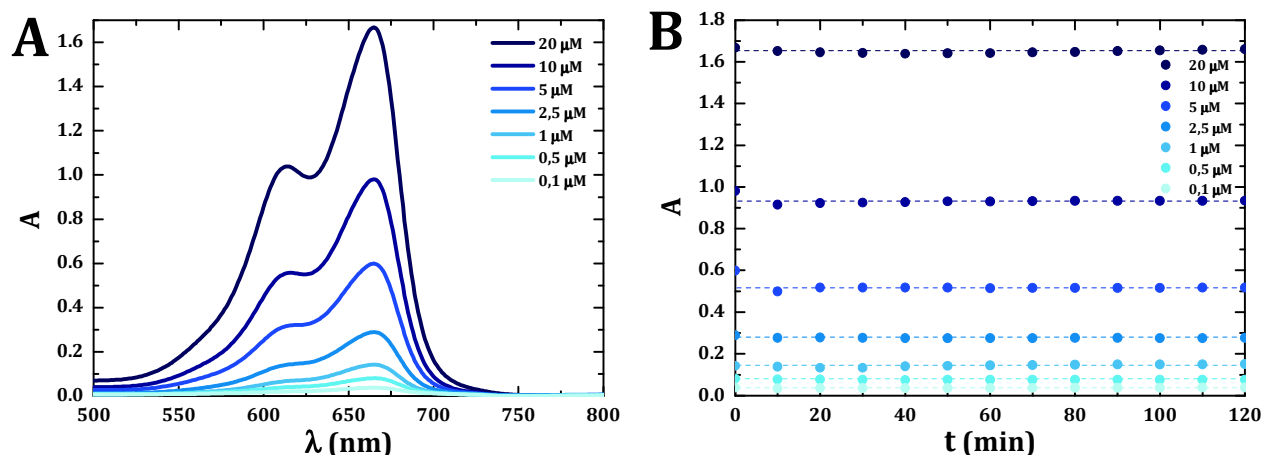
Stężenie roztworu pomiarowego MB [μM]	Objętość 1 mM roztworu MB [ml]	Objętość AcB-K [ml]
20	0,06	2,94
10	0,03	2,97
5	0,015	2,985
2,5	0,0075	2,9925
1	0,003	2,997
0,5	0,0015	2,9985
0,1	0,0003	2,9997

Na podstawie zarejestrowanych w tym eksperymencie widm zbadano stabilność w czasie pasm absorpcji promieniowania UV-Vis przez błękit metylenowy oraz zależność jego absorbancji od stężenia, co pozwoliło wyznaczyć krzywe kalibracyjne. Dzięki temu można było określić, czy struktura molekuł MB nie ulega zmianom pod wpływem warunków panujących podczas przeprowadzonej w kolejnym etapie analizie elektrochemicznej.

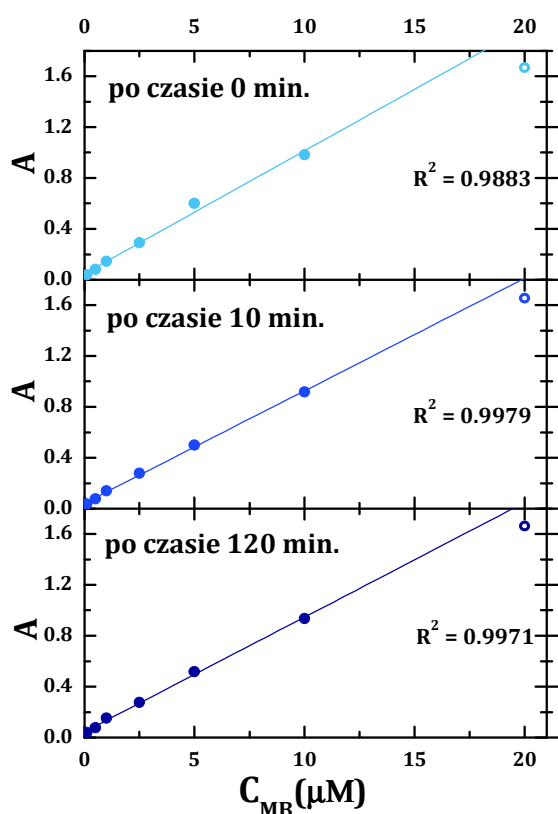
4.3.1.2. Wyniki

Na zarejestrowanych widmach błękitu metylenowego obecne było szerokie pasmo absorpcji w zakresie długości fali 550–700 nm, na którym widoczne były dwa wyraźne sygnały (RYS. 155A). Wyższy pojawiał się przy 665 nm i był dobrze widoczny w całym przebadanym zakresie stężeń. Kształt niższego natomiast zmieniał się w zależności od stężenia MB – powyżej 5 μM był dobrze wykształcony, w zakresie 1–5 μM stanowił jedynie „ramię” na zboczu głównego sygnału, zaś poniżej 1 μM zanikał zupełnie. Jego pozycja na osi długości fali nie była stabilna i od momentu pojawienia się na widmie wraz ze wzrostem stężenia MB jego maksimum przesuwało się w zakresie od 630 do 615 nm. Obecność tego niestabilnego sygnału może być wyrazem istnienia w roztworze oprócz pojedynczych cząsteczek błękitu metylenowego, także ich form dimerycznych lub nawet agregatów większej liczby molekuł. Przy takiej interpretacji nie jest zaskoczeniem, iż pasmo to uwidacznia się wraz ze wzrostem stężenia MB, gdyż wówczas przy większej liczbie cząsteczek w układzie jest większe prawdopodobieństwo tworzenia agregatów. Przy badaniu

trwałości molekuł błękitu metylenowego oraz wyznaczaniu krzywych kalibracyjnych uwaga skupiona została przede wszystkim na paśmie przy 665 nm, gdyż charakteryzowało się ono stabilnością i stosunkowo dużą intensywnością.



RYS. 155 – A – Widma UV-Vis błękitu metylenowego o różnych stężeniach w AcB-K zarejestrowane w roztworach od razu po ich sporządzeniu, B – Zmiany absorbancji przy długości fali 665 nm roztworów błękitu metylenowego o różnych stężeniach, sporządzonych w AcB-K, w czasie 120 minut.



RYS. 156 – Zależność absorbancji błękitu metylenowego w AcB-K przy długości fali 665 nm od jego stężenia, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu oraz po upływie 10 i 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.

Wartości absorbancji błękitu metylenowego przy 665 nm zarejestrowane dla zakresu stężeń 0,1–10 μM pozwoliły wykreślić krzywą kalibracyjną, która wskazuje na jej liniową zależność od stężenia (RYS. 156). Świadczą o tym wartości współczynnika korelacji R^2 , które wynosiły około 0,997. Jedynie w przypadku widm zarejestrowanych bezpośrednio po sporządzeniu roztworu współczynnik korelacji osiągał niższą wartość, co potwierdza wcześniejsze przypuszczenie o początkowym braku równowagi w układzie. Przy wyznaczaniu krzywych kalibracyjnych

Badanie intensywności pasma absorpcji przy długości fali 665 nm dla 7 stężeń MB, co 10 minut przez 2 godziny pozwoliło sprawdzić, na ile jest ono stabilne w czasie. Wszelkie zmiany absorbancji w czasie dla danego stężenia mają bezpośrednie przełożenie na przemiany strukturalne molekuł błękitu metylenowego wywołane ich długotrwałym przebywaniem w roztworze buforu o pH 4,75. Jak pokazują wyniki badań, absorpcja promieniowania UV-Vis przez błękit metylenowy bywała zaburzona jedynie podczas rejestracji pierwszego widma, tuż po sporządzeniu roztworu, a następnie dla każdego stężenia wartość absorbancji utrzymywała się praktycznie na stałym poziomie przez cały czas prowadzenia pomiaru (RYS. 155B). Dla stężenia 20 μM MB osiągała ona wysoką wartość 1,66, a dla niższych stężeń była proporcjonalnie niższa. Zaburzenia absorpcji na początku analizy danego stężenia wynikały najprawdopodobniej z niejednorodności roztworu i nieustalenia się w nim stanu równowagi. Już po 10 minutach problem ten zniknął. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż przebywanie w środowisku kwaśnym nie powoduje poważnych zmian strukturalnych w molekułach MB.

pominięty został punkt odpowiadający absorbancji 20 μM MB, gdyż wykazuje on odstępstwo od prawa absorpcji Lamberta-Beera. Przyczyn takiego stanu rzeczy należy doszukiwać się w dwojakiego rodzaju zaburzeniach. Po pierwsze, powyżej stężenia 5 μM MB zaczyna zachodzić proces dimeryzacji, którego intensywność wzrasta wraz z obecnością większej ilości molekuł błękitu w roztworze. Przy stężeniu 20 μM udział dimerów lub wyższych agregatów może być na tyle wysoki, że prowadzi do znacznego obniżenia pasma absorpcji przy 665 nm. Po drugie, wyższe stężenie MB przy jednocześnie dość wysokim stężeniu rozpuszczalnika powoduje zmniejszenie odległości pomiędzy molekułami, a to może powodować zaburzenia w rozkładzie ładunku w ich obrębie, prowadzące do osłabienia absorbancji. Jednak w rozpatrywanym przypadku pierwszy czynnik wydaje się mieć kluczowe znaczenie.

4.3.1.3. Wnioski

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że kwaśne środowisko buforu octanowego nie wpływa na trwałość molekuł błękitu metylenowego i w takich warunkach ich struktura nie ulega znaczącym zmianom. Przez cały czas trwania pomiarów absorbowały one promieniowanie UV-Vis na podobnym poziomie. MB wykazuje jednak tendencję do dimeryzacji. Jej pierwsze objawy pojawiają się już przy stężeniu 5 μM , lecz znaczący udział dimerów ma miejsce dopiero, gdy stężenie wzrasta do 20 μM . Jest to istotna informacja z punktu widzenia dalszych pomiarów zarówno elektroaktywności błękitu metylenowego, jak i jego oddziaływania z DNA. Aby uniknąć wpływu dimerów na wyniki eksperymentów, należy ograniczyć zakres stężeniowy do 10 μM .

Rezultaty tej części badań otwierają drogę do badania oddziaływań błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA przy użyciu elektrochemicznych biocujników DNA. Stosowana wówczas procedura pomiarowa, wymagająca długotrwałego przebywania molekuł MB w buforze octanowym, nie będzie powodowała zmian w ich strukturze. Jedynym ograniczeniem jest wartość stężenia, która nie powinna przekraczać 10 μM .

4.3.2. Badanie elektroaktywności błękitu metylenowego

Badanie oddziaływania błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA za pomocą biocujników elektrochemicznych opierało się na analizie zmian jego sygnałów utlenienia wywołaną obecnością kwasu nukleinowego. Ważne było sprawdzenie, czy nie nakładają się one z sygnałami utlenienia zasad azotowych. W tym celu przed przystąpieniem do analizy interakcji zbadana została elektroaktywność błękitu metylenowego w stosowanych warunkach pomiarowych.

Procesy redoks błękitu metylenowego szczegółowo zostały opisane w części literaturowej (rozdział I.2.1.1.2). W pomiarach woltamperometrycznych właściwości redoks MB objawiają się w postaci jednej pary pików, obrazujących utlenianie zachodzące w roztworze o pH 7,0 przy potencjale około -0,1 V oraz redukcję zachodzącą przy potencjale -0,3 V [254]. Gdy stężenie jonów wodorowych w układzie rośnie, sygnały te przesuwają się na osi potencjałów w stronę bardziej ujemnych wartości. Ponadto, tworzenie dimerów i większych agregatów powoduje obniżenie wysokości sygnałów redoks [284], a przykładanie zmieniającego się cyklicznie w szerokim zakresie potencjałów napięcia może prowadzić do polimeryzacji błękitu metylenowego na elektrodzie [286-291], co objawia się w postaci nowej pary pików przy nieco wyższych potencjałach oraz szerokiego sygnału anodowego w zakresie potencjałów +0,9–+1,15 V.

4.3.2.1. Procedura pomiarowa

Do zbadania elektroaktywności błękitu metylenowego na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej wykorzystano dwie techniki woltamperometryczne – woltamperometrię cykliczną (procedura VIII) oraz woltamperometrię fali prostokątnej (procedura IX). W obu przypadkach pomiar rozpoczynał się od elektrochemicznego oczyszczenia powierzchni elektrody pracującej na drodze kondycjonowania przy stałym potencjale oraz przykładania do niej cyklicznie zmieniającego się napięcia. Następnie układ zanurzany był w sporządzonym w AcB-K roztworze błękitu metylenowego o stężeniu $10\ \mu\text{M}$ i w nim rejestrowano cykliczne krzywe woltamperometryczne w przypadku procedury VIII, co umożliwiało monitorowanie zarówno sygnałów utlenienia, jak i redukcji MB, oraz woltamperogramy fali prostokątnej w przypadku procedury IX, podczas której monitorowano jedynie sygnały utleniania MB, będące istotne dla kolejnych etapów eksperymentów.

Procedura VIII

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Pomiar
 metoda: CV
 roztwór: $10\ \mu\text{M}$ roztwór MB w AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar:

liczba skanów	5
potencjał początkowy	$E_{\text{start}}: -0,6\ \text{V}$
pierwsze zawrócenie potencjału	$E_1: +0,2\ \text{V}$
drugie zawrócenie potencjału	$E_2: -0,6\ \text{V}$
krok potencjału	$E_{\text{krok}}: 0,005\ \text{V}$
szybkość polaryzacji	$0,05\ \text{V/s}$

Procedura IX

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Rejestracja linii podstawowej
 metoda: SWV
 roztwór: AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar:

potencjał początkowy	$E_{\text{start}}: -0,6\ \text{V}$
potencjał końcowy	$E_{\text{stop}}: +1,5\ \text{V}$
krok potencjału	$E_{\text{krok}}: 0,015\ \text{V}$
amplituda potencjału	$E_{\text{amplituda}}: 0,04\ \text{V}$
częstotliwość	$200\ \text{Hz}$
- 3) Pomiar
 metoda: SWV
 roztwór: $10\ \mu\text{M}$ roztwór MB w AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar: parametry jak w pkt. 2)

Trudności w interpretacji otrzymanych wyników spowodowały, że przeprowadzone zostały jeszcze dodatkowe pomiary, mające na celu sprawdzenie, czy błękit metylenowy nie ulega elektropolimeryzacji na elektrodzie. W tym celu, po zarejestrowaniu serii woltamperogramów fali prostokątnej w sporządzonym w AcB-K roztworze MB o wzrastającym od $1\ \text{nM}$ do $40\ \mu\text{M}$ stężeniu, taki układ poddano pięciokrotnej cyklicznej zmianie potencjału w szerokim zakresie (procedura Xa). Podobna analiza została przeprowadzona również w obecności DNA chromosomalnego ze

spermy łososa (dsDNA-ss), lecz przy stężeniu 30 μM MB i w węższym zakresie potencjałów (Procedura Xb).

Procedura X

układ po zarejestrowaniu serii woltamperogramów metodą SWV
metoda: CV
mieszanie: nie

Procedura Xa

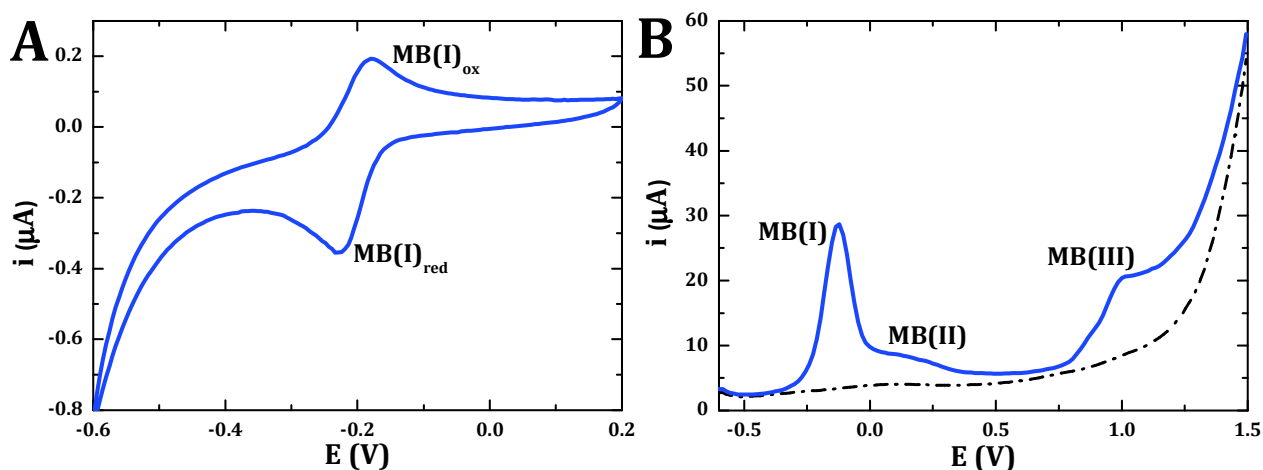
roztwór: 40 μM MB w AcB-K
pomiar: liczba skanów 5
potencjał początkowy E_{start} : -0,6 V
1-sze zawrótanie potencjału E_1 : +1,5 V
2-gie zawrótanie potencjału E_2 : -0,6 V
krok potencjału E_{krok} : 0,005 V
szybkość polaryzacji 0,1 V/s

Procedura Xb

roztwór: 30 μM MB + 9,1 ppm dsDNA-ss w AcB-K
pomiar: liczba skanów 40
potencjał początkowy E_{start} : -0,6 V
1-sze. zawrótanie potencjału E_1 : +1,0 V
2-gie zawrótanie potencjału E_2 : -0,6 V
krok potencjału E_{krok} : 0,005 V
szybkość polaryzacji 0,1 V/s

4.3.2.2. Wyniki

Procesy redoks błękitu metylenowego na woltamperogramie cyklicznym zarejestrowanym w wąskim zakresie potencjałów, od -0,6 V do +0,2 V, obrazowane są przez dwa piki – utlenienia przy potencjale -0,18 V (MB(I)_{ox}) i redukcji przy potencjale -0,23 V ($\text{MB(I)}_{\text{red}}$) (RYS. 157A). Mimo niskiego stężenia depolaryzatora, wynoszącego zaledwie 10 μM , sygnały te są dobrze wykształcone i symetryczne, a $\text{MB(I)}_{\text{red}}$ jest wyższy od MB(I)_{ox} zaledwie o niecałe 40 nA. Taki obraz wskazuje na odwracalność procesów redoks MB. Różnica potencjału występująca pomiędzy pikami utlenienia i redukcji wynosi 50 mV, co biorąc pod uwagę częściową adsorpcję molekuł depolaryzatora na powierzchni elektrody, odpowiada najprawdopodobniej procesowi jednoelektronowemu. Wiadomo jednak, że w proces utlenienia/redukcji błękitu metylenowego zaangażowane są dwa elektrony [284]. Być może przebiega on dwuetapowo, a drugi etap zachodzi przy innym potencjale, wykraczającym poza zastosowany zakres pomiarowy.

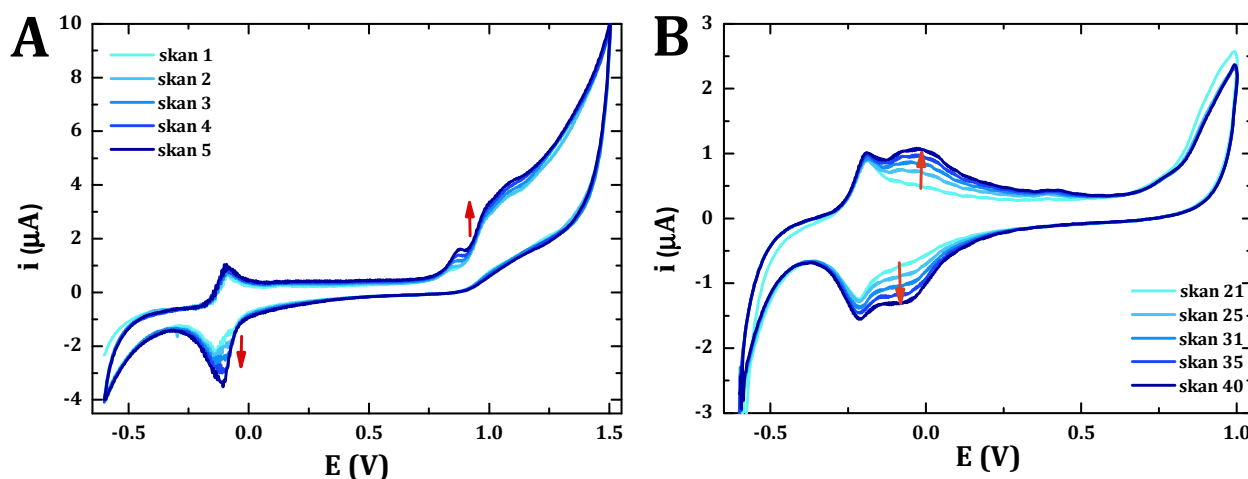


RYS. 157 – Woltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane w 10 μM roztworze MB w AcB-K metodą: A – CV, B – SWV. Linia przerywaną oznaczono linię podstawową elektrody zarejestrowaną w AcB-K.

Pomiary w szerszym przedziale potencjałów przeprowadzone zostały metodą woltamperometrii fali prostokątnej. W tym przypadku na krzywych woltamperometrycznych obecne były dwa wyraźne sygnały (RYS. 157B). Jeden z nich miał postać piku i występował przy potencjale -0,12 V (MB(I)), a drugi fali pojawiającej się przy potencjale około +1,00 V (MB(III)). Niewielki wzrost prądu można zauważyć również przy potencjale około +0,07–+0,09 V (MB(II)). Pik MB(I) odpowiada temu samemu procesowi utleniania, który został zarejestrowany metodą CV

(MB(I)_{ox} na RYS. 157A). Bardziej problematyczna jest interpretacja sygnału MB(III). W badaniu procesów elektropolimeryzacji MB szerokie pasmo w zakresie potencjałów +0,9–+1,15 V przypisywane było tworzeniu się kationorodników MB [288]. W naszym układzie nie zachodzi proces elektropolimeryzacji błękitu metylenowego, co zostało omówione poniżej, więc należy szukać innego źródła tego sygnału. Dość prawdopodobne wydaje się, że powstające kationorodniki są produktem pośrednim w procesach redoks, a nie indywidualnym charakterystycznym dla tworzenia polimerów MB. Wówczas sygnał MB(III) obrazowałoby przeniesienie drugiego elektronu podczas procesu elektROUTLENIA.

Proces polimeryzacji błękitu metylenowego na elektrodzie wywoływany jest cyklicznymi zmianami przykładanego do niej napięcia i sprzyja mu wyższe stężenie MB oraz alkaliczne pH środowiska, a oprócz szerokiego sygnału w zakresie potencjałów +0,9–+1,15 V towarzyszy mu również pojawienie się na woltamperogramie nowej pary pików redoks przy potencjałach nieco wyższych niż dla MB(I)_{ox/red} [288, 290]. By mieć pewność, iż sygnał MB(III), obecny na woltamperogramach fali prostokątnej zarejestrowanych w roztworze o stężeniu 10 μM, nie jest związany z tworzeniem się polimeru błękitu metylenowego, przeprowadzone zostały dodatkowe eksperymenty. Po serii pomiarów SWV, przeprowadzonych w roztworze MB o wzrastającym aż do 40 μM stężeniu, przykładano do elektrody pracującej napięcie zmieniające się cyklicznie od -0,6 V do +1,5 V. Jeśli w układzie obecna byłaby polimerowa forma błękitu metylenowego powinno objawiać się to przede wszystkim obecnością nowej pary pików w okolicy potencjału 0 V. Tymczasem na 5 zarejestrowanych woltamperogramach cyklicznych nie pojawiały się żadne sygnały w tym miejscu, a obecna była jedynie para pików redoks MB(I)_{ox/red} oraz fala około +1,0 V, której intensywność rosła nieznacznie przy kolejnych cyklach potencjałowych (RYS. 158A). Wskazuje to, iż nawet zwiększenie stężenia błękitu metylenowego i powtarzana kilkukrotnie cykliczna polaryzacja elektrody nie powoduje rozpoczęcia procesu jego elektropolimeryzacji. Tworzenie polimerów przez MB udało się zapoczątkować dopiero w obecności DNA chromosomalnego po ponad 20-krotnym powtarzaniu cyklicznego polaryzowania elektrody. Wówczas na woltamperogramach w zakresie potencjałów -0,087–+0,016 V pojawiała się nowa para szerokich pików (RYS. 158B). Elektropolimeryzacja błękitu metylenowego jest zagadnieniem dość skomplikowanym i jej szczegółowe omawianie wykracza poza tematykę niniejszej pracy.



RYS. 158 – Woltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą CV w roztworze: A – 40 μM MB w AcB-K, B – 30 μM MB i 9,1 ppm dsDNA-ss w AcB-K, w układzie poddanym wcześniej serii pomiarów SWV w roztworze o wzrastającym stężeniu MB.

4.3.2.3. Wnioski

W stosowanych przeze mnie warunkach pomiarowych błękit metylenowy ulega reakcjom redoks na elektrodach sitodrukowanych, w wyniku których na woltamperogramach pojawia się para pików redoks MB(I)_{ox/red} w okolicy potencjału -0,2 V oraz szeroka fala około +1,0 V.

W środowisku buforu octanowego o pH 4,75 przy wielokrotnym przykładaniu do elektrody zmieniającego się jednokierunkowo (w stronę wyższych wartości) napięcia, co odpowiada rejestrowaniu woltamperogramów fali prostokątnej, nie dochodzi do elektropolimeryzacji MB. Jest to ważna informacja, gdyż obecność form polimerowych mogłaby mieć ogromne znaczenie dla sposobu interakcji błękitu metylenowego z DNA.

W analizie oddziaływań występujących pomiędzy błękitem metylenowym a DNA, prowadzonej za pomocą elektrochemicznych czujników sitodrukowanych, głównymi sygnałami analitycznymi były piki utlenienia MB. Ich nakładanie się z sygnałami utlenienia zasad azotowych może utrudniać interpretację wyników. O ile pik MB(I) na pewno nie zostanie zaburzony, o tyle MB(III) może nakładać się z sygnałem utlenienia guaniny, co trzeba mieć na uwadze, analizując jego zmianę wywołaną obecnością DNA w układzie.

4.3.3. Badanie oddziaływań błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA

Błękit metylenowy (MB) jest heterocyklicznym związkiem aromatycznym, którego trójpierścieniowe molekuly obdarzone są ładunkiem dodatnim (RYS. 67 na stronie 62). Dzięki takiej budowie może wchodzić on w różnorodne interakcje z kwasem deoksyrybonukleinowym, które mimo licznych badań eksperymentalnych nadal nie zostały w pełni wyjaśnione [192, 265-267]. MB jako kation może być przyciągany elektrostatycznie przez ujemnie naładowany szkielet cukrowo-fosforanowy kwasu nukleinowego [266, 267, 270], jako związek o płaskiej budowie pierścieniowej może interkalować do helisy [175, 266, 267, 270], a dzięki niewielkim rozmiarom swoich cząsteczek może także lokować się w bruzdach DNA [237, 266, 267, 270]. Wszystkie te połączenia są odwracalne i mają charakter niekowalencyjny, lecz ich natura jest bardzo złożona i zależy od wielu czynników, wśród których wymienić można sekwencję łańcucha DNA, siłę jonową roztworu, czy stosunek stężeń MB i DNA w roztworze. Ponadto, kontakt błękitu metylenowego z niemi kwasu nukleinowego może prowadzić także do oksydacyjnych uszkodzeń zasad azotowych.

Pokazując zastosowanie sitodrukowanych układów trójelektrodowych produkcji polskiej do konstrukcji czujników użytecznych w badaniu oddziaływania kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi substancjami chemicznymi, wykorzystałam je do analizy interakcji występujących pomiędzy błękitem metylenowym a różnymi rodzajami DNA. Moim celem było zgłębienie tego tematu poprzez zastosowanie nieco innych procedur pomiarów woltamperometrycznych niż w przeprowadzonych dotychczas eksperymentach.

4.3.3.1. Elektrochemiczne czujniki sitodrukowane w badaniu oddziaływań błękitu metylenowego z różnymi rodzajami DNA

Badanie oddziaływania błękitu metylenowego z kwasem deoksyrybonukleinowym prowadzone było przy użyciu sitodrukowanych układów trójelektrodowych produkcji polskiej, ale do jego realizacji nie były konstruowane typowe bioczujniki DNA. MB i DNA znajdowały się w roztworze, w którym zanurzany był układ elektrod. Podstawą pomiarów było monitorowanie sygnałów utlenienia błękitu metylenowego, zasad azotowych i tworzonego przez nie kompleksu, których zmiany wywołane zwiększaniem stężenia ligandu mogą dostarczyć ważnych informacji na temat siły i natury oddziaływań występujących pomiędzy substancjami obecnymi w mieszaninie.

Ponieważ oddziaływanie MB z helisą DNA silnie zależy od sekwencji nukleotydowej, w eksperymencie wykorzystane zostały różne rodzaje DNA, w tym naturalne chromosomalne, syntetyczne oligonukleotydowe o znanym składzie nukleotydów oraz plazmidowe. Dotychczas, interakcje pomiędzy DNA i różnymi substancjami interkalującymi były badane głównie przy

użyciu DNA chromosomalnego, podczas gdy DNA plazmidowe było analizowane elektrochemicznie jedynie pod kątem jego elektroaktywności [75, 82, 85, 88, 111, 113-115]. Plazmidy stanowią ciekawą alternatywę w badaniach interakcji kwasu nukleinowego z różnymi substancjami ze względu na łatwość ich izolacji oraz różnorodność struktury, która może przyjmować kształt liniowy, kolisty czy superhelikalny.

Prowadzone przeze mnie badania opierały się na detekcji wywołanych obecnością DNA zmian sygnałów utlenienia MB przy potencjałach około -0,2 V, 0 V i +0,9 V, co odróżnia je od typowych analiz elektrochemicznych oddziaływań błękitu metylenowego z DNA, w których monitorowany był spadek jednego sygnału redukcji ligandu w obecności kwasu nukleinowego [159, 269, 275, 280, 281, 293]. Ponadto, w odróżnieniu od innych eksperymentów badaniu poddano szeroki zakres stężenia błękitu metylenowego, obejmujący oprócz stężeń mikromolowych, także ich nanomolowe wartości. Połączenie tych dwóch innowacyjnych elementów w jednej procedurze oraz zastosowanie innego konkurencyjnego interkalatora (ryboflawiny) umożliwiło rozróżnienie dwóch typów interakcji występujących pomiędzy molekułami DNA i MB.

4.3.3.1.1. Procedura pomiarowa

Na elektrodach sitodrukowanych zbadano procesy redoks błękitu metylenowego w obecności czterech rodzajów kwasu deoksyrybonukleinowego, różniącego się strukturą. DNA chromosomalne ze spermy łososia (dsDNA-ss) zostało zastosowane jako przykład długich, liniowych molekuł. Plazmidy pUC19 w formie superhelikalnej (scpUC19) stanowiły przykład kolistych cząsteczek DNA dodatkowo skręconych. Oligonukleotydy natomiast były najprostszym spośród użytych rodzajem DNA. Miały one postać krótkich łańcuchów, które zawierały zaledwie po 8 nukleotydów, tworzących sekwencje: 5'GCGCGCGC3' (d(GC)₄) i 5'ATATATAT3' (d(AT)₄).

Bez względu na rodzaj DNA obecnego w układzie pomiarowym stosowana była taka sama procedura pomiarowa (procedura XI), która rozpoczynała się od elektrochemicznego oczyszczenia powierzchni elektrody pracującej. Następnie efektywność czyszczenia oraz przewodnictwo układu elektrodowego sprawdzane było poprzez zarejestrowanie metodą SWV linii podstawowej w roztworze AcB-Mg. Później do 5 ml buforu dodawana była określona objętość stężonego roztworu danego rodzaju DNA, co prowadziło do jego stężenia w roztworze pomiarowym od 0,01 do 10 ppm w zależności od typu użytego kwasu (Tabela 15). Po dodatku DNA rejestrowano woltamperogramy i sprawdzano, czy pojawiają się na nich sygnały utlenienia zasad azotowych. Ich obecność świadczyła o adsorpcji łańcuchów DNA na powierzchni elektrody. W przypadku ślepej próby DNA nie było dodawane do roztworu, gdyż jej celem było monitorowanie procesów redoks MB w identycznych warunkach pomiarowych, ale pod nieobecność kwasu. Eksperyment polegał na stopniowym dodawaniu do układu błękitu metylenowego. Objętości dodawanego roztworu MB były różne w zależności od rodzaju DNA i we wszystkich przypadkach jego stężenie rosło stopniowo w zakresie od 1 nM do około 10 μM. Po każdym dodatku MB rejestrowano krzywą woltamperometryczną fali prostokątnej obrazującą jego procesy elektROUTLENIE. Analiza zmian wysokości oraz położenia każdego z trzech pików utlenienia błękitu metylenowego wywołanych obecnością różnych rodzajów DNA w układzie pozwoliła obserwować jego oddziaływania z różnymi formami kwasu nukleinowego.

Procedura XI

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Rejestracja linii podstawowej
metoda: SWV

roztwór: AcB-Mg
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar: potencjał kondycjonowania: +0,5 V przez 30 s
 liczba skanów 2
 potencjał początkowy $E_{\text{start}}: -0,6 \text{ V}$
 potencjał końcowy $E_{\text{stop}}: +1,5 \text{ V}$
 krok potencjału $E_{\text{krok}}: 0,015 \text{ V}$
 amplituda potencjału $E_{\text{amplituda}}: 0,04 \text{ V}$
 częstotliwość 200 Hz

3) Dodatek DNA do układu

roztwór: AcB-Mg + odpowiednia ilość roztworu DNA, prowadząca do jego stężenia w roztworze pomiarowym 10 ppm dla dsDNA-ss, 0,01 ppm dla scpUC19, 0,72 ppm dla d(GC)₄ oraz 0,12 ppm dla d(AT)₄

mieszanie roztworu: tak

pomiar: parametry jak w pkt. 2)

4) Kolejne dodatki MB do układu

roztwór: DNA w AcB-Mg + kolejne dodatki odpowiedniej ilości roztworu MB, prowadzące do jego stężenia w roztworze pomiarowym od 1 nM do 11 μM

mieszanie roztworu: tak

pomiar wykonywany po każdym dodatku MB do układu

pomiar: parametry jak w pkt. 2)

TABELA 15 – Sposób przygotowania roztworów różnych rodzajów DNA o określonym stężeniu, stosowanych w analizie ich oddziaływania z błękitem metylenowym.

Rodzaj DNA	Stężenie wyjściowego roztworu DNA [ppm]	Objętość wyjściowego roztworu DNA dodana do 5 ml AcB-Mg [μl]	Stężenie DNA w roztworze pomiarowym [ppm]
dsDNA-ss	500	100	10
scpUC19	86,5	0,6	0,01
d(GC)₄	246,5	14,6	0,72
d(AT)₄	246,2	2,5	0,12

Druga część eksperymentów miała pomóc w rozróżnieniu różnych typów interakcji błękitu metylenowego z DNA poprzez zastosowanie konkurencyjnego interkalatora. W tym przypadku wybór padł na ryboflawinę, która została dodana do układu zawierającego dsDNA-ss i MB. Podobnie jak poprzednio procedura pomiarowa (procedura XII) rozpoczęła się od elektrochemicznego oczyszczania powierzchni elektrody pracującej oraz zarejestrowania linii podstawowej. Następnie do 20 ml buforu octanowego zawierającego 18 mM chlorku magnezu dodano kolejno cztery porcje roztworu błękitu metylenowego, uzyskując jego stężenie w roztworze pomiarowym w przedziale 2–80 nM (Tabela 16). Po każdym dodatku dokonywano pomiaru metodą SWV, rejestrując voltamperogramy utleniania MB. W kolejnym kroku do układu wkroplono 0,4 ml roztworu dsDNA-ss o stężeniu 500 ppm, uzyskując stężenie w roztworze pomiarowym równe 10 ppm, i również zarejestrowano voltamperogramy fali prostokątnej. Następnie do układu stopniowo dodawano ryboflawinę, której stężenie rosło od 2 nM do 1,8 μM (Tabela 17). Po każdym dodatku rejestrowane były krzywe voltamperometryczne, na których pojawiał się dodatkowo sygnał utleniania RF. Obserwowane zmiany sygnałów utlenienia substancji obecnych w roztworze pomiarowym pozwoliły wyciągnąć wnioski odnośnie typów interakcji występujących pomiędzy DNA i MB.

Procedura XII

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Rejestracja linii podstawowej – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą XI**

- 3) Kolejne dodatki MB do układu
 roztwór: AcB-Mg + kolejne dodatki odpowiedniej ilości roztworu MB, prowadzące do jego stężenia w roztworze pomiarowym od 2 nM do 80 nM
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar wykonywany po każdym dodatku MB do układu
 pomiar: parametry jak w pkt. 2)
- 4) Dodatek DNA do układu
 roztwór: 80 nM MB w AcB-Mg + 0,4 ml stężonego roztworu dsDNA-ss, prowadząca do jego stężenia w roztworze pomiarowym 10 ppm
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar: parametry jak w pkt. 2)
- 5) Kolejne dodatki RF do układu
 roztwór: 80 nM MB i 10 ppm dsDNA-ss w AcB-Mg + odpowiednia ilość roztworu RF, prowadząca do jej stężenia w roztworze pomiarowym 2 nM do 1,8 μ M
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar wykonywany po każdym dodatku RF do układu
 pomiar: parametry jak w pkt. 2)

TABELA 16 – Kolejne dodatki błękitu metylenowego do roztworu pomiarowego podczas analizy jego oddziaływania z dsDNA-ss w obecności ryboflawiny.

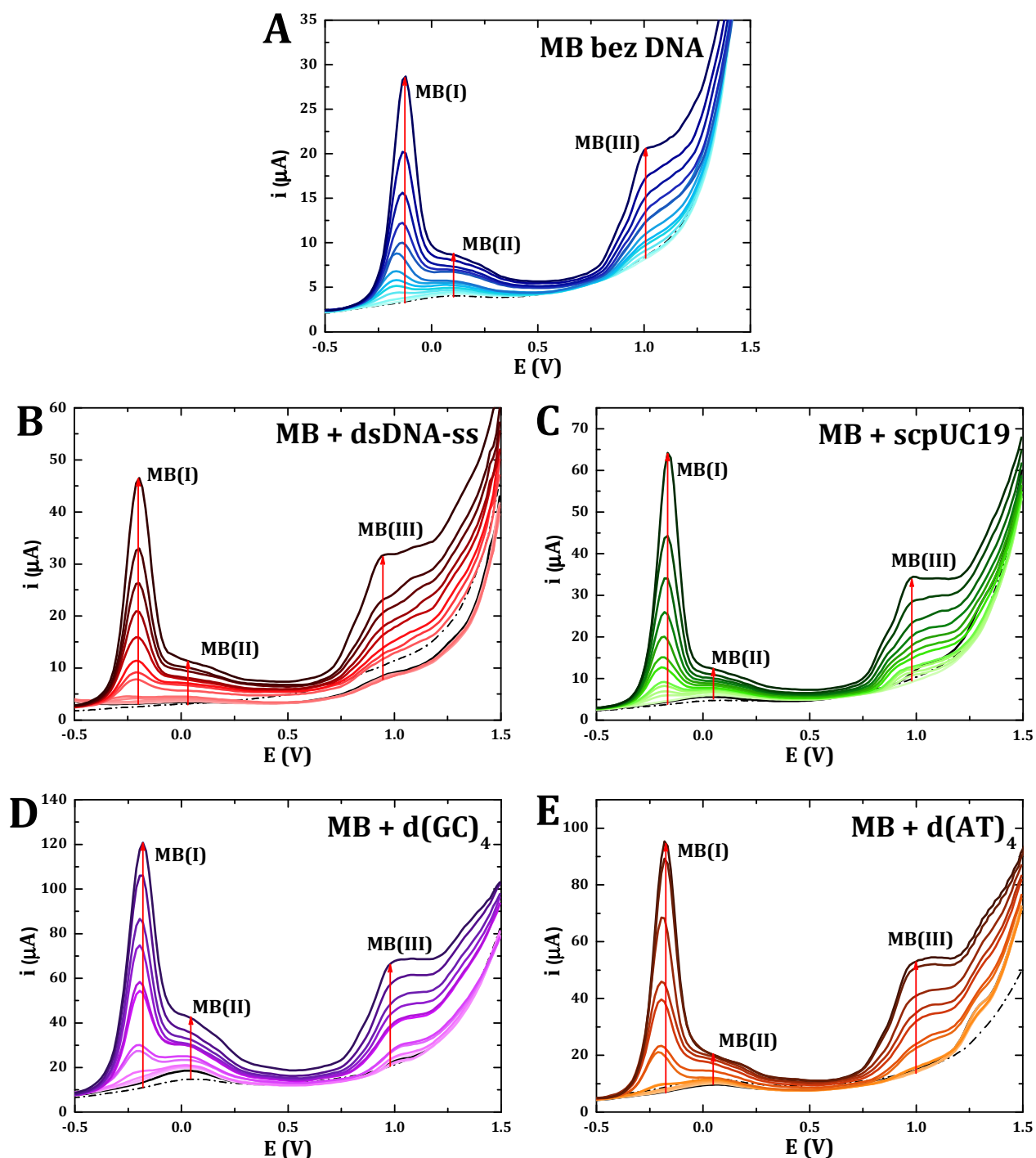
Stężenie wyjściowego roztworu DNA [μ M]	Objętość wyjściowego roztworu MB dodana do 20 ml AcB-Mg [μ l]	Stężenie MB w roztworze pomiarowym [nM]
2	20	2
2	180	20
2	200	40
200	4	80

TABELA 17 – Kolejne dodatki ryboflawiny do roztworu pomiarowego podczas analizy oddziaływania błękitu metylenowego z dsDNA-ss w jej obecności.

Stężenie wyjściowego roztworu RF [μ M]	Objętość wyjściowego roztworu RF dodana do roztworu pomiarowego [μ l]	Stężenie RF w roztworze pomiarowym [nM]
2	20	2
2	180	20
2	200	40
200	4	80
200	5	130
200	170	1830

4.3.3.1.2. Wyniki

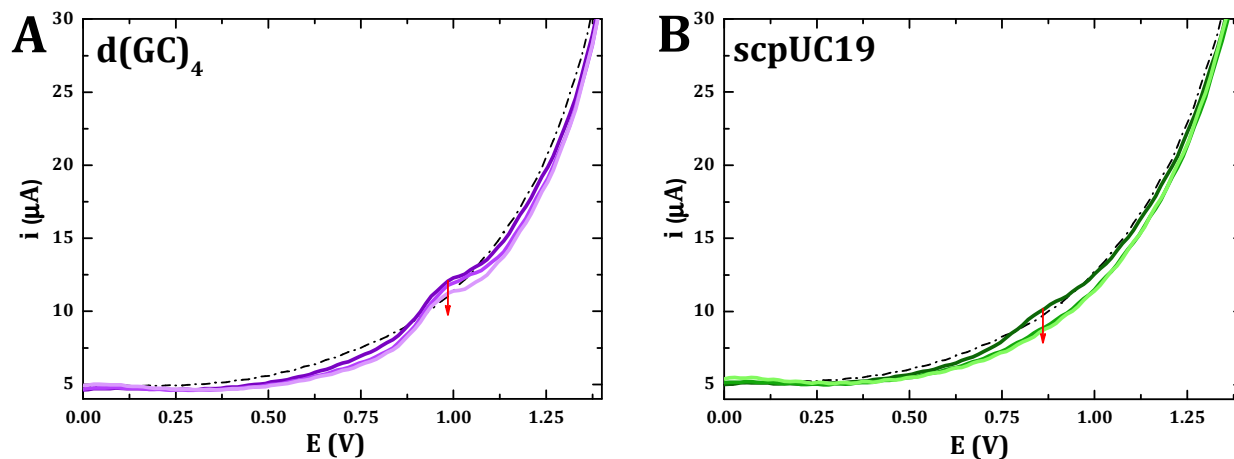
Znając właściwości elektrochemiczne błękitu metylenowego, oczekiwano, że na rejestrowanych woltamperogramach pojawią się trzy sygnały utleniania MB, a także w zależności od rodzaju DNA obecnego w roztworze sygnały utleniania guaniny i/lub adeniny. Na zarejestrowanych krzywych woltamperometrycznych bez względu na rodzaj obecnego w układzie kwasu deoksyrybonukleinowego widoczne były trzy sygnały pochodzące od błękitu metylenowego: wyraźny pik przy potencjale ok. -0,2 V, niewielki wzrost prądu ok. +0,05 V oraz wyraźna fala przy potencjale ok. +1,0 V (RYS. 159). Pewnym zaskoczeniem był jednak fakt, iż sygnały utleniania zasad azotowych nie pojawiały się na każdym kolejnym woltamperogramie rejestrowanym w roztworze pomiarowym zawierającym DNA (RYS. 159B-E), lecz były one dobrze widoczne na pierwszej krzywej rejestrowanej jeszcze przed dodatkiem MB (czarne linie ciągłe na RYS. 159B-E), a następnie stopniowo zanikały lub w przypadku guaniny nakładały się z dużo wyższym sygnałem utleniania MB.



RYS. 159 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE w roztworze AcB-Mg zawierającym błękit metylenowy o stężeniu wzrastającym stopniowo w zakresie: A – 0–9,7 μM pod nieobecność DNA, B – 0–11,0 μM w obecności 10 ppm dsDNA-ss, C – 0–9,8 μM w obecności 0,01 ppm scpUC19, D – 0–9,7 μM w obecności 0,72 ppm d(GC)₄, E – 0–9,8 μM w obecności 0,12 ppm d(AT)₄. Czerwone pionowe strzałki wskazują kierunek wzrostu stężenia MB. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg, zaś czarne linie ciągłe prezentują voltamperogramy zarejestrowane w roztworze AcB-Mg po dodatku danego rodzaju DNA.

Obniżenie sygnałów DNA w obecności błękitu metylenowego nie świadczy bynajmniej o blokowaniu procesu ich utleniania, gdyż pod jego nieobecność taki spadek również ma miejsce. W oddzielnym eksperymencie za pomocą trójelektrodowych układów sitodrukowanych, zanurzonych w roztworze danego DNA, w 10-minutowych odstępach czasu zarejestrowane zostały kolejne krzywe voltamperometryczne. Pojawiające się na nich sygnały utlenienia zasad azotowych nie wzrastały wraz z upływem czasu, co wydawałoby się oczywiste w wyniku adsorpcji kwasu nukleinowego na powierzchni elektrody, lecz stopniowo malały w przypadku oligonukleotydów (RYS. 160A) lub wręcz zanikały w przypadku DNA chromosomalnego i plazmidowego (RYS. 160B).

Najprawdopodobniej świadczy to o silnej adsorpcji na powierzchni sitodrukowanej elektrody grafitowej utlenionej formy DNA, która ogranicza dostęp do niej nowym molekułom. Nie oznacza to jednak, że adsorpcja DNA zostaje zahamowana. Wręcz przeciwnie na elektrodzie osadzają się kolejne warstwy łańcuchów kwasu, lecz nie ulegają one elektROUTLENIENIU. Podobne zjawisko było obserwowane już w przypadku analizy reakcji redoks wolnych zasad azotowych oraz ich nukleozydów na elektrodzie z węgla szklanego [98, 103].



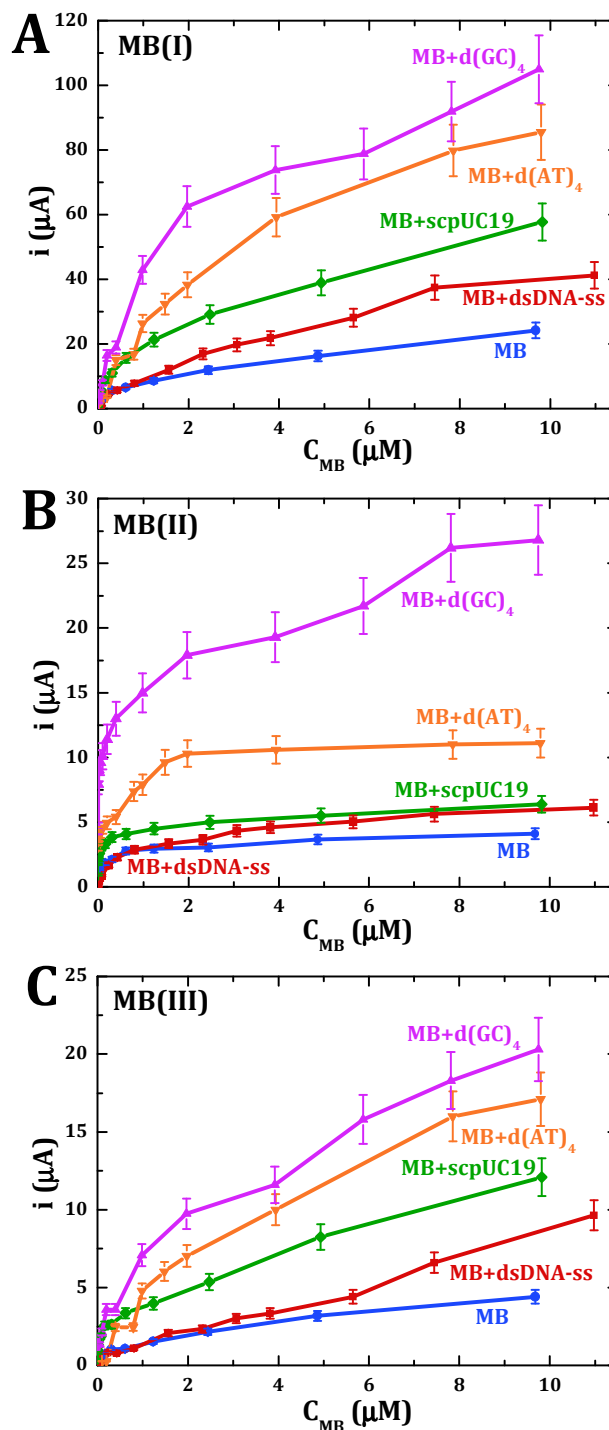
RYS. 160 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE co 10 minut w roztworze AcB-Mg zawierającym: A – 1 ppm $d(GC)_4$, B – 0,1 ppm scpUC19. Czerwone pionowe strzałki wskazują kolejność krzywych rejestrowanych w równych odstępach czasu. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg.

Wyjaśnwszy przyczynę zaniku sygnałów utlenienia DNA, można powrócić do analizy voltamperogramów zarejestrowanych w mieszaninach różnych rodzajów kwasu nukleinowego i błękitu metylenowego. Niezależnie od rodzaju DNA obecnego w układzie obserwowane były trzy sygnały MB. Jednak ich pozycja na osi potencjałów oraz wysokość ulegały znaczącym zmianom w zależności od formy kwasu nukleinowego. Najwyraźniej widać zmianę pozycji sygnału MB(I). Na skutek adsorpcji błękitu metylenowego na powierzchni elektrody pod nieobecność DNA przesunął się on wraz ze wzrostem stężenia z $-0,16$ V do $-0,12$ V (RYS. 159A). Do takiego stopniowego przesunięcia tego pików nie dochodziło, gdy do roztworu dodano uprzednio DNA. Wówczas powierzchnia elektrody była pokryta łańcuchami kwasu i bezpośrednia adsorpcja MB na niej była silnie ograniczona lub wręcz niemożliwa. Obserwowane sygnały pochodziły od molekuł błękitu znajdującego się w warstwie DNA i z nim oddziałującego. Dlatego też potencjał, przy którym dochodziło do procesów redoks, nie ulegał większym zmianom wraz ze wzrostem stężenia ligandu, lecz od początku był znacznie przesunięty w stronę bardziej ujemnych wartości. Pik MB(I) pojawiał się bowiem przy potencjale $-0,21$ V w obecności dsDNA-ss (RYS. 159B), $-0,18$ V w obecności scpUC19 (RYS. 159C) oraz $-0,20$ V w obecności obu typów przebadanych oligonukleotydów (RYS. 159D i E). Zmiana potencjałów sygnałów MB(II) i MB(III) jest trudniejsza do interpretacji ze względu na ich kształt. MB(II) ma bowiem postać niewielkiego wzrostu prądu w zakresie potencjału sięgającym nawet 200 mV bez ukształtowanego maksimum, a MB(III) z kolei to szeroka fala. W przypadku wszystkich sygnałów można dostrzec wpływ DNA obecnego w układzie na ich wysokość. Kwas deoksyrybonukleinowy powoduje istotne wzmocnienie wszystkich sygnałów utlenienia błękitu metylenowego. Wielkość tego efektu uzależniona jest od rodzaju DNA i wynika z niejednakowego powinowactwa MB do różnych form kwasu nukleinowego.

Porównując wpływ różnych rodzajów DNA na sygnały utlenienia błękitu metylenowego widać, iż każdy z nich powoduje znaczny wzrost prądów tych procesów (RYS. 161). Wielkość tego efektu świadczy o ilości molekuł MB wiążących się z łańcuchami kwasu i o sile występujących pomiędzy nimi interakcji. Gdy roztwór pomiarowy nie zawierał DNA, sygnał MB(I) wrażał stopniowo wraz ze wzrostem stężenia błękitu metylenowego, osiągając wysokość 24 μ A przy stężeniu 10 μ M (RYS. 161A). W obecności DNA porównywalna wartość prądu rejestrowana była

przy stężeniu MB ok. 4 μM dla dsDNA-ss, ok. 1,5 μM dla scpUC19, ok. 1 μM dla d(AT)₄ oraz ok. 0,4 μM dla d(GC)₄. Przy najwyższym stężeniu sygnał ten osiągał odpowiednio wartości ponad 40 μA , blisko 60 μA , 85 μA oraz 105 μA . Zmiany sygnału MB(I) wywołane zostały oddziaływaniem błękitu metylenowego z każdym rodzajem DNA, przy czym ich siła/intensywność nie była jednakowa. Najsilniejszy wpływ na sygnał utleniania MB przy potencjale około -0,2 V wywoływały oligonukleotydy o sekwencji d(GC)₄, a nieco słabszy o sekwencji d(AT)₄. Jego średnie wzmocnienie występowało w obecności plazmidów, a najsłabsze w przypadku DNA chromosomalnego.

Nieco inny charakter miały zmiany sygnału MB(II). Tutaj we wszystkich przypadkach, poza układem z d(GC)₄, po jego początkowym, gwałtownym wzroście następowała stabilizacja prądu i dalsze zwiększanie zawartości MB w układzie wywoływała już jedynie niewielki jego wzrost (RYS. 161B). W roztworze samego błękitu metylenowego prąd przy potencjale około +0,07 V już przy stężeniu 0,15 μM MB osiągał wartość 2 μA i przy zwiększeniu stężenia do 10 μM wzrastał zaledwie dwukrotnie. W obecności dsDNA-ss natomiast zakres stężenia, w którym następował wzrost prądu MB(II), był nieco szerszy. Dopiero od zawartość MB w roztworze pomiarowym 0,80 μM wzrost wysokości tego sygnału tracił na intensywności i po ponad dziesięciokrotnym zwiększeniu stężenia stawał się jedynie dwa razy wyższy, osiągając wartość 6 μA . Podobną wysokość miał sygnał MB(II) w obecności plazmidów przy najwyższym przebadanym stężeniu błękitu, lecz w tym przypadku jego stabilizacja rozpoczynała się już od stężenie 0,04 μM . Dużo silniejszy wzrost piku przy około +0,05 V wywoływały oligonukleotydy. O ile w obecności d(AT)₄ rósł on silnie aż do 0,80 μM stężenia MB, przekraczając wartość 7 μA i przy dalszym wzroście stężenia do 10 μM wzrastał jedynie półtorakrotnie, o tyle w obecności d(GC)₄ jego wysokość wzrastała sukcesywnie w całym zakresie stężeń, osiągając wartość ponad 25 μA przy stężeniu 10 μM . Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż zmiany sygnału MB(II) w obecności DNA obrazują inny typ oddziaływania błękitu metylenowego z łańcuchami kwasu deoksyrybonukleinowego niż to miało miejsce w przypadku MB(I). Charakteryzuje je bowiem inny typ zależności od stężenia MB. W tym przypadku DNA chromosomalne i plazmidowe wywoływały porównywalny wzrost prądu piku MB(II). Znacznie silniejszy efekt towarzyszył d(AT)₄, zaś do najsilniejszego wzmocnienia sygnału dochodziło dla

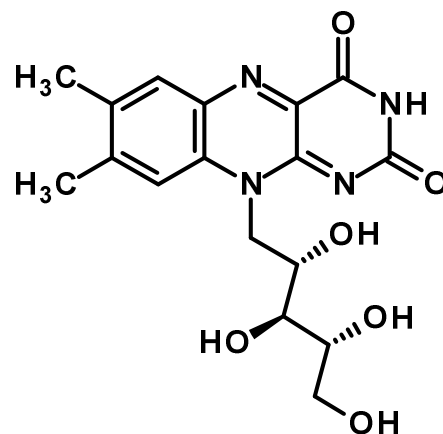


RYS. 161 - Zależność prądów utleniania błękitu metylenowego przy potencjałach: A - -0,2 V, B - +0,05 V, C - +0,9 V od stężenia MB zawartego w roztworze AcB-Mg pod nieobecność DNA oraz w obecności różnych rodzajów DNA: 10 ppm dsDNA-ss, 0,01 ppm scpUC19, 0,72 ppm d(GC)₄, 0,12 ppm d(AT)₄.

d(GC)₄. Należy zwrócić także uwagę, iż natura oddziaływania błękitu metylenowego z d(GC)₄ była odmienna niż dla pozostałych rodzajów DNA, o czym świadczy różny kształt zależności prądu MB(II) od stężenia ligandu.

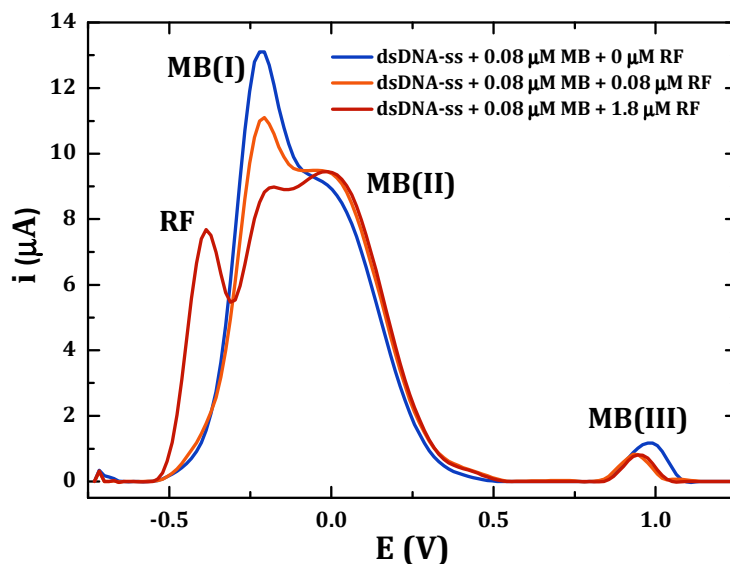
Ostatni analizowany sygnał MB występował przy potencjale około +1,0 V i nakładał się z pikiem guaniny. Jednak ze względu na niewielkie wartości prądu utlenienia G i jego zanikanie przy rejestrowaniu kolejnych krzywych voltamperometrycznych, nie powodowało to znaczących zaburzeń sygnału MB(III). Jego wysokość wzrastała stopniowo wraz ze wzrostem stężenia błękitu metylenowego w całym zakresie (RYS. 161C). Gdy w układzie DNA nie było obecne, sygnał ten osiągał wysokość blisko 4,5 μA przy 10 μM stężeniu MB. W obecności dsDNA-ss poniżej stężenia 2,5 μM MB pik MB(III) przyjmował wartości porównywalne z tymi rejestrowanymi dla układu z samym błękitem, a dopiero przy większej zawartości ligandu nieco wzrastał, aż do prawie 10 μA przy najwyższym stężeniu. Silniejszy efekt wywoływały scpUC19, d(AT)₄ i d(GC)₄, wzmacniając sygnał MB(III) odpowiednio około trzykrotnie, czterokrotnie i pięciokrotnie w porównaniu z układem, gdzie w roztworze obecny był sam MB. Źródłem niejednakowego wpływu różnych rodzajów DNA na zmianę sygnału utlenienia błękitu metylenowego przy potencjale około +0,9 V jest różne powinowactwo MB do poszczególnych typów kwasu nukleinowego. Im większe wzmocnienie sygnału MB(III) w obecności danego DNA, tym silniejsze powinowactwo molekuł MB do niego. Warto zauważyć również, że kształt zależności prądu pik MB(III) od stężenia błękitu metylenowego w obecności DNA jest analogiczna jak w przypadku sygnału MB(I). Sugeruje to, że zmiana obu tych sygnałów odpowiada temu samemu typowi oddziaływania pomiędzy molekułami MB i kwasu.

Na podstawie powyższej analizy zmian sygnałów utlenienia błękitu metylenowego w obecności różnych rodzajów DNA można stwierdzić, iż pomiędzy cząsteczkami tych substancji występują co najmniej dwa typy interakcji. Przesunięcie sygnałów redoks ligandów na osi potencjałów w stronę ujemnych wartości w obecności kwasu deoksyrybonukleinowego interpretowane jest zwykle jako wynik ich oddziaływania elektrostatycznego [186, 384]. Jednak w stosowanych przez mnie warunkach pomiarowych elektrostatyczne przyciąganie cząsteczek MB obdarzonych ładunkiem dodatnim przez naładowany ujemnie szkielet cukrowo-fosforanowy helisy DNA jest wykluczone, ponieważ bufor octanowy używany do sporządzenia roztworu pomiarowego zawierał 18 mM chlorku magnezu. Jest to wystarczająca ilość kationów, by oddziałując z grupami fosforanowymi w szkielecie DNA, zablokować jego dostępność dla molekuł błękitu. Jednak wykluczenie przyciągania elektrostatycznego, nie daje jeszcze odpowiedzi na pytanie o naturę oddziaływań występujących pomiędzy MB i DNA. W celu rozwikłania tej zagadki do układu pomiarowego wprowadzona została dodatkowa substancja wchodząca w interakcje z kwasem deoksyrybonukleinowym – ryboflawina (RF). Inna nazwa tego związku, zbudowanego z trójpierścieniowego układu flawiny połączonego z rybitolem (RYS. 162), to witamina B₂. W odróżnieniu od błękitu metylenowego molekuły RF przy pH ok. 5 są obojętne, a więc na pewno nie są w stanie wchodzić z DNA w jakiegokolwiek interakcje o naturze elektrostatycznej. Jednak dzięki obecności w ich strukturze trzech płaskich pierścieni aromatycznych interkalują one do helisy DNA, preferując pozycje w sąsiedztwie guaniny [481]. Dlatego też ryboflawina, jako konkurencyjny interkalator, może być stosowana przy określaniu typów oddziaływań występujących pomiędzy DNA i MB. Podczas przeprowadzonego eksperymentu RF była dodawana stopniowo do roztworu zawierającego 10 ppm dsDNA-ss i 80 nM MB. Na voltamperogramie zarejestrowanym jeszcze przed pierwszym dodatkiem RF pojawiły się standardowo trzy sygnały utlenienia błękitu metylenowego (niebieska krzywa na RYS. 163), a przesunięcie

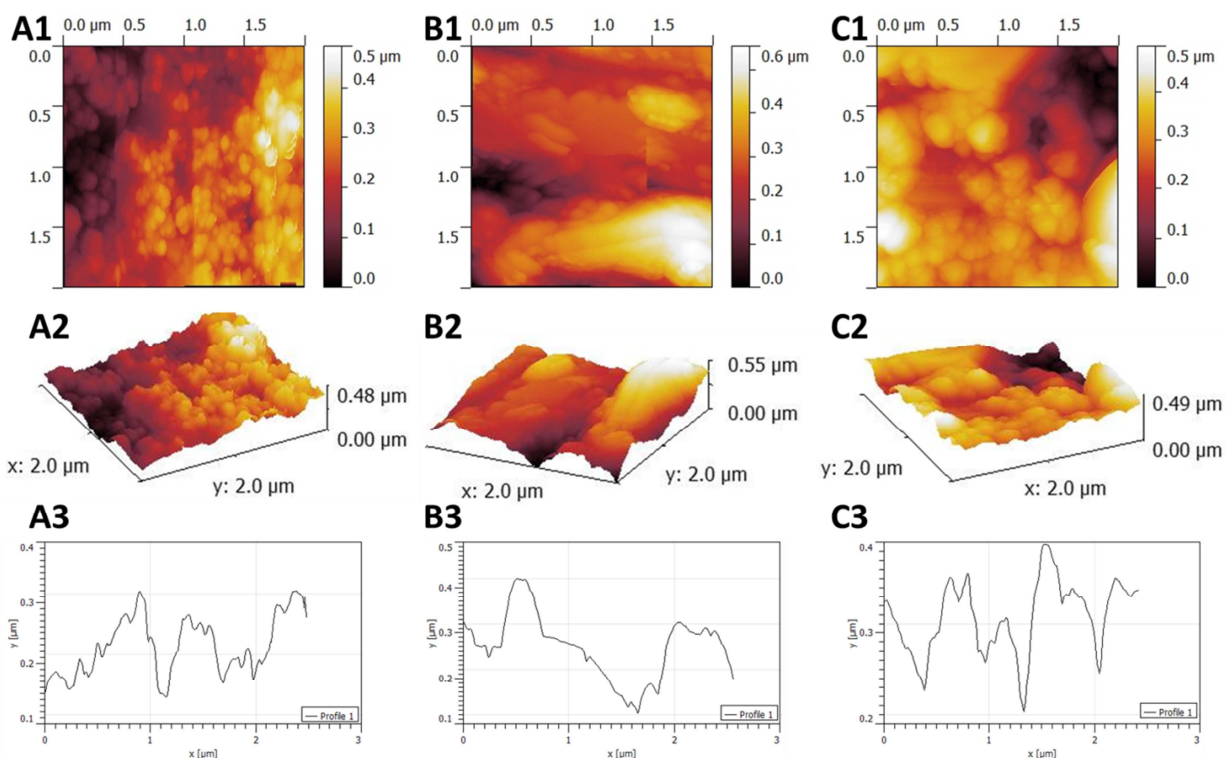


RYS. 162 – Wzór strukturalny ryboflawiny.

MB(I) na osi potencjałów w stronę ujemnych wartości o 40 mV w stosunku do potencjału tego pików pod nieobecność DNA (-0,2 V vs. -0,16 V) świadczyło o jego oddziaływaniu z molekułami DNA chromosomalnego. Choć po dodatku do układu 80 nM ryboflawiny na woltamperogramie nie pojawiał się jej wyraźny sygnał utlenienia, to powodowało to obniżenie sygnałów MB(I) i MB(III) (pomarańczowa krzywa na RYS. 163). Efekt ten pogłębiał się, gdy stężenie RF wzrastało do 1,8 μM . Wówczas na krzywych woltamperometrycznych pojawiał się nowy sygnał przy potencjale -0,39 V, obrazujący utlenianie ryboflawiny, a MB(I) malał jeszcze bardziej (czerwona krzywa na RYS. 163). Wskazuje to na zastępowanie przez molekuły RF cząsteczek MB oddziałujących z DNA. Wiedząc, że ryboflawina interkaluje do helisy kwasu, można stwierdzić, iż jednym z typów interakcji błękitu metylenowego z DNA jest właśnie interkalacja, a jej obrazem są zmiany wysokości sygnałów MB(I) i MB(III). Warto również zauważyć, iż wielkość pików MB(II) nie zmienia się w wyniku dodania do układu ryboflawiny. Pokazuje to, że sygnał ten związany jest z innym typem oddziaływania błękitu metylenowego z DNA i potwierdza wcześniejsze przypuszczenia dotyczące występowania co najmniej dwóch różnych typów interakcji pomiędzy nimi. W zaprezentowanym eksperymencie użycie dwóch interkalatorów ułatwiło znacząco wyjaśnienie natury wiązania ligandów z DNA.



RYS. 163 – Woltamperogramy po korekcji linii podstawowej zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE w AcB-Mg zawierającym 10 ppm dsDNA-ss, 0,08 μM błękitu metylenowego oraz ryboflawinę o wzrastającym stężeniu.



RYS. 164 – Powierzchnia sitodrukowanej elektrody grafitowej produkcji polskiej obrazowana za pomocą AFM: 1 – obraz w rzucie płaskim, 2 – obraz trójwymiarowy, 3 – profil powierzchni, w kolejnych etapach procedury pomiarowej stosowanej podczas badania oddziaływania DNA z błękitem metylenowym: A – po oczyszczeniu elektrochemicznym, B – po osadzeniu dsDNA-ss, C – po oddziaływaniu dsDNA-ss z błękitem metylenowym.

W wyniku oddziaływania błękitu metylenowego z DNA zmienia się także obraz powierzchni elektrody, na której dochodzi do interakcji, co monitorowane było techniką AFM. Powierzchnia sitodrukowanej elektrody grafitowej poddanej czyszczeniu elektrochemicznemu jest chropowata i zawiera wiele drobnych, niezbyt wypukłych ziarnistości (RYS. 164A). Po osadzeniu na niej dsDNA-ss obraz ziaren praktycznie zupełnie zanika, a w ich miejsce pojawiają się stosunkowo rozległe obszary, wystające bardziej ponad powierzchnię elektrody (RYS. 164B). Prawdopodobnie są to skupiska łańcuchów kwasu nukleinowego, które ulegają na przetworniku agregacji. Gdy następnie poddane są one działaniu błękitu metylenowego, obraz powierzchni elektrody zmienia się. Pojawiają się na niej zdecydowanie wyższe ziarnistości o średnicy większej niż po procesie czyszczenia (RYS. 164C). Świadczy to o zmianie organizacji nici DNA na powierzchni elektrody, która następuje w wyniku ich interakcji z błękitem metylenowym. Najprawdopodobniej ma miejsce interkalacja molekuł MB do łańcuchów kwasu, w wyniku czego ulegają one usztywnieniu i wydłużeniu, co w pewnym stopniu dezorganizuje utworzone wcześniej agregaty.

4.3.3.1.3. Wnioski

Obserwacja zmian rejestrowanych na sitodrukowanych elektrodach sygnałów utlenienia błękitu metylenowego w obecności kwasu deoksyrybonukleinowego pokazała, że wchodzi on w silne interakcje z różnymi rodzajami DNA, także charakteryzującymi się odmienną strukturą trzeciorzędową. Oddziaływanie MB z DNA powoduje wzrost trzech anodowych sygnałów utlenienia ligandu, dostarczając jednocześnie informacji o jego powinowactwie do kwasu. Jak pokazują badania przeprowadzone w obecności dodatkowego interkalatora w warunkach wykluczających interakcje elektrostatyczne ze szkieletem helisy, błękit metylenowy wiąże się z DNA na co najmniej dwa różne sposoby. Jednym z nich jest interkalacja obrazowana zmianami sygnałów MB(I) i MB(III). Natura drugiego nie jest zaś do końca znana, lecz bez wątplenia jego występowanie wpływa na podwyższenie sygnału MB(II).

Typ oddziaływań występujących pomiędzy DNA i błękitem metylenowym zależy od rodzaju kwasu. Do interkalacji dochodzi w przypadku wszystkich przebadanych DNA, lecz ilość molekuł MB wsuwających się pomiędzy pary komplementarnych zasad nukleinowych zależy od struktury łańcuchów DNA. Chociaż stężenie dsDNA-ss było najwyższe, to najslabiej wzmacniał on sygnały MB(I) i MB(III), co świadczy o najmniejszej liczbie interkalujących molekuł MB. Stężenie superhelikalnego DNA plazmidowego było 1000 razy niższe, a powodował on około dwukrotnie silniejszy efekt. Jest to dowód na dużo większe powinowactwo błękitu metylenowego do kolistych cząsteczek DNA w formie superhelikalnej niż do jego molekuł liniowych. Oba oligonukleotydy silniej wzmacniały sygnały utleniania MB niż DNA chromosomalne i plazmidowe. Powodem tego może być zdecydowanie mniejszy rozmiar ich łańcuchów, w których pojedyncza nić zbudowana jest zaledwie z ośmiu nukleotydów, a dzięki temu ich bardziej uporządkowana adsorpcja na powierzchni elektrody. Krótsze łańcuchy nie ulegają tak silnemu skręcaniu i zapętłaniu jak długie nici DNA chromosomalnego, co sprawia, że są one łatwiej dostępne dla cząsteczek MB obecnych w roztworze. Niemniej jednak, dwa rodzaje oligonukleotydów różniące się sekwencją wywołują niejednakowy wpływ na piki MB(I) i MB(II). Do ich silniejszego wzmocnienia dochodzi w obecności d(GC)₄ niż d(AT)₄. Oznacza to, że intensywność interkalacji molekuł błękitu metylenowego silnie zależy od budowy łańcuchów DNA i że preferowane są te, zbudowane z guaniny i cytozyny. Oligonukleotydy d(GC)₄ wyróżniają się także z punktu widzenia drugiego typu interakcji MB z DNA, objawiającego się wzrostem sygnału MB(II). Jako jedyne spośród wszystkich przebadanych rodzajów DNA powodują bardzo silne wzmocnienie tego piku. W przypadku d(AT)₄ efekt ten jest zdecydowanie słabszy, a w obecności dsDNA-ss i scpUC19 sygnał MB(II) wzrasta jedynie minimalnie w porównaniu ze ślepą próbą. W ten sposób ujawnia się odmienna natura oddziaływania błękitu metylenowego z d(GC)₄, które prawdopodobnie jest charakterystyczne dla

tej sekwencji lub dla zasad w niej zawartych. Być może polega ono na wiązaniu MB w rowkach DNA.

Podsumowując tą część eksperymentów, można stwierdzić, iż błękit metylenowy wchodzi w silne interakcje ze wszystkimi analizowanymi rodzajami DNA, a jego powinowactwo do nich wzrasta w następującym porządku: dsDNA-ss < scpUC19 < d(AT)₄ < d(GC)₄. Na naturę tych oddziaływań ogromny wpływ wywiera zarówno struktura, jak i sekwencja łańcuchów kwasu. Stosowane tutaj sitodrukowane układy trójelektrodowe produkcji polskiej stanowią proste i skuteczne narzędzie do badania oddziaływań DNA z ligandami w roztworze. Jedynym utrudnieniem jest blokowanie ich powierzchni przez utlenione molekuly kwasu nukleinowego, co powoduje zanik sygnałów utlenienia zasad azotowych na kolejnych rejestrowanych woltamperogramach.

4.3.3.2. Badanie elektrochemicznych właściwości różnych form DNA plazmidowego

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że nie tylko sekwencja, ale także trzeciorzędowa struktura DNA, wpływa na sposób jego oddziaływania z błękitem metylenowym. Rodzajem DNA o nietypowej organizacji przestrzennej łańcuchów są plazmidy. Jak wiadomo, mogą przyjmować one różnorodną strukturę, od kolistej superhelikalnej, przez kolistą zrelaksowaną, aż do liniowej. Łatwo się domyśleć, że tak poważne zmiany w ich kształcie mogą mieć znaczący wpływ na naturę ich oddziaływania z błękitem metylenowym. Nie pozostają one też bez znaczenia dla właściwości elektrochemicznych tego rodzaju DNA oraz intensywności jego adsorpcji na elektrodzie, co było przedmiotem różnych badań naukowych [75, 82, 85, 88, 111, 113-115].

Choć głównym celem tej części eksperymentów było zbadanie jak różne rodzaje DNA plazmidowego wpływają na sygnały utlenienia błękitu metylenowego, musiały zostać one poprzedzone sprawdzeniem ich właściwości elektrochemicznych, gdyż mogą być one różne w zależności od wielkości i formy danego plazmidu. Analizie poddane zostały dwa plazmidy o różnej wielkości, oba w formie superhelikalnej i liniowej. Wstępne badania pokazały, iż stosowane plazmidy silnie adsorbują się na elektrodzie z węgla szklanego, powodując znaczne zmiany pojemności/oporności przetwornika. Na sitodrukowanych elektrodach grafitowych natomiast efekty ich adsorpcji/reakcji redoks widoczne są przy dużo wyższych stężeniach i zanikają przy rejestrowaniu kolejnych krzywych woltamperometrycznych (*RYS. 160B*), co może wynikać z blokowania powierzchni przetwornika przez utlenione molekuly. Zdecydowano o przeprowadzeniu analizy właściwości elektrochemicznych plazmidów w klasycznym układzie elektrod.

4.3.3.2.1. Procedura pomiarowa

Przedmiotem badań była elektroaktywność dwóch różnych plazmidów – pUC19 o wielkości 2686 par zasad i pGEX-4T-2 o wielkości 4970 par zasad, przy czym każdy z nich w dwóch formach - superhelikalnej (scpUC19 i scpGEX-4T-2) i liniowej (linpUC19 i linpGEX-4T-2). Dla porównania analizie poddano również dsDNA-ct, co pozwoliło na wyraźne wskazanie różnic we właściwościach elektrochemicznych DNA plazmidowego i chromosomalnego. Badania przeprowadzone zostały w klasycznym układzie elektrod, który składał się z: elektrody z węgla szklanego (GCE) jako pracującej, nasyconej elektrody kalomelowej (NEK) jako odniesienia oraz elektrody pomocniczej w postaci pręta węglowego. Podstawową wadą takiego układu elektrodowego była żmudna i długotrwała procedura oczyszczania wszystkich jego elementów po każdym pomiarze. Obejmowała ona minimum 20-minutowe polerowanie GCE przy

użyciu tlenu glinu, mycie wszystkich elektrod i naczynka pomiarowego w płuczce ultradźwiękowej w kąpeli zawierającej 10% nadtlenu wodoru lub etanol oraz moczenie ich w stężonym kwasie siarkowym (VI) lub azotowym (V), a następnie dokładne płukanie wodą dejonizowaną, podwójnie destylowaną. W kolejnym kroku sprawdzana była czystość całego układu poprzez rejestrowanie cyklicznych woltamperogramów w 10 ml czystego 0,25 M buforu octanowego zawierającego 18 mM $MgCl_2$. Proces ten powtarzano aż do momentu, gdy krzywe woltamperometryczne miały identyczny kształt, a później jeszcze przez kolejną godzinę, by sprawdzić długotrwałą stabilność powierzchni elektrody pracującej. Kiedy elektroda była już czysta i charakteryzowała się stabilną powierzchnią, rejestrowano jej linię podstawową metodą SWV w zakresie potencjałów od -0,6 V do +1,55 V. Następnie do buforu dodawano określoną objętość odpowiednio rozcieńczonego wyjściowego roztworu danego rodzaju DNA, co prowadziło do uzyskania stężeń rzędu pg/ml (Tabela 18), po czym co 17 minut rejestrowano kolejne woltamperogramy fali prostokątnej. Wraz z upływem czasu plazmidy ulegały powolnej adsorpcji na powierzchni elektrody, czego obrazem były zarówno pojawiające się na rejestrowanych krzywych sygnały redoks, jak i sam wzrost prądu linii podstawowej elektrody. Cała procedura, według której prowadzone były pomiary, została przedstawiona poniżej (procedura XIII).

TABELA 18 – Sposób przygotowania roztworów pomiarowych różnych rodzajów DNA o określonym stężeniu, stosowanych w analizie ich właściwości elektrochemicznych.

Rodzaj DNA	Stężenie wyjściowego roztworu DNA [ppm = $\mu g/ml$]	Krotność rozcieńczenia wyjściowego roztworu DNA	Objętość rozcieńczonego roztworu DNA dodana do 10 ml AcB-Mg [μl]	Stężenie DNA w roztworze pomiarowym [pg/ml]
dsDNA-ct	20	1000	2	4
scpUC19	86,5	1000	0,9	8
linpUC19	11	10000	5,5	0,6
scpGEX-4T-2	0,252	10	2,8	7
linpGEX-4T-2	0,081	10	4,9	4

Procedura XIII

1) Czyszczenie układu pomiarowego

- polerowanie GCE przy użyciu tlenu glinu przez minimum 20 min.
- mycie w płuczce ultradźwiękowej w kąpeli zawierającej 10% nadtlenu wodoru lub etanol
- moczenie elektrod i naczynka pomiarowego w stężonym kwasie siarkowym (VI) lub azotowym (V)
- dokładne płukanie wodą podwójnie destylowaną, dejonizowaną

2) Elektrochemiczne sprawdzenie czystości i stabilności GCE

metoda: CV

roztwór: AcB-Mg

mieszanie roztworu: tak

pomiar:

liczba skanów

aż do uzyskania stabilnych woltamperogramów i następnie jeszcze przez 1 h

potencjał początkowy

E_{start} : -0,6 V

pierwsze zawrócenie potencjału

E_1 : +1,55 V

drugie zawrócenie potencjału

E_2 : -0,6 V

krok potencjału

E_{krok} : 0,005 V

szybkość polaryzacji

0,1 V/s

3) Rejestracja linii podstawowej

metoda: SWV

roztwór: AcB-Mg

mieszanie roztworu: tak

pomiar:

potencjał kondycjonowania:

+0,5 V przez 30 s

liczba skanów	2
potencjał początkowy	$E_{\text{start}}: -0,6 \text{ V}$
potencjał końcowy	$E_{\text{stop}}: +1,55 \text{ V}$
krok potencjału	$E_{\text{krok}}: 0,005 \text{ V}$
amplituda potencjału	$E_{\text{amplituda}}: 0,02 \text{ V}$
częstotliwość	25 Hz

4) Dodatek DNA do układu

metoda: SWV

roztwór: AcB-Mg + odpowiednia ilość roztworu DNA, prowadząca do jego stężenia w roztworze pomiarowym 4 pg/ml dla dsDNA-ct, 8 pg/ml dla scpUC19, 0,6 pg/ml linpUC19, 7 pg/ml dla scpGEX-4T-2, 4 pg/ml dla linpGEX-4T-2

mieszanie roztworu: tak

pomiar: parametry jak w pkt. 3

pomiar powtarzany co 17 minut

4.3.3.2.2. Wyniki

Zanurzenie na kilkadziesiąt minut starannie wyczyszczonej elektrody z węgla szklanego w roztworze AcB-Mg zawierającym niewielkie ilości DNA, rzędu pg/ml, skutkowało powolną adsorpcją cząsteczek kwasu na jej powierzchni, prowadzącą do utworzenia ich stabilnej warstwy. Rejestrowanie co kilkanaście minut woltamperogramów fali prostokątnej pozwalało na obserwację samego procesu adsorpcji, jak i ujawniało właściwości elektrochemiczne użytych rodzajów DNA, wśród których znalazły się cztery plazmidy różniące się wielkością i strukturą oraz dla porównania DNA chromosomalne z grasicą cięłej.

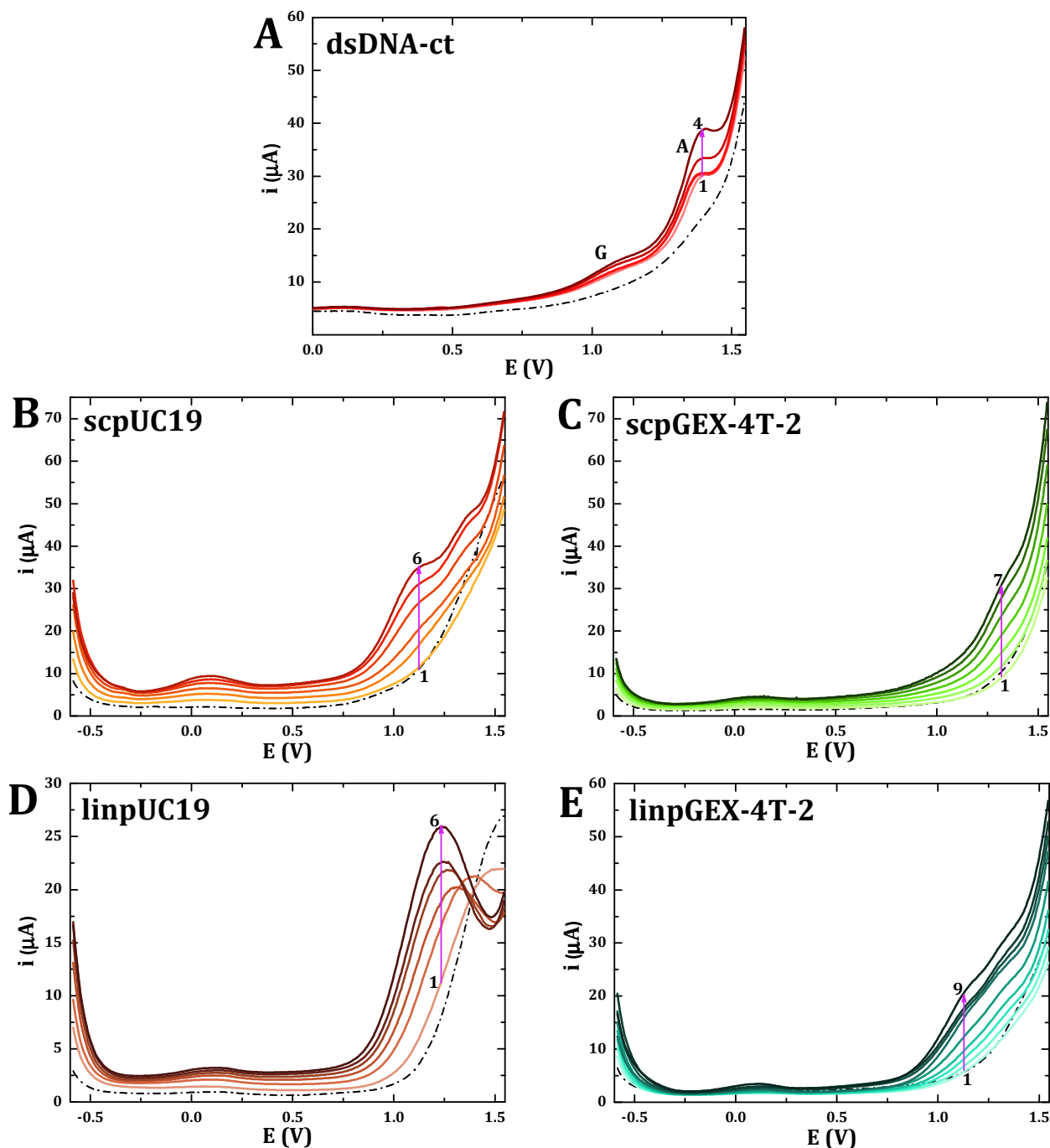
DNA chromosomalne charakteryzuje się typową liniową formą cząsteczek, które najczęściej są przedmiotem różnych badań eksperymentalnych. Użyte tu dsDNA-ct wykazywało standardową elektroaktywność, objawiającą się w postaci dwóch pików utlenienia, pojawiających się przy potencjale +1,05 V i +1,35 V (*RYS. 165A*). Obrazowały one elektROUTLENIANIE odpowiednio guaniny i adeniny. Oba sygnały wzrastały wraz z upływem czasu, co świadczyło o stopniowym osadzaniu się molekuł DNA na powierzchni elektrody, ale ich utlenione formy nie blokowały jej, jak miało to miejsce w przypadku elektrod sitodrukowanych. Ponadto, adsorpcja DNA na przetworniku wywoływała pewne zmiany jego pojemności/oporności, na co wskazywał ogólny wzrost w porównaniu z linią podstawową prądu rejestrowanego w całym zastosowanym zakresie potencjałów, szczególnie przy wartościach obejmujących sygnały G i A.

Inaczej wyglądają woltamperogramy zarejestrowane w obecności DNA plazmidowego (*RYS. 165B-E*). Nie pojawiały się na nich standardowe sygnały utlenienia zasad azotowych, lecz widoczne były dużo większe efekty pojemnościowe/opornościowe. Plazmidy w porównaniu z dsDNA-ct wykazują odmienną elektroaktywność, a ich obecność na powierzchni elektrody wywołuje dużo silniejsze zmiany pojemności podwójnej warstwy elektrycznej. Intensywność adsorpcji i pojawiające się na krzywych woltamperometrycznych sygnały nie są jednakowe dla wszystkich poddanych analizie plazmidów i zależą od ich wielkości oraz formy.

Superhelikalna forma plazmidu pUC19 ulegała elektROUTLENIANIU na elektrodzie GCE, lecz obrazujące ten proces sygnały nie były tak wyraźne i dobrze wykształcone jak w przypadku DNA chromosomalnego (*RYS. 165B*). Sygnały utleniania guaniny i adeniny pojawiały się na woltamperogramie zarejestrowanym dopiero po upływie około 50 minut i częściowo nakładały się one na siebie. Spowodowane było to przesunięciem pików na osi potencjałów w stronę dodatnich wartości, co wynikało z kolei z bardzo silnych efektów pojemnościowych/opornościowych wywoływanych przez scpUC19. O ich intensywności świadczyć może wzrost prądu przy potencjale spoza zakresu występowania sygnałów G i A, przykładowo +0,50 V. W przypadku dsDNA-ct po 50 minutach prąd ten rósł o około 0,3 μA , podczas gdy scpUC19 wywoływał wzrost aż o 4,8 μA .

Jeszcze bardziej zaskakujący kształt przybierały woltamperogramy rejestrowane dla superhelikalnego plazmidu o dużo większym rozmiarze, scpGEX-4T-2. Nie pojawiały się na nich

osobne sygnały utlenienia guaniny i adeniny, a z trudem można było dostrzec jedynie szeroki i bardzo niski sygnał w zakresie potencjału +1,15–+1,45 V (RYS. 165C). Zapewne stanowił on złane sygnały utleniania zasad azotowych. Również zmiany w podwójnej warstwie elektrycznej przetwornika wywołane adsorpcją scpGEX-4T-2 nie były tak znaczne jak w przypadku scpUC19, ale nadal pozostawały większe niż w obecności DNA chromosomalnego. Prąd przy potencjale +0,50 V rósł bowiem w stosunku do linii podstawowej o 1,9 μA .



RYS. 165 – Woltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na elektrodzie GCE co 17 minut w roztworze AcB-Mg zawierającym różne rodzaje DNA: A – 4 pg/ml dsDNA-ct, B – 8 pg/ml scpUC19, C – 7 pg/ml scpGEX-4T-2, D – 0,6 pg/ml linpUC19, E – 4 pg/ml linpGEX-4T-2. Różowe pionowe strzałki wskazują kolejność krzywych rejestrowanych w równych odstępach czasu. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg.

Efekty obserwowane dla plazmidów w formie superhelikalnej, tzn. zlewianie sygnałów G i A oraz silne zmiany pojemnościowo-opornościowe, występują także w przypadku analizy ich form liniowych, choć jednocześnie intensywność tych efektów nie jest jednakowa dla obu form. Podczas gdy utlenianie scpUC19 objawiało się na woltamperogramie w postaci dwóch częściowo nakładających sygnałów G i A, linpUC19 dawał tylko jeden wyraźny pik przy potencjale około

+1,2 V (RYS. 165D). Prawdopodobnie stanowił on przesunięte, a przez to zlane, sygnały utlenienia obu tych zasad przy takim samym potencjale. Ponadto, pik ten pojawiał się dużo szybciej i rósł gwałtowniej w czasie, mimo iż stężenie linpUC19 w roztworze było ponad 10-krotnie niższe niż scpUC19. Świadczy to o szybszej i silniejszej adsorpcji na elektrodzie formy liniowej tego plazmidu w porównaniu z superhelikalną, pomimo tego, że zawierają one dokładnie taką samą liczbę par zasad uszeregowanych w identycznym porządku. Jedyne, co je różni, to struktura trzeciorzędowa.

W przypadku drugiego plazmidu w formie liniowej, lin pGEX-4T-2, również dochodziło do nakładania się sygnałów utleniania guaniny i adeniny, choć nie obrazował tego na krzywej woltamperometrycznej tak dobrze wykształcony pik (RYS. 165E). Sygnał ten miał raczej postać szerokiego obszaru w zakresie potencjałów od +0,90 do +1,45 V, w którym następował znaczący wzrost prądu. Porównując wygląd woltamperogramów zarejestrowanych dla pGEX-4T-2 w formie liniowej i superhelikalnej, nie zauważa się tak jednoznacznych różnic, jak miało to miejsce w przypadku mniejszego plazmidu, pUC19.

4.3.3.2.3. Wnioski

Przeprowadzona analiza właściwości elektrochemicznych różnych typów DNA plazmidowego ujawniła, jak bardzo różnią się one od DNA chromosomalnego. Przede wszystkim plazmidy dużo silniej adsorbują się na powierzchni elektrody z węgla szklatego, a potencjał procesów utlenienia zawartej w nich guaniny i adeniny ulega przesunięciom, powodując często nakładanie się ich pików i zlewanie w jeden sygnał. Taki rezultat jest nową obserwacją i był zaskakujący. Choć wiadomo, że sygnały utleniania G i A mogą ulegać niewielkim przesunięciom na osi potencjałów w zależności od materiału stosowanej do pomiarów elektrody [82], czy sekwencji nukleotydowej w przypadku analizy krótkich łańcuchów oligonukleotydowych [482], to niespotykane jest ich nakładanie się. Częściowo różnice w wyglądzie sygnałów redoks guaniny i adeniny, wchodzącej w skład molekuł dsDNA-ct i plazmidów, można starać się wytłumaczyć silnymi efektami pojemnościowymi/opornościowymi wywoływanymi przez DNA plazmidowe. Jego cząsteczki, szczególnie w formie superhelikalnej, mają zupełnie odmienną strukturę niż łańcuchy DNA chromosomalnego, co może prowadzić do odmiennego sposobu osadzania się ich na powierzchni elektrody.

Efekt zlewania się sygnałów utlenienia guaniny i adeniny jest silniejszy dla plazmidów liniowych niż superhelikalnych, co w niektórych przypadkach może stanowić podstawę do ich rozróżnienia. Różnice w woltamperometrycznej odpowiedzi tych dwóch form plazmidów pokazują jednak, że nie tylko liczba i sekwencja zasad azotowych, ale przede wszystkim ich orientacja względem siebie w warstwie adsorpcyjnej na przetworniku wpływa na jej przewodnictwo elektronowe. Wydaje się mieć to szczególne znaczenie, jeśli przyjmie się, iż przepływ ładunku przez warstwę DNA odbywa się według mechanizmu domenowego [124, 141, 156, 157]. Wówczas wzajemna pozycja zasad azotowych będzie miała kluczowe znaczenie dla tworzenia się kilkuzasadowych domen, za pośrednictwem których odbywa się transport ładunku.

Analiza elektroaktywności różnych form plazmidów pokazała odmienną ich adsorpcji na elektrodzie oraz reakcji redoks G i A. Próba rozróżnienia form superhelikalnych i liniowych na tej podstawie nie jest zawsze zadaniem prostym, dlatego też warto poszukać alternatywnego rozwiązania. Może być nim na przykład dodanie do układu substancji, której natura oddziaływań z DNA będzie zależna od jego struktury trzeciorzędowej. Jak pokazały badania, wykonane wcześniej przy użyciu sitodrukowanych układów trójelektrodowych, ligandem spełniającym te warunki jest błękit metylenowy.

4.3.3.3. Rozróżnianie różnych form DNA plazmidowego na podstawie ich oddziaływania z błękitem metylenowym

Błękit metylenowy wykazuje odmienne powinowactwo do DNA chromosomalnego i plazmidowego (rozdział II.4.3.3.). Pozwala to przypuszczać, że nie będzie on również oddziaływał w taki sam sposób z plazmidami o różnej strukturze przestrzennej, a tym samym pozwoli na ich rozróżnienie, co nie jest łatwym zadaniem wyłącznie na podstawie różnic w ich właściwościach elektrochemicznych. Analiza wywołanych obecnością różnych rodzajów plazmidów zmian prądów i potencjałów sygnałów utlenienia MB może ujawnić różnice wystarczające do identyfikacji ich trzeciorzędowej struktury. Wówczas błękit metylenowy mógłby stanowić znacznik, umożliwiający odróżnienie form liniowych i superhelikalnych DNA plazmidowego.

4.3.3.3.1. Procedura pomiarowa

Podobnie jak badanie elektrochemicznych właściwości plazmidów, tak i ta część eksperymentów wykonywana była przy użyciu klasycznego układu elektrod, w którym elektroda pracująca wykonana była z węgla szklistego. Analizie poddane zostały oddziaływania błękitu metylenowego z czterema rodzajami DNA plazmidowego – dwoma superhelikalnymi (scpUC19 i scpGEX-4T-2) i dwoma liniowymi (linpUC19 i linpGEX-4T-2). Stosowana tutaj procedura pomiarowa (procedura XIV), jak i poprzednio, rozpoczynała się od wieloetapowego czyszczenia układu i sprawdzenia stabilności powierzchni elektrody pracującej. Po zarejestrowaniu linii podstawowej elektrody do elektrolitu, który stanowiło 10 ml buforu octanowego zawierającego 18 mM MgCl₂, wkraplana była określona objętość odpowiednio rozcieńczonego wyjściowego roztworu danego rodzaju plazmidów (*Tabela 19*) i przez około 140 min. w 17-minutowych odstępach czasu monitorowano metodą SWV ich utlenianie na powierzchni przetwornika. Cały etap związany z dodawaniem do układu DNA pomijany był w przypadku ślepej próby. Najistotniejszym punktem całej procedury było stopniowe dodawanie do układu roztworu błękitu metylenowego i rejestrowanie po każdym dodatku krzywej woltamperometrycznej prezentującej proces jego elektrotleniania. Objętości porcji dodawanego roztworu MB były różne w obecności poszczególnych plazmidów, lecz we wszystkich przypadkach jego stężenie rosło stopniowo w zakresie od 0,2 do 5,4 μM. Porównując zmiany wysokości oraz położenia każdego z trzech pików utlenienia MB wywołane obecnością różnych rodzajów plazmidów, można było dostrzec pewne prawidłowości, pozwalające na rozróżnienie poszczególnych form plazmidów już przy ich stężeniach rzędu pg/ml.

Procedura XIV

- 1) Czyszczenie układu pomiarowego
- 2) Elektrochemiczne sprawdzenie czystości i stabilności GCE
- 3) Rejestracja linii podstawowej
- 4) Dodatek DNA do układu (etap pomijany dla ślepej próby)
 metoda: SWV
 roztwór: AcB-Mg + odpowiednia ilość roztworu DNA plazmidowego, prowadząca do jego stężenia w roztworze pomiarowym 4 pg/ml dla scpUC19, 2 pg/ml linpUC19, 7 pg/ml dla scpGEX-4T-2, 4 pg/ml dla linpGEX-4T-2
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar: parametry jak w pkt. 3
 pomiar powtarzany co 17 min. przez ok. 140 min.
- 5) Kolejne dodatki MB do układu
 metoda: SWV

} przeprowadzone zgodnie z
Procedurą XIII

roztwór: DNA plazmidowe w AcB-Mg + kolejne dodatki odpowiedniej ilości roztworu MB, prowadzące do jego stężenia w roztworze pomiarowym od 0,1 do 5,4 μM
 mieszanie roztworu: tak
 pomiar: parametry jak w pkt. 2

TABELA 19 – Dodatki różnych rodzajów DNA plazmidowego o określonym stężeniu do roztworu pomiarowego, stosowanych w analizie ich oddziaływania z błękitem metylenowym.

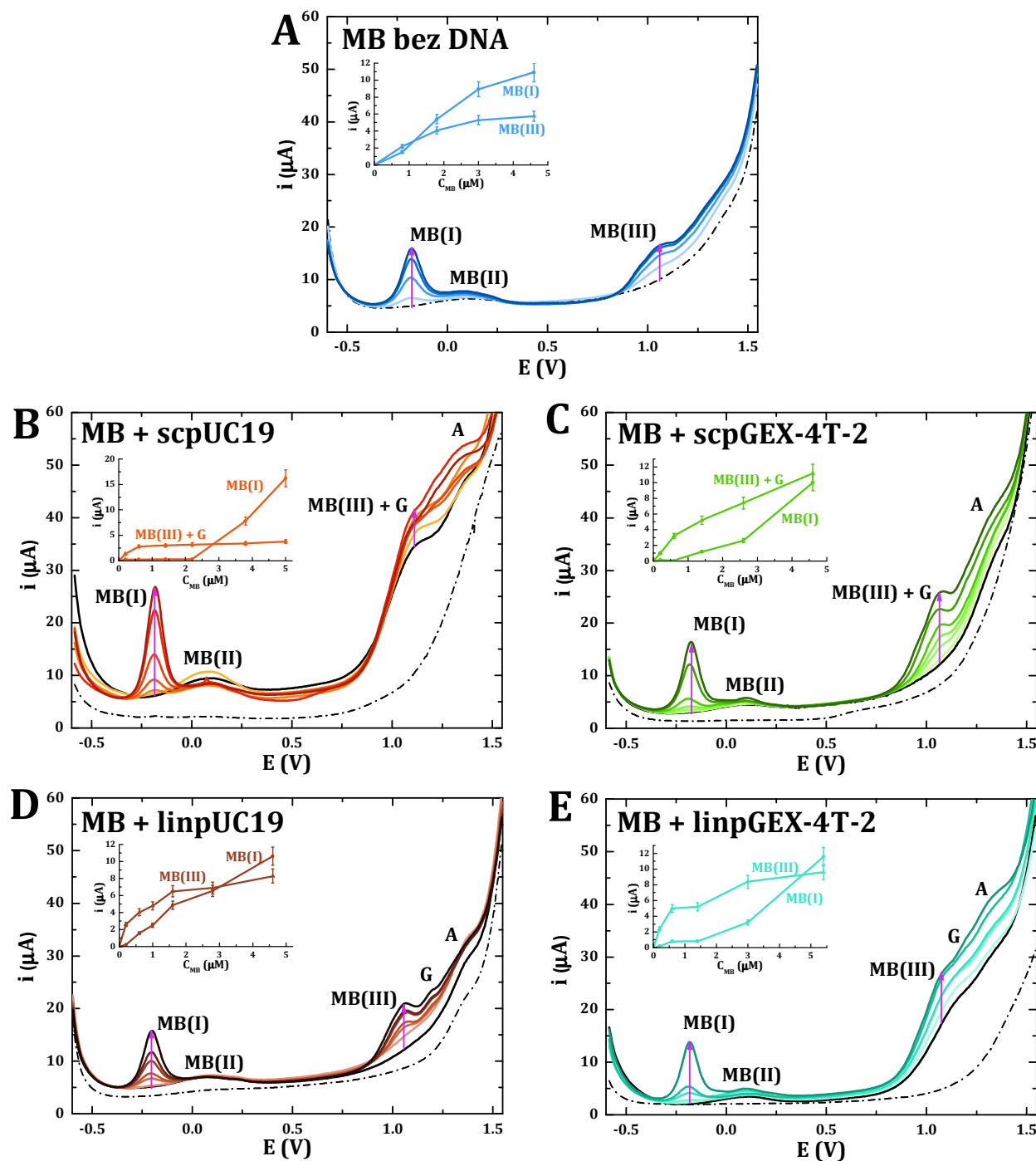
Rodzaj DNA	Stężenie wyjściowego roztworu DNA [ppm = $\mu\text{g/ml}$]	Krotność rozcieńczenia wyjściowego roztworu DNA	Objętość rozcieńczonego roztworu DNA dodana do 10 ml AcB-Mg [μl]	Stężenie DNA w roztworze pomiarowym [pg/ml]
scpUC19	86,5	10000	4,6	4
linpUC19	11	1000	1,8	2
scpGEX-4T-2	0,252	10	2,8	7
linpGEX-4T-2	0,081	10	4,9	4

4.3.3.3.2. Wyniki

Zanurzenie elektrody z węgla szklistego w roztworze DNA plazmidowego na ponad 2 godziny prowadziło do jego powolnej adsorpcji na jej powierzchni i osiągnięcia wysycenia warstwy powierzchniowej. Tworzone w ten sposób warstwy adsorpcyjne różniły się jednak strukturą zależnie od wielkości i formy plazmidów. Warto tu zauważyć, że w obecności dodawanego do układu w kolejnym etapie błękitu metylenowego warstwa DNA osadzonego na elektrodzie pozostawała stabilna zarówno ze wzrostem jego stężenia, jak i w czasie. Działo się tak, gdyż zawartość plazmidów w układzie nie ulegała zmianie, a powierzchnia przetwornika została nimi wysycona jeszcze przed dodatkiem MB. Wprowadzenie do roztworu pomiarowego błękitu metylenowego prowadziło do jego interakcji z molekułami plazmidów, przez co również następowało jego osadzanie na powierzchni przetwornika. Stężenie MB w roztworze wzrastało stopniowo i po każdym jego dodatku rejestrowane były krzywe voltamperometryczne, które prezentowały procesy utleniania zarówno błękitu metylenowego, jak i plazmidów. Analizując zmiany pików MB spowodowane poszczególnymi rodzajami DNA plazmidowego i porównując je z sygnałami zarejestrowanymi podczas ślepej próby, można było wyciągnąć wnioski odnośnie występujących pomiędzy nimi oddziaływań oraz podjąć próbę rozróżnienia plazmidów.

Eksperyment rozpoczęto od zbadania akumulacji i elektroaktywności błękitu metylenowego na czystej elektrodzie z węgla szklistego w warunkach pomiarowych stosowanych później także w obecności plazmidów. Na voltamperogramach zarejestrowanych w AcB-Mg zawierającym MB o stężeniu wzrastającym w zakresie 0,8-4,6 μM występowały trzy sygnały jego utlenienia: MB(I) przy -0,18 V, MB(II) przy +0,07 V oraz MB(III) przy 1,10 V (RYS. 166A). Ich potencjały nie ulegały gwałtownym przesunięciom w wyniku wzrostu stężenia MB, co świadczy o tym, że podczas adsorpcji w badanym zakresie stężeń jego molekule układają się w jednakowy sposób na elektrodzie. Prawdopodobnie zorientowane są one równolegle do powierzchni przetwornika. Piki utleniania błękitu metylenowego pojawiały się już przy jego najniższym stężeniu, po czym stopniowo rosły, a powyżej stężenia 3 μM ulegały stabilizacji (wstawienie na RYS. 166A). Pik MB(II) z kolei był dużo niższy i nie ulegał bardzo znaczącemu podwyższeniu. Trend wzrostu MB(I) i MB(III), w przeciwieństwie do MB(II), był bardzo podobny, co sugeruje, iż procesy redoks obrazowane przez dwa pierwsze piki były ze sobą powiązane. Podobnie jak podczas badania elektroaktywności błękitu metylenowego na elektrodach sitodrukowanych (rozdział II.4.3.2), tak i tutaj nie dochodziło do jego elektropolimeryzacji, gdyż nie były spełnione jej podstawowe warunki, tj. przykładanie do elektrody cyklicznie zmieniającego się napięcia,

alkaliczne środowisko, milimolowe stężenia MB, a na voltamperogramie nie obserwowano znaczącego obniżenia MB(I) przy jednoczesnym gwałtownym wzroście MB(II).



RYS. 166 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na elektrodzie GCE w roztworze AcB-Mg zawierającym błękit metylenowy o stężeniu wzrastającym stopniowo w zakresie: A – 0–4,6 μM pod nieobecność DNA, B – 0–5,0 μM w obecności 4 pg/ml scpUC19, C – 0–4,6 μM w obecności 7 pg/ml scpGEX-4T-2, D – 0–4,6 μM w obecności 2 pg/ml linpUC19, E – 0–5,4 μM w obecności 4 pg/ml linpGEX-4T-2. Różowe pionowe strzałki wskazują kierunek wzrostu stężenia MB. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg, zaś czarne linie ciągłe prezentują voltamperogramy zarejestrowane w roztworze AcB-Mg po dodatku danego rodzaju DNA. Wstawienia: Zależność prądów utlenienia sygnałów MB(I) i MB(III) od stężenia MB w roztworze pomiarowym.

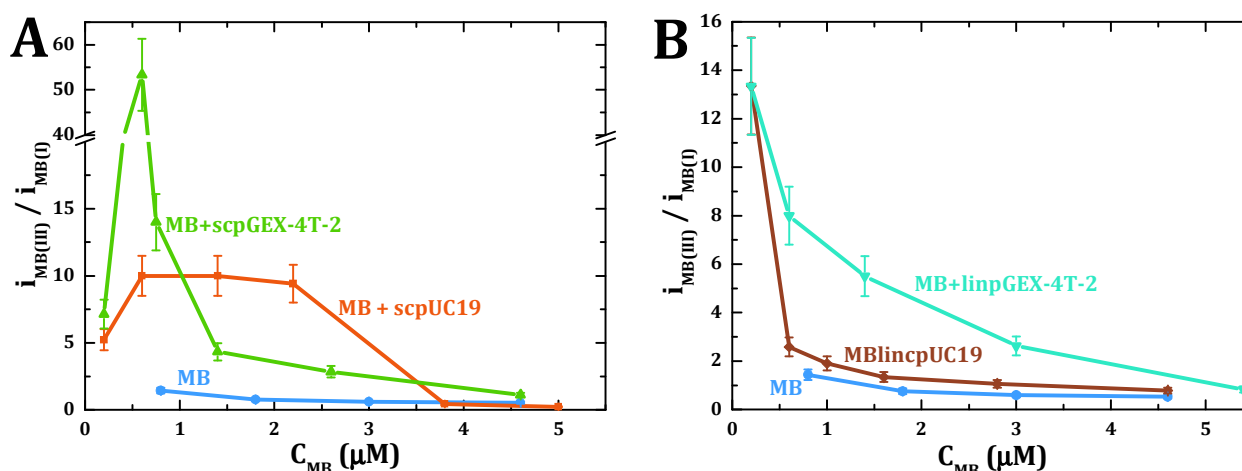
Voltamperogramy prezentujące utlenianie błękitu metylenowego miały inny kształt, gdy były rejestrowane na elektrodzie z węgla szklanego, na której uprzednio utworzona została stabilna warstwa danych plazmidów. Ich obecność objawiała się w postaci, pojawiających się obok trzech typowych sygnałów utleniania błękitu metylenowego, sygnałów utleniania zawartej w nich guaniny i adeniny, które zlewały się ze sobą, tworząc często jedno szerokie pasmo (*RYS. 166B-E*). W przypadku superhelikalnych form plazmidów sygnał utleniania guaniny nakładał się z pikem

MB(III), który występował przy potencjale +1,10 V, zaś adenina utleniała się przy potencjale +1,30 V (RYS. 166B-C). Plazmidy w formie liniowej natomiast utleniały się na elektrodzie, dając piki przy potencjale +1,2 V (G) i +1,3 V (A), przy czym częściowo zlewały się one ze sobą, ale w mniejszym stopniu zakłócały sygnał MB(III) (RYS. 166D-E). To, co było charakterystyczne dla wszystkich analizowanych rodzajów DNA, to fakt znacznego podwyższenia w obecności MB sygnałów utlenienia guaniny i adeniny, pojawiających się w zakresie potencjałów +1,1–+1,4 V (RYS. 166B-E – czarne ciągłe krzywe vs. kolejne kolorowe krzywe). Może mieć to ogromne znaczenie przy detekcji DNA plazmidowego i pozwolić na obniżenie i tak już niskiej (rzędu pg/ml) granicy wykrywalności.

Podstawą analizy w tym eksperymencie były sygnały utlenienia błękitu metylenowego i to ich zmiana wywołana obecnością plazmidów poddawana była szczegółowej interpretacji, ujawniając różnorodność ich oddziaływań z MB zależnie od wielkości i struktury trzyczłonowej ich molekuł. W przypadku wszystkich form DNA plazmidowego piki MB(I) i MB(III) rosły stopniowo wraz ze wzrostem stężenia błękitu metylenowego w zakresie ok. 0,2–5,0 μM , a wysokość piku MB(II) wzrastała tylko nieznacznie, co potwierdzało brak polimeryzacji MB na elektrodzie (wstawienia na RYS. 166B-E). Obserwując uważniej trendy wzrostu prądów MB(I) i MB(III) wraz ze wzrostem stężenia ligandu, można zauważyć, że nie były one identyczne tak, jak miało to miejsce w układzie pod nieobecność DNA (wstawienia na RYS. 166A). Podczas gdy MB(III) wrastał znacząco już od najniższych stężeń błękitu metylenowego, o tyle MB(I) ciężko było dostrzec na voltamperogramach przy najniższych stężeniach ligandu, a jego wzrost następował dopiero powyżej stężenia 2 μM dla scpUC19 (wstawienie na RYS. 166B) i 1 μM dla scpGEX-4T-2 (wstawienie na RYS. 166C) oraz poniżej 1 μM dla obu plazmidów liniowych (wstawienia na RYS. 166D-E). Wskazuje to, iż błękit metylenowy, adsorbując się w warstwie plazmidów, ulega odmiennym procesom niż w przypadku adsorpcji na czystej elektrodzie GCE. Niższa wysokość sygnału MB(I) w obecności plazmidów przy niskich stężeniach ligandu nie jest zaskakująca, gdyż powierzchnia elektrody dostępna dla bezpośredniej adsorpcji MB była dużo mniejsza ze względu na obecność plazmidów. Sygnał MB(I) zarejestrowany na elektrodzie pokrytej plazmidami odpowiadał jednak utlenianiu molekuł MB znajdujących się w ich warstwie, tak więc kinetyka tej reakcji mogła zostać spowolniona, co przekładało się na jego obniżenie w stosunku do sygnału zarejestrowanego na czystej elektrodzie GCE. Wolniejsza reakcja mogła być spowodowana większą odległością molekuł MB od przetwornika lub też jej utrudnieniem wywołanym silnymi oddziaływaniami molekuł błękitu metylenowego z plazmidami. Inaczej sytuacja wyglądała w przypadku sygnału MB(III), który w obecności warstwy plazmidów na elektrodzie rósł przy jednoczesnym podwyższeniu sygnałów utlenienia zasad azotowych. Efekt ten wynikał prawdopodobnie z wnikania molekuł błękitu, nawet przy ich bardzo niskim stężeniu, do warstwy plazmidów i wiązania się z nimi na drodze interkalacji i/lub innych typów oddziaływań. Proces utleniania molekuł błękitu metylenowego oddziałujących z plazmidami, obrazowany pikiem MB(III), miał prawdopodobnie katalityczny wpływ na utlenianie zasad azotowych.

Biorąc pod uwagę różną tendencję zmian wysokości sygnałów MB(I) i MB(III) w obecności różnych plazmidów, warto przeanalizować także zależność stosunku MB(III)/MB(I) od stężenia błękitu metylenowego, gdyż powinna być ona charakterystyczna dla poszczególnych form DNA plazmidowego zaadsorbowanego na elektrodzie. Stosunek ten dla utleniania błękitu metylenowego zaadsorbowanego bezpośrednio na elektrodzie pod nieobecność plazmidów jedynie nieznacznie spadał wraz ze wzrostem stężenia MB, a jego wartość w całym zakresie stężeń wynosiła 1-2 (RYS. 167). Zależność ta przyjmowała zupełnie inne kształty, gdy cząsteczki błękitu metylenowego znajdowały się w warstwie DNA plazmidowego. W obecności scpUC19 stosunek MB(III)/MB(I) wynosił około 10 dla szeregu stężeń MB poniżej 10 μM , a dla scpGEX-4T-2 już przy stężeniu około 0,5 μM osiągał on maksimum o wartości 50 (RYS. 167A). Świadczy to, że scpGEX-4T-2 oddziaływał silniej z MB niż scpUC19, gdyż molekuly ligandu były w stanie akumulować się w jego warstwie przy niższym stężeniu. Dla plazmidów liniowych natomiast stosunek ten przyjmował najwyższe

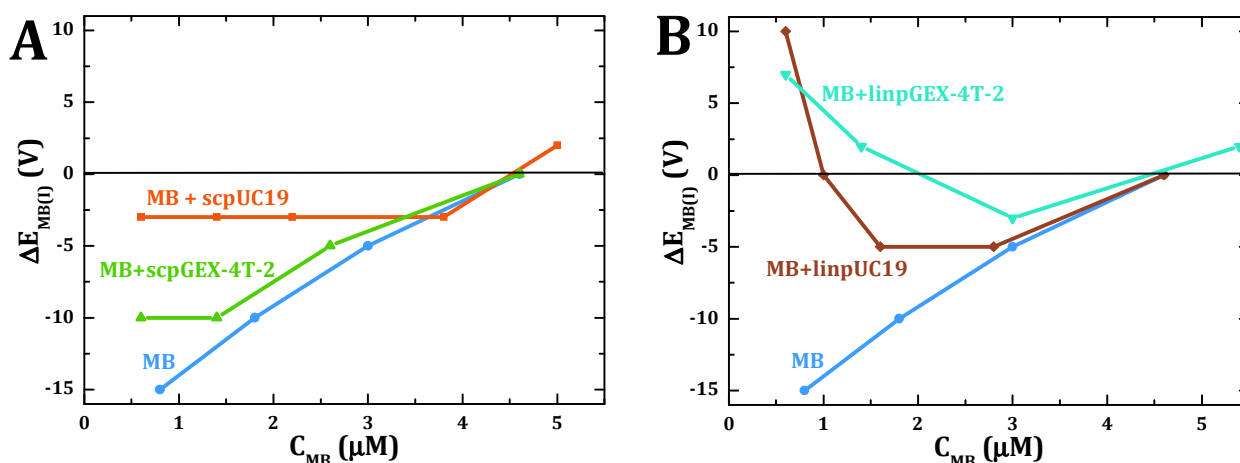
wartości, ok. 13, dla najniższych stężeń MB, po czym następował jego gwałtowny spadek – bardziej ostry dla linpUC19 niż dla linpGEX-4T-2 (RYS. 167B). Przy wyższych stężeniach w obecności każdego z plazmidów MB(III)/MB(I) spadał aż do wartości zbliżonej do charakterystycznej dla układu bez plazmidów. Na podstawie takich zależności doskonale widać, że różnice w sposobie wiązania się błękitu metylenowego z zaadsorbowanymi plazmidami ujawniają się w stosunku wysokości sygnałów MB(III) do MB(I). Choć formy liniowe plazmidów danej wielkości różnią się od swoich superhelikalnych odpowiedników jedynie strukturą przestrzenną łańcuchów, a nie liczbą i sekwencją nukleotydów, to kształty zależności MB(III)/MB(I) od stężenia błękitu są podobne dla plazmidów o tej samej formie, a zupełnie odmienne dla plazmidów o tej samej wielkości i sekwencji. Dowodzi to, iż analiza różnic w stosunku sygnałów MB(III)/MB(I) może posłużyć do odróżnienia plazmidów superhelikalnych i liniowych. Różnice w kształcie tych zależności dla plazmidów o tej samej strukturze a różniących się wielkością są na tyle istotne, że również umożliwiają ich rozróżnienie.



RYS. 167 – Zależność stosunku wysokości sygnałów MB(III)/MB(I) od stężenia błękitu metylenowego pod nieobecność plazmidów oraz w obecności: A – 4 pg/ml scpUC19 i 7 pg/ml scpGEX-4T-2, B – 2 pg/ml linpUC19 i 4 pg/ml linpGEX-4T-2.

Oddziaływania plazmidów z błękitem metylenowym mogą być również analizowane na podstawie różnic w potencjale pików MB(I) zarejestrowanym dla MB zaadsorbowanego na czystej elektrodzie GCE oraz w warstwie DNA plazmidowego. Za wartość odniesienia wybrano potencjał sygnału przy stężeniu MB 4,6 μM , dlatego też wszystkie wartości $\Delta E[MB(I)]$ przy tym stężeniu wynosiły 0. Choć do wyznaczenia potencjału odniesienia mogło zostać wybrane każde inne stężenie błękitu metylenowego, to wybór padł na jego najwyższą wartość wspólną dla wszystkich krzywych. Zastosowanie do porównania różnicy potencjału zamiast jego faktycznej wartości miało na celu uniknięcie wpływu wahań potencjału elektrody odniesienia NEK. Choć z reguły są one niewielkie i nie przekraczają wartości kilku miliwoltów, to dla $\Delta E[MB(I)]$, który przyjmował wartość 2–15 mV, mogły mieć kluczowe znaczenie. Kiedy utlenianie błękitu metylenowego zachodziło na czystej elektrodzie GCE, to zależność $\Delta E[MB(I)]$ od stężenia MB była prawie liniowa, a potencjał pików przesunął się o 15 mV w stronę dodatnich potencjałów (RYS. 168). W obecności plazmidów superhelikalnych zależność ta przybierała zupełnie inny kształt. Mianowicie, dla scpUC19 aż do stężenia 4 μM $\Delta E[MB(I)]$ przyjmowała stałą wartość i dopiero przy wyższej zawartości MB w układzie potencjał pików ulegał zmianie (RYS. 168A). W obecności scpGEX-4T-2 natomiast do zmiany potencjału pików nie dochodziło jedynie przy stężeniu MB nieprzekraczającym 1,4 μM , zaś powyżej tej wartości przesunął się on w analogiczny sposób jak w przypadku ślepej próby. Zupełnie inny kształt przyjmowała zależność $\Delta E[MB(I)]$ od stężenia MB w przypadku plazmidów liniowych (RYS. 168B). Zarówno dla linpUC19, jak i dla linpGEX-4T-2 przy stężeniu MB poniżej 1 μM pik MB(I) przesunął się o około 25 mV w stosunku do ślepej próby. Przy wyższych stężeniach różnica potencjałów stopniowo malała, zbliżając się do wartości charakterystycznej dla sygnału MB

zarejestrowanego na czystej elektrodzie. W rezultacie powyżej stężenia 3 μM MB przesunięcie sygnału MB(I) było identyczne dla wszystkich przebadanych układów, tj. pod nieobecność plazmidów oraz w obecności obu plazmidów w obu formach. Podobnie jak w przypadku analizy zmian stosunku wysokości sygnałów MB(III) do MB(I) w zależności od stężenia MB, tak i tutaj można dostrzec pewną prawidłowość, iż kształty zależności $\Delta E[\text{MB(I)}]$ od stężenia MB dla plazmidów o tej samej strukturze przestrzennej są do siebie podobne, a więc obserwacja przesuwania się pików utleniania błękitu metylenowego przy potencjale ok. -0,2 V może posłużyć do odróżniania plazmidów superhelikalnych i liniowych. Zmiany pozycji MB(I) na osi potencjałów dla plazmidów w tej samej formie, ale różniących się ilością par zasad również są na tyle znaczące, że mogą posłużyć do ich rozróżniania.



RYS. 168 – Zależność różnic potencjału pików MB(I) przy 4,6 μM i innym dowolnym stężeniu błękitu metylenowego od stężenia MB uzyskanych pod nieobecność plazmidów oraz w obecności: A – 4 pg/ml scpUC19 i 7 pg/ml scpGEX-4T-2, B – 2 pg/ml linpUC19 i 4 pg/ml linpGEX-4T-2.

Porównując zależności stosunku MB(III)/MB(I) od stężenia MB i $\Delta E[\text{MB(I)}]$ od stężenia MB dla plazmidów o tej samej formie (RYS. 167A vs. RYS. 168A oraz RYS. 167B vs. RYS. 168B), nietrudno zauważyć, iż występują pomiędzy nimi pewne korelacje. Sygnał MB(I) nie ulegał żadnym przesunięciom na osi potencjałów w obecności scpUC19 w zakresie stężeń 1–3 μM i wówczas również stosunek MB(III)/MB(I) pozostawał stały. Podobna zależność występowała też w przypadku scpGEX-4T-2, lecz tutaj potencjał pików MB(I) nie zmieniał się jedynie przy najniższych stężeniach błękitu metylenowego, kiedy to stosunek MB(III)/MB(I) osiągał wartość maksymalną. Początkowa stałość potencjału sygnału MB(I) oraz osiąganie pewnego maksimum stosunku MB(III)/MB(I) w obecności plazmidów superhelikalnych świadczy o występowaniu silnych oddziaływań pomiędzy molekułami błękitu metylenowego a zaadsorbowanymi na elektrodzie plazmidami przy niskich stężeniach MB (< 2 μM dla scpUC19 i < 1,5 μM dla scpGEX-4T-2). Oddziaływania te nie mają jednak identycznej natury, o czym świadczą różnice w wielkości stosunku dwóch sygnałów utlenienia MB w tym zakresie stężeń. Gdy następnie stężenie MB w układzie przekraczało podane powyżej wartości, to stosunek MB(III)/MB(I) oraz wielkość $\Delta E[\text{MB(I)}]$ malały, sugerując jednocześnie zmianę sposobu interakcji błękitu metylenowego z DNA. Powyżej stężenia 3 μM zarówno wartość stosunku wysokości pików MB(III) do MB(I), jak i trend zmiany potencjału pików MB(I) zaczynały być praktycznie identyczne z obserwowanymi dla ślepej próby. Sugeruje to, iż ilość molekuł błękitu metylenowego obecnych w warstwie DNA plazmidowego na elektrodzie zaczęła przekraczać ilość jego molekuł związanych z cząsteczkami plazmidów, co oznaczało, że w warstwie DNA były obecne molekuły MB niezwiązane z nim. Pomimo odmiennych kształtów zależności stosunku MB(III)/MB(I) i $\Delta E[\text{MB(I)}]$ od stężenia MB dla plazmidów liniowych, w ich przypadku także można doszukać się podobnych relacji.

Podsumowując, można stwierdzić, że sposób oddziaływania błękitu metylenowego z plazmidami zaadsorbowanymi na elektrodzie z węgla szklonego zależy od stężenia tego ligandu

w roztworze pomiarowym. Przy niskich stężeniach MB dochodzi do silnych interakcji pomiędzy jego molekułami a plazmidami, które prawdopodobnie realizowane są na drodze interkalacji. Gdy zawartość błękitu w układzie rośnie, zaczyna zwiększać się udział słabszych oddziaływań, np. elektrostatycznych. Finalnie, kiedy już maksymalna ilość MB wniknęła do warstwy DNA, możliwe są jedynie wzajemne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami ligandu, co odpowiada adsorpcji błękitu metylenowego na czystej elektrodzie GCE.

4.3.3.3.3. Wnioski

Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że błękit metylenowy wchodzi w silne interakcje z plazmidami różniącymi się wielkością i strukturą przestrzenną. Wiązanie się molekuł MB z warstwą DNA plazmidowego zaadsorbowaną na powierzchni elektrody z węgla szklanego powoduje wzmocnienie prądowych sygnałów utlenienia zasad azotowych, wchodzących w skład cząsteczek plazmidów. Tym samym MB może zostać użyty jako rodzaj znacznika, umożliwiającego wykrywanie DNA plazmidowego na poziomie stężenia pg/ml.

Błękit metylenowy wykazuje różnice w naturze oddziaływania z plazmidami zależnie od ich struktury i wielkości, co objawia się zmianami wysokości i położenia jego sygnałów utlenienia przy potencjałach ok. -0,2 V i ok. +1,0 V. Ponadto, sposób jego interakcji z warstwą DNA plazmidowego osadzonego na powierzchni przetwornika zależy od zawartości ligandu w układzie. Gdy jego stężenie nie przekracza 1 μM , przeważają silne oddziaływania, prawdopodobnie interkalacyjne. W zakresie stężenia MB od 1 μM do 3 μM zaczynają dominować słabsze interakcje, a kiedy stężenie przekracza wartość 3 μM , więcej molekuł błękitu nie jest już w stanie wejść do warstwy DNA i istotne stają się wzajemne oddziaływania pomiędzy jego cząsteczkami.

Parametrami, których porównanie pozwala na rozróżnienie typów DNA plazmidowego obecnego w układzie pomiarowym, są: zależność stosunku wysokości sygnałów MB(III) do MB(I) od stężenia błękitu metylenowego oraz zmiana położenia pików MB(I) na osi potencjałów przy wzrastającym stężeniu MB. Na ich podstawie udało się ustalić, że w zakresie stężeń błękitu metylenowego 0,5–3 μM plazmidy superhelikalne wchodzi z nim w silne interakcje, podczas gdy ich liniowe analogi są w stanie wiązać się silnie z MB jedynie, gdy jego stężenie nie przekracza 0,2 μM . Sytuacja ulega odwróceniu w zakresie stężenia błękitu 1–3 μM , kiedy to większa ilość molekuł MB jest w stanie wniknąć do warstwy plazmidów liniowych niż superhelikalnych, czemu towarzyszy także intensyfikacja słabych oddziaływań, których występowanie jest ograniczone w przypadku form superhelikalnych. Można przypuszczać, że warstwa elektrodowa tworzona przez koliste struktury superhelikalne charakteryzuje się większą gęstością, co utrudnia wnikanie do niej cząsteczek błękitu metylenowego. Kiedy stężenie MB przekracza 4–5 μM , to analizowane parametry dla wszystkich rodzajów DNA plazmidowego przyjmują wartości bardzo zbliżone lub wręcz identyczne jak podczas ślepej próby, gdy w układzie plazmidy nie są obecne. Tym samym zostaje wyznaczony górny limit wartości stężenia MB, przy którym można analizować oddziaływania błękitu metylenowego w zastosowanych warunkach pomiarowych.

Reasumując, dzięki różnorodności swych oddziaływań z DNA błękit metylenowy staje się użytecznym narzędziem analitycznym, które pozwala zarówno na wykrywanie bardzo niskich stężeń plazmidów, jak i rozróżnianie ich struktury przestrzennej oraz wielkości. Jednocześnie jest on popularną substancją o dość dobrze poznanych właściwościach, a przy tym jego koszt na tle innych odczynników stosowanych w tego typu analizach biologicznych jest stosunkowo niewielki. Cechy te czynią go atrakcyjnym z analitycznego punktu widzenia.

4.3.3.4. Podsumowanie

Woltamperometryczne analizy oddziaływań błękitu metylenowego z DNA niejednokrotnie były już przedmiotem rozmaitych prac eksperymentalnych, lecz zwykle badano w nich interakcje

DNA chromosomalnego z MB w mikromolowym zakresie stężeń, monitorując sygnał redukcji ligandu. Przeprowadzone przeze mnie kompleksowe badania nie tylko obejmowały użycie różnorodnych typów kwasu deoksyrybonukleinowego, w tym plazmidów różniących się strukturą przestrzenną, oraz zastosowanie szerokiego zakresu stężeń błękitu metylenowego, obejmującego wartości z zakresu nano- i milimolowego, ale także opierały się na detekcji trzech sygnałów utlenienia MB. Takie nowatorskie podejście pozwoliło wykazać, że błękit metylenowy wchodzi w silne interakcje z różnymi rodzajami DNA. Ich natura zależy zarówno od struktury trzeciorzędowej DNA oraz jego sekwencji, jak i stężenia ligandu. Wśród typów oddziaływania MB z DNA wymienić można na pewno interkalację, elektrostatyczne przyciąganie jego molekuł przez szkielet cukrowo-fosforanowy helisy, oddziaływanie w bruzdach DNA.

Sitodrukowane układy trójelektrodowe produkcji polskiej stanowią narzędzie użyteczne w badaniu powinowactwa błękitu metylenowego do DNA chromosomalnego, superhelikalnych plazmidów oraz oligonukleotydów, przy zastosowaniu procedury, w której oddziałujące indywidualnie chemiczne znajdują się w roztworze. Na podstawie takiej analizy udało się ustalić, iż błękit metylenowy wchodzi w silniejsze interakcje z DNA plazmidowym niż chromosomalnym i jako miejsce oddziaływania z helisą preferuje sekwencje zawierające guaninę i cytozynę. Pewnym utrudnieniem podczas prowadzenia tego typu eksperymentów jest blokowanie powierzchni czujnika sitodrukowanego przez utlenione molekuły kwasu nukleinowego, co prowadzi do zaniku sygnałów utlenienia zasad azotowych na kolejnych rejestrowanych voltamperogramach. Z tego też względu elektrody te w mniejszym stopniu nadają się do pomiarów opartych na monitorowaniu powolnej adsorpcji DNA na powierzchni przetwornika.

Ze względu na ograniczoną stosowalność elektrod sitodrukowanych, w badaniu właściwości elektrochemicznych różnych typów DNA plazmidowego lepszym rozwiązaniem było użycie klasycznego układu elektrodowego z elektrodą z węgla szklanego jako pracującą. Plazmidy dużo silniej adsorbują się na powierzchni elektrody GCE oraz wykazują nieco inną elektroaktywność niż DNA chromosomalne. Procesy, którym one ulegają, są silnie uzależnione od trójwymiarowej struktury ich molekuł, determinującej sposób ich ułożenia na powierzchni przetwornika elektrycznego. Sygnały utlenienia zawartej w nich guaniny i adeniny ulegają przesunięciom na osi potencjału i często zlewają się ze sobą, co jest bardziej charakterystyczne dla ich form liniowych niż superhelikalnych. Identyfikacja różnych struktur plazmidowych wyłącznie na podstawie ich sygnałów utlenienia i krzywych akumulacji może prowadzić czasem do niejednoznacznych wyników. W takiej sytuacji pomocna okazuje się voltamperometryczna analiza interakcji plazmidów z błękitem metylenowym.

Sposób oddziaływania błękitu metylenowego z plazmidami zależy od wielkości i struktury ich cząsteczek. Gdy MB wiąże się z DNA plazmidowym, tworząc stabilną warstwę adsorpcyjną na elektrodzie GCE, zmianie ulegają jego sygnały utlenienia. Na szczególną uwagę zasługują zachodzące pod nieobecność plazmidów i w obecności poszczególnych ich form, zmiany wysokości i pozycji pików MB przy potencjałach ok. $-0,2$ V i ok. $+1,0$ V, które są wywołane wzrostem jego stężenia, a co za tym idzie różnicami w akumulacji na powierzchni przetwornika. Ponadto, na skutek katalitycznego wpływu reakcji utleniania błękitu metylenowego znacznemu podwyższeniu ulegają również sygnały utlenienia zasad azotowych. Taka analiza dostarcza istotnych informacji na temat sposobów oddziaływania MB z plazmidami.

Błękit metylenowy stanowi interesujący związek chemiczny ze względu na swoje różnorodne właściwości, w tym fotochemiczne, antyseptyczne, czy też farmakologiczne. Dołączyć do nich należy także niezwykle silne powinowactwo do kwasu deoksyrybonukleinowego, które może być podstawą do wykrywania śladowych ilości DNA plazmidowego oraz rozróżnianie jego struktur trzeciorzędowych. Gama związków, wchodzących w specyficzne interakcje z DNA jest bardzo szeroka, więc zastosowanie błękitu metylenowego może stanowić tylko pierwszy krok do rozwinięcia uniwersalnej procedury tego typu oznaczeń.

4.4. Badanie oddziaływań antracyklin i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami DNA

Antracykliny to wielopierścieniowe związki organiczne, których cząsteczki zbudowane są z aglikonu i daunozaminy. Do najpopularniejszych z nich należą daunorubicyna (DAU) i doksorubicyna (DOX), różniące się od DAU jedynie obecnością grupy hydroksylowej przy węglu C14. Substancje te wykazują antynowotworowe działanie cytostatyczne i cytotoksyczne, dlatego też od wielu lat stosowane są jako skuteczne chemioterapeutyki. Dokładny mechanizm ich aktywności antynowotworowej nie jest w pełni wyjaśniony, ale nie ulega wątpliwości, że wchodzi one w bezpośrednie interakcje z kwasem deoksyrybonukleinowym, tworząc między innymi kompleksy interkalacyjne. Niestety oprócz działania terapeutycznego antracykliny wywołują także wiele skutków ubocznych. Z tego powodu tak ważne jest poszukiwanie nowych pochodnych tych substancji, które odznaczałyby się niższą toksycznością i/lub podwyższoną aktywnością antynowotworową.

Do wielu pozytywnych zmian we właściwościach antracyklin prowadzi wprowadzenie ugrupowania formamidynowego do części cukrowej. Nową grupę ich analogów stanowią pochodne, w których pierwszorzędowa grupa aminowa w pozycji C3' daunozaminy została zastąpiona ugrupowaniem formamidynowym ($-N=CH-NR^1R^2$), zawierającym resztę aminy cyklicznej. Całe serie takich pochodnych daunorubicyny, doksorubicyny, epidaunorubicyny i epidoksorubicyny o różnej wielkości pierścienia drugorzędowej aminy cyklicznej zsyntetyzowane zostały w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie [351]. Liczne badania biologiczne pokazały, iż taka modyfikacja wpływa na wiele ich właściwości, w tym na cytotoksyczność, aktywność antyproliferacyjną, kardiotoxyczność, pokonywanie oporności lekowej oraz tworzenie połączeń z kwasem deoksyrybonukleinowym [352-360]. Dzięki uprzejmości Pani prof. Ireny Oszczapowicz, Pana prof. Janusza Oszczapowicza i Pani dr Małgorzaty Łukawskiej udostępnione zostały mi próbki pochodnych daunorubicyny i doksorubicyny, zawierających jako aminę cykliczną pierścień morfolinowy (DAU-Fmor, DOX-Fmor) lub heksametylenoiminowy (DAU-Fhex, DOX-Fhex). Moim zadaniem było zbadanie za pomocą elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA skonstruowanych na trójelektrodowych układach sitodrukowanych ich oddziaływanie z różnymi rodzajami DNA, naturalnymi chromosomalnymi oraz syntetycznymi oligonukleotydami. Nieuzasadnione byłoby użycie w tym przypadku DNA plazmidowego, gdyż ten rodzaj kwasu nukleinowego nie występuje praktycznie w komórkach organizmów eukariotycznych.

4.4.1. Badanie trwałości antracyklin i ich formamidynowych pochodnych w roztworze

Zbadanie oddziaływań antracyklin i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami kwasu deoksyrybonukleinowego za pomocą zoptymalizowanych przeze mnie elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA, konstruowanych na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej, wymagało sporządzenia roztworów tych związków w buforze octanowym o pH 4,75, a jedna seria pomiarowa z użyciem danego roztworu trwała około 2 godzin. Dlatego też kluczową kwestią było zbadanie trwałości i stabilności analizowanych antracyklin w takich warunkach, gdyż każda zmiana w strukturze ich cząsteczek, ewentualny rozpad czy inna przemiana, mogła mieć ogromny wpływ na naturę występujących interakcji.

Techniką analityczną, zastosowaną przeze mnie do badania trwałości daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych w roztworze była spektrofotometria UV-Vis. Antracykliny wykazują absorpcję promieniowania w zakresie długości fali 220–320 nm oraz 400–570 nm (rozdział I.2.2.1.4.). Zmiany w intensywności pasm pojawiających się w zakresie fal

dłuższych były monitorowane przeze mnie. Na podstawie wielkości tych zmian zostały wyciągnięte wnioski odnośnie stabilności molekuł antracyklin w AcB-K o pH 4,75. Ponadto, sporządzone zostały krzywe kalibracyjne dla poszczególnych związków, które pozwoliły sprawdzić, w jakim zakresie spełniają one prawo Lamberta-Beera o proporcjonalności absorbancji do stężenia substancji absorbującej promieniowanie.

4.4.1.1. Procedura pomiarowa

Przy badaniu trwałości daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych w roztworze o odczynie kwaśnym, stosowana była dość prosta, choć czasochłonna procedura. Pomiar rozpoczynał się od zarejestrowania za pomocą spektrofotometru widma ślepej próby, podczas której w celce pomiarowej umieszczana była kuweta z mieszaniną wody i buforu octanowego w stosunku 1:1 (1,5 ml H₂O + 1,5 ml AcB-K). Widmo to stanowiło tło i było automatycznie odejmowane od rejestrowanych następnie widm właściwych. W kolejnym kroku w celce pomiarowej umieszczana była kuweta wypełniona roztworem danej antracykliny o określonym stężeniu z zakresu 5–50 μM i następowała rejestracja jej 13 widm adsorpcyjnych przez 2 godziny w 10-minutowych odstępach czasu. Pomiar prowadzone były zgodnie z następującymi parametrami:

- zakres długości fali: 400–600 nm
- interwał: 1,0 nm
- prędkość zmiany długości fali: 480 nm/min
- ilość cykli: 13
- czas cyklu pomiarowego: 600 s

Roztwory pomiarowe poszczególnych antracyklin o danym stężeniu i objętości 3 ml były sporządzane w buforze octanowym w kuwecie plastikowej bezpośrednio przed każdym pomiarem. Polegało to na wymieszaniu w odpowiednich proporcjach przygotowanego wcześniej w wodzie roztworu wyjściowego danej antracykliny o stężeniu 1 mM, wody oraz AcB-K. Sposób przygotowania poszczególnych próbek przedstawia poniższa tabela (Tabela 20).

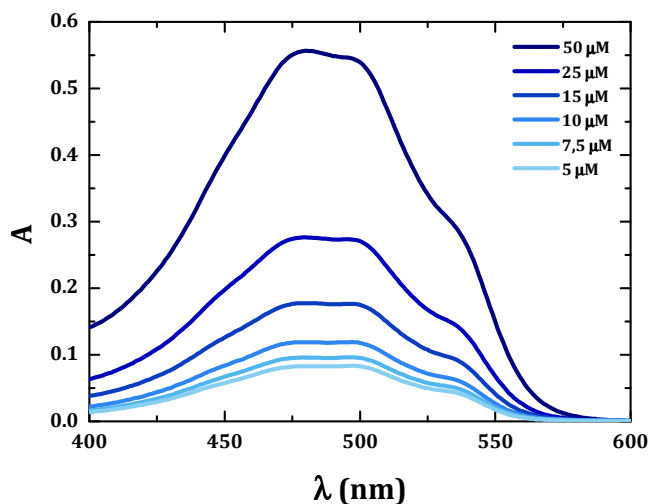
TABELA 20 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych o określonym stężeniu.

Stężenie roztworu pomiarowego danej antracykliny [μM]	Objętość 1 mM roztworu danej antracykliny [ml]	Objętość wody [ml]	Objętość AcB-K [ml]
50	0,150	1,350	1,5
25	0,075	1,425	1,5
15	0,045	1,455	1,5
10	0,030	1,470	1,5
7,5	0,0225	1,4775	1,5
5	0,015	1,485	1,5

Zarejestrowane w tym eksperymencie widma pozwoliły na sprawdzenie stabilności w czasie pasm absorpcji promieniowania przez serie roztworów poszczególnych antracyklin oraz zbadanie zależności ich absorbancji od stężenia, dzięki czemu wyznaczone zostały krzywe kalibracyjne. Umożliwiło to stwierdzenie, czy zastosowane później w pomiarach elektrochemicznych warunki pomiarowe nie wpływają destrukcyjnie na strukturę badanych substancji.

4.4.1.2. Wyniki

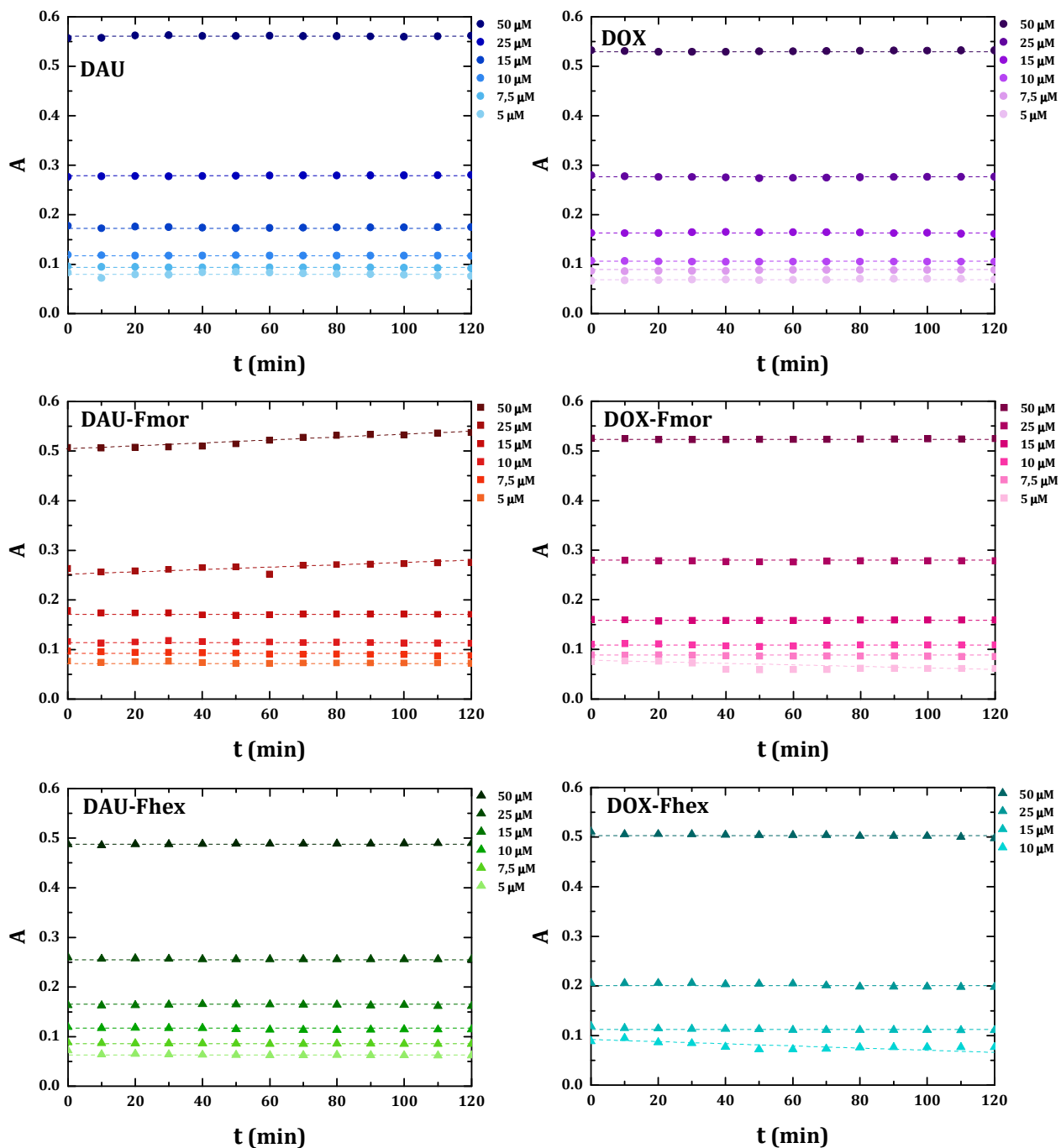
Widma wszystkich przebadanych związków wyglądały bardzo podobnie, a niewielkie różnice występowały jedynie w intensywności sygnałów. Z tego też względu pokazane zostały tylko zarejestrowane dla daunorubicyny (RYS. 169). Antracykliny absorbowały promieniowanie w zakresie długości fali od 400 nm do 570 nm. Ich pasmo absorpcji było szerokie i obejmowało dwa położone blisko siebie maksima przy 481 nm i 497 nm oraz „ramię” na jego zboczu przy 533 nm. Najwyższy sygnał występował przy długości fali 481 nm i to on został wykorzystany przy badaniu trwałości cząsteczek antracyklin w roztworze oraz wyznaczaniu krzywych kalibracyjnych.



RYS. 169 – Widma UV-Vis daunorubicyny o różnych stężeniach w AcB-K zarejestrowane w roztworach od razu po ich sporządzeniu.

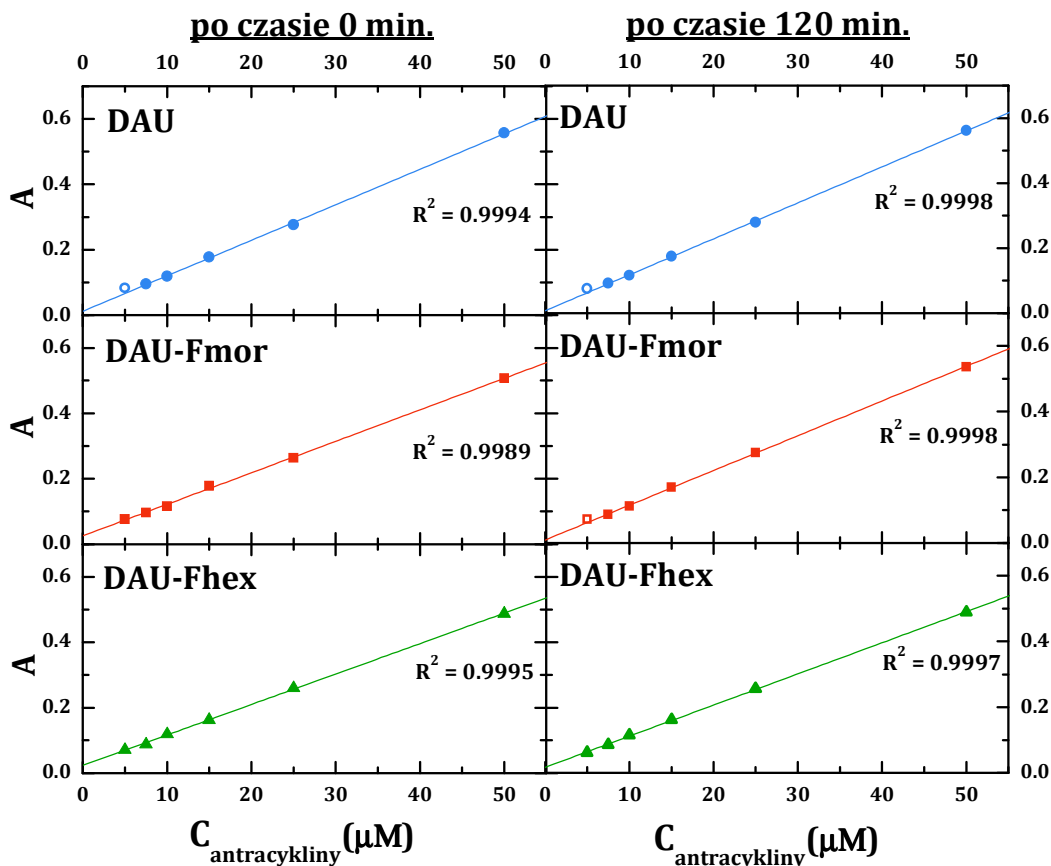
Dla wszystkich antracyklin widma rejestrowane były dla 6 stężeń, co 10 minut przez 2 godziny. Pozwoliło to na zbadanie zmiany intensywności absorpcji promieniowania przy długości fali 481 nm w czasie, a tym samym ustalenie, czy cząsteczki tych związków ulegają jakimś przemianom strukturalnym w buforze o pH 4,75. Wszystkie przebadane substancje poza DOX-Fhex absorbowały promieniowanie na podobnym poziomie (RYS. 170). Przy stężeniu 50 μM absorbancja osiągała wartość około 0,5–0,55, przy 25 μM – 0,25–0,30, przy 15 μM – 0,16–0,18, przy 10 μM – 0,10–0,12, przy 7,5 μM – 0,08–0,09, a przy 5 μM – 0,07. W przypadku DOX-Fhex przy niższych stężeniach intensywność absorpcji dużo szybciej malała i już dla 10 μM absorbancja spadała do wartości około 0,07–0,08, przez co niższe stężenia nie były analizowane. Związki macierzyste, czyli daunorubicyna i doksorubicyna, wykazywały absorbancję niezmienną w czasie dla całego zakresu stężeń, o czym świadczą przerywane linie proste, równoległe do osi odciętych, wykreślone na RYS. 170. W przypadku pochodnych z podstawnikiem morfolinowym sytuacja uległa niewielkiej zmianie. Absorbancja DAU-Fmor dla stężeń 50 μM i 25 μM wzrastała nieco w czasie 120 minut odpowiednio o około 0,03 i 0,02, po czym dla niższych stężeń stabilizowała się i nie zmieniała się wraz z upływem czasu. DOX-Fmor z kolei charakteryzowała się stałą w czasie absorbancją w prawie całym zakresie stężeń. Jedynie przy najniższym z nich po 30 minutach następowało jej nagłe obniżenie, po czym ulegała ona stabilizacji. Pochodna daunorubicyny z pierścieniem heksametylenoiminowym zachowywała się podobnie jak związek macierzysty, to znaczy dla wszystkich stężeń absorbowała promieniowanie w sposób niezmienny w czasie. Absorbancja analogicznej pochodnej doksorubicyny również nie zmieniała się w czasie dla wyższych stężeń, lecz przy najniższym przebadanym stężeniu (10 μM) wykazywała stosunkowo niskie wartości, które w ciągu 120 minut ulegały obniżeniu o około 0,02.

Podsumowując, większość antracyklin absorbowała promieniowanie przy długości fali 481 nm z jednakową intensywnością przez cały cykl pomiarowy. Pojawiające się wzrosty (DAU-Fmor) i spadki (DOX-Fmor i DOX-Fhex) absorbancji w czasie dla niektórych stężeń były stosunkowo niewielkie i raczej nie świadczą o niestabilności cząsteczek tych związków w roztworze buforu. Pewne wątpliwości może budzić jedynie DOX-Fhex, którego absorbancja ulegała dużo większemu w porównaniu z innymi analogami obniżeniu wraz ze spadkiem stężenia.

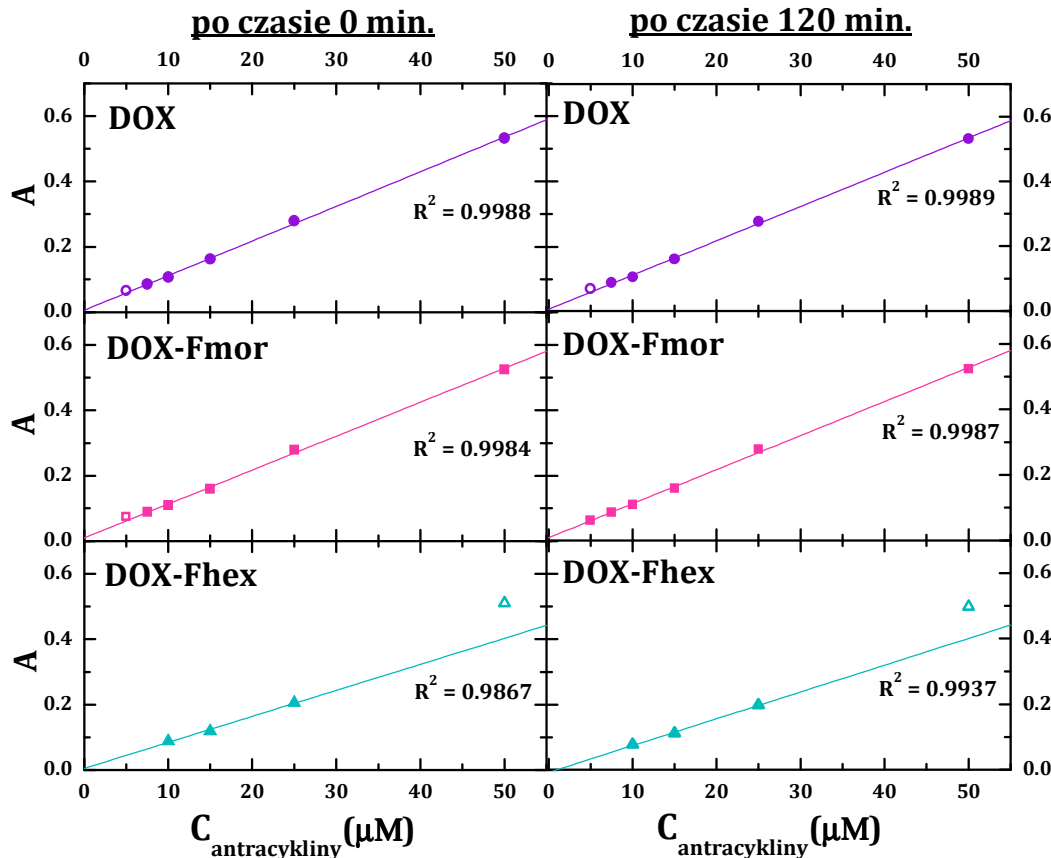


RYS. 170 – Zmiana absorbancji przy długości fali 481 nm roztworów DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych o różnych stężeniach, sporządzonych w AcB-K, w czasie 120 minut.

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów absorbancji zarejestrowanej przy 481 nm wykreślone zostały krzywe kalibracyjne dla poszczególnych antracyklin. Wszystkie substancje oprócz DOX-Fhex wykazywały liniową zależność absorbancji od stężenia, o czym świadczą wysokie wartości współczynnika korelacji R^2 , które w większości przypadków osiągały wartość zbliżoną do 0,999 (RYS. 171 i RYS. 172). Warto jednak zwrócić uwagę, iż liniowość tej zależności bywała zaburzona dla najniższego analizowanego stężenia, tj. 5 μM . Wówczas taki punkt był odrzucany przy wyznaczaniu danej krzywej. Działo się tak, gdy w roztworze obecnych było mało molekuł danej substancji przy jednoczesnym wysokim stężeniu rozpuszczalnika (w tym przypadku jest to bufor octanowy o stężeniu 0,25 M zawierający 10 mM KCl). Znaczny nadmiar składników rozpuszczalnika sprawia, że kluczową rolę mogą odgrywać oddziaływania występujące pomiędzy jego jonami a antracykliną, co może zaburzać absorpcję promieniowania przez badaną substancję.



RYS. 171 – Zależność absorbancji przy długości fali 481 nm DAU i jej formamidynowych pochodnych w AcB-K od stężenia danej antracykliny, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu i po upływie 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.



RYS. 172 - Zależność absorbancji przy długości fali 481 nm DOX i jej formamidynowych pochodnych w AcB-K od stężenia danej antracykliny, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu i po upływie 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.

Praw absorpcji nie spełnia DOX-Fhex, którego wartości absorbancji są niższe niż dla pozostałych antracyklin. Jego krzywa kalibracyjna wykazuje dodatnie odchylenie dla stężenia powyżej 25 μM (RYS. 172). Ciężko jest znaleźć wytłumaczenie tego faktu, ponieważ wszystkie badane substancje charakteryzują się podobną budową i właściwościami spektralnymi. Jedyną cechą wyróżniającą tę pochodną doksorubicyny jest jednoczesna obecność w molekuale grupy OH przy węglu C14 w łańcuchu bocznym aglikonu oraz pierścienia heksametylenoiminowego, większego o jeden człon od morfolinowego, w części daunozaminowej. Być może pomiędzy tymi ugrupowaniami, bezpośrednio lub przy udziale molekuł rozpuszczalnika, pojawiają się pewne oddziaływania, które zmieniają właściwości absorpcyjne DOX-Fhex.

4.4.1.3. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów można stwierdzić, iż kwaśne środowisko buforu octanowego nie wpływa na trwałość daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych w roztworze. Nawet po upływie 2 godzin nie zmieniała się intensywność absorbowania przez nie promieniowania z zakresu UV-Vis. Sugeruje to, iż takie warunki nie powodują istotnych zmian w strukturze cząsteczek antracyklin. Taki rezultat otwiera drogę do badania oddziaływań tych substancji z kwasem deoksyrybonukleinowym za pomocą elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA.

4.4.2. Badanie elektroaktywności antracyklin i ich formamidynowych pochodnych

Przed przystąpieniem do analizy oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich pochodnych z różnymi rodzajami kwasu deoksyrybonukleinowego przy pomocy elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA niezbędne było zbadanie ich elektroaktywności. Miało to na celu sprawdzenie, czy sygnały utlenienia antracyklin nie nakładają się z sygnałami utlenienia zasad azotowych, które stanowiły sygnały analityczne w kolejnych etapach eksperymentów. Nałożenie tych sygnałów byłoby dużym utrudnieniem w analizie wpływu antracyklin na właściwości elektrochemiczne DNA i występujących pomiędzy nimi oddziaływań.

4.4.2.1. Procedura pomiarowa

Elektroaktywność DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych zbadana została na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej przy zastosowaniu dwóch technik woltamperometrycznych – woltamperometrii cyklicznej (procedura XV) oraz woltamperometrii fali prostokątnej (procedura XVI). W pierwszym przypadku monitorowane były zarówno sygnały utlenienia, jak i redukcji antracyklin, w drugim zaś jedynie sygnały utlenienia, gdyż to one właśnie były kluczowe dla kolejnych eksperymentów. W obu procedurach pomiar rozpoczynał się od elektrochemicznego oczyszczania elektrody pracującej, po czym następowała rejestracja linii podstawowej. W procedurze XV układ elektrod zanurzany był następnie w roztworze 0,5 mM danej antracykliny, sporządzonym poprzez zmieszanie 2,5 ml 1 mM roztworu badanej substancji w wodzie z 2,5 ml AcB-K, i w nim rejestrowano cykliczne krzywe woltamperometryczne. W pomiarach według procedury XVI natomiast, układ elektrod zanurzany był w analogicznym roztworze danej antracykliny na 2 minuty bez przykładania potencjału, co miało na celu osadzenie molekuł badanej substancji na elektrodzie. W kolejnym kroku elektrodę płukano w AcB-K, by

pozbyć się niezaadsorbowanych cząsteczek i na koniec rejestrowano woltamperogramy fali prostokątnej.

Procedura XV

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Rejestracja linii podstawowej
 metoda: CV
 roztwór: AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar:

liczba skanów	2
potencjał początkowy	$E_{\text{start}}: -1,5 \text{ V}$
pierwsze zawrócenie potencjału	$E_1: +1,5 \text{ V}$
drugie zawrócenie potencjału	$E_2: -1,5 \text{ V}$
krok potencjału	$E_{\text{krok}}: 0,005 \text{ V}$
szybkość polaryzacji	0,1 V/s
- 3) Pomiar
 metoda: CV
 roztwór: 0,5 mM roztwór danej antracykliny w AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar:

liczba skanów	5
pozostałe parametry	jak w pkt. 2)

Procedura XVI

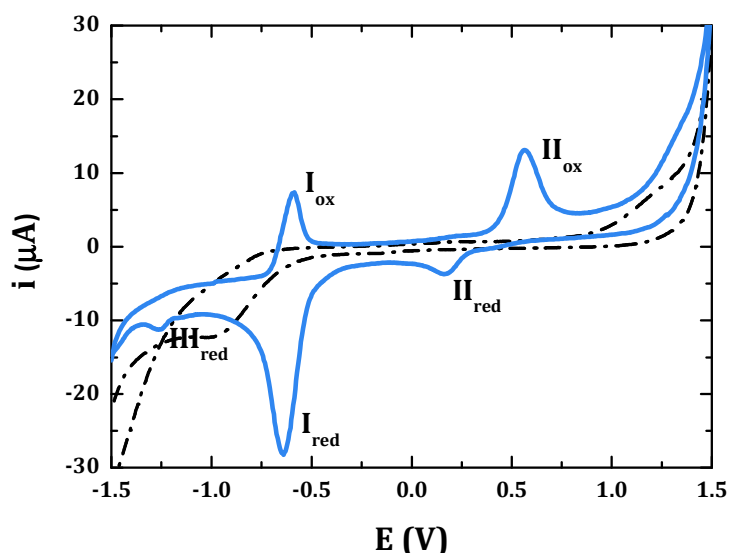
- 1) Czyszczenie elektrochemiczne – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 2) Rejestracja linii podstawowej
 metoda: SWV
 roztwór: AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar:

potencjał początkowy	$E_{\text{start}}: -1,4 \text{ V}$
potencjał końcowy	$E_{\text{stop}}: +1,5 \text{ V}$
krok potencjału	$E_{\text{krok}}: 0,015 \text{ V}$
amplituda potencjału	$E_{\text{amplituda}}: 0,04 \text{ V}$
częstotliwość	200 Hz
- 3) Adsorpcja danej antracykliny na powierzchni elektrody
 roztwór: 0,5 mM roztwór danej antracykliny w AcB-K
 mieszanie roztworu: tak
 potencjał: nieprzyłożony potencjał zewnętrzny
 czas trwania: 120 s
- 4) Płukanie elektrody – przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- 5) Pomiar
 metoda: SWV
 roztwór: AcB-K
 mieszanie roztworu: nie
 pomiar: parametry jak w pkt. 2)

4.4.2.2. Wyniki

Obrazem właściwości elektrochemicznych daunorubicyny, zarejestrowanych na SPE-PL w jej roztworze w środowisku kwaśnym, był woltamperogram cykliczny przedstawiający dwie pary pików redoks oraz pojedynczy pik redukcji (RYS. 173). Pierwsza para odpowiada odwracalnemu utlenianiu i redukcji układu chinonowego. Sygnał utlenienia (I_{ox}) pojawiał się tutaj

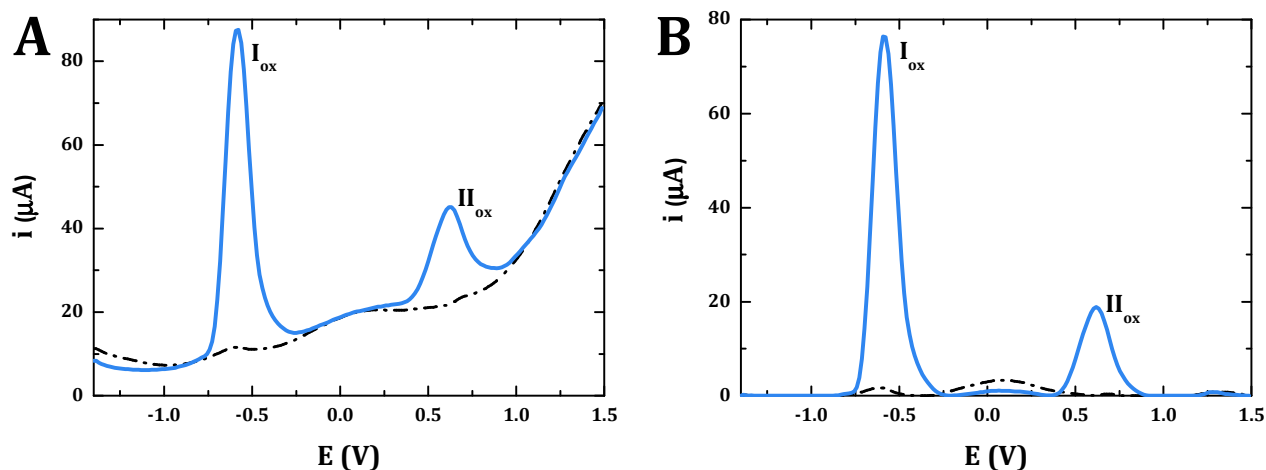
przy potencjale $-0,59$ V i osiągał wysokość blisko $10 \mu\text{A}$, a redukcji (I_{red}) przy $-0,64$ V i jego wielkość przekraczała $-22 \mu\text{A}$. Druga para sygnałów obrazuje odwracalny proces redoks układu hydrochinowego. Prąd piku utlenienia (II_{ox}) przy potencjale $+0,56$ V wynosił około $10 \mu\text{A}$, zaś redukcji (II_{red}) przy $+0,16$ V zaledwie $-2,6 \mu\text{A}$. To, co zwraca szczególną uwagę przy analizowaniu zarejestrowanej dla daunorubicyny krzywej voltamperometrycznej, to niesymetryczność pików w każdej z par. Należy pamiętać, iż pomiar rozpoczynał się od przemieszczenia potencjału w stronę wartości dodatnich, co wywołuje utlenianie depolaryzatora przy charakterystycznym dla niego potencjale. Teoretycznie, w momencie rozpoczęcia pomiaru układ chinonowy (para I) we wszystkich molekułach DAU powinien mieć formę utlenioną, a więc nie powinien zawierać ugrupowań mogących ulegać utlenianiu. Mimo to na voltamperogramie, przy charakterystycznym dla niego potencjale, pojawiał się wyraźny sygnał utlenienia (I_{ox}). Prawdopodobnie w układzie obecna była już niewielka ilość molekuł zredukowanych, które mogły pojawić się w nim na skutek przemian wywołanych warunkami otoczenia oraz w wyniku wcześniejszego rejestrowania w tym samym roztworze krzywych voltamperometrycznych i desorpcji z powierzchni elektrody molekuł, które uległy przemianom redoks. Skutkowało to pojawieniem się na voltamperogramie piku reutlenia (I_{ox}), który był o połowę niższy niż odpowiadający mu pik redukcji (I_{red}). Duża różnica w wysokości tych sygnałów oraz sygnałów odpowiadających procesom redoks układu hydrochinonowego (para II) może świadczyć o różnej sile adsorpcji utlenionych i zredukowanych molekuł daunorubicyny na powierzchni grafitowej elektrody sitodrukowanej oraz niepełnej odwracalności zachodzących na niej przemian. Ponadto, piki tworzące daną parę redoks oddalone były znacznie od siebie (para I – o 50 mV, para II – o 400 mV). Są to wartości przekraczające zdecydowanie wartość około 30 mV, charakterystyczną dla odwracalnych procesów dwuelektronowych. Dodatkowo potwierdza to nieodwracalność procesów elektrodowych oraz sugeruje, iż były one kontrolowane powolnym przeniesieniem elektronów. Analizując poniższy voltamperogram (RYS. 173), warto zwrócić również uwagę na niewielki sygnał redukcji, pojawiający się przy potencjale ok. $-1,27$ V (III_{red}). Według danych literaturowych [327] prawdopodobnie odpowiada on nieodwracalnej redukcji grupy karbonylowej obecnej przy węglu C9 w łańcuchu bocznym DAU.



RYS. 173 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą CV w: AcB-K – linia podstawowa elektrody (linia przerywana) oraz $0,5$ mM roztworze DAU w AcB-K (linia ciągła).

Analogiczny kształt, jak w przypadku DAU, przybierały voltamperogramy pozostałych antracyklin. Na każdym z nich widoczne były dwie pary pików redoks ($I_{\text{ox/red}}$ i $II_{\text{ox/red}}$) oraz pojedynczy sygnał redukcji (III_{red}). O ile sygnały pochodnych daunorubicyny pojawiały się w zasadzie przy takich samych potencjałach i miały podobną wysokość jak związek macierzysty, o tyle DOX i jej pochodne wykazywały już pewne różnice. Pik I_{ox} ulegał przesunięciu w stronę

ujemnych potencjałów o ok. 40 mV w przypadku DOX i DOX-Fmor, a I_{red} o ok. 30 mV w przypadku wszystkich trzech związków. Prądy towarzyszące temu procesowi utleniania i redukcji doksorubicyny i jej pochodnych były nieco niższe niż dla analogicznych procesów DAU. Podobnie do I_{red} zmieniała się również pozycja na osi potencjałów piku redukcji z pary redoks II, lecz zmiany potencjału sygnału II_{ox} były już dużo bardziej znaczące. W porównaniu z DAU przesunął się on bowiem o około 70 mV w stronę potencjałów dodatnich, a tym samym odległość pomiędzy pikami II wzrastała aż do 500 mV. Mniejsze różnice pomiędzy II_{ox} i II_{red} występowały jednak w odniesieniu do ich wysokości. O ile prąd redukcji był porównywalny z tym zarejestrowanym dla DAU, o tyle prąd utleniania był nieco niższy. Niewielki sygnał III_{red} dla DOX i jej pochodnych występował przy potencjale ok. -1,26--1,29 V, lecz ze względu na niski prąd ciężko było jednoznacznie wyznaczyć jego parametry.



RYS. 174 - Voltamperogramy: A - po wygładzeniu, B - po korekcji linii podstawowej, zarejestrowane metodą SWV w AcB-K na: czystej elektrodzie - linia podstawowa (linia przerywana) oraz elektrodzie z zaadsorbowaną DAU (linia ciągła).

Po ogólnej analizie elektroaktywności DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych metodą CV, należało także sprawdzić, jak będą się one zachowywać w warunkach pomiarowych kolejnego etapu eksperymentu, czyli badania oddziaływań pomiędzy kwasem deoksyrybonukleinowym a antracyklinami za pomocą elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA. Dlatego też ich krzywe voltamperometryczne zarejestrowane zostały metodą voltamperometrii fali prostokątnej, a układ elektrod nie był już zanurzany w roztworze analizowanej substancji, lecz była ona uprzednio adsorbowana na elektrodzie i pomiaru dokonywano w roztworze buforu octanowego. Na otrzymanych w ten sposób krzywych pojawiły się analogiczne sygnały utleniania jak przy CV, lecz zgodnie z założeniami metody, osiągały one dużo większe wysokości. Dla daunorubicyny na voltamperogramie pojawiły się dwa wyraźne piki utleniania przy potencjałach -0,58 V i +0,62 V (RYS. 174A), których wielkość po korekcji linii podstawowej wynosiła odpowiednio około 76 μA i 19 μA (RYS. 174B). Podobnie jak w przypadku CV, tak i tutaj voltamperogramy utleniania pozostałych antracyklin miały bardzo podobny kształt i nie zostały pokazane na osobnych diagramach. W porównaniu z DAU sygnał I_{ox} DOX i wszystkich formamidynowych pochodnych pojawiał się przy takim samym potencjale lub ulegał niewielkim 10-20 miliwoltowym przesunięciom. Potencjał piku II_{ox} zmieniał się z kolei o około 10-30 mV. Były to na tyle małe zmiany, że w połączeniu z niewielkimi różnicami w wysokościach zarejestrowanych sygnałów nie powodowały poważnych różnic w wyglądzie krzywych voltamperometrycznych.

4.4.2.3. Wnioski

Zarówno daunorubicyna, doksorubicyna, jak i ich formamidynowe pochodne wykazują podobną elektroaktywność. Na ich voltamperogramach obecne są dwie pary pików redoks,

odnoszących się do układu chinonowego i hydrochinonowego, oraz pojedynczy sygnał redukcji, związany prawdopodobnie z grupą karbonylową, usytuowaną przy węglu C9 w łańcuchu bocznym cząsteczki. Brak wyraźnych różnic we właściwościach redoks przebadanych antracyklin wskazuje na to, że modyfikacja związków macierzystych dość dużymi ugrupowaniami (morfolinowym lub heksametylenoiminowym) w części daunozaminowej nie wpływa znacząco na właściwości redoks analizowanych substancji, ani nie prowadzi do pojawienia się nowych sygnałów na woltamperogramach, świadczących o obecności nowych centrów redoks w molekułach.

Podczas opisanego w kolejnym rozdziale badania oddziaływań antracyklin z kwasem deoksyrybonukleinowym za pomocą elektrochemicznych bioczujników DNA, podstawę oznaczenia stanowiły sygnały utlenienia zasad azotowych, dlatego też ważne jest, by nie były one zakłócone przez sygnały redoks innych substancji obecnych w układzie, w tym przypadku DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych. Utlenianie antracyklin zachodzi przy potencjałach około -0,6 V i +0,6 V, zaś guaniny i adeniny odpowiednio przy +1,0 V i +1,3 V. W związku z tym, o ile w wyniku interakcji piki te nie ulegną znacznym przesunięciom, nie powinny nakładać się na siebie i utrudniać analizy.

4.4.3. Badanie oddziaływań antracyklin i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami DNA

Jak pokazuje wiele badań [227, 229, 307, 318, 323, 324], daunorubicyna i doksorubicyna tworzą z DNA kompleksy interkalacyjne, w których aglikon wsuwa się pomiędzy ułożone równolegle komplementarne pary zasad nukleinowych w taki sposób, że pierścień D wysuwa się nieco w stronę dużej bruzdy, a pierścień A wraz z łańcuchem bocznym przy węglu C9 i daunozaminą lokuje się w małym rowku. Jednak kluczową rolę odgrywa tutaj grupa aminowa części cukrowej, która z fragmentami łańcucha kwasu nukleinowego może oddziaływać siłami van der Waalsa oraz tworzyć wiązania wodorowe bezpośrednio lub przy udziale molekuł wody. Sposób oraz siła jej interakcji z helisą determinowane są sekwencją nukleotydową i to od nich zależy stabilność całego kompleksu. Z tego też powodu ogromny wpływ na oddziaływanie antracyklin z DNA wywołują wszelkie modyfikacje części daunozaminowej, a w szczególności grupy NH_2 .

Pochodne daunorubicyny i doksorubicyny, będące przedmiotem moich badań, to związki, w których pierwszorzędowa grupa aminowa daunozaminy została zastąpiona ugrupowaniem formamidynowym, zawierającym resztę aminy cyklicznej. Można się więc spodziewać, że taka modyfikacja będzie odgrywała ogromną rolę w sposobie ich interakcji z kwasem nukleinowym.

4.4.3.1. Elektrochemiczne bioczujniki sitodrukowane w badaniu oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych z DNA

Podczas badania oddziaływania kwasu nukleinowego z błękitem metylenowym za pomocą elektrochemicznych bioczujników DNA, skonstruowanych na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej, obie substancje znajdowały się w roztworze, w którym zanurzany był układ elektrodowy. Jednak tego typu sensory mogą być z powodzeniem użyte także do pomiarów według odmiennej procedury, w której DNA zostaje unieruchomiony na powierzchni przetwornika, zanurzanego w roztworze analizowanego ligandu dopiero w kolejnym kroku. Taki sposób prowadzenia pomiaru został wykorzystany przeze mnie do dość szerokiej analizy interakcji kwasu deoksyrybonukleinowego z daunorubicyną, doksorubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi.

Badania te pozwoliły sprawdzić, jak antracykliny wpływają na właściwości redoks DNA, a na podstawie zmian w sygnałach utlenienia zasad azotowych (guaniny i adeniny) wyciągnąć

wnioski na temat siły i natury połączeń tworzonych między ligandami a DNA. Tego typu procedury są dość popularne przy stosowaniu elektrochemicznych biocujników DNA do badania jego oddziaływań z różnymi substancjami [171, 199, 209, 239, 383], ale nigdy dotychczas nie zostały użyte w przypadku formamidynowych pochodnych daunorubicyny i doksorubicyny. Ze względu na to, iż będące przedmiotem badań antracykliny różniły się między sobą jedynie podstawnikiem w części cukrowej, można było sprawdzić, jak taka modyfikacja wpływa na powinowactwo danego związku do łańcuchów kwasu. Mając też na uwadze fakt, iż w związkach macierzystych oddziaływanie grupy aminowej daunozaminy z helisą silnie zależy od sekwencji nukleotydowej, w eksperymencie wykorzystane zostały różne rodzaje DNA, w tym naturalne chromosomalne oraz syntetyczne oligonukleotydowe o znanym składzie nukleotydów.

4.4.3.1.1. Procedura pomiarowa

Badanie oddziaływania antracyklin z kwasem nukleinowym objęło sześć substancji: dwa związki macierzyste – DAU i DOX, ich dwie pochodne zawierające w części daunozaminowej pierścień morfolinowy – DAU-Fmor i DOX-Fmor oraz dwie zawierające w części daunozaminowej pierścień heksametylenoiminowy – DAU-Fhex i DOX-Fhex. Stężenia stosowanych roztworów obejmowały dość szeroki zakres (od 0,1 μM do 0,5 mM), lecz ich konkretne wartości były dobierane indywidualnie do poszczególnych pomiarów. Przygotowanie roztworów pomiarowych każdej z antracyklin opierało się na takim samym schemacie i polegało na zmieszaniu w odpowiednich proporcjach 1 mM roztworu danej substancji, wody i buforu octanowego tak, by powstała mieszanina miała objętość 5 ml. Jedynie w przypadku badania oddziaływania oligonukleotydu (A)₈ z daunorubicyną stosowane były wyższe stężenia leku, a jego wyjściowy roztwór miał stężenie 3 lub 4 mM. Sposób przygotowania poszczególnych próbek przedstawiają poniższe tabele (Tabela 21 i Tabela 22).

W eksperymencie wykorzystanych zostało w sumie pięć rodzajów DNA: dwa chromosomalne – ze spermy łosia dsDNA-ss i z grasicy cielęcej dsDNA-ct oraz trzy oligonukleotydowe o łańcuchach składających się z ośmiu nukleotydów – zawierający tylko guaninę i cytozynę d(GC)₄, zawierający tylko cytozynę i tyminę d(AT)₄ oraz zbudowany wyłącznie z nukleotydów adeninowych (A)₈. Stosowane były ich roztwory o stężeniu 20 ppm, które zostały przygotowane zgodnie z zaprezentowanym wcześniej opisem (rozdział II.3.).

TABELA 21 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach voltamperometrycznych roztworów daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych o określonym stężeniu.

Stężenie roztworu pomiarowego danej antracykliny [mM]	Objętość 1 mM roztworu danej antracykliny [ml]	Objętość wody [ml]	Objętość AcB-K [ml]
0,5	2,5	0	2,5
0,25	1,25	1,25	2,5
0,1	0,5	2	2,5
0,05	0,25	2,25	2,5
0,025	0,125	2,375	2,5
0,02	0,1	2,4	2,5
0,01	0,05	2,45	2,5
0,005	0,025	2,475	2,5
0,0025	0,0125	2,4875	2,5
0,002	0,01	2,49	2,5
0,001	0,005	2,495	2,5
0,0005	0,0025	2,4975	2,5
0,0001	0,0005	2,4995	2,5

TABELA 22 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach woltamperometrycznych z $(A)_8$ roztworów daunorubicyny o określonym stężeniu.

Stężenie roztworu pomiarowego danej antracykliny [mM]	Objętość roztworu DAU o danym stężeniu [ml]		Objętość wody [ml]	Objętość AcB-K [ml]
	3 mM	4 mM		
2	-	2,5	0	2,5
1,5	2,5	-	0	2,5
1	-	1,25	1,25	2,5
0,67	1,117	-	1,383	2,5
0,375	0,625	-	1,875	2,5
0,25	-	0,3125	2,1875	2,5
0,1	-	0,125	2,375	2,5
0,01	-	0,0125	2,4875	2,5

Bez względu na rodzaj DNA użyty przy konstrukcji bioczuJNIKÓW oraz analizowaną antracyklinę, wszystkie pomiary wykonywane były według jednakowej procedury (procedura XVII). Rozpocząła się ona od elektrochemicznego oczyszczenia powierzchni elektrody pracującej, po czym w celu sprawdzenia jego efektywności oraz przewodnictwa elektrody metodą SWV rejestrowana była jej linia podstawowa. Później układ elektrodowy zanurzany był w roztworze danego DNA, przez 5 minut przykładano do niego niezbyt wysokie napięcie dodatnie i następowała adsorpcja molekuł kwasu na elektrodzie pracującej na drodze przyciągania elektrostatycznego. Tak przygotowany czujnik umieszczany był na 2 minuty w roztworze badanej antracykliny i wówczas na powierzchni elektrody dochodziło do jej oddziaływania z molekułami kwasu. Następnie z układu wypłukiwane były niezwiązane cząsteczki substancji i rejestrowana była krzywa woltamperometryczna utleniania zarówno antracykliny, jak i zasad azotowych. Prowadzony w ten sposób eksperyment był dość czasochłonny. Pojedynczy pomiar zajmował około pół godziny, a przy każdym przebadanym stężeniu antracykliny dla poszczególnych rodzajów DNA powtarzany był on 5-8-krotnie.

Procedura XVII

- 1) Czyszczenie elektrochemiczne
 - 2) Rejestracja linii podstawowej
 - 3) Unieruchomienie DNA na powierzchni elektrody
roztwór: 20 ppm DNA (dsDNA-ss, dsDNA-ct, d(GC)₄, d(AT)₄ lub (A)₈) w AcB-K
mieszanie roztworu: tak
przyłożony potencjał: +0,5 V
czas trwania: 300 s
 - 4) Oddziaływanie DNA z badanym związkiem lub czystym buforem
roztwór: 0,0005-0,5 mM danej antracykliny (DAU, DAU-Fmor, DAU-Fhex, DOX, DOX-Fmor lub DOX-Fhex) w mieszaninie AcB-K i H₂O w stosunku 1:1 lub czysty AcB-K (ślepa próba)
mieszanie roztworu: tak
potencjał: nieprzyłożony potencjał zewnętrzny
czas trwania: 120 s
 - 9) Płukanie elektrody
 - 10) Pomiar
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**
- } przeprowadzone zgodnie z **Procedurą Podstawową**

Na podstawie prądów utlenienia zasad azotowych, odczytanych z zarejestrowanych woltamperogramów, poddanych wygładzeniu i korekcji linii podstawowej, wyznaczony został

sygnał analityczny, określający powinowactwo danej antracykliny do DNA. Był on zdefiniowany jako wyrażony w procentach stosunek średniej wysokości sygnału utlenienia guaniny lub adeniny po interakcji z daną antracykliną, do średniej wysokości pików tej samej zasady nukleinowej podczas ślepej próby, czyli w układzie, gdzie oddziaływała jedynie z czystym buforem. Opisuje go poniższe równanie (7):

$$S(\%) = \frac{S_{interakcja}}{S_{blank}} \cdot 100\% \quad (7)$$

w którym:

$S(\%)$ – sygnał analityczny

$S_{interakcja}$ – średnia wysokość sygnału utlenienia guaniny lub adeniny po oddziaływaniu z ligandem

S_{blank} – średnia wysokość sygnału utlenienia danej zasady nukleinowej przy ślepej próbie

Błąd obliczonego w ten sposób sygnału analitycznego wyznaczony został jako stosunek odchylenia standardowego średniego sygnału utlenienia guaniny lub adeniny po interakcji z daną antracykliną do średniego sygnału utlenienia tej samej zasady podczas ślepej próby, co przedstawia poniższe równanie (8):

$$\pm S(\%) = \frac{SD_{interakcja}}{S_{blank}} \cdot 100\% \quad (8)$$

w którym:

$\pm S(\%)$ – błąd sygnału analitycznego

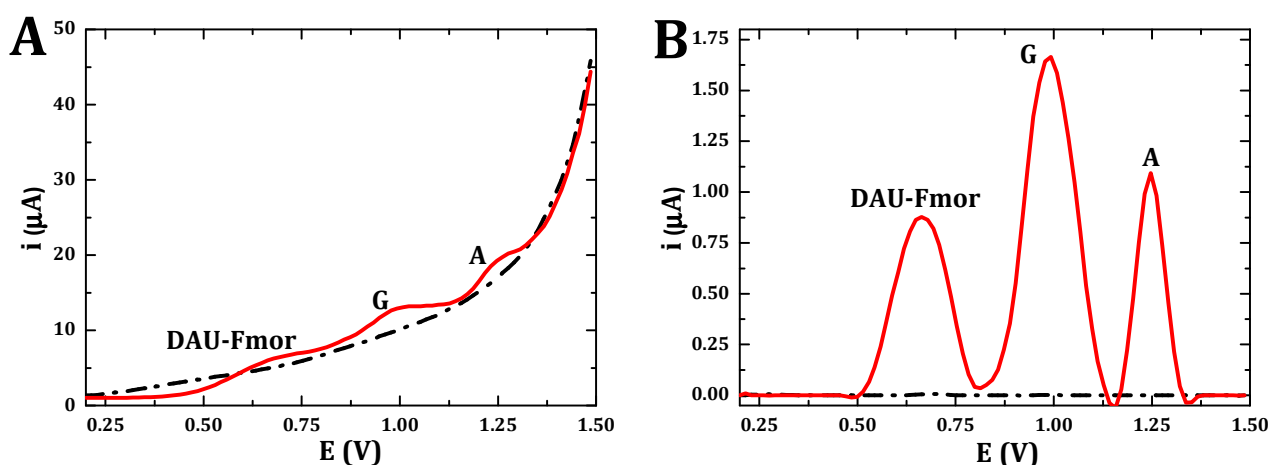
$SD_{interakcja}$ – odchylenie standardowe średniej wysokości sygnału utlenienia guaniny lub adeniny po oddziaływaniu z ligandem

Sygnał analityczny określa, jaki procent cząsteczek danej zasady azotowej, ulegających utlenieniu podczas ślepej próby, może ulec temu procesowi także po oddziaływaniu z danym ligandem. Na jej podstawie można określić powinowactwo poszczególnych antracyklin do DNA, a precyzyjniej do zawartej w nim guaniny i adeniny. Sygnał równy 100% odpowiada utlenianiu zasad azotowych po oddziaływaniu z samym buforem octanowym, czyli podczas ślepej próby. Jeśli po ich kontakcie z danym ligandem jego wartość nie zmienia się znacząco, to oznacza, że obecność molekuł tej substancji nie wpływa na procesy redoks DNA, a tym samym, nie wchodzi z nim w interakcje. Wzrost lub spadek $S(\%)$ świadczy o tym, że odpowiednio większa lub mniejsza ilość zasad azotowych zostaje utleniona w porównaniu z ilością utlenianą podczas ślepej próby, co jest konsekwencją oddziaływania pomiędzy molekułami farmaceutyków i kwasu nukleinowego. Sygnał analityczny mniejszy od 100% wskazuje na utrudnienie procesu utleniania zasad azotowych, spowodowane ich udziałem w tworzeniu kompleksu z cząsteczkami danej antracykliny. Jeżeli zaś sygnał analityczny jest większy od 100%, sugeruje to, że pod wpływem ligandu większa ilość guaniny lub adeniny ulega utlenieniu, co może wynikać na przykład z rozplatania helisy DNA.

4.4.3.1.2. Wyniki

Jak już zostało wyjaśnione wcześniej, DAU, DOX i ich formamidynowe pochodne wykazują identyczne właściwości elektrochemiczne, a ich utlenianie zachodzi przy dużo niższych potencjałach niż DNA, dzięki czemu nie następuje wzajemne nakładanie się ich pików. W związku z tym na woltamperogramach zarejestrowanych w zakresie +0,2–+1,5 V w zależności od rodzaju zastosowanego DNA widoczne były dwa lub trzy sygnały utlenienia (RYS. 175). Pierwszy z nich przy potencjale około +0,6 V obrazował utlenianie danej antracykliny, a dwa kolejne przy potencjałach około +0,9–+1,0 V i +1,2–+1,3 V odpowiadały utlenianiu guaniny i adeniny. O ile w przypadku DNA chromosomalnego, dsDNA-ss i dsDNA-ct, obecne były oba sygnały zasad azotowych, o tyle przy

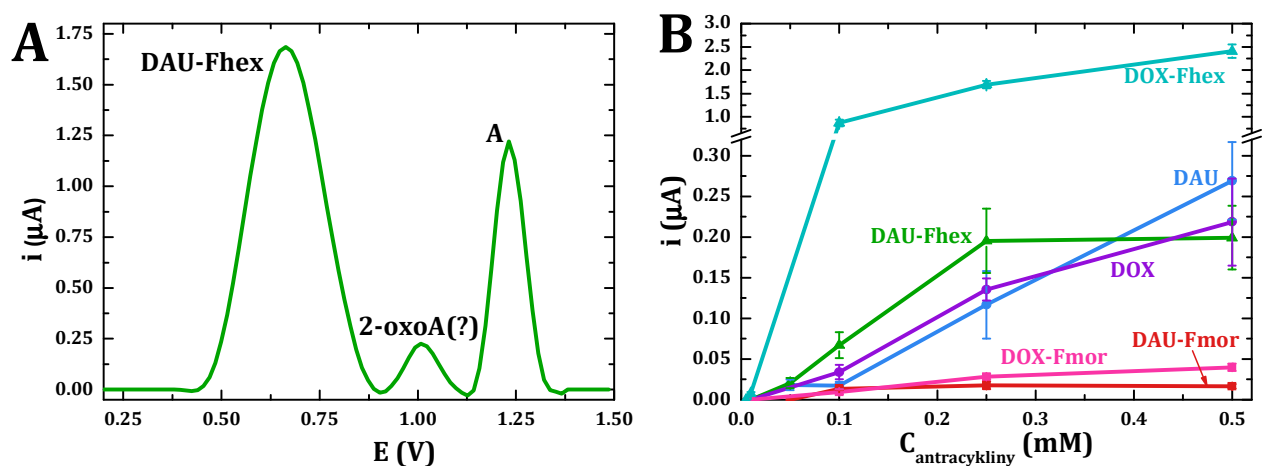
oligonukleotydach o określonej sekwencji nukleotydowej obecny był tylko jeden z nich – guaniny dla $d(\text{GC})_4$ lub adeniny dla $d(\text{AT})_4$ i $(\text{A})_8$. W wyniku oddziaływania z antracyklinami piki utlenienia zasad azotowych ulegały czasem niewielkim, rzędu 15–20 mV, przesunięciom w stronę wyższych potencjałów. Zmiany te były zwykle widoczne jedynie dla stężeń ligandów przewyższających 0,05 mM i ciężko było dostrzec ich systematyczność. Na ich podstawie można wyciągnąć wstępne wnioski, iż antracykliny wchodziły w interakcje z DNA zaadsorbowanym na elektrodzie sitodrukowanej, lecz nie dostarczają one konkretnych informacji na ten temat. Wysokość wszystkich rejestrowanych w tym eksperymencie sygnałów ulegała zmianie wraz ze zmianą stężenia danej antracykliny. Fakt ten nie dziwi w przypadku sygnału antracyklin, gdyż rzeczą naturalną jest wzrost prądu redoks danej substancji wraz ze zwiększaniem jej stężenia, lecz w odniesieniu do sygnałów DNA nie jest to już tak oczywiste. Zmiany sygnałów utlenienia zasad azotowych spowodowane obecnością poszczególnych antracyklin w układzie były odzwierciedleniem oddziaływań występujących pomiędzy tymi substancjami i stanowiły sygnał analityczny. Z tego też powodu zagadnienie to zostanie omówione bardziej szczegółowo w dalszej części rozdziału.



RYS. 175 – Voltamperogramy: A – po wygładzeniu, B – po korekcji linii podstawowej, zarejestrowane metodą SWV w AcB-K na: czystej elektrodzie – linia podstawowa (linia przerywana) oraz elektrodzie z osadzonym $ds\text{DNA-ct}$ po oddziaływaniu z 0,1 mM DAU-Fmor (linia ciągła).

Zaskakujący kształt voltamperogramów otrzymano w przypadku oddziaływania antracyklin z oligonukleotydami o sekwencji 5'ATATATAT3'. Wówczas pojawiał się na nich nowy, niewielki pik przy potencjale ok. +1,0 V (RYS. 176A). Mimo iż potencjał ten jest charakterystyczny dla utleniania guaniny, to w tym przypadku nie mogła być ona jego źródłem, gdyż nie wchodziła w skład stosowanego DNA. Zagadkowy sygnał obecny był w przypadku wszystkich przebadanych antracyklin, a jego intensywność zależała od rodzaju i stężenia ligandu. Występował on w zakresie stężeń 0,05–0,5 mM, a przy niższych jego wysokość nie przekraczała 0,01 μA lub zanikał zupełnie. Rodzaj antracykliny oddziałującej z $d(\text{AT})_4$ bardzo silnie determinował jego wysokość (RYS. 176B). Zależała ona przede wszystkim od rodzaju podstawnika w części daunozaminowej (związki macierzyste vs. pochodne Fmor vs. pochodne Fhex), a nie od obecności grupy OH przy węglu C14 w łańcuchu bocznym aglikonu (DAU i pochodne vs. DOX i pochodne). Sygnał przy ok. +1,0 V osiągnął najniższe wartości, rzędu 10^{-2} μA , dla pochodnych zawierających układ morfolinowy w całym zakresie ich stężeń (krzywa czerwona i różowa na RYS. 176B). Dla DAU i DOX był on znacznie wyższy, lecz nie przekraczał 0,3 μA przy stężeniu 0,5 mM (krzywa niebieska i fioletowa na RYS. 176B). Zarówno dla związków macierzystych, jak i pochodnych Fmor zależność ta była w przybliżeniu liniowa. Jej kształt diametralnie się zmieniał, gdy oligonukleotydy oddziaływały z pochodnymi zawierającymi w swej strukturze układ heksametylenoiminowy. Wówczas początkowo następował silny wzrost sygnału przy +1,0 V, po czym od stężenia 0,1 mM dla DOX-Fhex i 0,25 mM dla DAU-Fhex ulegał on stabilizacji i jego wysokość zmieniała się już w niewielkim stopniu (krzywa turkusowa i zielona na RYS. 176B). Choć dla tych pochodnych kształt omawianej

zależności był podobny, to zdecydowane różnice występowały w wartościach prądowych. W obecności DAU-Fhex były one porównywalne z tymi zarejestrowanymi w przypadku związków macierzystych, lecz dla DOX-Fhex osiągały one wielkość kilku mikroamperów. By znaleźć przyczynę takich różnic w wysokości sygnału utlenienia przy potencjale około +1,0 V, należało zastanowić się najpierw nad jego pochodzeniem. Jest on charakterystyczny dla DNA zawierającego nukleotydy adeninowe, a jego pojawienie się związane jest z obecnością antracyklin w układzie, gdyż nie był on rejestrowany ani podczas ślepej próby, gdy w układzie DNA było jedyną elektroaktywną substancją, ani podczas badania elektroaktywności antracyklin, gdy jedynie one ulegały utlenieniu. Można przypuszczać, że w wyniku oddziaływania antracyklin z $d(AT)_4$ na powierzchni elektrody w nieodtlenionym układzie dochodzi do oksydacyjnego uszkodzenia adeniny, co objawia się obecnością na woltamperogramie sygnału oddalonego od pików utleniania adeniny o około 300 mV, który może odpowiadać elektrotlenieniu 2-oksoadeniny (2-oxoA) [97]. Pojawianie się na woltamperogramach nowego pików, świadczącego wówczas o oksydacyjnym uszkodzeniu guaniny, było już obserwowana przy badaniu oddziaływania doksorubicyny z dsDNA z grasicy cięłej [314, 326]. Fakt, że 2-oxoA najwyższą wartość osiągał w wyniku interakcji DNA z DOX-Fhex, sugeruje, iż ta właśnie pochodna wywołuje największe uszkodzenia oksydacyjne w helisie kwasu. Najniższe wartości dla pochodnych z układem morfolinowym świadczą o tym, że ich działanie utleniające jest najmniejsze. Zjawisko to prawdopodobnie występuje także dla innych rodzajów DNA zawierających adeninę (w omawianym eksperymencie – dsDNA-ss i dsDNA-ct), ale jest ono maskowane obecnością sygnału utlenienia guaniny przy potencjale +0,9–+1,0 V. Warto zwrócić także uwagę, że z uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi antracyklinami nie mamy do czynienia w przypadku guaniny. Na żadnym woltamperogramie zarejestrowanym na elektrodzie z osadzonym DNA, zawierającym G w strukturze, nie pojawiał się bowiem pik utleniania 8-oxoguaniny (8-oxoG). Ponadto, sygnał 2-oxoA pojawiał się również, gdy do modyfikacji czujnika użyto oligonukleotydów $(A)_8$ i poddano je działaniu daunorubicyny. Odznaczał się on jednak mniejszą wysokością w porównaniu z pikiem zarejestrowanym dla $d(AT)_4$, mimo iż wydawałoby się, że powinno być odwrotnie ze względu na większą zawartość adeniny. Chociaż temperatura topnienia $d(AT)_4$ wynosi 16°C, to w temperaturze pokojowej jego roztwór stanowi mieszaninę form jedno- i dwuniciowych, gdyż łańcuchy te są komplementarne względem siebie. W przypadku oligonukleotydów $(A)_8$ natomiast, ich roztwór nie zawiera wzajemnie komplementarnych nici, więc wszystkie molekuly mają postać ssDNA. W związku z tym można przypuszczać, że silniejszemu działaniu utleniającemu antracyklin w stosunku do adeniny sprzyja występowanie DNA w formie podwójnej helisy, przez co efekty uszkodzeń oksydacyjnych dla $(A)_8$ były mniej intensywne.



RYS. 176 – A – Woltamperogram po korekcji linii podstawowej, zarejestrowany metodą SWV w AcB-K na elektrodzie z osadzonym $d(AT)_4$ po oddziaływaniu z 0,25 mM DAU-Fhex. B – Zależność wysokości sygnału utlenienia przy potencjale ok. +1 V zarejestrowanego metodą SWV w AcB-K na elektrodzie z osadzonym $d(AT)_4$ po oddziaływaniu z różnymi antracyklinami od ich stężenia.

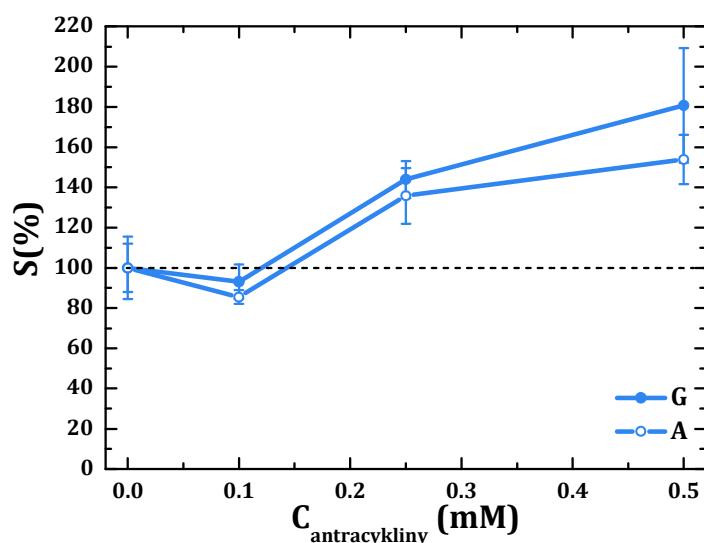
Podstawą oceny oddziaływań występujących pomiędzy DNA a antracyklinami była jednak zmiana sygnałów utlenienia guaniny i adeniny. Analizę rozpoczęto od zbadania interakcji daunorubicyny i jej pochodnych z DNA chromosomalnym – ze spermy łososia (dsDNA-ss) i z grasicy cielej (dsDNA-ct). Następnie została ona poszerzona o DNA oligonukleotydowe oraz doksorubicynę i jej pochodne.

Oddziaływanie daunorubicyny (DAU) i jej formamidynowych pochodnych (DAU-Fmor i DAU-Fhex) z chromosomalnym DNA ze spermy łososia (dsDNA-ss)

Wyniki badań wskazują, iż oddziaływanie daunorubicyny z dsDNA-ss powoduje podwyższenie pików utlenienia zasad azotowych, co obrazują wartości S(%) przekraczające 100% (Tabela 23). Oznacza to, że w wyniku interakcji większa ilość guaniny i adeniny może ulec procesom redoks w porównaniu z układem, w którym DAU jest nieobecna. Sugeruje to uwalnianie zasad ze struktury podwójnej helisy, co może zostać osiągnięte na drodze jej rozplatania, w wyniku czego komplementarne zasady azotowe ulegają rozparowaniu i mają ułatwiony kontakt z elektrodą. Trend i wielkość zmian prądów utlenienia guaniny i adeniny w zależności od stężenia DAU była bardzo podobna (RYS. 177), co wskazuje na jej jednakowe powinowactwo do obu zasad. Najsilniejsze wzmocnienie sygnału, sięgające 180% dla G i 150% dla A, miało miejsce przy najwyższym przebadanym stężeniu antracykliny, wynoszącym 0,5 mM. Następnie S(%) stopniowo spadało, aż do wartości odpowiednio 93% i 85% dla stężenia 0,1 mM. Wartości te niewiele różnią się jednak od 100% i można przypuszczać, że przy takim stężeniu daunorubicyny jej oddziaływanie z dsDNA-ss jest znikome.

TABELA 23 – Sygnały procentowe utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny.

Stężenie DAU [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]
0,5	180,8	28,5	153,8	12,2
0,25	143,9	9,3	135,8	13,8
0,1	93,1	8,6	85,5	3,3
0	100	15,5	100	12,0



RYS. 177 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Zupełnie odmienne wyniki dla dsDNA-ss uzyskano w obecności pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy. Tutaj w całym zakresie stężeń DAU-Fmor, od 0,001 mM do 0,5 mM, procentowa zmiana sygnałów utlenienia zasad azotowych była niższa od 100% (Tabela

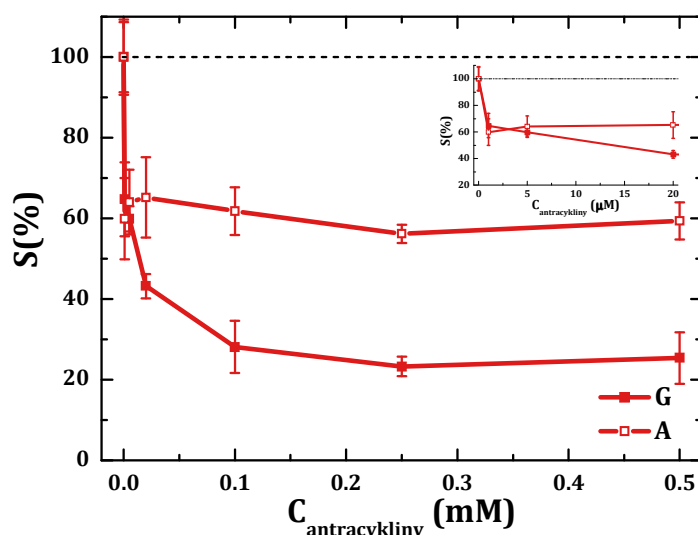
24). Świadczy to o utrudnianiu lub wręcz blokowaniu tego procesu przez molekuly DAU-Fmor, które najprawdopodobniej ulegają interkalacji do podwójnej helisy DNA. Taki sposób interakcji związany jest z tworzeniem wiązań wodorowych, a być może nawet kowalencyjnych, pomiędzy łańcuchami kwasu nukleinowego a molekułami antracykliny.

W przypadku guaniny największy spadek sygnału analitycznego następował przy stężeniach 0,1–0,5 mM. Osiągał on wartość poniżej 30% i już od stężenia 0,1 mM zaczynał ulegać stabilizacji (RYS. 178). Poniżej stężenia 0,1 mM S(%) guaniny stopniowo rósł, wynosząc blisko 65% przy stężeniu 1 μM (wstawienie na RYS. 178). Na tej podstawie doskonale widać, iż wraz ze wzrostem stężenia DAU-Fmor następuje intensyfikacja jej interakcji z guaniną zawartą w dsDNA-ss aż do stężenia 0,1 mM, przy którym sygnał osiąga plateau. Dalsze zwiększanie zawartości pochodnej daunorubicyny w układzie nie powoduje silniejszego wpływu na sygnał G, a tym samym nie prowadzi to interkalacji kolejnych molekuł antracykliny do helisy DNA.

Sytuacja wygląda nieco inaczej w przypadku adeniny, gdzie S(%) spadło do około 60% przy stężeniu 1 μM (wstawienie na RYS. 178) i utrzymywał się mniej więcej na tym samym poziomie w całym przebadanym zakresie stężeń (RYS. 178). DAU-Fmor w mniejszym stopniu wpływa na proces utleniania adeniny niż guaniny, co może świadczyć o jego słabszym powinowactwie do A i preferowaniu interkalacji w rejonach DNA bogatych w G.

TABELA 24 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

Stężenie DAU-Fmor [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]
0,5	25,4	6,4	59,4	4,6
0,25	23,3	2,5	56,2	2,3
0,1	28,1	6,4	61,8	5,9
0,02	43,2	3,0	65,2	9,9
0,005	59,9	3,1	64,1	8,0
0,001	64,8	9,2	59,9	10,1
0	100	9,3	100	8,7



RYS. 178 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

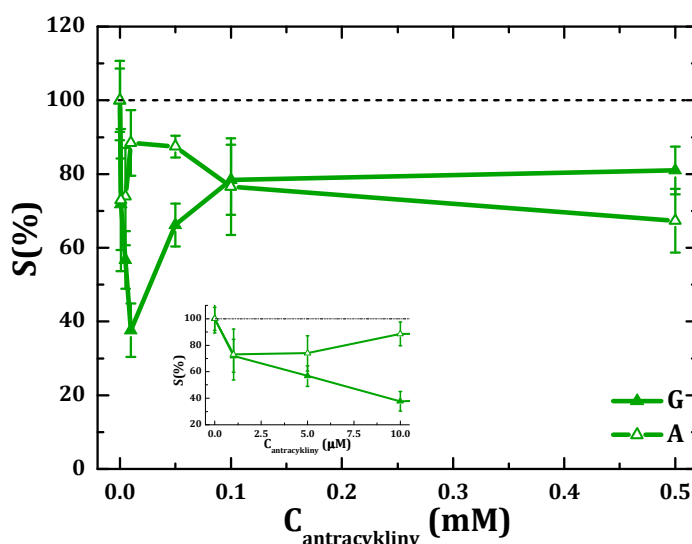
Pochodna daunorubicyny zawierająca układ heksametylenoiminowy również wchodzi w interakcje z dsDNA-ss, o czym świadczy jej znaczący wpływ na sygnały utleniania zasad azotowych. Tendencja ich zmian nie jest jednak już tak jednoznaczna, jak w przypadku poprzednich substancji (Tabela 25).

Najsilniejsze obniżenie sygnału utlenienia guaniny występowało przy stężeniu DAU-Fhex 0,01 mM i S(%) spadło wówczas poniżej 40% (RYS. 179). Dla niższych stężeń jego wartość stopniowo wzrastała, osiągając blisko 72% przy stężeniu 1 μM (wstawienie na RYS. 179). Zastanawiający jest fakt, że powyżej stężenia 0,01 mM procentowy sygnał analityczny również wzrastał i od stężenia 0,1 mM zaczynał się stabilizować na poziomie 80%. Sugeruje to, iż zwiększenie stężenia DAU-Fhex nie skutkuje jego silniejszym oddziaływaniem z łańcuchami kwasu nukleinowego, a wręcz wywołuje efekt odwrotny. Być może znaczna ilość molekuł antracykliny sprzyja ich oddziaływaniom elektrostatycznym z naładowanym ujemnie szkieletem cukrowo-fosforanowym DNA, co jednocześnie blokuje ich dostęp do miejsc interkalacji i tworzenie specyficznych połączeń.

Nieco inny efekt wywołuje ta pochodna antracyklinowa w przypadku adeniny. Tutaj już przy najniższych stężeniach mikromolowych S(%) spadło do wartości nieco ponad 70% (wstawienie na RYS. 179), po czym wzrosło do 88–89% i od stężenia 0,1 mM znów zaczynało stopniowo spadać (RYS. 179). Na podstawie tych wyników widać, że DAU-Fhex słabiej oddziałuje z adeniną niż z guaniną. W obu przypadkach siła tych interakcji nie wzrasta jednak proporcjonalnie do zmiany stężenia antracykliny. Molekuły DNA chromosomalnego są stosunkowo duże, mogą różnie układać się na powierzchni elektrody i ulegać splątaniu. Może to prowadzić do zaburzeń w oddziaływaniu z ligandami i ograniczać im dostęp do miejsc specyficznych interakcji.

TABELA 25 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.

Stężenie DAU-Fhex [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ss [%]	RSD [%]
0,5	81,0	6,5	67,4	8,6
0,1	78,5	9,5	76,6	13,1
0,05	66,2	5,8	87,5	3,0
0,01	37,7	7,3	88,5	8,9
0,005	56,8	7,8	73,9	13,2
0,001	71,9	12,4	72,9	19,3
0	100	8,6	100	10,8

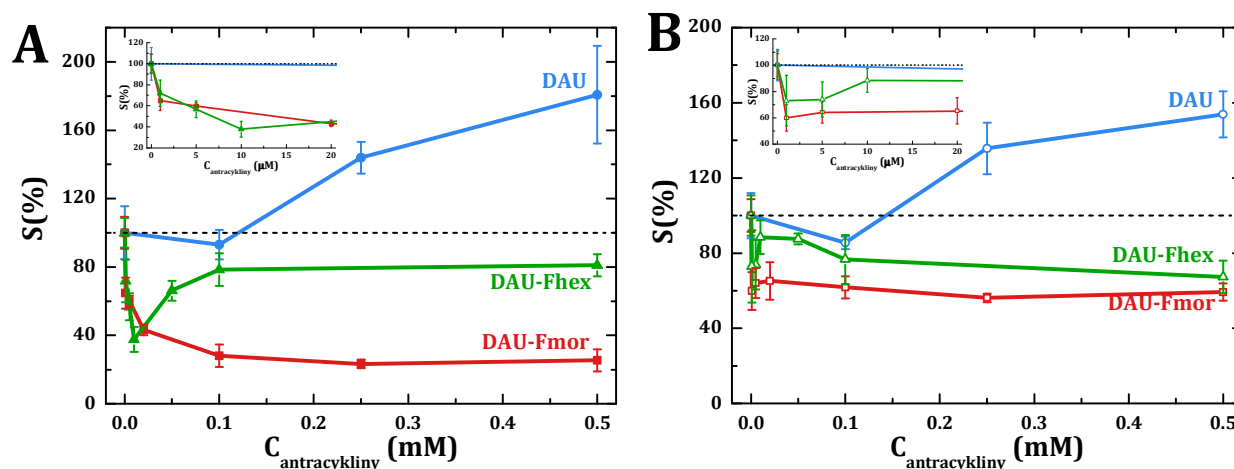


RYS. 179 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Porównując wpływ daunorubicyny i jej dwóch formamidynowych pochodnych na sygnały utlenienia guaniny i adeniny zawartych w DNA chromosomalnym ze spermy łosia, doskonale widać, jak różne jest ich powinowactwo do kwasu nukleinowego. Dla wszystkich przebadanych

antracyklin zmiany sygnałów utlenienia guaniny (*RYS. 180A*) są większe niż adeniny (*RYS. 180B*). Świadczy to o silniejszym powinowactwie tych substancji do fragmentów helisy bogatych w G.

Oddziaływanie DAU z dsDNA-ss ma zupełnie inną naturę niż jej pochodnych. Związek macierzysty, wiążąc się z podwójną helisą, umożliwia utlenienie większej liczby zasad azotowych, co prawdopodobnie wynika z rozplatania podwójnej helisy. Podobny efekt podwyższenia sygnałów utlenienia zasad azotowych DNA pod wpływem daunorubicyny [225] oraz innych oddziałujących z nim ligandów (np. lewofloksacyny [209], analogów pentamidyny [239], czy likoryny [383]) był już wcześniej obserwowany w różnych eksperymentach. Efekt ten nie występuje w obecności DAU-Fmor i DAU-Fhex, które interkalując w różnym stopniu utrudniają utlenianie zasad azotowych. Poniżej stężenia 0,01 mM wykazują one zbliżone powinowactwo do guaniny, redukując jej sygnał o około 60% (wstawienie na *RYS. 180A*). O ile siła interakcji DAU-Fmor powyżej tego stężenia nieco wzrasta, o tyle dla DAU-Fhex znacznie słabnie. W obu przypadkach jednak zwiększenie stężenia substancji powyżej 0,1 mM nie powoduje już istotnych zmian w układzie (*RYS. 180A*), co świadczy o tym, że przy tym stężeniu następuje wysycenie guaniny dostępnej w procesie utleniania elektrodowego i więcej molekuł danej antracykliny nie jest już w stanie się z nią związać. Powinowactwo DAU-Fmor do adeniny jest zaś większe niż DAU-Fhex w całym zakresie stężeń, utrzymując się na poziomie odpowiednio 60% i 70% dla wyższych stężeń (*RYS. 180B*). Podobnie jednak jak w przypadku guaniny, efekty oddziaływania są widoczne już przy najmniejszych stężeniach mikromolowych (wstawienie na *RYS. 180B*). Co ciekawe przy stężeniu 0,1 mM związku macierzystego efekty jego oddziaływania z zasadami nukleinowymi są znikome i pojawiają się dopiero przy większej zawartości DAU w układzie. Świadczy to o tym, że wprowadzenie dodatkowych układów amin cyklicznych w części daunozaminowej ma znaczący wpływ zarówno na siłę, jak sposób oddziaływania poszczególnych antracyklin z DNA chromosomalnym.



RYS. 180 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny, B – adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.

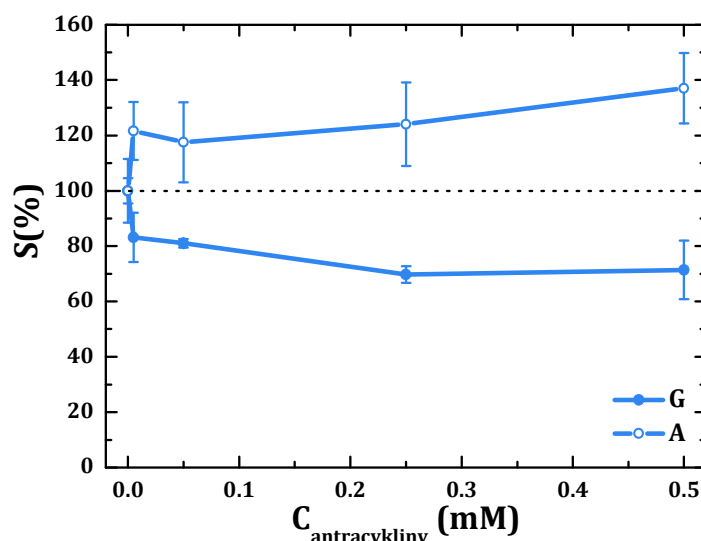
Oddziaływanie daunorubicyny (DAU) i jej formamidynowych pochodnych (DAU-Fmor i DAU-Fhex) z chromosomalnym DNA ze grasicy sielęcej (dsDNA-ct)

Celem kolejnego etapu eksperymentu było sprawdzenie, czy DAU i jej pochodne w taki sam sposób oddziałują z innym rodzajem DNA chromosomalnego. W tym celu użyte zostało DNA z grasicy sielęcej (dsDNA-ct). W przypadku związku macierzystego na podstawie wartości S(%), które były mniejsze od 100% dla guaniny i większe od 100% dla adeniny (*Tabela 26*), od razu można dostrzec, jak bardzo interakcje te różnią się w zależności od zasady azotowej. Choć wielkość zmian sygnału utlenienia obu zasad była porównywalna w całym zakresie stężeń (20–30%) (*RYS. 181*), to proces utleniania G jest blokowany przez molekuly DAU prawdopodobnie w wyniku interkalacji, zaś fragmenty helisy zawierające A, oddziałującą z antracykliną, ulegają przypuszczalnie rozpleceniu, zwiększając tym samym dostępność tej zasady w procesie

elektrooutlenienia. Ponadto, proces rozplatania łańcuchów DNA może być także ułatwiony ze względu na oksydacyjne uszkodzenia adeniny wywołane DAU. Omówione wcześniej powstawanie 2-oxoA na powierzchni elektrody związane jest z utlenieniem węgla C2 adeniny, co może w znaczący sposób wpływać na wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi zasadami – adeniną i tyminą, a tym samym osłabiać stabilizację podwójnej helisy kwasu deoksyrybonukleinowego. Efekt ten nie jest widoczny w przypadku guaniny, gdyż zgodnie z tym, co zostało zarejestrowane, antracykliny nie powodują oksydacyjnych uszkodzeń w jej strukturze.

TABELA 26 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny.

Stężenie DAU [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]
0,5	71,4	10,5	137,0	12,7
0,25	69,8	3,0	124,0	15,1
0,05	81,1	1,6	117,5	14,5
0,005	83,1	8,9	121,6	10,5
0	100	4,6	100	11,5



RYS. 181 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

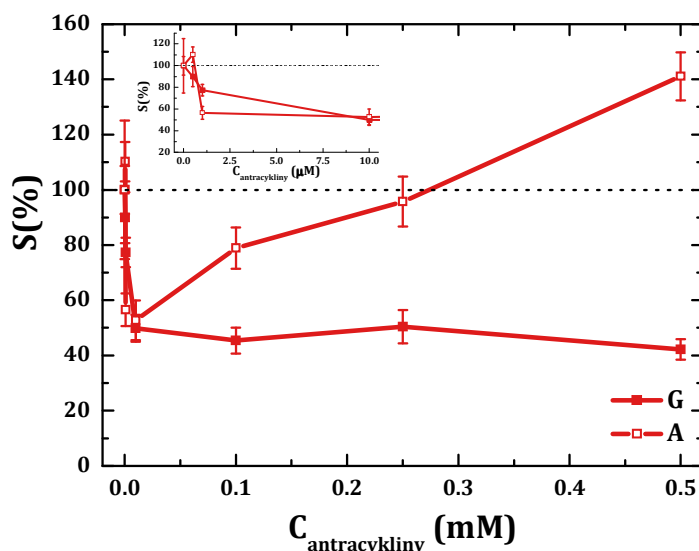
W inny sposób na zmianę sygnałów utleniania zasad azotowych dsDNA-ct wpływa pochodna daunorubicyny z układem morfolinowym. W wyniku oddziaływania z rejonami helisy bogatymi w guaninę, powoduje ona dość gwałtowny spadek prądu utlenienia tej zasady (Tabela 27). Co prawda przy stężeniu 0,5 μM S(%) spadło jedynie do 90%, co nie świadczy jeszcze o występowaniu interakcji, ale wartość ta szybko jednak zmalała i przy stężeniu 10 μM sygnał utlenienia guaniny został obniżony o połowę w porównaniu ze ślepą próbą (wstawienie na RYS. 182). Następnie utrzymywał się na tym poziomie aż do najwyższego przebadanego stężenia DAU-Fmor, 0,5 mM (RYS. 182).

Zależność procentowego sygnału analitycznego od stężenia tej pochodnej dla adeniny kształtuje się bardzo podobnie jak dla guaniny jedynie w zakresie stężeń mikromolowych. Tu również obserwujemy gwałtowny spadek S(%) aż do wartości około 50% przy stężeniu antracykliny 10 μM (wstawienie na RYS. 182), jednak potem następował jego stopniowy wzrost aż do wartości przekraczającej 140% dla stężenia 0,5 mM (RYS. 182). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, iż DAU-Fmor wykazuje podobne powinowactwo do G i A, lecz mechanizm tych interakcji już nieco się różni. W przypadku guaniny w całym zakresie stężeń

polega on prawdopodobnie na interkalacji, blokującej jej procesy redoks. Adenina z kolei przy niskich stężeniach DAU-Fmor podlega podobnemu działaniu, lecz dla wyższych pojawia się konkurencyjny mechanizm, polegający na rozplataniu helisy. Być może jest on wspomagany uszkodzeniami oksydacyjnymi, które także mają miejsce tylko, gdy stężenie antracykliny przekracza 0,1 mM.

TABELA 27 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

Stężenie DAU-Fmor [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]
0,5	42,2	3,7	141,2	8,7
0,25	50,4	6,0	95,8	9,1
0,1	45,4	4,7	78,9	7,5
0,01	49,8	4,9	52,7	7,2
0,001	77,4	5,4	56,5	5,9
0,0005	89,9	9,3	110,3	7,1
0	100	8,7	100	25,1

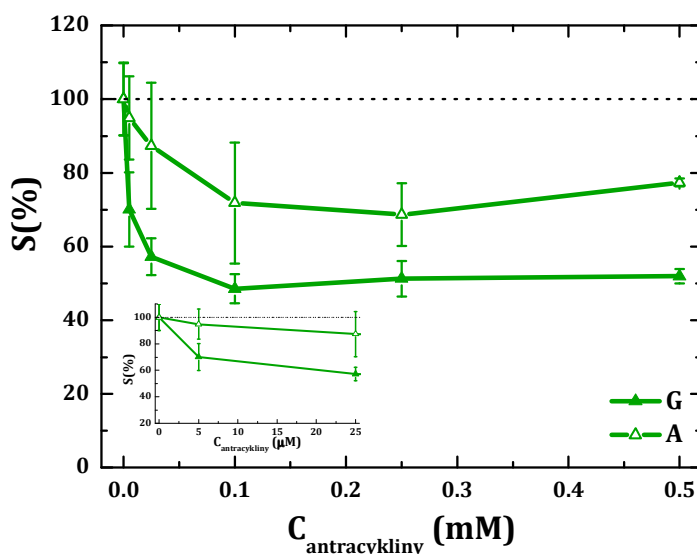


RYS. 182 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Pochodna daunorubicyny zawierająca układ heksametylenoiminowy również wchodzi w interakcje z dsDNA-ct, ale nie są one tak różnorodne jak w przypadku poprzedniej substancji. Pod wpływem DAU-Fhex, w całym przebadanym zakresie stężeń, sygnały utleniania guaniny i adeniny ulegają znacznemu obniżeniu w porównaniu ze ślepą próbą (Tabela 28). Wielkość tego spadku nie jest jednak identyczna dla obu zasad. Gdy stężenie DAU-Fhex w układzie nie przekraczało 0,1 mM, prądy utlenienia zasad guaniny i adeniny malały, aż do momentu, gdy stanowiły odpowiednio około 50% i 70% wartości wyjściowej (RYS. 183). Świadczy to o zdecydowanie silniejszym powinowactwie DAU-Fhex do guaniny niż adeniny. Zwiększanie stężenia antracykliny powyżej 0,1 mM nie powodowało dalszego obniżania S(%). Sugeruje to, że wszystkie miejsca w helisie zdolne do związania się z molekułami DAU-Fhex zostały już zajęte i dalsze zwiększanie ich ilości nie wpływa na właściwości redoks DNA. Nadmiarowa liczba cząsteczek może oddziaływać z łańcuchami kwasu jedynie w sposób niespecyficzny, poprzez elektrostatyczne przyciąganie pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi szkieletu helisy a obdarzonymi ładunkiem dodatnim molekułami antracykliny.

TABELA 28 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.

Stężenie DAU-Fhex [mM]	S(%) guaniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]	S(%) adeniny dsDNA-ct [%]	RSD [%]
0,5	52,0	2,0	77,4	1,1
0,25	51,3	4,8	68,7	8,6
0,1	48,6	4,0	71,8	16,4
0,025	57,2	5,0	87,4	17,1
0,005	70,1	10,1	94,9	11,3
0	100	9,9	100	9,8

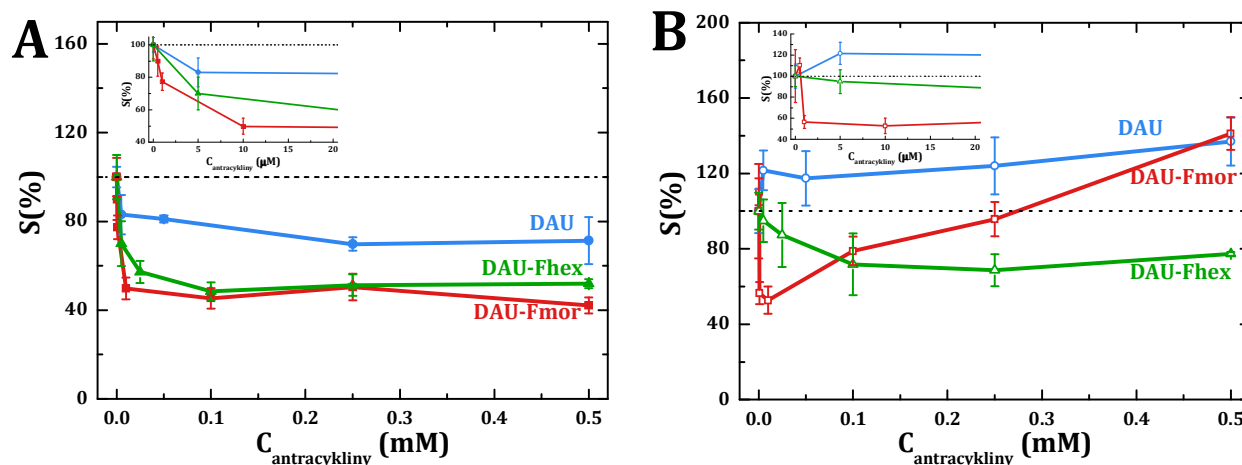


RYS. 183 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Wszystkie przebadane w tej części eksperymentu substancje oddziałują z DNA chromosomalnym z grasicą cielęcej, lecz nie w jednakowy sposób. Pod ich wpływem sygnał utleniania guaniny w porównaniu ze ślepą próbą ulega obniżeniu o 30% w przypadku DAU oraz o 50% w przypadku jej pochodnych (RYS. 184A). Świadczy to o silniejszych interakcjach DNA z pochodnymi niż ze związkiem macierzystym. DAU-Fmor i DAU-Fhex wykazują bardzo podobne powinowactwo do dsDNA-ct, ale należy zwrócić uwagę, że pierwsza pochodna wywołuje maksymalny efekt przy niższym stężeniu niż druga z nich (0,01 mM vs. 0,1 mM). Oznacza to, że mniejsza liczba cząsteczek jest potrzebna, by wysycić nimi helisę DNA. Gdyby substancje te stosowane były jako farmaceutyki, z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, iż skuteczna dawka DAU-Fmor byłaby niższa niż DAU-Fhex.

Zupełnie inne zależności pomiędzy S(%) a stężeniem antracyklin występują w przypadku adeniny (RYS. 184B). Różnice w kształcie poszczególnych krzywych sugerują odmienne mechanizmy ich działania. Dla związku macierzystego w całym zakresie stężeń procesy redoks A na elektrodzie przebiegają łatwiej (S(%) w granicy 120%), co może być związane z rozplataniem helisy. DAU-Fhex z kolei utrudnia ten proces, redukując ostatecznie ilość utlenianej adeniny o około 30%. Najbardziej skomplikowana sytuacja ma miejsce dla DAU-Fmor, gdyż w zależności od stężenia jej mechanizm oddziaływania z DNA ulega zmianie. Przy niższych stężeniach mikromolowych na skutek interkalacji sygnał utleniania A spada nawet o połowę (wstawienie na RYS. 184B), po czym przy wyższych stężeniach znacząco rośnie, przekraczając nawet prąd zarejestrowany pod nieobecność tej antracykliny (RYS. 184B). Podwyższanie sygnału utleniania adeniny w wyniku

oddziaływania z antracyklinami interpretowane jest jako rozplatanie podwójnej helisy, ułatwiane przez oksydacyjne uszkodzenia tej zasady. Zastanawiający jest jednak fakt, że mimo iż sygnał 2-oxoA rejestrowany był również dla DAU-Fhex, to w tym przypadku nie obserwowano efektu podwyższania sygnału utleniania adeniny.



RYS. 184 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny, B – adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.

Porównując wyniki otrzymane przy zastosowaniu dwóch różnych rodzajów DNA chromosomalnego (RYS. 180 vs. RYS. 184), już na pierwszy rzut oka można dostrzec pewne rozbieżności. Sugerowałoby to zależność oddziaływania daunorubicyny i jej pochodnych od rodzaju kwasu nukleinowego. Nie należy jednak zapominać, że molekuly DNA chromosomalnego są stosunkowo duże, poskręcane i wykazują tendencję do tworzenia agregatów, co może wpływać na ich nie zawsze powtarzalne ułożenie na powierzchni elektrody i zdolność do wchodzenia w interakcje z ligandami. Ponadto, nie jest nam znana sekwencja nukleotydowa DNA ze spermy łososia i grasicy cielęcej, a jak wiadomo, ma ona ogromny wpływ na mechanizm oddziaływania DAU z DNA [228, 229]. Zarówno sekwencja, z którą wiąże się daunorubicyna, jak i jej otoczenie, odgrywają kluczową rolę przy tworzeniu jej kompleksu z kwasem nukleinowym. Sąsiednie zasady azotowe determinują gęstość elektronową na atomach zdolnych do utworzenia wiązań wodorowych oraz są odpowiedzialne za tworzenie ewentualnej zawady sterycznej, wpływając tym samym na sposób wiązania daunozyminy w małym rowku [228, 229]. W związku z takimi utrudnieniami w analizie, wynikającymi z zastosowania w badaniach DNA chromosomalnego, cały eksperyment został powtórzony z wykorzystaniem oligonukleotydów o określonej sekwencji zasad. Miało to ułatwić interpretację wyników i doprowadzić do jednoznacznych wniosków odnośnie oddziaływania formamidynowych pochodnych antracyklin z kwasem deoksyrybonukleinowym.

Oddziaływanie daunorubicyny (DAU) i jej formamidynowych pochodnych (DAU-Fmor i DAU-Fhex) z oligonukleotydami d(GC)₄ i d(AT)₄

W nadziei na uzyskanie prostszych do interpretacji wyników zastosowane zostały dwa rodzaje oligonukleotydów, których łańcuchy zbudowane były z ośmiu nukleotydów. Pierwszy z nich zawierał w swej strukturze występujące naprzemiennie guaninę i cytozynę (5'GCGCGGC3'). Łańcuchy te są komplementarne w stosunku do siebie, a temperatura topnienia tworzonej przez nie helisy wynosi 32°C. W związku z tym w warunkach pomiarowych (temperatura pokojowa) tworzyły one mieszaninę pojedynczych i podwójnych nici nukleotydowych, ze zdecydowaną przewagą form dwuniciowych. Drugi rodzaj użytych oligonukleotydów zbudowany był z ułożonych na przemian nukleotydów adeninowych i tyminowych (5'ATATATAT3'). Podobnie jak dla d(GC)₄,

tutaj także nici były wzajemnie komplementarne, lecz charakteryzowała je mniejsza trwałość, co objawiało się znacznie niższą temperaturą topnienia ich podwójnej helisy, która wynosiła zaledwie 16°C. W temperaturze pokojowej roztwór d(AT)₄ był mieszaniną form jedno- i dwuniciowych, lecz te pierwsze występowały w przewodzie.

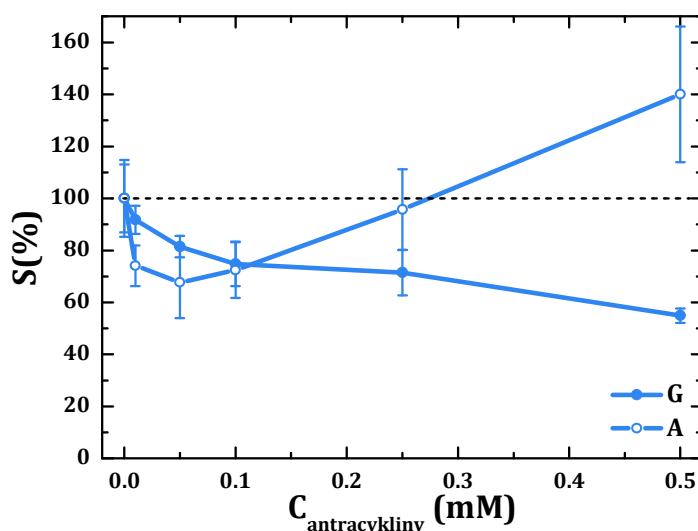
Tak jak przy DNA chromosomalnym, eksperyment rozpoczęto od zbadania interakcji oligonukleotydów ze związkiem macierzystym, czyli daunorubicyną. DAU wykazuje powinowactwo zarówno do d(GC)₄, jak i d(AT)₄, lecz wywołuje różne zmiany w sygnałach utlenienia zasad azotowych (Tabela 29).

TABELA 29 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia daunorubicyny.

Stężenie DAU [mM]	S(%) guaniny d(GC) ₄ [%]	RSD [%]	Stężenie DAU [mM]	S(%) adeniny d(AT) ₄ [%]	RSD [%]
0,5	54,9	2,8	0,5	140,0	26,1
0,25	71,4	8,8	0,25	95,7	15,5
0,1	74,8	8,6	0,1	72,4	10,7
0,05	81,5	4,1	0,05	67,7	13,8
0,01	91,7	5,4	0,01	74,1	7,9
0	100	14,8	0	100	13,0

Na skutek oddziaływania d(GC)₄ z daunorubicyną prąd utlenienia guaniny powoli malał wraz ze wzrostem jej stężenia (RYS. 185). Przy stężeniu 10 μM DAU spadł on o niecałe 10%, co nie świadczy jeszcze o występowaniu znaczących interakcji. Jednak gdy stężenie wzrosło do 0,5 mM, wartość S(%) obniżyła się do 55%, co potwierdza najprawdopodobniej interkalację cząsteczek antracykliny do helisy. Nie występuje tu plateau na krzywej, co sugeruje, że dodanie większej ilości DAU mogłoby jeszcze pogłębiać ten efekt.

Przebieg zmiany sygnału utlenienia adeniny pod wpływem DAU jest nieco inny. Po początkowym spadku S(%) poniżej 70% dla stężenia 50 μM, następował jego powolny wzrost aż do 140% przy najwyższym przebadanym stężeniu (RYS. 185). Taki wynik może sugerować, iż po początkowej interkalacji i blokowaniu utleniania adeniny cząsteczki daunorubicyny powodują rozplatanie helisy. Proces ten może być też wspomagany oksydacyjnymi uszkodzeniami adeniny, które objawiały się obecnością pików 2-oxoA na voltamperogramie (RYS. 176B).

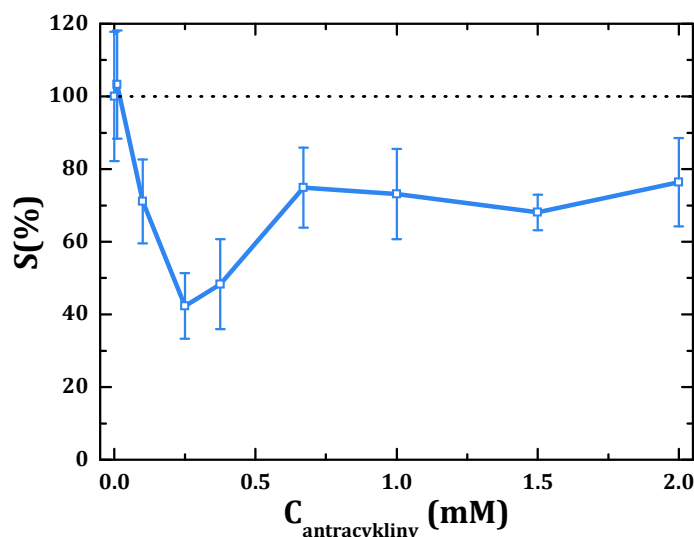


RYS. 185 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w d(GC)₄ i adeniny zawartej w d(AT)₄ w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Poszukując potwierdzenia teorii o rozplataniu fragmentów helisy bogatych w adeninę w wyniku oddziaływania z antracyklinami, analogiczny eksperyment przeprowadzony został z oligonukleotydami, zbudowanymi z ośmiu nukleotydów adeninowych (5'AAAAAAAAA3'). Tego typu łańcuchy DNA nie mają szansy tworzyć podwójnej helisy, gdyż nie są one komplementarne względem siebie. Tym samym w przygotowanym roztworze oraz na elektrodzie obecna była wyłącznie forma ssDNA. Jeśli wzrost S(%) adeniny powyżej 100% po oddziaływaniu z antracyklinami jest wynikiem rozplatania podwójnej helisy, to nie powinien mieć on miejsca w przypadku (A)₈. W związku z tym sprawdzono, jak zmienia się pod wpływem daunorubicyny sygnał utlenienia adeniny zawartej w takich łańcuchach. W związku z tym, że w dotychczasowych badaniach wzrost prądu utlenienia adeniny w większości przypadków nie występował przy najniższych stężeniach mikromolowych, w bieżącym eksperymencie zmieniony został zakres stężeń daunorubicyny. Rozszerzono go aż do stężenia 2 mM, a pominięto te najniższe (poniżej 10 μM) (Tabela 30). Przy stężeniu 10 μM DAU sygnał utlenienia adeniny był bardzo zbliżony do wartości odpowiadającej ślepej próbie (RYS. 186), co wskazuje na brak interakcji pomiędzy molekułami antracykliny i DNA. Następnie S(%) stopniowo malało aż do 42% dla stężenia 0,25 mM DAU, po czym ponownie wzrastało i od stężenia 0,67 mM stabilizowało się na poziomie około 70%. Świadczy to o silnym oddziaływaniu daunorubicyny z (A)₈, które słabnie wraz ze wzrostem stężenia. Taka tendencja może wynikać z przewagi niespecyficznych oddziaływań elektrostatycznych przy wyższym stężeniu daunorubicyny nad interakcjami specyficznymi, realizowanymi za pośrednictwem wiązań wodorowych czy kowalencyjnych. Znaczne nagromadzenie molekuł DAU w obrębie naładowanego ujemnie szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA może ograniczać ich dostęp do miejsc oddziaływań specyficznych. Nie mniej jednak w całym przebadanym zakresie stężeń nie stwierdzono, by wartość S(%) wzrastała powyżej 100%, jak to miało miejsce w analogicznym eksperymencie z użyciem d(AT)₄. Co więcej, nawet zwiększenie stężenia DAU powyżej 2 mM z pewnością nie spowodowałoby takiego efektu, gdyż już od stężenia 0,67 mM układ ulega stabilizacji i zwiększanie ilości DAU nie wpływa na sygnał utlenienia adeniny. Na podstawie tego można stwierdzić, że warunkiem wzrostu sygnału utleniania adeniny po oddziaływaniu z DAU jest obecność dwuniciowych form DNA w układzie. Tym samym udowodniono, iż wzrost procentowego sygnału analitycznego powyżej 100% w przypadku oddziaływania DAU z d(AT)₄, a także z innymi rodzajami DNA, może być związany z rozplataniem podwójnej helisy.

TABELA 30 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania adeniny (A)₈ w zależności od stężenia daunorubicyny.

Stężenie DAU [mM]	S(%) adeniny (A) ₈ [%]	RSD [%]
2	76,4	12,2
1,5	68,1	4,9
1	73,1	12,4
0,67	74,9	11,0
0,375	48,3	12,4
0,25	42,3	9,0
0,1	71,1	11,5
0,01	103,3	14,9
0	100	17,8



RYS. 186 – Procentowa zmiana sygnału utleniania adeniny zawartej w $(A)_8$ w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Wracając do badania oddziaływań formamidynowych pochodnych daunorubicyny z oligonukleotydami, przeanalizowano wpływ DAU-Fmor na utlenianie zawartej w nich guaniny i adeniny. Oba sygnały ulegają znacznemu obniżeniu w porównaniu ze ślepą próbą (Tabela 31), co świadczy o silnych oddziaływaniach pomiędzy DNA a antracykliną.

TABELA 31 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

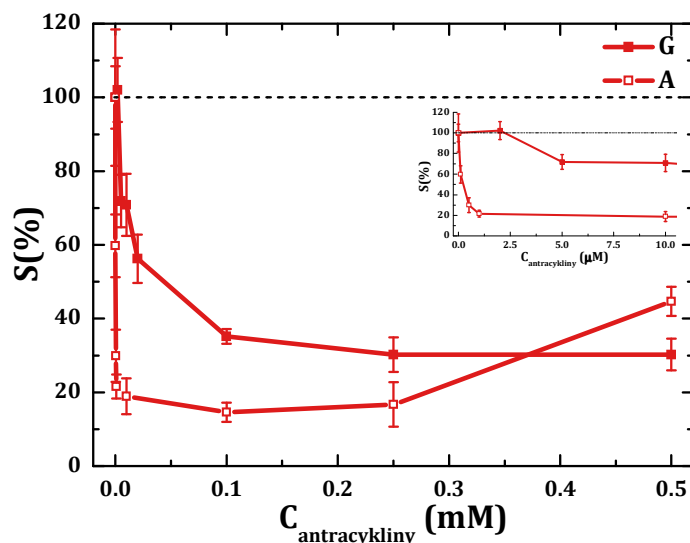
Stężenie DAU-Fmor [mM]	S(%) guaniny $d(GC)_4$ [%]	RSD [%]
0,5	30,3	4,3
0,25	30,2	4,7
0,1	35,2	2,0
0,02	56,3	6,6
0,01	70,9	8,4
0,005	71,9	7,1
0,002	102,1	8,7
0	100	8,5

Stężenie DAU-Fmor [mM]	S(%) adeniny $d(AT)_4$ [%]	RSD [%]
0,5	44,7	4,0
0,25	16,7	6,0
0,1	14,6	2,6
0,01	18,9	4,9
0,001	21,6	3,2
0,0005	29,9	7,1
0,0001	59,8	8,5
0	100	18,5

Począwszy od stężenia $5 \mu\text{M}$ DAU-Fmor prąd utleniania G obniżał się stopniowo wraz z jego wzrostem (wstawienie na RYS. 187), aż przy stężeniu $0,25 \text{ mM}$ S(%) osiągał wartość 30% i stabilizował się na tym poziomie (RYS. 187). Nawet dalsze zwiększanie stężenia pochodnej nie powodowało pogłębiania się efektu redukcji wysokości piku utlenienia, co najprawdopodobniej spowodowane jest zajęciem przez molekule DAU-Fmor wszystkich pozycji w helisie $d(GC)_4$, zdolnych do związania się z nimi.

Silniejsze powinowactwo niż do guaniny DAU-Fmor wykazuje w stosunku do adeniny zawartej w $d(AT)_4$. Już przy stężeniu $0,1 \mu\text{M}$ DAU-Fmor sygnał jej utlenienia obniżył się o około 40% w porównaniu ze ślepą próbą (wstawienie na RYS. 187), po czym wraz ze wzrostem stężenia następował jego dalszy dość gwałtowny spadek. W zakresie stężeń $0,001\text{--}0,25 \text{ mM}$ S(%) ulegało względnej stabilizacji na poziomie 15–20% (RYS. 187), co świadczy o bardzo silnych oddziaływaniach molekuł DAU-Fmor z oligonukleotydami. Nie jest już tak zaskakujące, iż dalszy wzrost ilości antracykliny w układzie powodował wzrost procentowego sygnału analitycznego aż do poziomu 45%. Najprawdopodobniej przy stężeniu $0,5 \text{ mM}$ obok interkalacji rozpoczyna się proces rozplatania helisy $d(AT)_4$, który wraz z dalszym wzrostem stężenia DAU-Fmor stawałby się

intensywniejszy. Efekt ten nie jest jednak tak znaczny ($S(\%)$ nie przekraczało wartości 100%), jak dla daunorubicyny, co koreluje z niewielką intensywnością oksydacyjnych uszkodzeń adeniny (RYS. 176B).



RYS. 187 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

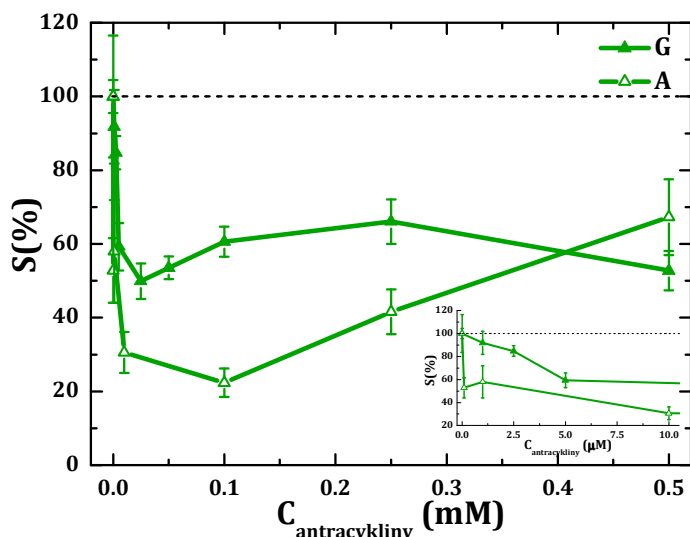
W nieco podobny sposób wpływa na sygnały utlenienia zasad azotowych oligonukleotydów pochodna zawierająca pierścień heksametylenoiminowy (Tabela 32). Sygnał guaniny ulegał stopniowemu obniżaniu wraz ze wzrastającym stężeniem DAU-Fhex (RYS. 188). Przy stężeniu 25 μM malał on o połowę (wstawienie na RYS. 188), a $S(\%)$ utrzymywało się na poziomie 50–60% aż do końca przebadanego zakresu stężeń.

DAU-Fhex wykazuje jednak silniejsze powinowactwo do adeniny. Prąd jej utlenienia malał stopniowo wraz ze wzrostem stężenia antracykliny, w wyniku czego wartość $S(\%)$ nieznacznie przekraczała 20% przy stężeniu 0,1 mM (RYS. 188). Gdy zawartość DAU-Fhex dalej rosła, pik A zaczynał wzrastać liniowo, a $S(\%)$ dla stężenia 0,5 mM było bliskie 70%. Ponownie mamy do czynienia tutaj z interkalacją, prowadzącą do rozplatania łańcuchów oligonukleotydów zawierających adeninę i ułatwionym kontaktem molekuł tej zasady z elektrodą. Dodatkowo zbiega się to z obecnością pików 2-oxoA na voltamperogramach, co po raz kolejny potwierdza związek uszkodzeń oksydacyjnych DNA z rozplataniem helisy.

TABELA 32 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.

Stężenie DAU-Fhex [mM]	$S(\%)$ guaniny $d(GC)_4$ [%]	RSD [%]
0,5	52,8	5,4
0,25	66,1	6,1
0,1	60,6	4,1
0,05	53,6	3,1
0,025	49,9	4,8
0,005	59,3	6,4
0,0025	84,8	4,5
0,001	91,8	10,0
0	100	4,5

Stężenie DAU-Fhex [mM]	$S(\%)$ adeniny $d(AT)_4$ [%]	RSD [%]
0,5	67,3	10,3
0,25	41,6	6,1
0,1	22,4	3,8
0,01	30,6	5,6
0,001	58,0	13,9
0,0001	52,8	8,8
0	100	16,5

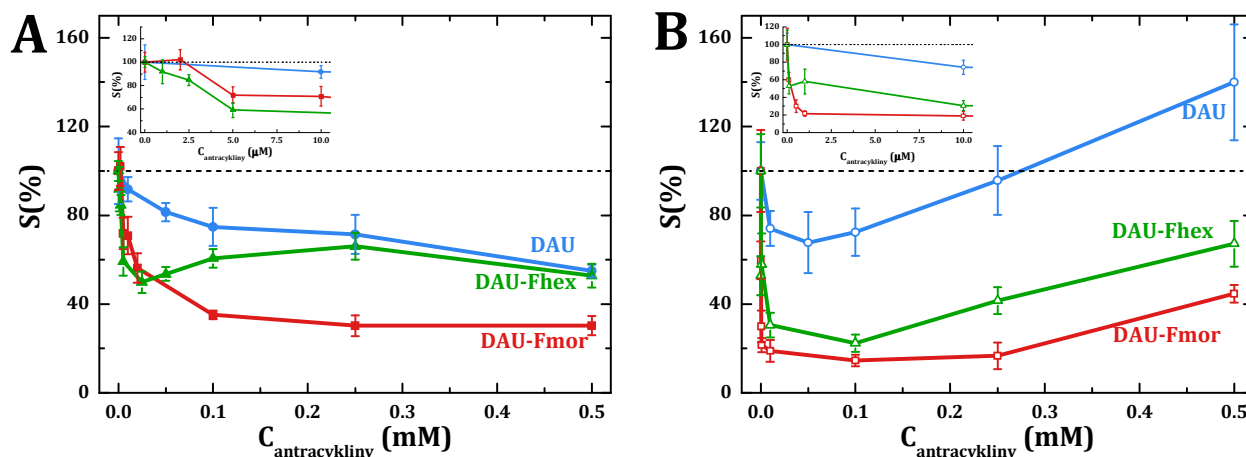


RYS. 188 - Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Podsumowując tę część eksperymentów, bez wątplenia można stwierdzić, iż daunorubicyna i jej formamidynowe pochodne wchodzi w silne interakcje z oligonukleotydami, lecz ich natura zależy od sekwencji zasad azotowych w helisie. Warto jednak zauważyć, że dla danej sekwencji DNA tendencja zmian sygnałów utleniania zasad nukleinowych w obecności wszystkich antracyklin jest w zasadzie jednakowa, a różnice widoczne są jedynie w ich intensywności (RYS. 189). W przypadku guaniny antracykliny powodują obniżenie prądów jej utlenienia, nasilające się wraz ze wzrostem ich stężenia (RYS. 189A). Najmniejszy efekt występuje w obecności związku macierzystego, co wskazuje na najsłabsze oddziaływanie jego molekuł z $d(GC)_4$. W zakresie stężeń milimolowych S(%) osiąga wartości średnio o 10% niższe w obecności DAU-Fhex niż DAU-Fmor, co świadczy o nieco silniejszym powinowactwie pierwszej pochodnej do guaniny. Sytuacja zmienia się powyżej stężenia $25 \mu\text{M}$. Wówczas S(%) dla DAU-Fhex utrzymuje się na poziomie 50–60%, podczas gdy prąd utleniania guaniny w obecności DAU-Fmor wciąż maleje i stabilizuje się dopiero przy stężeniu $0,25 \text{ mM}$, gdy stanowi zaledwie 30% wartości zarejestrowanej podczas ślepej próby. Takie wyniki sugerują, że większa liczba cząsteczek DAU-Fmor jest w stanie związać się z helisą $d(GC)_4$, blokując jednocześnie możliwość elektroutlenienia guaniny.

Zupełnie inny mechanizm oddziaływania DAU i jej pochodnych z DNA występuje w przypadku osadzenia na elektrodzie $d(AT)_4$. Tutaj krzywe zależności S(%) od stężenia danej antracykliny mają taki sam kształt dla każdej z nich, a różnią się jedynie położeniem na osi rzędnych (RYS. 189B). Charakteryzuje je dość gwałtowny spadek wartości S(%) w zakresie niskich stężeń badanych substancji, po czym po osiągnięciu przy stężeniu $0,05\text{--}0,1 \text{ mM}$ minimum, które wynosi 72% dla DAU, 22% dla DAU-Fhex i 15% dla DAU-Fmor, zaczyna ona ponownie wzrastać, przekraczając nawet 100% w przypadku DAU. Taki przebieg charakterystyczny jest dla nałożenia się pewnych procesów związanych z tworzeniem przez antracykliny kompleksów z DNA. Początkowy spadek odpowiada prawdopodobnie interkalacji ich molekuł do helisy, połączonej z tworzeniem wiązań wodorowych i/lub kowalencyjnych. Im spadek S(%) jest większy, tym silniejsze powinowactwo danej substancji do $d(AT)_4$. Nagły wzrost S(%), mający miejsce przy wyższych stężeniach antracyklin, może być związany z omawianym już wcześniej rozplataniem helisy.

Reasumując, daunorubicyna oraz jej dwie formamidynowe pochodne oddziałują z oligonukleotydami $d(GC)_4$ i $d(AT)_4$. Natura tych interakcji zależy od sekwencji nukleotydowej, a jej siła od stężenia i struktury ligandu – w tym przypadku podstawnika w części daunozaminowej antracykliny, gdyż reszta cząsteczki się nie zmienia. Powinowactwo przebadanych substancji do obu rodzajów oligonukleotydów rośnie według następującego porządku: DAU < DAU-Fhex < DAU-Fmor.



RYS. 189 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny zawartej w $d(GC)_4$, B – adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.

Oddziaływanie doksorubicyny (DOX) i jej formamidynowych pochodnych (DAU-Fmor i DAU-Fhex) z oligonukleotydami $d(GC)_4$ i $d(AT)_4$

W analogiczny sposób zbadane zostało powinowactwo doksorubicyny i jej formamidynowych pochodnych do oligonukleotydów. Różnica w strukturze DAU i DOX, polegająca na obecności przy węglu C14 trzech atomów wodoru w przypadku pierwszej z nich lub dwóch atomów wodoru i jednej grupy OH w przypadku drugiej, mogłaby się wydawać marginalna. Determinuje ona jednak właściwości tych związków i wpływa na sposób ich oddziaływania z DNA [307]. W tej części eksperymentów sprawdzono, czy modyfikacja części danozaminowej doksorubicyny poprzez wprowadzenie pierścienia aminy cyklicznej również odgrywa kluczową rolę dla natury oddziaływań tych substancji z kwasem deoksyrybonukleinowym tak, jak ma to miejsce w przypadku DAU i jej pochodnych.

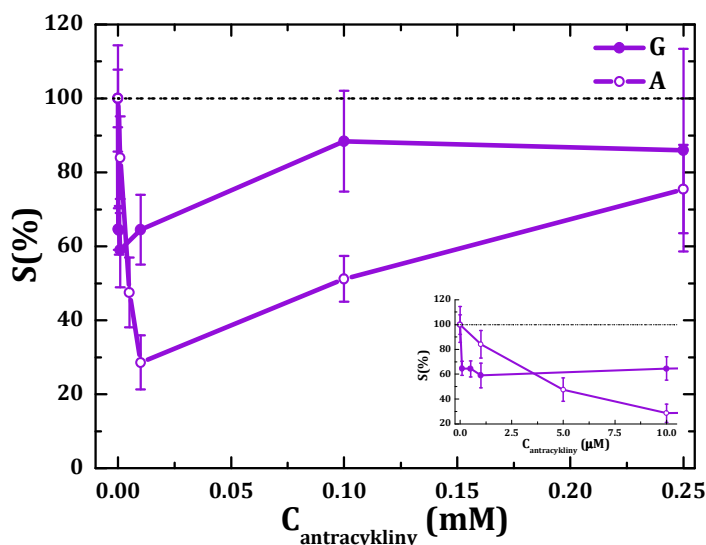
TABELA 33 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia doksorubicyny.

Stężenie DOX [mM]	S(%) guaniny $d(GC)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	86,0	27,4
0,1	88,4	13,7
0,01	64,5	9,4
0,001	59,0	10,0
0,0005	64,3	6,5
0,0001	64,7	5,7
0	100	7,8

Stężenie DOX [mM]	S(%) adeniny $d(AT)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	75,5	12,0
0,1	51,2	6,2
0,01	28,6	7,3
0,005	47,5	9,4
0,001	84,0	11,2
0	100	14,4

Doksorubicyna wywołuje znaczący wpływ na prąd utleniania zasad azotowych zawartych w stosowanych oligonukleotydach (Tabela 33). W przypadku $d(GC)_4$ już najniższe stężenia DOX, rzędu dziesiątych części μM , powodowały spadek sygnału G o około 35% w porównaniu ze ślepą próbą (wstawienie na RYS. 190). S(%) najniższą wartość (59%) osiągało przy 1 μM stężeniu DOX, następnie stopniowo wzrastało, po czym od stężenia 0,1 mM stabilizowało się na poziomie 86–88% (RYS. 190). Taki przebieg krzywej sugeruje, iż już niewielka ilość doksorubicyny wiąże się z helisą DNA, skutecznie blokując utlenianie guaniny. Wyższe stężenia antracykliny powodują najprawdopodobniej nagromadzenie jej molekuł w sąsiedztwie szkieletu cukrowo-fosforanowego w wyniku przyciągania elektrostatycznego, co może ograniczać ich dostęp do wnętrza helisy. W rezultacie ograniczona liczba cząsteczek DOX ma szansę na specyficzne oddziaływanie z DNA na drodze interkalacji oraz utworzenie wiązań kowalencyjnych i/lub wodorowych. Skutkuje to

podwyższeniem S(%) w porównaniu z wartościami dla stężeń mikromolowych, gdyż mniejsza liczba molekuł DOX związanych z helisą oznacza słabszy efekt blokowania utleniania guaniny.



RYS. 190 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia doksorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Zależność S(%) od stężenia doksorubicyny ma nieco inny przebieg w przypadku $d(AT)_4$. Choć tu również następuje obniżenie sygnału utlenienia zasady azotowej, tym razem adeniny, to nie jest to proces tak gwałtowny i zachodzi stopniowo wraz ze wzrostem stężenia DOX w układzie. S(%) minimalną wartość, poniżej 30%, osiągnęło przy stężeniu 10 μM (wstawienie na RYS. 190), po czym zaczęło ono rosnąć liniowo z dalszym wzrostem stężenia (RYS. 190). Początkowy spadek, analogicznie jak dla $d(GC)_4$, jest wynikiem ograniczenia ilości adeniny mogącej ulec procesowi elektROUTLENIA, zaś dalszy wzrost to najprawdopodobniej efekt rozplatania helisy DNA. Wyniki uzyskane w tym eksperymencie różnią się znacząco od tych zarejestrowanych w obecności daunorubicyny (RYS. 190 vs. RYS. 185), co pokazuje, że obecność grupy hydroksylowej przy węglu C14 w cząsteczce DOX ma ogromny wpływ na jej powinowactwo do oligonukleotydów i naturę występujących pomiędzy nimi oddziaływań.

Silne interakcje występują także pomiędzy oligonukleotydami a pochodną doksorubicyny, zawierającą układ morfolinowy, o czym świadczą bardzo duże zmiany w wysokości sygnałów utleniania guaniny i adeniny zawartej w oligonukleotydach (Tabela 34).

TABELA 34 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

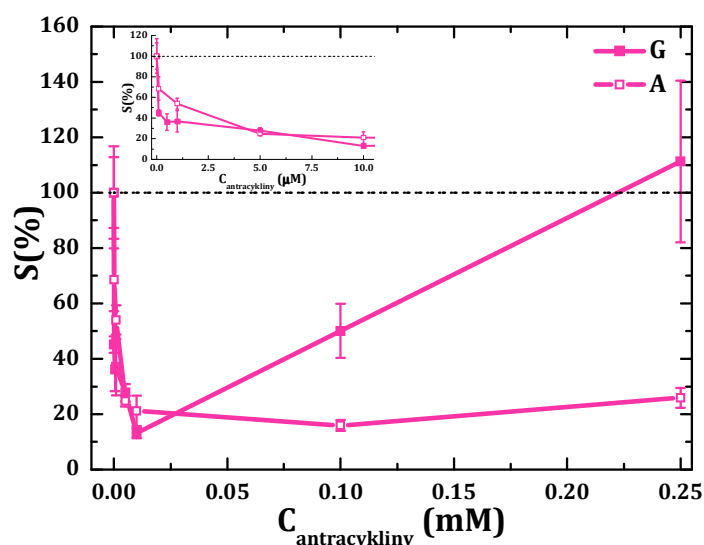
Stężenie DOX-Fmor [mM]	S(%) guaniny $d(GC)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	111,2	29,2
0,1	50,1	9,8
0,01	13,1	1,9
0,005	27,7	3,1
0,001	37,0	10,2
0,0005	36,2	7,9
0,0001	45,2	3,0
0	100	16,7

Stężenie DOX-Fmor [mM]	S(%) adeniny $d(AT)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	25,9	3,6
0,1	15,9	2,0
0,01	21,2	5,5
0,005	24,7	1,9
0,001	54,0	5,3
0,0001	68,5	11,4
0	100	12,8

Prąd utlenienia G zawartej w $d(GC)_4$ już przy najniższych stężeniach DOX-Fmor ulegał znacznej redukcji, stanowiąc zaledwie 36% wartości wyjściowej dla ślepej próby (wstawienie na RYS. 191). Powyżej stężenia 0,5 μM spadek ten stawał się mniej gwałtowny, a minimalna wartość

S(%) wynosiła 13% i została zarejestrowana przy 10 μM stężeniu formamidynoantracykliny. Tak duży spadek wysokości sygnałów guaniny świadczy o bardzo silnym związaniu jej z molekułami DOX-Fmor, które prawdopodobnie interkalując, tworzą jednocześnie wiązania wodorowe i/lub kowalencyjne z helisą. Powyżej stężenia 10 μM obniżanie pików G na skutek interakcji z DOX-Fmor traciło na intensywności i S(%) zaczynało liniowo rosnać. W rezultacie przy 0,25 mM stężeniu pochodnej przekroczyło ono 100% (RYS. 191), co świadczy o rozplataniu podwójnej helisy i zwiększeniu ilości guaniny dostępnej w procesie utlenienia na powierzchni elektrody.

Zupełnie inny kształt przybiera krzywa zmian S(%) dla adeniny zawartej w $d(\text{AT})_4$ (RYS. 191). Miał tutaj miejsce mniej gwałtowny spadek sygnału utleniania A wraz ze wzrostem stężenia DOX-Fmor, a minimalna wartość S(%), wynosząca 16%, przypadła na stężenie 0,1 mM i podobnie jak dla $d(\text{GC})_4$, świadczy o bardzo silnym powinowactwie molekuł antracykliny do stosowanych oligonukleotydów. Powyżej tego stężenia następował zaledwie 10-cio procentowy wzrost sygnału utleniania adeniny w porównaniu z minimalną wartością S(%), co wskazuje na pewną stabilizację układu w tym zakresie stężeń.



RYS. 191 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(\text{GC})_4$ i adeniny zawartej w $d(\text{AT})_4$ w zależności od stężenia pochodnej doksorubicyny DOX-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Porównując uzyskane tutaj wyniki z tymi zarejestrowanymi dla alogicznej pochodnej daunorubicyny, można zauważyć pewne podobieństwa, jak i różnice (RYS. 191 vs. RYS. 187). Zmiany sygnału utleniania zawartej w oligonukleotydach adeniny wraz ze wzrastającym stężeniem antracyklin mają bardzo podobny przebieg w obecności DOX-Fmor i DAU-Fmor. Świadczy to o decydującym wpływie morfolinowego pierścienia obecnego w części daunozaminowej, a nie podstawnika przy węglu C14 aglikonu, na sposób i siłę oddziaływania tych pochodnych z $d(\text{AT})_4$. Sytuacja zmienia się jednak w przypadku $d(\text{GC})_4$, gdzie zależności procentowej zmiany sygnału utleniania guaniny od stężenia DOX-Fmor lub DAU-Fmor różnią się diametralnie pod względem wartości i kształtu. Najprawdopodobniej w tym przypadku modyfikacja daunozaminy nie odgrywa kluczowej roli dla sposobu oddziaływania.

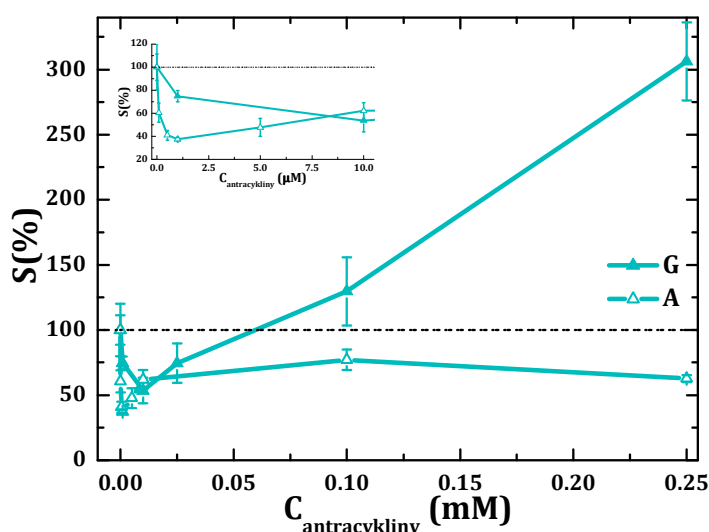
Pochodna doksorubicyny modyfikowana pierścieniem heksametylenoiminowym w części daunozaminowej również powoduje znaczące zmiany w sygnałach utleniania zasad azotowych oligonukleotydów (Tabela 35). Prąd utleniania guaniny pod wpływem DOX-Fhex ulegał stopniowemu obniżeniu, stanowiąc przy stężeniu 10 μM połowę wartości zarejestrowanej dla ślepej próby (wstawienie na RYS. 192). Powyżej tego stężenia zaczynał on gwałtownie rosnać i przy najwyższym zbadanym stężeniu (0,25 mM) S(%) przekraczało 300% (RYS. 192). Tak duży wzrost nie był obserwowany dla żadnej z analizowanych dotychczas substancji. Może świadczyć on

o bardzo silnym rozplataniu helisy DNA, wynikającym z interkalacji molekuł antracykliny prowadzącej do osłabiania wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami.

TABELA 35 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.

Stężenie DOX-Fhex [mM]	S(%) guaniny $d(GC)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	306,2	30,1
0,1	129,7	26,2
0,025	74,5	15,2
0,01	53,5	9,7
0,001	74,8	4,9
0	100	20,3

Stężenie DOX-Fhex [mM]	S(%) adeniny $d(AT)_4$ [%]	RSD [%]
0,25	62,6	2,8
0,1	77,1	7,9
0,01	62,0	7,3
0,005	47,7	7,7
0,001	37,4	1,8
0,0005	40,8	4,2
0,0001	60,5	8,5
0	100	11,4



RYS. 192 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej doksorubicyny DOX-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

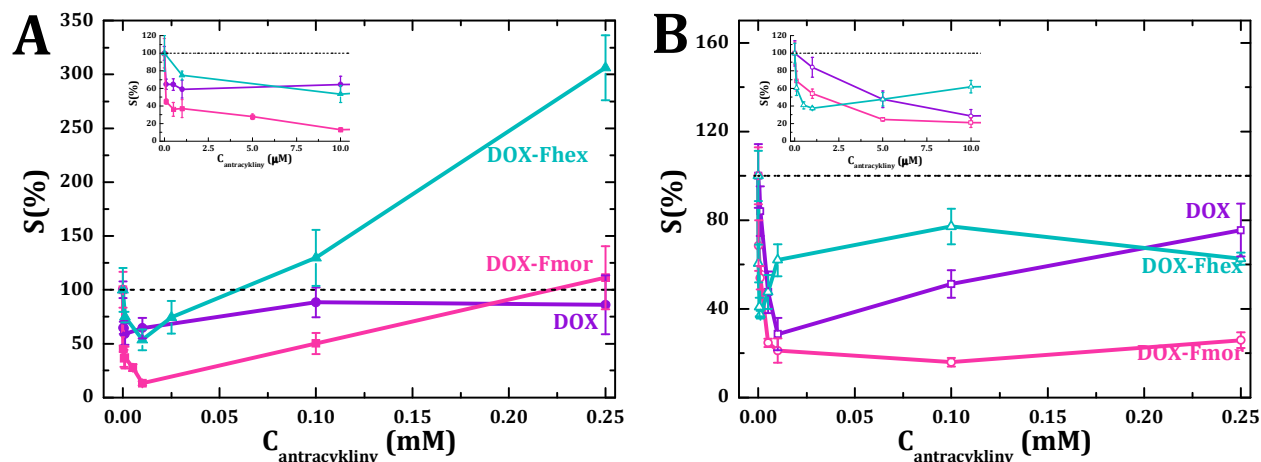
Efekt ten nie występuje w przypadku $d(AT)_4$. Tutaj procentowa zmiana sygnału utleniania adeniny ani nie przekroczyła wartości 100%, ani nie wykazywała nagłego wzrostu. S(%) dla mikromolowych stężeń DOX-Fhex gwałtownie spadło aż poniżej wartości 40% przy stężeniu 1 μM (wstawienie na RYS. 192). Gdy zawartość antracykliny w układzie wzrastała, S(%) też pomału rosło, po czym od stężenia 10 μM stabilizowało się na poziomie 60-80% (RYS. 192). Taki przebieg krzywej świadczy o średniej sile oddziaływania pomiędzy adeniną i DOX-Fhex, które przy wyższych stężeniach jest dodatkowo osłabiane w wyniku blokowania dostępu do wnętrza helisy przez nagromadzenie w pobliżu szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA cząsteczek antracykliny.

Natura interakcji DOX-Fhex i DAU-Fhex z oboma rodzajami oligonukleotydów różni się diametralnie (RYS. 192 vs. RYS. 188). Obecność grupy hydroksylowej przy węglu C14 w pochodnej doksorubicyny odgrywa kluczową rolę dla tworzenia jej kompleksu z DNA.

Wszystkie przebadane w tej części eksperymentów antracykliny wchodzi z oligonukleotydami w interakcje, których natura jest bardzo zróżnicowana nawet dla tego samego rodzaju DNA (RYS. 193). Gdy na elektrodzie osadzony jest $d(GC)_4$ najsilniejsze obniżenie sygnału utleniania guaniny odnotowuje się dla DOX-Fmor (S(%) ok. 13%) (wstawienie na RYS. 193A). Pozostałe substancje w mniejszym stopniu blokują ten proces, redukując wysokość piku G o 40–50% w porównaniu ze ślepą próbą. We wszystkich przypadkach efekt ten występuje

w zakresie stężeń mikromolowych. Oznacza to, że minimalna ilość danej antracykliny jest w stanie efektywnie związać się z DNA, uniemożliwiając jednocześnie elektroutlenienie guaniny na powierzchni czujnika. Kiedy stężenie antracyklin w układzie przekracza $10\ \mu\text{M}$, zaczynają one w odmienny sposób wpływać na ten proces (RYS. 193A). W obecności związku macierzystego ustala się pewna równowaga pomiędzy liczbą jego cząsteczek zaangażowanych w specyficzną interkalację do helisy a przyciąganych elektrostatycznie przez jej szkielet, co na krzywej zależności $S(\%)$ od stężenia objawia się w postaci plateau na poziomie nieprzekraczającym 90%. W przypadku pochodnych natomiast, wraz ze wzrostem ich stężenia stopniowo zwiększa się wartość procentowego sygnału analitycznego, przekraczając nawet 100%. Efekt ten jest dużo intensywniejszy dla DOX-Fhex niż DOX-Fmor – przy stężeniu $0,25\ \text{mM}$ $S(\%)$ wynosi odpowiednio 306% i 111%. Taka tendencja jest charakterystyczna dla rozplatania podwójnej helisy DNA i uwalniania z jej wnętrza kolejnych zasad azotowych, dzięki czemu mają one ułatwiony dostęp do elektrody.

Pod wpływem DOX i jej pochodnych w nieco inny sposób zmienia się sygnał utlenienia adeniny zawartej w $d(\text{AT})_4$. Co prawda tutaj również już przy mikromolowych stężeniach antracyklin następuje spadek wysokości piku A (najniższe wartości $S(\%)$ to 29% dla DOX, 21% dla DOX-Fmor oraz 37% dla DOX-Fhex) (wstawienie na RYS. 193B), lecz dalsze zwiększanie ich ilości w układzie nie prowadzi do wzrostu $S(\%)$ powyżej 100%. W przypadku związku macierzystego powyżej stężenia $10\ \mu\text{M}$ procentowy sygnał analityczny zaczyna stopniowo rosnąć (RYS. 193B), co może świadczyć o rozplataniu helisy. Efekt ten nie odznacza się jednak dużą intensywnością. DOX-Fmor z kolei nie prowadzi już do dalszego pogłębienia redukcji sygnału utlenienia A, a $S(\%)$ stabilizuje się na poziomie 20%. Wskazuje to, iż przy stężeniu $10\ \mu\text{M}$ następuje wysycenie helisy molekułami formamidynoantracykliny i zwiększenie ich ilości nie wpływa już na procesy redoks DNA. W obecności DOX-Fhex wartość $S(\%)$ zaczyna rosnąć już powyżej stężenia $1\ \mu\text{M}$, po czym od stężenia $10\ \mu\text{M}$ waha się na poziomie 60–80%. Efekt ten można wytłumaczyć w analogiczny sposób jak w przypadku guaniny w obecności DOX.



RYS. 193 - Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny zawartej w $d(\text{GC})_4$, B – adeniny zawartej w $d(\text{AT})_4$ w zależności od stężenia doksorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.

Jak widać, doksorubicyna i jej dwie pochodne formamidynowe oddziałują z oligonukleotydami, lecz ze względu na różną naturę tych interakcji często trudno je porównać i uporządkować według wzrastającej siły wiązania z $d(\text{GC})_4$ i $d(\text{AT})_4$. Z całą pewnością można jednak stwierdzić, że najsilniejsze powinowactwo wobec obu rodzajów DNA wykazuje pochodna doksorubicyny zawierająca pierścień morfolinowy. Sposób oddziaływania DOX, DOX-Fmor i DOX-Fhex z DNA silnie determinowany jest strukturą i stężeniem ligandów oraz sekwencją nukleotydową kwasu.

4.4.3.1.3. Wnioski

Seria przeprowadzonych i opisanych powyżej badań jednoznacznie pokazuje, iż daunorubicyna, doksorubicyna oraz ich formamidynowe pochodne oddziałują zarówno z DNA chromosomalnym, jak i oligonukleotydami. Na podstawie wywoływanych przez nie zmian sygnałów utlenienia zasad azotowych widać, jak różnorodna jest natura tych interakcji. Uzyskane wyniki eksperymentalne wskazują, iż ich mechanizm zależy głównie od trzech czynników: sekwencji nukleotydowej DNA, struktury oddziałującej z nim antracykliny oraz jej stężenia (Tabela 36).

TABELA 36 – Wpływ daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych na sygnały utlenienia guaniny i adeniny zawartej w różnych rodzajach DNA zależnie od zakresu stężenia antracyklin.

Stężenia antracyklin	Efekt wywołany przez wzrastającą ilość danej antracykliny na wartość S(%) danej zasady azotowej	DAU	DAU-Fmor	DAU-Fhex	DOX	DOX-Fmor	DOX-Fhex	
zakres mikromolowy	stopniowy spadek S(%)	G	dsDNA-ct d(GC) ₄	dsDNA-ct d(GC) ₄	dsDNA-ss dsDNA-ct d(GC) ₄	—	—	d(GC) ₄
		A	d(AT) ₄ (A) ₈	—	dsDNA-ct	d(AT) ₄	d(AT) ₄	—
	gwałtowny spadek S(%)	G	—	dsDNA-ss	—	d(GC) ₄	d(GC) ₄	—
		A	—	dsDNA-ss dsDNA-ct d(AT) ₄	d(AT) ₄	—	—	d(AT) ₄
zakres milimolowy	dalszy stopniowy spadek S(%)	G	d(GC) ₄	—	—	—	—	—
		A	—	—	—	—	—	—
	stabilizacja S(%) na danym poziomie	G	dsDNA-ct	dsDNA-ss dsDNA-ct d(GC) ₄	dsDNA-ct d(GC) ₄	—	—	—
		A	dsDNA-ct	dsDNA-ss	dsDNA-ct	—	d(AT) ₄	—
	nagły wzrost S(%), bez przekroczenia granicy 100%, zakończony stabilizacją sygnału na danym poziomie	G	—	—	dsDNA-ss	d(GC) ₄	—	—
		A	(A) ₈	—	—	—	—	d(AT) ₄
	nagły wzrost S(%), zwykle powyżej 100%, bez stabilizacji na danym poziomie	G	dsDNA-ss	—	—	—	d(GC) ₄	d(GC) ₄
		A	dsDNA-ss d(AT) ₄	dsDNA-ct d(AT) ₄	d(AT) ₄	d(AT) ₄	—	—
	uszkodzenia oksydacyjne	A	d(AT) ₄ (A) ₈	d(AT) ₄	d(AT) ₄	d(AT) ₄	d(AT) ₄	d(AT) ₄

Zależność sposobu interakcji od ułożenia kolejnych nukleotydów w łańcuchu kwasu ujawniła się już podczas użycia DNA chromosomalnego jako warstwy receptorowej bioczułnika. Choć sekwencje dwóch zastosowanych rodzajów dsDNA – ze spermy łososia i z grasicy cielęcej –

nie były znane, to z pewnością różniły się od siebie. Wpływ danej antracykliny na sygnał utlenienia guaniny lub adeniny zawartej w dsDNA-ss i dsDNA-ct był odmienny, co świadczy o innym sposobie jej oddziaływania z każdym z DNA. Gdyby natura tych interakcji była podobna, to kształt zależności procentowej zmiany wysokości sygnału utlenienia danej zasady azotowej od stężenia określonej antracykliny byłby zbliżony dla obu rodzajów kwasu nukleinowego. Tymczasem jej przebieg zwykle jest diametralnie różny, jak na przykład w przypadku utleniania guaniny w obecności DAU (niebieskie krzywe na: *RYS. 180A* vs. *RYS. 184A*), czy adeniny w obecności DAU-Fmor (czerwone krzywe na: *RYS. 180B* vs. *RYS. 184B*). O wpływie sekwencji DNA na naturę jego oddziaływań z antracyklinami świadczy już sam fakt ich różnego powinowactwa do guaniny i adeniny. Efekt ten można zauważyć dla DNA chromosomalnego, przykładowo podczas oddziaływania dsDNA-ss z DAU-Fhex (*RYS. 179*) czy dsDNA-ct z DAU-Fmor (*RYS. 182*), lecz jest jeszcze lepiej widoczny, gdy na elektrodzie osadzone są krótkie oligonukleotydy o różnych sekwencjach. Tutaj oba łańcuchy DNA zawierają jedynie po dwie z czterech zasad nukleinowych – guaninę i cytozynę w przypadku d(GC)₄ lub adeninę i tyminę w przypadku d(AT)₄, więc automatycznie oddziaływania ograniczone są tylko do nich. Co ciekawe, różnice w ich naturze, wynikające z obecności w niciach DNA guaniny lub adeniny, widoczne są dla każdej analizowanej antracykliny (*RYS. 189A* vs. *RYS. 189B* dla DAU i jej pochodnych oraz *RYS. 193A* vs. *RYS. 193B* dla DOX i jej pochodnych). Jest to bardzo istotne spostrzeżenie, gdyż projektując eksperyment, można tak dobrać sekwencję DNA, by była ona charakterystyczna dla określonego typu komórek nowotworowych, i w ten sposób zbadać powinowactwo danej antracykliny, jej pochodnej, a idąc dalej każdej innej substancji o domniemanym działaniu antynowotworowym, do takiego fragmentu DNA. Jeśli pod jej wpływem następuje znacząca zmiana sygnałów utlenienia zasad azotowych, a tym samym dana substancja wykazuje powinowactwo do zastosowanego kwasu nukleinowego, może wskazywać to na jej aktywność chemioterapeutyczną, o ile mechanizm jej działania antynowotworowego opiera się na bezpośrednim oddziaływaniu z DNA.

Kolejnym czynnikiem, odgrywającym ważną rolę w sposobie oddziaływania antracyklin z DNA, jest ich struktura i wprowadzone w niej modyfikacje. Zagadnienie to stanowiło jednocześnie podstawowy temat tej części moich badań eksperymentalnych. Analizowane przeze mnie pochodne różniły się od związków macierzystych obecnością układu aminy cyklicznej w części daunozaminowej, co jak pokazują uzyskane wyniki, miało ogromny wpływ zarówno na stopień ich powinowactwa do łańcuchów kwasu nukleinowego, jak i na naturę występujących pomiędzy nimi oddziaływań. Jak wiadomo, grupa aminowa przy węglu C3' części daunozaminy w cząsteczkach antracyklin odgrywa kluczową rolę w procesie ich wiązania z helisą kwasu deoksyrybonukleinowego. W związku z tym zastąpienie jej ugrupowaniem formamidynowym, zawierającym resztę cyklicznej aminy o pierścieniu sześcioczłonowym (pochodne Fmor) lub siedmioczłonowym (pochodne Fhex), wywiera ogromny wpływ na ilość i rodzaj połączeń, które mogą zostać utworzone pomiędzy daną molekułą ligandu a nicią DNA. Obrazem tego są powodowane przez poszczególne substancje zmiany w sygnałach utlenienia guaniny i adeniny. Czasem wskazują one, iż obecność reszty aminy cyklicznej w strukturze danej antracykliny wywołuje wpływ jedynie na wielkość procentowego sygnału analitycznego, a kształt jego zależności od stężenia ligandu pozostaje prawie niezmienny w porównaniu ze związkiem macierzystym. Sytuacja taka miała miejsce w przypadku badania oddziaływania DAU i jej pochodnych z oligonukleotydami (*RYS. 189*) oraz z dsDNA-ct, ale tylko dla guaniny (*RYS. 184A*). Na jej podstawie można stwierdzić, iż powinowactwo tych substancji do tych rodzajów DNA wzrasta według następującego porządku: DAU < DAU-Fhex < DAU-Fmor. W niewielkim stopniu jest on zaburzony jedynie w stosunku do d(GC)₄, gdyż przy mikromolowych stężeniach formamidynopochodnych minimalnie większy wpływ na sygnał utlenienia guaniny wywołuje DAU-Fhex. Warto też zwrócić uwagę, iż w większości przypadków pochodne wywołują maksymalną zmianę sygnałów utlenienia zasad azotowych przy niższym stężeniu niż związki macierzyste, co w odniesieniu do zastosowania chemioterapeutycznego może oznaczać możliwość

stosowania mniejszych dawek o porównywalnej lub większej aktywności antynowotworowej. Jednocześnie mniejsza ilość antracykliny wprowadzanej do organizmu ograniczałaby jej działanie toksyczne, a tym samym wywoływane przez nią skutki uboczne. Uszeregowanie analizowanych związków zgodnie ze wzrostem siły ich interakcji z DNA jest poważnie utrudnione, gdy modyfikacja części daunozaminowej powoduje zmianę ich mechanizmu. Wówczas krzywa zależności $S(\%)$ od stężenia ligandu dla danej zasady azotowej DNA może przyjmować zupełnie inny kształt. Dzieje się tak na przykład przy oddziaływaniu daunorubicyny i jej pochodnych z dsDNA-ss (RYS. 180), czy doksorubicyny i jej pochodnych z oligonukleotydami (RYS. 193). W pierwszym przypadku kształt analizowanych krzywych sugeruje rozplatanie podwójnej helisy pod wpływem DAU, blokowanie procesów redoks zasad azotowych przez DAU-Fmor na skutek jego interkalacji do łańcuchów DNA i tworzenia z nimi wiązań wodorowych i/lub kowalencyjnych oraz ograniczenie możliwości specyficznego wiązania DAU-Fhex z kwasem w wyniku intensyfikacji oddziaływań elektrostatycznych przy wyższych stężeniach. Tak duże zróżnicowanie mechanizmów oddziaływania DAU, DOX i ich pochodnych z różnymi rodzajami DNA wynika ze struktury podstawnika przy węglu C3' daunozaminy, jego wielkości i potencjału do tworzenia wiązań wodorowych i kowalencyjnych z helisą. Jak wiadomo, w związkach macierzystych w pozycji tej znajduje się grupa aminowa, która pomimo niewielkich rozmiarów może tworzyć wiązania wodorowe w małym rowku. Sytuacja wygląda zupełnie inaczej w przypadku pochodnych, w których została ona zastąpiona dużo większymi ugrupowaniami formamidynowymi podstawionymi układami reszt amin cyklicznych – morfolinowym (Fmor), zawierającym w pierścieniu atom tlenu, który potencjalnie stanowi nowe centrum do utworzenia połączeń wodorowych, oraz heksametyleiminowym (Fhex), zawierającym w pierścieniu grupy metylenowe, niewykazujące tego typu aktywności. Tego typu różnice determinują przestrzenne ułożenie molekuł antracyklin względem helisy DNA oraz tworzone z nią wiązania.

Istotnym czynnikiem, który wpływa na sposób oddziaływania DNA z daunorubicyną, doksorubicyną i ich pochodnymi jest także ich stężenie. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że w wielu przypadkach trend zmiany sygnałów utlenienia zasad azotowych wywołanych tymi interakcjami, a tym samym ich mechanizm, ulegał zmianie wraz ze wzrostem stężenia danej antracykliny w układzie (Tabela 36). Zwykle przy najmniejszych stężeniach mikromolowych antracyklin następowało obniżenie prądów utlenienia guaniny i adeniny, będące następstwem tworzenia wiązań wodorowych i/lub kowalencyjnych pomiędzy DNA a ligandem. Zależnie od rodzaju antracyklin spadek ten bywał stopniowy, jak na przykład dla oligonukleotydów w obecności DOX-Fhex (RYS. 192) czy dla dsDNA-ct w obecności DAU-Fhex (RYS. 183), lub gwałtowny, jak przykładowo dla $d(GC)_4$ w obecności DOX-Fmor (RYS. 191) czy dla dsDNA-ss w obecności DAU-Fmor (RYS. 178). Przy wyższych stężeniach antracyklin zmiana intensywności sygnałów utlenienia zasad azotowych była już bardziej zróżnicowana. W najprostszym przypadku ulegały one stabilizacji na danym poziomie, do którego zostały obniżone w pierwszej fazie (np. dla dsDNA-ss w obecności DAU-Fmor (RYS. 178) czy dla $d(AT)_4$ w obecności DOX-Fmor (RYS. 191)). Oznaczało to, że już przy minimalnej ilości danej antracykliny w układzie jej molekuly wiązały się silnie z łańcuchami DNA, zajmując wszystkie pozycje dostępne dla interakcji specyficznych, a dalsze zwiększanie ich zawartości w układzie nie miało już wpływu na procesy redoks kwasu nukleinowego. Sytuacja była nieco bardziej skomplikowana, gdy po początkowym spadku sygnału utlenienia guaniny lub adeniny następował jego nagły wzrost w wyniku wzrostu stężenia antracykliny, a następnie stabilizacja na określonym poziomie, niższym niż dla ślepej próby (np. dla G zawartej w dsDNA-ss w obecności DAU-Fhex (RYS. 179) czy dla $d(AT)_4$ w obecności DOX-Fhex (RYS. 192)). Interpretacja takiego przebiegu krzywej zależności $S(\%)$ od stężenia danej antracykliny nie jest już tak oczywista. Można przypuszczać, iż przy wyższych stężeniach antracykliny zaczyna dominować niespecyficzne przyciąganie elektrostatyczne jej dodatnio naładowanych molekuł przez ujemnie naładowany szkielet cukrowo-fosforanowy DNA, co znacząco utrudnia jej dostęp do miejsc oddziaływania specyficznego we wnętrzu helisy. Takie zachowanie było już obserwowane

między innymi w przypadku błękitu metylenowego [265, 277]. Jednak najbardziej zaskakujące zmiany sygnałów utlenienia zasad azotowych, będące następstwem wzrostu stężenia antracyklin do wartości milimolowych, polegały na ich gwałtownym wzroście, przekraczającym zwykle prądy zarejestrowane dla ślepej próby (np. dla $d(AT)_4$ w obecności DAU i jej obu pochodnych (*RYS. 189B*) czy dla $d(GC)_4$ w obecności DOX-Fmor (*RYS. 191*) i DOX-Fhex (*RYS. 192*)). Pamiętając, że podczas ślepej próby utlenieniu nie ulegają wszystkie zasady azotowe zawarte w danym DNA, a jedynie dostępne dla tego procesu w warunkach pomiarowych, można wnioskować, iż w wyniku oddziaływania z niektórymi antracyklinami zwiększa się ich dostępność. Taki skutek może być wywołany przez zrywanie wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami w helisie i w konsekwencji jej rozplatanie. Wydaje się to wielce prawdopodobne, gdyż wiązanie molekuł antracyklin z helisą DNA z pewnością prowadzi do jej deformacji i wielu naprężeń w jej strukturze, które mogą prowadzić do rozparowywania zasad i zwiększania ich dostępności w procesie elektrotlenienia. Niewykluczone jest również, że milimolowe stężenia analizowanych antracyklin mogą powodować oksydacyjne uszkodzenia kwasu deoksyrybonukleinowego, a konkretnie adeniny. Świadczy o tym pojawienie się na woltamperogramach, zarejestrowanych w ich obecności dla $d(AT)_4$ i $(A)_8$, dodatkowego pikę, mogącego odpowiadać utlenianiu 2-oxoA (*RYS. 176*). Jak widać, natura oddziaływań daunorubicyny, dokсорubicyny i ich formamidynowych pochodnych z DNA bywa bardzo zróżnicowana, szczególnie przy ich wyższych stężeniach. Jednak z punktu widzenia ich zastosowania farmakologicznego najistotniejszy wydaje się być wpływ na DNA ich najniższych stężeń, ponieważ stężenie w osoczu antracyklin stosowanych w terapii antynowotworowej wynosi zaledwie 0,1–5 μM [307]. Jak pokazują wyniki przeprowadzonych badań, przy stężeniach mikromolowych analizowane antracykliny oddziałują z DNA w dość jednorodny sposób.

Ze względu na duże zróżnicowanie interakcji występujących pomiędzy poszczególnymi antracyklinami a różnymi rodzajami DNA, trudno jest jednoznacznie uszeregować je w kolejności wzrastającego powinowactwa do kwasu nukleinowego. Rysuje się jednak ogólny wniosek, iż pochodne wykazują większą aktywność w stosunku do DNA niż związki macierzyste, a w większości przypadków obecność układu morfolinowego warunkuje najsilniejsze interakcje. Wnioski te pokrywają się z wynikami przeprowadzonych wcześniej badań biologicznych, które wykazały między innymi, iż: obecność pierścienia morfolinowego w cząsteczce antracykliny gwarantuje najsilniejszą aktywność antyproliferacyjną [353, 355], spośród wszystkich substancji DOX-Fmor charakteryzuje się najlepszymi właściwościami antynowotworowymi [355], a DAU-Fmor najłatwiej wnika do komórek L1210 [352].

Zgodność wyników przeprowadzonych wcześniej badań biologicznych z przeprowadzonymi przeze mnie badaniami elektrochemicznymi jest ważnym osiągnięciem. Sugeruje bowiem, że proste pomiary wykonane za pomocą elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA, skonstruowanych na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej są skutecznym narzędziem w analizie interakcji DNA z substancjami o działaniu antynowotworowym i mogą być źródłem szerokiej wiedzy na ten temat. Biorąc pod uwagę fakt, iż te oddziaływania mają miejsce na powierzchni elektrody, z powodzeniem można je przyrównać do analogicznych procesów zachodzących *in vivo*. Podczas tworzenia kompleksu DNA z cząsteczką leku w komórce łańcuchy kwasu znajdują się w pobliżu obdarzonych ładunkiem warstw fosfolipidowych i białek, co można porównać do ich unieruchomienia na powierzchni czujnika [90, 169, 376, 384]. Tego typu bioczuJNIKI mogą stanowić narzędzie przesiewowe, pozwalające już na wstępnych etapach badań wskazać, które związki z serii nowych pochodnych chemioterapeutyków wykazują najsilniejsze powinowactwo do DNA. Taka procedura pozwoliłaby ograniczyć skomplikowane i kosztowne testy biologiczne jedynie do związków wytypowanych podczas wstępnej selekcji za pomocą bioczuJNIKÓW DNA. Być może w obecnym poszukiwaniu coraz doskonalszych metod pomiarowych i konstruowaniu coraz bardziej skomplikowanych układów warto także pamiętać o prostych, tanich i łatwo dostępnych narzędziach analitycznych, które mogą dostarczyć naprawdę szerokiej gamy informacji i być wstępem do dalszych, bardziej kosztownych badań.

4.4.3.2. Spektrofotometryczne badanie oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych z DNA

Mimo iż analiza elektrochemiczna dostarczyła bardzo szerokiej wiedzy na temat oddziaływań daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych z różnymi rodzajami DNA, to zbadane zostały one także przy wykorzystaniu innej techniki pomiarowej, a mianowicie spektrofotometrii UV-Vis. Wybór padł akurat na tę metodę ze względu na jej prostotę i łatwość przeprowadzenia eksperymentów oraz fakt, iż w wyniku utworzenia kompleksów interkalacyjnych DAU i DOX z DNA oraz nakładania się chmur elektronowych sparowanych zasad nukleinowych i aglikonu absorpcja promieniowania przez antracykliny zostaje obniżona [330, 333, 343]. Jak pokazały wcześniejsze eksperymenty (rozdział II.4.4.1), ich formamidynowa modyfikacja w części daunoaminowej nie powoduje znaczących zmian ich absorbancji, ale w ogromnym stopniu wpływa na sposób ich oddziaływania z kwasem deoksyrybonukleinowym, a to może skutkować również zmianami w nałożeniu wspomnianych powyżej chmur elektronowych, co nie jest już bez znaczenia dla wyglądu ich widm absorpcji promieniowania UV-Vis. Dlatego też w tej części doświadczeń zbadano, jaki wpływ na absorbancję DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych wywierają różne stężenia oligonukleotydów, a następnie na tej podstawie podjęto próbę oceny stopnia ich wzajemnego powinowactwa.

4.4.3.2.1. Procedura pomiarowa

Badaniom spektrofotometrycznym poddanych zostało sześć antracyklin: związki macierzyste – DAU i DOX, pochodne zawierające układ morfolinowy – DAU-Fmor i DOX-Fmor oraz pochodne zawierające układ heksametylenoiminowy – DAU-Fhex i DOX-Fhex, a także dwa rodzaje oligonukleotydów: d(GC)₄ i d(AT)₄. Analizowane były kolejno mieszaniny poszczególnych antracyklin o stałym stężeniu 10 μM i DNA o wzrastającym stężeniu (od 5 do 20 ppm), sporządzone w mieszaninie wody i AcB-K w stosunku 1:1 oraz roztwory samych antracyklin sporządzone w tym samym rozpuszczalniku, stanowiące ślepą próbę. Roztwory pomiarowe o objętości 3 ml były sporządzane w kuwecie plastikowej bezpośrednio przed każdym pomiarem. Polegało to na wymieszaniu w odpowiednich proporcjach przygotowanego wcześniej w wodzie roztworu wyjściowego danej antracykliny o stężeniu 1 mM, wodnego roztworu danych oligonukleotydów o stężeniu 492 ppm, wody oraz AcB-K. Sposób przygotowania poszczególnych mieszanin przedstawia poniższa tabela (Tabela 37).

TABELA 37 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów pomiarowych, stanowiących mieszaniny poszczególnych antracyklin i oligonukleotydów.

Skład roztworu pomiarowego		Objętość 1 mM roztworu danej antracykliny [ml]	Objętość roztworu d(GC) ₄ lub d(AT) ₄ o stężeniu 492 ppm [ml]	Objętość wody [ml]	Objętość AcB-K [ml]
Stężenie antracykliny [μM]	Stężenie DNA [ppm]				
10	0	0,03	0	1,497	1,5
10	5	0,03	0,0305	1,4395	1,5
10	10	0,03	0,0610	1,4090	1,5
10	20	0,03	0,1220	1,3480	1,5

Procedura spektrofotometrycznego badania wpływu oligonukleotydów na widma absorpcji poszczególnych antracyklin była powtarzana kolejno dla wszystkich czterech roztworów pomiarowych. Rozpoczynała się od umieszczenia w celce pomiarowej kuwety z mieszaniną wody i buforu octanowego w stosunku 1:1 (1,5 ml H₂O + 1,5 ml AcB-K) oraz zarejestrowania jej widma,

które stanowiło tło i było automatycznie odejmowane od rejestrowanych następnie widm właściwych. W kolejnym kroku w celce pomiarowej umieszczana była kuweta z roztworem samej antracykliny (ślepa próba) lub z jej mieszaniną z oligonukleotydami i następowała rejestracja 13 widm adsorpcyjnych przez 1 godzinę w 5-minutowych odstępach czasu. Pomiar prowadzone były zgodnie z następującymi parametrami:

- zakres długości fali: 400–600 nm
- interwał: 1,0 nm
- prędkość zmiany długości fali: 480 nm/min
- ilość cykli: 13
- czas cyklu pomiarowego: 300 s

Wybór zakresu długości fali podyktowany był przede wszystkim względami praktycznymi i ułatwieniem interpretacji uzyskanych wyników. Mimo iż najwyższe pasma absorpcji promieniowania antracyklin przypadają w zakresie długości fali 220–230 nm, zdecydowano się na monitorowanie pasm w zakresie 400–570 nm. Miało to na celu uniknięcie ich nakładania się z sygnałami DNA, który absorbuje promieniowanie w zakresie fali 240–300 nm. Brak absorpcji promieniowania przez używane oligonukleotydy przy długości fali z zakresu 400–570 nm został potwierdzony w osobnym eksperymencie.

Porównanie widm zarejestrowanych dla mieszanin danej antracykliny i oligonukleotydów o wzrastającym stężeniu z widmami zarejestrowanym dla samej antracykliny podczas ślepej próby ukazywało, jakie zmiany w jej absorpcji promieniowania wywoływała obecność kwasu nukleinowego. Na podstawie najintensywniejszego pasma absorbancji przy długości fali około 497 nm wyznaczony został sygnał analityczny, określający jego procentową zmianę w zależności od zawartości DNA w układzie. Był on zdefiniowany jako wyrażony w procentach stosunek absorbancji danej antracykliny w obecności określonego stężenia oligonukleotydów do jej absorbancji w roztworze samego rozpuszczalnika, czyli podczas ślepej próby. Opisuje go poniższe równanie (9):

$$A(\%) = \frac{A_{interakcja}}{A_{blank}} \cdot 100\% \quad (9)$$

w którym:

$A(\%)$ – sygnał analityczny

$A_{interakcja}$ – absorbancja danej antracykliny po oddziaływaniu z oligonukleotydami

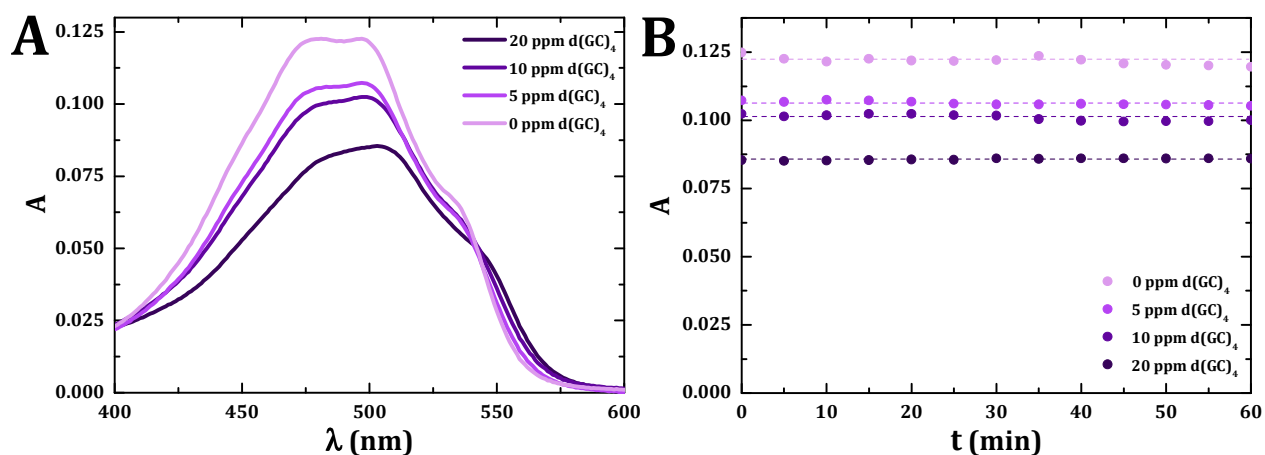
A_{blank} – absorbancja danej antracykliny podczas ślepej próby

Określony w ten sposób sygnał analityczny pokazuje, jak bardzo spada natężenie promieniowania absorbowanego przez antracykliny po ich oddziaływaniu z DNA, co daje podstawy do oceny powinowactwa tych substancji do siebie. Sygnał równy 100% odpowiada absorbancji danej antracykliny pod nieobecność DNA, czyli podczas ślepej próby. Jeśli po dodatku kwasu nukleinowego do układu jego wartość nie zmienia się znacząco, to może świadczyć to o braku interakcji między tymi substancjami lub o utworzeniu pomiędzy nimi jedynie takiego kompleksu, który nie wpływa na właściwości absorpcyjne antracykliny, a tym samym nie powoduje deformacji chmur elektronowych aglikonu. Spadek wartości $A(\%)$ poniżej 100% wskazuje na występowanie oddziaływań, w szczególności interkalacji.

4.4.3.2.2. Wyniki

Kształt widm absorpcji promieniowania UV-Vis przez daunorubicynę, doksorubicynę i ich pochodne przy długość fali 400–600 nm został już zbadany (rozdział II.4.4.1) i wiadomo, że niezależnie od modyfikacji ich cząsteczek wykazują one w tym zakresie trzy pasma absorpcji, których maksima przypadają na około 480 nm, 497 nm i 533 nm. Zważywszy, że drugie z nich

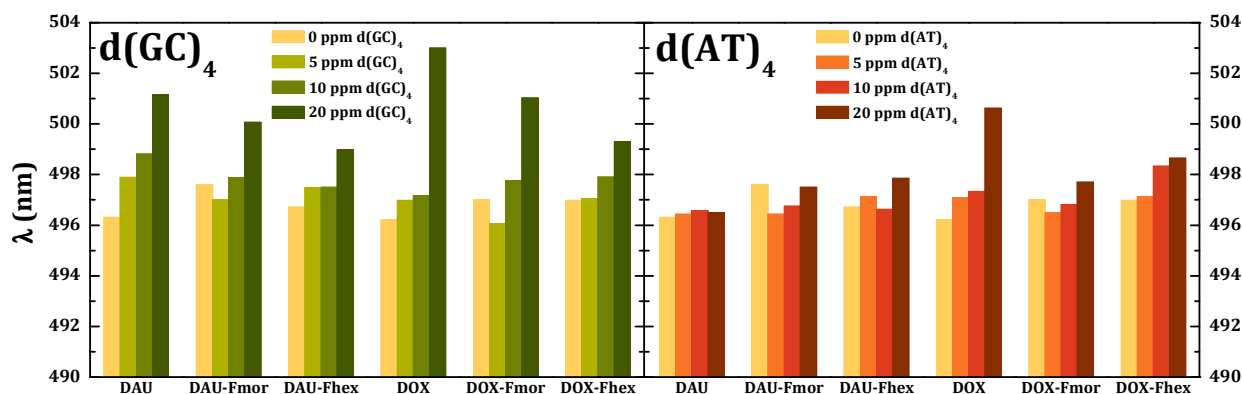
charakteryzuje się największą intensywnością, w głównej mierze jego zmiany wywołane przez oligonukleotydy były analizowane. Obecność DNA w układzie nie powodowała pojawienia się dodatkowych pasm absorpcji, ale zmieniała kształt widm antracyklin, powodując zmianę intensywności sygnałów i ich położenie na osi długości fali (RYS. 194A). Każda mieszanina zawierająca antracyklinę o stężeniu 10 μM oraz określoną ilość oligonukleotydów analizowana była przez 1 godzinę. Porównując widma rejestrowane w tym czasie co 5 minut, nie dostrzeżono większych różnic między nimi. Intensywność poszczególnych pasm absorpcji pozostawała praktycznie niezmienna, o czym świadczą przerywane linie proste, równoległe do osi odciętych, wykreślone przykładowo dla absorbancji układu DOX i $d(\text{GC})_4$ przy długości fali 496 nm na RYS. 194B. W niektórych przypadkach niewielkie wahania sygnałów pojawiały się na samym początku pomiaru, lecz po upływie 10 minut układ stabilizował się. Z tego też powodu dalsza interpretacja wyników została oparta na widmach zarejestrowanych po upływie 15 minut.



RYS. 194 – A – Widma UV-Vis, B – zmiana absorbancji w czasie 60 minut przy długości fali 496 nm mieszaniny 10 μM doksorubicyny i różnych stężeń $d(\text{GC})_4$ w AcB-K- H_2O (1:1) zarejestrowane po 15 minutach od zmieszania składników.

Oligonukleotydy w znaczący sposób wpływają na zmiany wyglądu widm absorpcji promieniowania UV-Vis antracyklin. Wywołują one efekt batochromowy i hipochromowy, którego natężenie zależy od ich stężenia i sekwencji (RYS. 194A). Analizując wywołane obecnością DNA zmiany długości fali, przy których pojawiały się maksima absorpcji antracyklin, skupiono się na paśmie przy około 497 nm. Ogólnie rzecz ujmując, w obecności oligonukleotydów ulegało ono przesunięciu w stronę dłuższych fali, a wraz ze wzrostem ich stężenia długość fali także rosła (RYS. 195). Dla wszystkich antracyklin efekt ten był dużo silniejszy w obecności $d(\text{GC})_4$ niż $d(\text{AT})_4$. Przesunięcie maksimum absorpcji antracyklin było konsekwencją ich interakcji z łańcuchami DNA, a występujący tu efekt batochromowy jest charakterystyczny dla interkalacji [211, 333, 483]. Jak już zostało pokazane, wprowadzenie ugrupowania formamidynowego zawierającego resztę aminy cyklicznej do struktury DAU czy DOX determinuje sposób ich oddziaływania z kwasem deoksyrybonukleinowym. Tym samym taka modyfikacja wywiera ogromny wpływ na zmiany widma absorpcyjnego danej antracykliny wywołane obecnością DNA. W przypadku oddziaływania antracyklin z $d(\text{GC})_4$ najsilniejsze przesunięcie maksimum absorpcji w stronę dłuższych fali występowało dla DOX (o blisko 7 nm) przy najwyższym stężeniu DNA. Nieco mniejsza zmiana miała miejsca dla DAU (blisko o 5 nm) i DOX-Fmor (o 4 nm). Pasma pozostałych antracyklin przesunęły się o nieco ponad 2 nm. Warto zwrócić także uwagę, że w większości przypadków przesunięcie widm nie następowało stopniowo wraz ze wzrostem stężenia DNA (wyjątek stanowiła daunorubicyna). Było ono nieznaczne dla stężenia 5 i 10 ppm, a dopiero przy 20 ppm następowała gwałtowna zmiana długości fali maksimum absorpcji. Sugeruje to, iż przy niższych stężeniach DNA układ zawiera zbyt małą ilość jego cząsteczek, by oddziałując z antracyklinami, mogły one

w znaczący sposób zaburzyć ich absorpcję promieniowania. Sytuacja wyglądała zupełnie inaczej, gdy w mieszaninie obecny był $d(AT)_4$. Tutaj jedynie dla DOX następowało znaczne przesunięcie widma (prawie o 4,5 nm) przy 20 ppm stężeniu DNA. Dla pozostałych substancji zmiany te są bardzo niewielkie (poniżej 2 nm dla DOX-Fhex) lub nie występują w ogóle. Taki wynik nie musi oznaczać od razu braku interakcji pomiędzy molekułami DNA i antracyklin, a może wskazywać na dominację innego niż interkalacja mechanizmu oddziaływania, który nie powoduje istotnych zmian w chmurach elektronowych komplementarnych zasad.



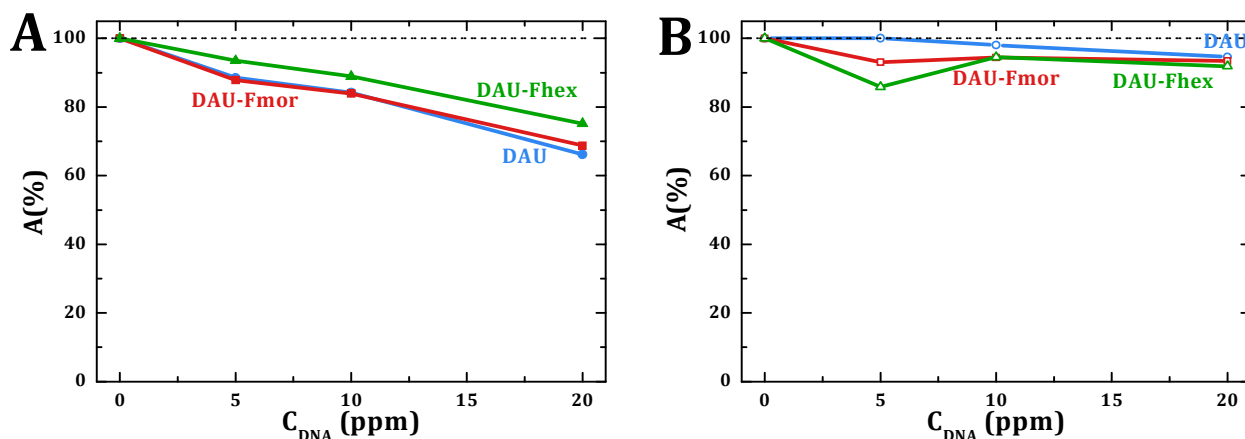
RYS. 195 – Zmiany długości fali maksimum absorpcji daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych przy ok. 497 nm, wywołane różnymi stężeniami $d(GC)_4$ i $d(AT)_4$.

Informacji na temat oddziaływań antracyklin z oligonukleotydami może dostarczyć także analiza efektu hipochromowego wywoływanego przez DNA. W przypadku daunorubicyny i jej pochodnych zarówno w obecności $d(GC)_4$, jak i $d(AT)_4$ następuje obniżenie intensywności pasm absorpcji (Tabela 38). W wyniku interakcji antracyklin z łańcuchami DNA zawierającymi guaninę i cytozynę następował stopniowy spadek absorpcji wraz ze wzrostem stężenia kwasu (RYS. 196). Najślabszy efekt występował dla DAU-Fhex i przy 20 ppm stężeniu $d(GC)_4$ sygnał był obniżony o 25% w stosunku do ślepej próby (RYS. 196A). Daunorubicyna oraz pochodna z układem morfolinowym wykazywały praktycznie identyczny przebieg zależności $A(\%)$ od stężenia oligonukleotydów, co może świadczyć o podobnej naturze ich oddziaływania z łańcuchami kwasu. Tutaj przy najwyższym stężeniu $d(GC)_4$ procentowa zmiana absorpcji spadała poniżej 70%. Zupełnie innym przebiegiem charakteryzowały się zależności dla $d(AT)_4$, gdzie absorpcja nie malała proporcjonalnie do stężenia DNA (RYS. 196B). W przypadku DAU i obu pochodnych zmiana intensywności absorpcji była nieznaczna i $A(\%)$ nie spadało poniżej 90% (wyjątek stanowił sygnał DAU-Fhex w obecności 5 ppm oligonukleotydów, gdzie sygnał procentowy wynosił 86%). Tak niewielkie zmiany absorpcji mogą sugerować znikomy udział interkalacji w mechanizmie tworzenia ich kompleksu z $d(AT)_4$.

TABELA 38 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

Stężenie $d(GC)_4$ [ppm]	A(%) DAU [%]	A(%) DAU-Fmor [%]	A(%) DAU-Fhex [%]
20	66,2	68,8	75,2
10	84,3	84,0	88,9
5	88,6	87,8	93,5
0	100	100	100

Stężenie $d(AT)_4$ [ppm]	A(%) DAU [%]	A(%) DAU-Fmor [%]	A(%) DAU-Fhex [%]
20	94,6	93,5	91,9
10	98,1	94,4	94,6
5	100,1	93,1	85,9
0	100	100	100



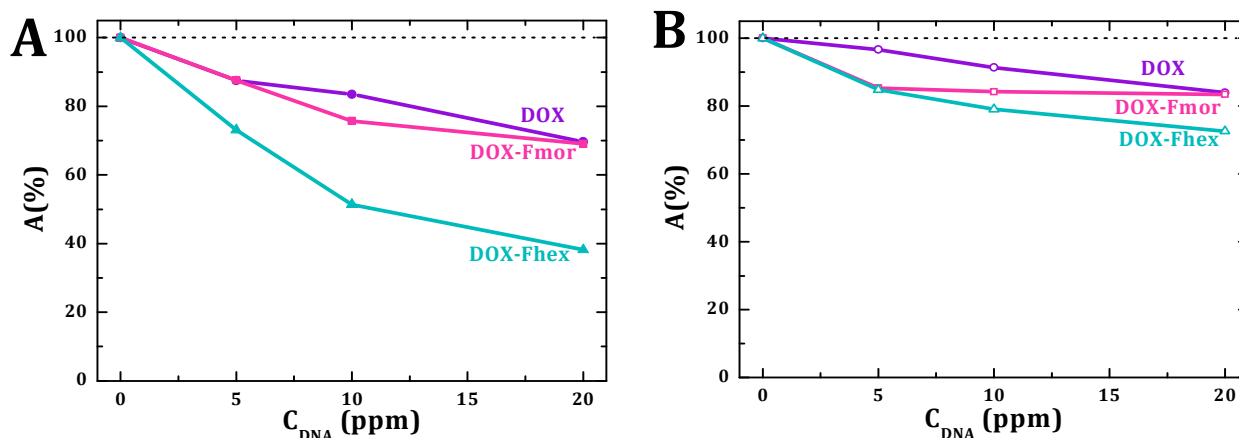
RYS. 196 – Procentowa zmiana absorbancji daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych wywołana wzrastającym stężeniem: A – $d(GC)_4$, B – $d(AT)_4$. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

Obecność oligonukleotydów wywierała większy wpływ na zmiany w intensywności absorpcji promieniowania UV-Vis w przypadku doksorubicyny i jej pochodnych (Tabela 39), powodując podobnie jak poprzednio spadek absorbancji (RYS. 197). Na skutek oddziaływania z $d(GC)_4$ procentowa zmiana absorbancji antracyklin obniżała się stopniowo wraz ze wzrostem stężenia DNA (RYS. 197A). Efekt dla DOX i DOX-Fmor był porównywalny i $A(\%)$ obu substancji spadało poniżej 70% przy najwyższym przebadanym stężeniu oligonukleotydów. Najsilniejsza redukcja absorpcji promieniowania występowała w przypadku DOX-Fhex. Tutaj już przy stężeniu 10 ppm $d(GC)_4$ procentowa zmiana absorbancji stanowiła zaledwie połowę wartości zarejestrowanej dla ślepej próby, a przy stężeniu 20 ppm spadała poniżej 40%. Taki przebieg zależności sugeruje bardzo silną interkalację molekuł DOX-Fhex do helisy DNA. Słabsze efekty obserwowane były w obecności $d(AT)_4$ (RYS. 197B). Najmniejszy wpływ wywarły one na absorpcję promieniowania przez związek macierzysty, którego absorbancja przy stężeniu DNA 20 ppm uległa obniżeniu o około 16% w porównaniu ze ślepą próbą. DOX-Fmor z kolei już przy stężeniu $d(AT)_4$ 5 ppm absorbowała o 15% mniej promieniowania i absorbancja utrzymywała się na tym samym poziomie w całym zakresie stężeń. Sugeruje to, iż już przy najniższym stężeniu DNA maksymalna liczba molekuł formamidynopochodnej wiąże się z łańcuchami kwasu, i dalszy wzrost ich ilości nie wpływa już na zmiany jej absorbancji. Nieco silniejszy efekt $d(AT)_4$ wywołało w przypadku DOX-Fhex, gdzie absorbancja, spadająca stopniowo ze wzrostem stężenia DNA, przy najwyższym stężeniu stanowiła ponad 70% wartości wyjściowej.

TABELA 39 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny $d(GC)_4$ i adeniny $d(AT)_4$ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.

Stężenie $d(GC)_4$ [ppm]	A(%) DOX [%]	A(%) DOX-Fmor [%]	A(%) DOX-Fhex [%]
20	69,7	69,1	38,2
10	83,5	75,7	51,4
5	87,5	87,6	73,1
0	100	100	100

Stężenie $d(AT)_4$ [ppm]	A(%) DOX [%]	A(%) DOX-Fmor [%]	A(%) DOX-Fhex [%]
20	83,9	83,5	72,6
10	91,3	84,2	79,1
5	96,6	85,3	84,8
0	100	100	100



RYS. 197 – Procentowa zmiana absorbancji doksorubicyny i jej formamidynowych pochodnych wywołana wzrastającym stężeniem: A – d(GC)₄, B – d(AT)₄. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.

4.4.3.2.3. Wnioski

Przeprowadzone eksperymenty spektrofotometryczne wskazują na występowanie oddziaływań pomiędzy oligonukleotydami, a daunorubicyną, doksorubicyną oraz ich formamidynowymi pochodnymi. Co prawda DNA w przypadku większości antracyklin nie spowodowało spektakularnych zmian w ich widmach absorpcyjnych, lecz na podstawie niewielkiego przesunięcia pasm absorpcji oraz zmiany ich intensywności można wnioskować na temat skłonności poszczególnych antracyklin do interkalacji. Uzyskane wyniki wskazują, iż zależy ona od sekwencji nukleotydowej i stężenia DNA oraz struktury antracykliny.

W przypadku wszystkich przebadanych antracyklin do zdecydowanie silniejszych zmian zarówno intensywności ich absorpcji promieniowania UV-Vis, jak i długości fali, przy której występują ich maksima dochodzi w obecności d(GC)₄ niż d(AT)₄. Jednoznacznie wskazuje to, że antracykliny wchodzi w silniejsze interakcje oparte na interkalacji z łańcuchami DNA zawierającymi cytozynę i guaninę, ujawniając tym samym ich preferencje do wiązania się z DNA w rejonach nici nukleinowych bogatych w te właśnie zasady. W licznych badaniach naukowych taka prawidłowość była już obserwowana dla daunorubicyny i doksorubicyny [228, 319, 320, 325], a tu została ujawniona także dla ich formamidynowych pochodnych. Na intensywność zmian w widmie absorpcyjnym antracyklin duży wpływ wywiera także stężenie DNA. Przeprowadzone badania pokazały, iż ich absorbancja zwykle maleje stopniowo wraz ze wzrostem stężenia kwasu nukleinowego, co sugeruje, iż ich 10 μM stężenie jest wystarczająco wysokie, by wiązać się efektywnie z podobną ilością oligonukleotydów (20 ppm odpowiada stężeniu ok. 8 μM). Odchylenie od tej prawidłowości wykazują w obecności d(AT)₄ trzy formamidynopochodne: DAU-Fhex, DAU-Fmor i DOX-Fmor. W pierwszym przypadku najsilniejsze obniżenie absorbancji odnotowano dla stężenia 5 ppm oligonukleotydów, a w dwóch kolejnych po nieznacznym osłabieniu absorpcji dla najniższego stężenia DNA stabilizowała się na tym poziomie również, gdy zawartość DNA rosła. Takie zachowanie może być spowodowane dominacją innego sposobu oddziaływania niż interkalacja.

Jak pokazały wcześniejsze eksperymenty elektrochemiczne, kluczową kwestią dla oddziaływania daunorubicyny, doksorubicyny i ich pochodnych z DNA jest ich modyfikacja w części daunozaminowej. Wyniki pomiarów spektrofotometrycznych też prowadzą do podobnych wniosków, lecz na ich podstawie można oceniać jedynie stopień interkalacji, a trudno jest wyciągać wnioski na temat innych sposobów interakcji. W obecności danego rodzaju oligonukleotydów stopień obniżenia absorbancji ściśle zależy od struktury antracyklin, co ma bezpośrednie przełożenie na różnice w sposobie ich oddziaływania z DNA. W przypadku d(GC)₄ wielkość jego wpływu na absorpcję promieniowania przez antracykliny rośnie według następującego porządku:

DAU-Fhex < DAU-Fmor < DOX ~ DOX-Fmor < DAU << DOX-Fhex, a w obecności d(AT)₄ szereg ten przyjmuje postać: DAU-Fmor ~ DAU ~ DAU-Fhex < DOX ~ DOX-Fmor < DOX-Fhex. Oba rodzaje oligonukleotydów najsilniej wpływają na absorbancję pochodnej doksorubicyny zawierającą układ heksametylenoiminowy, co jednocześnie sugeruje jej najsilniejszą interkalację. Mimo iż wyniki te nie pokrywają się w pełni z rezultatami eksperymentów elektrochemicznych, nie można zakładać, że są one sprzeczne. Należy zwrócić uwagę, że warunki pomiarowe w obu metodach nie były identyczne. O ile w analizie spektrofotometrycznej do interakcji dochodziło w roztworze, o tyle w bioczujnikach elektrochemicznych antracykliny oddziaływały z DNA unieruchomionym na powierzchni elektrody. Taka różnica może odgrywać istotną rolę dla natury tworzenia połączeń pomiędzy kwasem nukleinowym a ligandami.

4.4.3.3. Podsumowanie

Szerokie badania woltamperometryczne oraz spektrofotometryczne nad oddziaływaniem różnych rodzajów DNA z daunorubicyną, doksorubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi pokazują, że wykazują one silne powinowactwo do kwasów nukleinowych. Sposób oraz siła tych interakcji zależy zarówno od struktury i stężenia poszczególnych antracyklin, jak i od sekwencji i stężenia DNA. Mechanizm oddziaływań, który najprawdopodobniej obejmuje interkalację, połączoną z tworzeniem wiązań wodorowych i kowalencyjnych, elektrostatyczne przyciąganie przez szkielet cukrowo-fosforanowy helisy oraz jej rozplatanie, jest ściśle uzależniony od obecności w nici DNA rejonów bogatych w guaninę i adeninę. Jednak najistotniejszym wnioskiem płynącym z przeprowadzonych badań jest stwierdzenie, że formamidynowe pochodne wykazują silniejsze powinowactwo do kwasu deoksyrybonukleinowego niż związki macierzyste, co w dużej mierze pokrywa się z wynikami przeprowadzonych wcześniej badań biologicznych. Pokazuje to, że obrona droga poszukiwania nowych substancji o zwiększonej aktywności antynowotworowej jest właściwa.

Dwie metody zastosowane do badania oddziaływań pomiędzy DNA i antracyklinami okazały się trafnym wyborem, lecz nie wykazują jednakowej użyteczności. Pomiar spektrofotometryczny dostarczył niepełnych informacji o naturze tych interakcji i skupiał się głównie na interkalacji. Ponadto, zmiany sygnału analitycznego, który stanowiła absorbancja danej antracykliny, wywołane jej oddziaływaniem z oligonukleotydami, nie były bardzo duże, co ograniczało możliwości interpretacyjne. Spektrofotometria UV-Vis umożliwia monitorowanie procesu interakcji kwasu nukleinowego z antracyklinami, lecz raczej jako uzupełniająca, a nie główna, technika pomiarowa. Stanowi ona na przykład świetne dopełnienie woltamperometrycznej analizy za pomocą biosensorów DNA.

Elektrochemiczne bioczujniki DNA skonstruowane na elektrodach sitodrukowanych to skuteczne, a zarazem proste i niekosztowne, narzędzie analityczne do badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z antracyklinami. W roli przetwornika elektrycznego, a zarazem powierzchni do unieruchomienia DNA, świetnie sprawdzają się polskie trójelektrodowe układy sitodrukowane, które przed użyciem wymagają jedynie oczyszczenia elektrochemicznego. Wyniki pomiarów prowadzonych przy użyciu takich bioczujników dostarczają szerokiej wiedzy na temat interakcji występujących pomiędzy DNA a antracyklinami, ujawniając szczegóły ich natury i pozwalając na rozróżnienie odmiennych mechanizmów. Ze względu na unieruchomienie kwasu nukleinowego na powierzchni elektrody procesy te mogą z powodzeniem zostać przyrównane do analogicznych, zachodzących *in vivo*. Użycie tego typu bioczujników DNA do analizy nowych substancji o potencjalnym działaniu antynowotworowym może stanowić procedurę przesiewową, pozwalającą na wyłonienie z grupy wielu pochodnych tylko tych, które charakteryzują się najsilniejszym powinowactwem do DNA, i następnie zakwalifikowanie ich do kosztownych i czasochłonnych testów biologicznych.

PODSUMOWANIE

Tematyka zaprezentowanej rozprawy doktorskiej obejmuje zagadnienia związane z konstrukcją i zastosowaniem elektrochemicznych bioczuJNIKÓW DNA utworzonych na układach sitodrukowanych. Przeprowadzony został szereg badań, mających na celu optymalizację procedury przygotowywania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej oraz polepszenie parametrów pomiarowych układów na drodze modyfikacji nanorurkami węglowymi. Zoptymalizowane czujniki zostały wykorzystane do analizy oddziaływań różnych rodzajów DNA z błękitem metylenowym oraz daunorubicyną, doksorubicyną i ich formamidynowymi pochodnymi.

Przetestowane zostały cztery metody przygotowania powierzchni sitodrukowanej elektrody pracującej: oczyszczanie elektrochemiczne, oczyszczanie elektrochemiczne poprzedzone działaniem NaOH, oczyszczanie elektrochemiczne poprzedzone działaniem H₂O₂ oraz oczyszczanie elektrochemiczne poprzedzone szlifowaniem. Na elektrodach przygotowanych według poszczególnych procedur osadzane było DNA i dokonywano woltamperometrycznego pomiaru jego elektrotlenienia. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki oraz charakteryzujące je parametry, można stwierdzić, że najwłaściwszym sposobem przygotowania elektrody sitodrukowanej produkcji polskiej do konstrukcji bioczuJNIKA DNA jest czyszczenie elektrochemiczne, składające się z kondycjonowania elektrody przy stałym dodatnim potencjale oraz cyklicznego utleniania i redukcji jej powierzchni w szerokim zakresie potencjałów.

Podjęto próbę poprawy parametrów pomiarowych, zwiększenia czułości i powtarzalności, stosowanych układów sitodrukowanych poprzez ich modyfikację wielościennymi nanorurkami węglowymi. Wstępny etap obejmował dobór rozpuszczalnika właściwego do sporządzenia zawiesiny nanorurek węglowych i następnie użycia jej do modyfikacji elektrod sitodrukowanych. Stabilne, jednorodne zawiesiny nanorurek węglowych udało się uzyskać jedynie w DMF, jego mieszaninie z wodą w stosunku 1:1 oraz cellosolwie butylowym. W pozostałych rozpuszczalnikach MWCNT ulegały silnej agregacji i sedymentacji, co uniemożliwiało równomierne pokrycie nimi elektrody pracującej. DMF powodował zniekształcenia woltamperogramów, uniemożliwiając monitorowanie sygnałów utlenienia zasad azotowych, co jednoznacznie wyeliminowało go z dalszych pomiarów. Nieco lepsze wyniki dawał cellosolv butylowy, zaś modyfikacja elektrod mieszaniną DMF i H₂O w stosunku 1:1 wręcz poprawiała właściwości elektryczne przetwornika. Ostatecznie do modyfikacji elektrod sitodrukowanych zdecydowano się użyć zawiesin sporządzonych właśnie w tych dwóch rozpuszczalnikach. Modyfikacja nanorurkami prowadzona była na dwa sposoby: poprzez nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię elektrody pracującej oraz poprzez wzbogacenie nimi grafitowej pasty sitodrukowej używanej do nadruku układów elektrodowych. Pierwsza metoda okazała się skuteczna jedynie w przypadku zastosowania zawiesiny MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O do modyfikacji sitodrukowanych elektrod produkcji włoskiej, powodując podwyższenie rejestrowanych na nich sygnałów utlenienia DNA, podczas gdy na elektrodach polskich modyfikowanych w analogiczny sposób ulegały one obniżeniu. Warto zwrócić jednak uwagę, iż mimo wzrostu wysokości pików rejestrowanych na elektrodach włoskich w obecności nanorurek, pozostawały one niższe i mniej powtarzalne niż rejestrowane na niemodyfikowanych elektrodach polskich. Alternatywna metoda modyfikacji elektrod sitodrukowanych nanorurkami węglowymi stosowana była tylko dla układów polskich i polegała na dodatku 1% MWCNT do grafitowej pasty sitodrukowej. W tym przypadku wpływ nanorurek węglowych na sygnały utlenienia zasad azotowych był zależny od sposobu osadzania DNA – gdy było ono nakraplane, ich obecność nie powodowała wzrostu pików, gdy zaś było ono adsorbowane z roztworu przy stałym potencjale, ulegały one niewielkiemu podwyższeniu i odznaczały się dużo mniejszym rozrzutem. Takie efekty świadczą o wpływie nanorurek węglowych na intensyfikację

przepływu elektronów, towarzyszących procesom elektrolitycznym zachodzącym podczas adsorpcji DNA, a nie o ich katalitycznym działaniu na samą reakcję redoks. Podsumowując wszystkie przeprowadzone w tej części pracy eksperymenty, można stwierdzić, iż modyfikacja elektrod sitodrukowanych wielościennymi nanorurkami węglowymi poprzez ich dodatek do warstwy grafitowej jest dużo bardziej efektywna niż nakroplenie ich zawiesiny na powierzchnię elektrody pracującej. Do dalszych eksperymentów wybrano ostatecznie elektrody produkcji polskiej bez modyfikacji ze względu na dość duży koszt zakupu MWCNT, nieprzekładający się na znaczącą poprawę parametrów pomiarowych elektrod modyfikowanych.

BioczuJNIKI DNA zostały zastosowane do badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z różnymi substancjami chemicznymi. Pierwszym przebadanym związkiem był popularny interkalator – błękit metylenowy. Analiza przeprowadzona w mieszaninie MB i poszczególnych rodzajów DNA ujawniła, że wchodzi on w silniejsze interakcje z DNA plazmidowym niż chromosomalnym, a jako miejsce oddziaływania z helisą preferuje sekwencje zawierające guaninę i cytozynę. Niestety blokowanie powierzchni czujników sitodrukowanych przez utlenione molekuly kwasu nukleinowego uniemożliwiało użycie ich do badania procesów akumulacji i elektroaktywności różnych rodzajów DNA plazmidowego, a następnie ich oddziaływania z błękitem metylenowym. Dlatego w tych badaniach użyty został klasyczny układ elektrodowy, w którym elektroda z węgla szklistego była elektrodą pracującą. Adsorpcja plazmidów na niej jest dużo silniejsza niż DNA chromosomalnego, a procesy elektrodowe, którym ulegają, zależą od trójwymiarowej struktury ich molekuly, determinującej sposób ich ułożenia na powierzchni przetwornika. Rozróżnienie form plazmidów na podstawie ich sygnałów utlenienia nie jest zadaniem łatwym, dlatego też wiedząc na podstawie eksperymentów wykonanych za pomocą układów sitodrukowanych, że oddziaływanie MB z DNA zależy struktury trzeciorzędowej kwasu, z powodzeniem użyto tego ligandu jako narzędzia do odróżnienia form plazmidów o różnej wielkości i strukturze przestrzennej.

Ważną częścią prowadzonych przeze mnie badań była analiza oddziaływań występujących pomiędzy DNA a daunorubicyną, dokсорubicyną i ich pochodnymi, w których grupa aminowa w części daunozaminowej zastąpiona została ugrupowaniem formamidynowym zawierającym resztę aminy cyklicznej. W tym celu przeprowadzono eksperymenty spektrofotometryczne oraz voltamperometryczne przy użyciu sitodrukowanych bioczuJNIKÓW DNA. Wyniki jednych i drugich wskazują na powinowactwo wszystkich antracyklin do kwasu nukleinowego, które zależy od struktury i stężenia antracyklin oraz sekwencji i stężenia łańcuchów DNA. Pomiarы elektrochemiczne dostarczyły pełniejszych informacji na temat interakcji występujących pomiędzy tymi substancjami, ujawniając różnorodność ich mechanizmów. Na podstawie wywołanych obecnością poszczególnych antracyklin zmian sygnałów utlenienia guaniny i adeniny różnych rodzajów DNA (chromosomalnych i oligonukleotydowych) stwierdzono, iż wśród sposobów ich oddziaływania wymienić można: interkalację, połączoną z tworzeniem wiązań wodorowych i kowalencyjnych, elektrostatyczne przyciąganie molekuly antracyklin przez szkielet cukrowo-fosforanowy helisy oraz jej rozplatanie połączone ze zrywaniem wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi zasadami. Bez względu na mechanizm interakcji w porównaniu ze związkami macierzystymi formamidynowe pochodne wykazywały zwykle silniejsze powinowactwo do DNA oraz większy wpływ na zmianę sygnałów utlenienia zasad azotowych w zakresie niższych stężeń. W odniesieniu do zastosowania chemioterapeutycznego pokazuje to, że obrana droga poszukiwania nowych antracyklin o podwyższonej aktywności antynowotworowej i obniżonej toksyczności jest właściwa.

Oceniając użyteczność technik analitycznych zastosowanych do badania oddziaływań kwasu deoksyrybonukleinowego z ligandami, należy stwierdzić, iż spektrofotometria UV-Vis może być stosowana jako uzupełniająca a nie główna metoda pomiarowa, zaś elektrochemiczne bioczuJNIKI DNA skonstruowane na elektrodach sitodrukowanych samodzielnie stanowią użyteczne narzędzie analityczne, które dostarcza szczegółowych informacji na ten temat. Mogą pozwolić one

na prowadzenie przy ich użyciu badań przesiewowych, pozwalających z grupy wielu substancji (np. analogów leków antynowotworowych) wyłonić tylko te, które charakteryzują się najsilniejszym powinowactwem do DNA, i w przypadku związków o właściwościach terapeutycznych zakwalifikować je następnie do kosztownych i czasochłonnych testów biologicznych.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Dolan DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory, „DNA Interactive,” [Online]: <http://www.dnai.org>.
- [2] Solomon, Berg, Martin i Villee, *Biologia*, Warszawa: MULTICO Oficyna Wydawnicza, 1998.
- [3] H. Yahya, *If Darwin had known about DNA*, Istanbul, Turkey: Global Publishing, 2008.
- [4] W. Lewiński, *Genetyka*, Rumia: Wydawnictwo Operon, 2001.
- [5] M. Callahan, J. C. Stern, D. P. Glavin, J. P. Dworkin, NASA Goddard's Astrobiology Analytical Laboratory, K. E. Smith, C. H. House, Pennsylvania State University, H. J. Cleaves II, the Carnegie Institution of Washington i J. Ruzicka, Thermo Fisher Scientific, „DNA building blocks can be made in space,” NASA, 8 sierpnia 2011. [Online]: <http://www.nasa.gov/topics/solarsystem/features/dna-meteorites.html>.
- [6] Y. Benenson, T. Paz-Elizur, R. Adar, E. Keinan, Z. Livneh i E. Shapiro, „Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules,” *Nature*, tom 414, pp. 430-434, 2001.
- [7] K. Urbański, „Żywy komputer,” *Rzeczpospolita*, 8 sierpnia 2009. [Online]: <http://www.rp.pl/artukul/346090.html>.
- [8] [Online]: <http://northamptongosia.blox.pl>.
- [9] [Online]: <http://www.portrety-dna.pl/sztuka.html>.
- [10] L. Loh, „DNA-inspired: World's first curved double helix bridge at Marina Bay,” CNN GO, 26 kwietnia 2010. [Online]: <http://www.cnn.go.com/singapore/play/worlds-first-curved-double-helix-bridge-marina-bay-505668>.
- [11] Travellers Worldwide, [Online]: <http://www.travellersworldwide.com/18-australia/aus-kings-park.htm>.
- [12] [Online]: <http://www.besthomesdesign.com/innovative-design-lamp-piroled-in-dna-from-osram/innovative-design-lamp-piroled-in-dna-from-osram1>.
- [13] [Online]: <http://freshome.com/2011/04/05/elegant-table-with-legs-inspired-by-the-structure-of-dna>.
- [14] [Online]: <http://www.spreadshirt.com/red-dna-women-s-t-shirts-C3376A3641997>.
- [15] [Online]: http://www.polyvore.com/dna_jewelry/thing?id=12998076.
- [16] L. Stryer, *Biochemia*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003.
- [17] „Jak długa może być cząsteczka DNA?,” *Focus Ekstra*, 7 lipca 2009. [Online]: <http://www.focus.pl/cywilizacja/zobacz/publikacje/jak-dluga-moze-byc-czasteczka-dna>.
- [18] R. Solare, „Synchronicity,” *Emergent Culture*, 12 września 2010. [Online]: <http://emergent-culture.com/introducing-einsteins-piper-the-tzolkin-code-unveiled-and-how-every-event-is-a-synchronicity-sos-pt-5>.
- [19] B. D. Hames i N. M. Hooper, *Krótkie wykłady - Biochemia*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
- [20] P. C. Winter, G. I. Hickley i H. L. Fletcher, *Krótkie wykłady - Genetyka*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
- [21] J. N. Davidson, *Biochemia kwasów nukleinowych*, Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, 1972.
- [22] „Biochemistry, Advanced Molecular Biology,” Computational Services and Bioinformatics Facility, Stanford University, School of Medicine, 2000. [Online]: <http://cmgm.stanford.edu/biochem201/Slides/DNA%20Structure/015%20A+B%20DNA%20X-Ray%20Diffract.JPG>.
- [23] „Cast UDL Book Builder,” [Online]: http://bookbuilder.cast.org/bookresources/27/27951/104490_1.jpg.

- [24] Office of History, National Institutes of Health, Marshall Nirenberg, „Deciphering the Genetic Code,” Office of History, National Institutes of Health, Marshall Nirenberg, Czerwiec 2010. [Online]: http://history.nih.gov/exhibits/nirenberg/HS2_DNA.htm.
- [25] L. Fredholm, „The discovery of the molecular structure of DNA - The double helix,” The Official Web Site of the Nobel Prize, 30 września 2003. [Online]: http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna_double_helix/readmore.html.
- [26] Editors of the American Heritage Dictionaries, The American heritage dictionary of the English language, Boston, Nowy Jork: Houghton Mifflin Company, 2000.
- [27] R. Wheller (Zephyris), 26 kwietnia 2011. [Online]: http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_Structure%2BKey%2BLabelled.pn_NoBB.png.
- [28] L. Kłyszajko-Stefanowicz, Ćwiczenia z biochemii, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2005.
- [29] [Online]: http://www.yellowtang.org/images/dna_double_helix_c_la_784.jpg.
- [30] C. A. Rinehart, „Molecular Genetics - Biology 495,” Western Kentucky University, Department of Biology, 2005. [Online]: <http://bioweb.wku.edu/courses/biol495g/DNA1/AllRightHelix5.html>.
- [31] K. A. Hartman, R. C. Lord i G. J. Thomas, Jr., „Structural studies of nucleic acids and polynucleotides by infrared and Raman spectroscopy,” w *Physico-chemical properties of nucleic acids, Volume 2*, London, New York, Academic Press, 1973, pp. 1-89.
- [32] „Thousands of expression plasmids and many empty vectors available,” ASBMB today, Grudzień 2011. [Online]: http://www.asbmb.org/asbmbtoday/asbmbtoday_article.aspx?id=15152.
- [33] „Introduction to molecular biology & cell,” Western Kentucky University, Department of Biology, 2006. [Online]: <http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/6StructureNA/default.html>.
- [34] G. R. Kantharaj, „Molecular biology,” Molecular Biology for Masters, [Online]: http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/Molecular_Biology_Table_Of_Contents.html.
- [35] W. Lewiński i J. Walkiewicz, Biologia 1, Podręcznik dla klasy pierwszej liceum ogólnokształcącego, Wydawnictwo Operon, 1998.
- [36] „DNA, chromosomes and gene expression,” Science Learning, 8 czerwca 2011. [Online]: <http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Uniquely-Me/Science-Ideas-and-Concepts/DNA-chromosomes-and-gene-expression>.
- [37] D. L. Nelson i M. M. Cox, Lehninger principles of biochemistry, New York: W.H. Freeman and Company, 2008.
- [38] BioClix, [Online]: <http://www.bioclix.org/default.asp?pg=212&seq=3>.
- [39] M. Włodarczyk, „Co to jest plazmid?,” *Kosmos*, tom 51, pp. 231-240, 2002.
- [40] K. Hardy, Bacterial plasmids, Springer-Verlag GmbH, 1986.
- [41] B. Révet i A. Fourcade, „Short unligated sticky ends enable the observation of circularised DNA by atomic force and electron microscopies,” *Nucleic Acids Research*, tom 26, pp. 2092-2097, 1998.
- [42] „Topoisomer Part 1 (Molecular Biology),” what-when-how In Dept Information, [Online]: <http://what-when-how.com/molecular-biology/topoisomer-part-1-molecular-biology/>.
- [43] B. Kępska, Praca magisterska, Właściwości elektrochemiczne plazmidowego i chromosomalnego DNA, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Warszawa, maj 2008.
- [44] B. Wróbel, „Replikacja plazmidów,” *Kosmos*, tom 51, pp. 255-272, 2002.
- [45] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore i J. Darnell, Molecular cell biology, New York: W. H. Freeman, 2000.
- [46] P. Broda, Plasmids, Oxford and San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1979.
- [47] [Online]: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/horizontal.html>.
- [48] M. Włodarczyk, „Różnorodność cech fenotypowych bakterii kodowanych przez plazmidy,” *Kosmos*, tom 51, pp. 241-254, 2002.

- [49] G. Węgrzyn, „Wstęp - plazmidy,” *Kosmos*, tom 51, pp. 227-228, 2002.
- [50] M. Łobocka, „Liniowe plazmidy bakteryjne,” *Kosmos*, tom 51, pp. 283-296, 2002.
- [51] J. Potrykus, „Oporność na antybiotyki związana z genami obecnymi na plazmidach,” *Kosmos*, tom 51, pp. 331-342, 2002.
- [52] A. Ziemienowicz, „Transfer plazmidów między bakteriami a komórkami eukariotycznymi,” *Kosmos*, tom 51, p. 343-351, 2002.
- [53] M. Kawa, „Rośliny transgeniczne GMO - przykłady modyfikacji,” *BioTechnolog.pl*, 27 listopada 2004. [Online]: <http://www.biotechnolog.pl/gmo-4.htm>.
- [54] P. Węgleński, *Genetyka molekularna*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [55] K. Podolska, „Podstawy terapii genowej (terapia genowa),” *BioTechnolog.pl*, 8 grudnia 2008. [Online]: <http://www.biotechnolog.pl/arttykul-222.htm>.
- [56] A. K. Boal i J. K. Barton, „Electrochemical detection of lesions in DNA,” *Bioconjugate Chemistry*, tom 16, pp. 312-321, 2005.
- [57] M. Falk, K. A. Hartman i R. C. Lord, „Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study,” *Journal of the American Chemical Society*, tom 85, pp. 387-391, 1963.
- [58] I. Żak, *Chemia medyczna*, Katowice: Śląska Akademia Medyczna, 2002.
- [59] Jia Yu, Zhenfeng Zhang, Kou Cao i Xitai Huang, „Visualization of alkali-denatured supercoiled plasmid DNA by atomic,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 374, pp. 415-418, 2008.
- [60] J.-L. Butou i J.-P. Macquet, „Viscosity, nicking, thermal and alkaline denaturation studies on three classes of DNA-platinum complex,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, tom 653, pp. 305-315, 1981.
- [61] R. N. Maslova, V. V. Grechko i J. M. Varshavsky, „Acid-base denaturation of DNA in heavy water,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*, tom 87, pp. 314-325, 1964.
- [62] R. S. Lee i S. Bone, „Dielectric studies of chain melting and denaturation in native DNA,” *Biochimica et Biophysica Acta*, tom 1397, pp. 316-324, 1998.
- [63] J. Cortadas i J. A. Subirana, „The incomplete denaturation of DNA in N,N-dimethyl formamide,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, tom 476, pp. 203-206, 1977.
- [64] T. T. Herskovits i S. J. Singer, „Nonaqueous solutions of DNA. Denaturation in methanol and ethanol,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, tom 94, pp. 99-114, 1961.
- [65] J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides i G. J. Thomas, „Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. II. The thermal denaturation of DNA in the presence of Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , and Cd^{2+} ,” *Biophysical Journal*, tom 69, pp. 2623-2641, 1995.
- [66] W. F. Dove i N. Davidson, „Cation effects on the denaturation of DNA,” *Journal of Molecular Biology*, tom 5, pp. 467-478, 1962.
- [67] N. K. Chin i G. A. Rodley, „Denaturation of DNA in the presence of chromous (Cr^{2+}) ions,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, tom 13, pp. 253-265, 1980.
- [68] J. M. Gonzalez i C. Saiz-Jimenez, „A simple fluorimetric method for the estimation of DNA-DNA relatedness,” *Extremophiles*, tom 9, pp. 75-79, 2005.
- [69] K. Nazari, N. Gholami i A. A. Moosavi-Movahedi, „Stability of DNA upon interaction with dimethyltin,” *Medical Chemistry Research*, tom 16, pp. 238-257, 2007.
- [70] Lifeng Yan i Hiroshi Iwasaki, „Fractal aggregation of DNA after thermal denaturation,” *Chaos, Solitons and Fractals*, tom 20, pp. 877-881, 2004.
- [71] Bing-Yi Pan, Lingyun Zhang, Shuo-Xing Dou i Peng-Ye Wang, „Forces-induced pinpoint denaturation of short DNA,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 388, pp. 137-140, 2009.
- [72] K. Okano, K. Yasuda i S. Ishi, „Position-specific release of DNA from a chip by using photothermal,” *Sensors and Actuators B*, tom 64, pp. 88-94, 2000.
- [73] W. G. Stroop i D. C. Schaefer, „Comparative effect of microwaves and boiling on the

- denaturation of DNA," *Analytical Biochemistry*, tom 182, pp. 222-225, 1989.
- [74] R. P. Johnson, R. Gao, T. Brown i P. N. Bartlett, „The effect of base-pair sequence on electrochemically driven denaturation,” *Bioelectrochemistry*, tom 85, pp. 7-13, 2012.
- [75] E. Paleček i F. Jelen, „Electrochemistry of nucleic acids,” w *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Amsterdam, Elsevier, 2005, pp. 73-173.
- [76] MCB 201 Gene Expression, University of Connecticut, „Lecture 3 (Structure of nucleic acids continued),” MCB 201 Gene Expression, University of Connecticut, 2005. [Online]: <http://web.uconn.edu/mcb201/lecture03.html>.
- [77] J. Duchesne, *Physico-chemical properties of nucleic acids*, Volume 1, London and New York: Academic Press, 1973.
- [78] R. Thomas, „The denaturation of DNA,” *Gene*, tom 135, pp. 77-79, 1993.
- [79] M. Mandel i J. Marmur, „Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA,” *Methods in Enzymology*, tom 12, pp. 195-206, 1968.
- [80] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers i I. Tinoco, *Nucleic acids: structures, properties, and functions*, Sausalito, California: University Science Books, 2000.
- [81] H. Richard, „Renaturation of DNA in the absence and in the presence of Cu^{2+} ions,” w *Physico-chemical properties of nucleic acids, Volume 3*, London and New York, Academic Press, 1973.
- [82] E. Paleček i M. Bartošik, „Electrochemistry of nucleic acids,” *Chemical Reviews*, tom 112, pp. 3427-3481, 2012.
- [83] H. Berg, „Polarographic studies on nucleic acids and nucleases. I. Polarographic determination of proteins in the presence of nucleic acids,” *Biochemische Zeitschrift*, tom 329, pp. 274-276, 1957.
- [84] E. Paleček, „Oszillografische Polarographie der Nucleinsäuren und ihrer Bestandteile,” *Naturwissenschaften*, tom 45, pp. 186-187, 1958.
- [85] E. Paleček, „Past, present and future of nucleic acids electrochemistry,” *Talanta*, tom 56, pp. 809-819, 2002.
- [86] E. Paleček, „Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid,” *Nature*, tom 1690, pp. 656-657, 1960.
- [87] A. Radomyski, Praca magisterska: Zastosowanie sitodrukowanych bioczuJNIKÓW DNA w badaniu toksyczności jonów metali ciężkich na przykładzie kadmu i ołowiu oraz w oznaczaniu całkowitej toksyczności ścieków komunalno-przemysłowych, Uniwersytet Warszawski, Międzywydziałowe Studia Ochrony Środowiska, Warszawa, wrzesień 2011.
- [88] E. Paleček, „From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes,” *Electroanalysis*, tom 8, pp. 7-14, 1996.
- [89] F. Jelen, M. Fojta i E. Paleček, „Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 427, pp. 49-56, 1997.
- [90] P. de-los-Santos Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres i P. Tuñón-Blanco, „Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications,” *Electroanalysis*, tom 16, pp. 1193-1204, 2004.
- [91] P. Singhal i W. G. Kuhr, „Ultrasensitive voltammetric detection of underivatized oligonucleotides and DNA,” *Analytical Chemistry*, tom 69, pp. 4828-4832, 1997.
- [92] M. Fojta, „Electrochemical sensors for DNA interactions and damage,” *Electroanalysis*, tom 14, pp. 1449-1463, 2002.
- [93] A. Cygański, *Podstawy metod elektroanalitycznych*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 1999.
- [94] W. W. Kubiak i R. Piech, *Wstęp do polarografii i voltamperometrii*, Kraków: Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Chemii Analitycznej.
- [95] Z. Wang, D. Liu i S. Dong, „In situ infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode,” *Bioelectrochemistry*, tom 53, pp. 175-181, 2001.

- [96] A. M. Oliveira-Brett, S. H. P. Serrano, A. J. P. Piedade, „Electrochemistry of DNA,” w *Comprehensive Chemical Kinetics, Applications of Kinetic Modelling, Volume 37*, Amsterdam, Elsevier, 1999.
- [97] A. M. Oliveira-Brett, V. C. Diculescu, J. A. P. Piedade, „Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode,” *Bioelectrochemistry*, tom 55, pp. 61-62, 2002.
- [98] A. M. Oliveira-Brett, F.-M. Matysik, „Voltammetric and sonovoltammetric studies on the oxidation of thymine and cytosine at a glassy carbon electrode,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 429, pp. 95-99, 1997.
- [99] C.-X. Ruan, J. Lou, Y.-Y. Duan i W. Sun, „Electrochemical oxidation of cytosine on carbon paste electrode and its determination,” *Journal of the Chinese Chemical Society*, tom 57, pp. 1056-1060, 2010.
- [100] W. Sun, M. Xi, L. Zhang, T. Zhan, H. Gao i K. Jiao, „Electrochemical behaviors of thymine on a new ionic liquid modified carbon electrode and its detection,” *Electrochimica Acta*, tom 56, pp. 222-226, 2010.
- [101] Z. Wang, Y. Wang i G. Luo, „The electrocatalytic oxidation of thymine at alpha-cyclodextrin incorporated carbon nanotube-coated electrode,” *Electroanalysis*, tom 15, pp. 1129-1133, 2003.
- [102] A. M. Oliveira-Brett, J. A. P. Piedade, L. A. Silva, V. C. Diculescu, „Voltammetric determination of all DNA nucleotides,” *Analytical Biochemistry*, tom 332, pp. 321-329, 2004.
- [103] A. M. Oliveira-Brett, F.-M. Matysik, „Sonoelectrochemical studies of guanine and guanosine,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 42, pp. 111-116, 1997.
- [104] A. M. Oliveira-Brett, F.-M. Matysik, „Sonoelectrochemical determination of nucleosides and nucleotides,” *Ultrasonics Sonochemistry*, tom 4, pp. 125-126, 1997.
- [105] M. S. Goh i M. Pumera, „Oxidation of DNA bases influenced by the presence of other bases,” *Electroanalysis*, tom 24, 2012.
- [106] F. Boussicault i M. Robert, „Electron transfer in DNA and in DNA-related biological processes. Electrochemical insights,” *Chemical Reviews*, tom 108, pp. 2622-2645, 2008.
- [107] I. Stempkowska, M. Ligaj, J. Jasnowska, J. Langer i M. Filipiak, „Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode,” *Bioelectrochemistry*, tom 70, pp. 488-494, 2007.
- [108] V. C. Diculescu, A. M. Chiorces-Paquim i A. M. Oliveira-Brett, „Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage,” *Sensors*, tom 5, pp. 377-393, 2005.
- [109] A. M. Oliveira-Brett, S. H. P. Serrano, „The electrochemical oxidation of DNA,” *Journal of Brazilian Chemical Society*, tom 6, pp. 97-100, 1995.
- [110] M. Zhou, Y. Zhai i S. Dong, „Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide,” *Analytical Chemistry*, tom 81, pp. 5603-5613, 2009.
- [111] X. Cai, G. Rivas, P. A. M. Farias, H. Shiraishi, J. Wang, M. Fojta i E. Paleček, „Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrode,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 40, pp. 41-47, 1996.
- [112] F. Jelen i E. Paleček, „Nucleotide sequence-dependent opening of double-stranded DNA at an electrically charged surface,” *General Physiology and Biophysics*, tom 4, pp. 219-237, 1985.
- [113] M. Fojta i E. Paleček, „Supercoiled DNA-modified mercury electrode: A highly sensitive tool for the detection of DNA damage,” *Analytica Chimica Acta*, tom 342, pp. 1-12, 1997.
- [114] M. Vojtíšková, E. Lukášová, F. Jelen i E. Paleček, „Polarography of circular DNAs,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 8, pp. 487-496, 1981.
- [115] C. Teijeiro, K. Nejedlý i E. Paleček, „Cyclic voltammetry of submicrogram quantities of supercoiled, linear and denatured DNAs with DNA-modified mercury electrode,” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, tom 11, pp. 313-331, 1993.
- [116] S. O. Kelley, „Charge migration through the DNA double helix,” w *Electroanalytical methods for biological materials*, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2002, pp. 1-26.
- [117] D. D. Eley i D. I. Spivey, „Semiconductivity of organic substances. Part 9.—Nucleic acid in the dry state,” *Transactions of the Faraday Society*, tom 58, pp. 411-415, 1962.

- [118] C. Y. Liang i E. G. Scalco, „Electrical conduction of a high polymerized sample of sodium salt of deoxyribonucleic acid,” *Journal of Chemical Physics*, tom 40, pp. 919-922, 1964.
- [119] R. S. Snart, „Photoelectric effects of deoxyribonucleic acid,” *Biopolymers*, tom 6, pp. 293-297, 1968.
- [120] J. K. Barton, C. V. Kumar i N. J. Turro, „DNA-mediated photoelectron transfer reactions,” *Journal of American Chemical Society*, tom 108, pp. 6391-6393, 1986.
- [121] K. E. Augustyn, J. C. Genereux i J. K. Barton, „Distance-independent DNA charge transport across an adenine tract,” *Angewandte Chemie International Edition*, tom 46, pp. 5731-5733, 2007.
- [122] Y. A. Berlin, A. L. Burin i M. A. Ratner, „Charge hopping in DNA,” *Journal of American Chemical Society*, tom 123, pp. 260-268, 2001.
- [123] B. Giese, „Long-distance charge transport in DNA: The hopping mechanism,” *Accounts of Chemical Research*, tom 33, pp. 631-636, 2000.
- [124] E. M. Boon i J. K. Barton, „Charge transport in DNA,” *Current Opinion in Structural Biology*, tom 12, pp. 320-329, 2002.
- [125] B. Giese, „Long-distance electron transfer through DNA,” *Annual Review of Biochemistry*, tom 71, pp. 51-70, 2002.
- [126] S. Kanvah, J. Joseph, G. B. Schuster, N. B. Barnett, C. L. Cleveland i U. Landman, „Oxidation of DNA: damage to nucleobases,” *Accounts of Chemical Research*, tom 43, pp. 280-287, 2010.
- [127] H.-A. Wagenknecht, „Principles and mechanisms of photoinduced charge injection, transport and trapping in DNA,” w *Charge transfer in DNA, From mechanism to application*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 1-26.
- [128] Y. A. Berlin, A. L. Burin i M. A. Ratner, „DNA as a molecular wire,” *Superlattices and Microstructures*, tom 28, pp. 241-252, 2000.
- [129] N. J. Turro i J. K. Barton, „Paradigms, supermolecules, electron transfer and chemistry at a distance. What's the problem? The science or the paradigm?,” *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, tom 3, pp. 201-209, 1998.
- [130] S. O. Kelley i J. K. Barton, „Electron transfer between bases in double helical DNA,” *Science*, tom 283, pp. 375-381, 1999.
- [131] S. Delaney i J. K. Barton, „Long-range DNA charge transport,” *Journal of Organic Chemistry*, tom 68, pp. 6475-6483, 2003.
- [132] E. M. Boon, N. M. Jackson, M. D. Wightman, S. O. Kelley, M. G. Hill i J. K. Barton, „Intercalative stacking: A critical feature of DNA charge-transport electrochemistry,” *Journal of Physical Chemistry*, tom 107, pp. 11805-11812, 2003.
- [133] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva i N. E. Geacintov, „Electron transfer at a distance induced by site-selective photoionization of 2-aminopurine in oligonucleotides and investigated by transient absorption techniques,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, tom 2, pp. 4399-4408, 2000.
- [134] E. Meggers, D. Kusch, M. Spichy, U. Wille i B. Giese, „Electron transfer through DNA in the course of radical-induced strand cleavage,” *Angewandte Chemie International Edition*, tom 37, pp. 460-462, 1998.
- [135] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro i J. K. Barton, „Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix,” *Science*, tom 262, pp. 1025-1029, 1993.
- [136] T. Liu i J. K. Barton, „DNA electrochemistry through the base pairs not the sugar-phosphate backbone,” *Journal of American Chemical Society*, tom 127, pp. 10160-10161, 2005.
- [137] T. G. Drummond, M. G. Hill i J. K. Barton, „Electron transfer rates in DNA films as a function of tether length,” *Journal of American Chemical Society*, tom 126, pp. 15010-15011, 2004.
- [138] S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson i M. G. Hill, „Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA,” *Nucleic Acid Research*, tom 27, pp. 4830-4837, 1999.
- [139] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton i A. H. Zewail, „Femtosecond direct observation of

- charge transfer between bases in DNA," *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, tom 97, pp. 14052-14055, 2000.
- [140] T. Carell i M. von Meltzer, „Excess electron transfer in DNA probed with flavin- and thymine dimer-modified oligonucleotides,” w *Charge transfer in DNA, From mechanism to application*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 77-91.
- [141] M. A. O'Neill i J. K. Barton, „Sequence-dependant DNA dynamics: the regulator of DNA-mediated charge transport,” w *Charge transfer in DNA, From mechanism to application*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 27-75.
- [142] T. Douki, J.-C. Ravanat, D. Angelov, J. R. Wagner i J. Cadet, „Effects of duplex stability on charge-transfer efficiency within DNA,” *Topics in Current Chemistry*, tom 236, pp. 127-139, 2004.
- [143] C. R. Treadway, M. G. Hill i J. K. Barton, „Charge transport through a molecular π -stack: double helical DNA,” *Chemical Physics*, tom 281, pp. 409-428, 2002.
- [144] J. C. Genereux i J. K. Barton, „Mechanisms for DNA charge transport,” *Chemical Reviews*, tom 110, pp. 1642-1662, 2010.
- [145] B. Giese i S. Wessely, „The significance of proton migration during hole hopping through DNA,” *Chemical Communications*, pp. 2108-2109, 2001.
- [146] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka i T. Majima, „Charge separation in DNA via consecutive adenine hopping,” *Journal of American Chemical Society*, tom 126, pp. 1125-1129, 2004.
- [147] K. Kawai i T. Majima, „Spectroscopic investigation of oxidative hole transfer via adenine hopping in DNA,” w *Charge transfer in DNA, From mechanism to application*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 117-132.
- [148] Z. Cai i M. D. Sevilla, „Studies of excess electron and hole transfer in DNA at low temperatures,” *Topics in Current Chemistry*, tom 237, pp. 103-128, 2004.
- [149] S. Steenken, „Electron transfer in DNA? Competition by ultra-fast proton transfer?,” *Biological Chemistry*, tom 378, pp. 1293-1297, 1997.
- [150] R. Huber, T. Fiebig i H.-A. Wagenknecht, „Pyrene as a fluorescent probe for DNA base radicals,” *Chemical Communications*, pp. 187-1879, 2003.
- [151] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht i T. Fiebig, „Ultrafast proton-coupled electron-transfer dynamics in pyrene-modified pyrimidine nucleosides: model studies towards an understanding of reductive electron transport in DNA,” *ChemPhysChem*, tom 5, pp. 706-712, 2004.
- [152] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle i R. Notker, „Energetics of excess electron transfer in DNA,” *Chemical Physics Letters*, tom 342, pp. 231-238, 2001.
- [153] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler i T. Carell, „Weak distance dependence of excess electron transfer in DNA,” *Angewandte Chemie International Edition*, tom 41, pp. 1763-1766, 2002.
- [154] E. Conwell, „Polarons and transport in DNA,” *Topics in Current Chemistry*, tom 237, pp. 73-102, 2004.
- [155] G. B. Schuster i U. Landman, „The mechanism of long-distance radical cation transport in duplex DNA: ion-gated hopping of polaron-like distortions,” *Topics in Current Chemistry*, tom 236, pp. 139-161, 2004.
- [156] M. A. O'Neill i J. K. Barton, „DNA charge transport: conformationally gated hopping through stacked domains,” *Journal of American Chemical Society*, tom 126, pp. 11471-11483, 2004.
- [157] T. T. Williams, D. T. Odom i J. K. Barton, „Variations in DNA charge transport with nucleotide composition and sequence,” *Journal of American Chemical Society*, tom 122, pp. 9048-9049, 2000.
- [158] S. E. Rokita i T. Ito, „Chemical probing of reductive electron transfer in DNA,” w *Charge transfer in DNA, From mechanism to application*, Wienheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, pp. 133-151.
- [159] E. M. Boon i J. K. Barton, „DNA electrochemistry as a probe of base pair stacking in A-, B-, and

- Z-form DNA," *Bioconjugate Chemistry*, tom 14, pp. 1140-1147, 2003.
- [160] E. L. S. Wong, F. J. Mearns i J. J. Gooding, „Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer,” *Sensors and Actuators B*, tom 111-112, pp. 515-521, 2005.
- [161] M. A. O'Neill i J. K. Barton, „DNA-mediated charge transport chemistry and biology,” *Topics in Current Chemistry*, tom 236, pp. 165-176, 2004.
- [162] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajska, M. Pascaly, E. D. A. Stemp i J. K. Barton, „Direct observation of radical intermediates in protein-dependent DNA charge transport,” *Journal of American Chemical Society*, tom 123, pp. 4400-4407, 2001.
- [163] S. R. Rajska, S. Kumar, R. J. Roberts i J. K. Barton, „Protein-modulated DNA electron transfer,” *Journal of American Chemical Society*, tom 1999, pp. 5615-5616, 1999.
- [164] S. R. Rajska i J. K. Barton, „How different DNA-binding proteins affect long-range oxidative damage to DNA,” *Biochemistry*, tom 40, pp. 5556-5564, 2001.
- [165] W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2002.
- [166] J. Duchesne, *Physico-chemical properties of nucleic acids, Volume 2*, London and New York: Academic Press, 1973.
- [167] F.-X. Schmid, „Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry,” w *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, 2001.
- [168] S. L. Upstone, „Ultraviolet/visible light absorption spectrophotometry in clinical chemistry,” w *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000, pp. 1699-1714.
- [169] S. Rauf, J. J. Gooding, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar i A. M. Khalid, „Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 37, pp. 205-217, 2005.
- [170] A. Erdem i M. Ozsoz, „Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions,” *Electroanalysis*, tom 14, pp. 965-974, 2002.
- [171] G. Bagni, D. Osella, E. Sturchio i M. Mascini, „Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies,” *Analytica Chimica Acta*, tom 573-574, pp. 81-89, 2006.
- [172] T. Leszczyński i H. Duński, „Sposoby wiązania cząsteczek ligandów z DNA,” *Zeszyty Politechniki Łódzkiej*, tom 984, pp. 65-77, 2006.
- [173] R. Palchadhuri i P. J. Hergenrother, „DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action,” *Current Opinion in Biotechnology*, tom 18, pp. 497-503, 2007.
- [174] B. B. Hasinoff, H. Liang, X. Wu, L. J. Guziec, F. S. Guziec, K. Marshall i J. C. Yalowich, „The structure-based design, synthesis and biological evaluation of DNA-binding bisintercalating bisanthrapyrazole anticancer compounds,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, tom 16, pp. 3959-3968, 2008.
- [175] E. E. Ferapontova, „Electrochemical indicators for DNA electroanalysis,” *Current Analytical Chemistry*, tom 7, pp. 51-62, 2011.
- [176] J. Miller, „Intercalation between Anthracyclines and DNA,” [Online]: <http://www.jonathanpmiller.com/intercalation/>.
- [177] J. Feigon, W. A. Denny, W. Leupin i D. R. Kearns, „Interactions of antitumor drugs with natural DNA: proton NMR study of binding mode and kinetics,” *Journal of Medicinal Chemistry*, tom 27, pp. 450-465, 1984.
- [178] J. Kang, L. Zhuo, X. Lu, H. Liu, H. Zhang i J. Wu, „Electrochemical investigation on interaction between DNA with quercetin and Eu-Qu₃ complex,” *Journal of Inorganic Biochemistry*, tom 98, pp. 79-86, 2004.
- [179] L. S. Lerman, „Structural considerations in the interactions of DNA and acridines,” *Journal of Molecular Biology*, tom 3, pp. 18-30, 1961.
- [180] L. D. Williams, M. Egli, Q. Gao i A. Rich, „DNA intercalation: helix unwinding and neighbor-

- exclusion," w *Structure and Function, Volume 1 - Nucleic Acids*, New York, Adenine Press, 1992, pp. 107-125.
- [181] M. A. Loza-Mejía, R. Castillo i A. Lira-Rocha, „Molecular modeling of tricyclic compounds with anilino substituents and their intercalation complexes with DNA sequences," *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, tom 27, pp. 90-907, 2009.
- [182] E. Fredericq i C. Houssier, „Study of the intercalation of DNA and acridine orange by various optical methods," *Biopolymers*, tom 11, pp. 2281-2308, 1972.
- [183] S. F. Baranovskii, P. A. Bolotin i M. P. Evstigneev, „Complexation of heterocyclic ligands with DNA in aqueous solution," *Journal of Applied Spectroscopy*, tom 75, pp. 251-260, 2008.
- [184] S. H. Minasyan, L. A. Tavadyan, A. P. Antonyan, H. G. Davtyan, M. A. Parsadanyan i P. O. Vardevanyan, „Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA," *Bioelectrochemistry*, tom 68, pp. 48-55, 2006.
- [185] I. C. Gherghi, S. T. Girousi, A. Voulgaropoulos i R. Tzimou-Tsitouridou, „Interaction of the mutagen ethidium bromide with DNA, using a carbon paste electrode and a hanging mercury drop electrode," *Analytica Chimica Acta*, tom 505, pp. 135-144, 2004.
- [186] L. Wang, L. Lin i B. Ye, „Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 42, pp. 625-629, 2006.
- [187] J. Zheng, Z. Li, A. Wu, H. Zhou, H. Bai i Y. Song, „The structural transition of DNA-Tris(1,10-phenanthroline) cobalt (III) complexes in ethanol-water solution," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 299, pp. 910-915, 2002.
- [188] J. Gallego i B. R. Reid, „Solution structure and dynamics of a complex between DNA and the antitumor bisnaphthalimide LU-79553: intercalated ring flipping on the millisecond time scale," *Biochemistry*, tom 38, pp. 15105-15115, 1999.
- [189] B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques, J. B. Le Pecq i M. Le Brat, „DNA bifunctional intercalators. 2. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer," *Biochemistry*, tom 17, pp. 5078-5088, 1978.
- [190] F. Jelen, A. Erdem i E. Paleček, „Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode," *Bioelectrochemistry*, tom 55, pp. 165-167, 2002.
- [191] A. Hason, J. Dvořák, F. Jelen i V. Vetterl, „Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements," *Talanta*, tom 56, pp. 905-913, 2002.
- [192] L. Z. Zhang i G.-Q. Tang, „The binding properties of photosensitizer methylene blue to herring sperm DNA: a spectroscopic study," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, tom 74, pp. 119-125, 2004.
- [193] C. A. Laughton i S. A. Harris, „The atomistic simulation of DNA," *Computational Molecular Science*, tom 1, pp. 590-600, 2011.
- [194] D. Rentzeperis i L. A. Marky, „Netropsin binding as a thermodynamic probe of the grooves of parallel DNA," *Journal of American Chemical Society*, tom 115, pp. 1645-1650, 1993.
- [195] T. Brown, „Nucleic Acids Book, Nucleic acid-drug interactions," ATDbio, [Online]: <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>.
- [196] W. Sufen, P. Tuzhi i C. F. Yang, „Electrochemical studies for the interaction of DNA with an irreversible redox compound – Hoechst 33258," *Electroanalysis*, tom 14, pp. 1648-1653, 2002.
- [197] C. M. Nunn, T. C. Jenkins i S. Neidle, „Crystal structure of γ -oxapentamidine complexed with d(CGCGAATTCGCG)₂: the effects of drug structural change on DNA minor-groove recognition," *European Journal of Biochemistry*, tom 226, pp. 953-961, 1994.
- [198] W. Hu, C. Blecking, M. Kralj, L. Suman, I. Piantanida i T. Schrader, „Dimeric calixarenes: a new family of major-groove binders," *Chemistry - A European Journal*, tom 3589-3597, p. 18, 2012.
- [199] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, O. Erdem, O. Kucukoglu, E. Erciyas i M. Ozsoz, „Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4,4'-

- dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 30, pp. 1339-1346, 2002.
- [200] J. R. Dimmock, N. M. Kandepu, M. Hetherington, J. W. Quail, U. Pugazhenthii, A. M. Sudom, M. Chamankhah, P. Rose, T. M. Allen, S. Halleran, J. Szydłowski, B. Mutus, M. Tannous, E. K. Manavathu, T. G. Myers, E. De Clercq i J. Balzarini, „Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds," *Journal of Medicinal Chemistry*, tom 41, pp. 1014-1026, 1998.
- [201] D. Marín, P. Pérez, C. Teijeiro i E. Paleček, „Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C," *Biophysical Chemistry*, tom 75, pp. 87-95, 1998.
- [202] P. Perez, C. Teijeiro i D. Marin, „Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C," *Chemico-Biological Interactions*, tom 117, pp. 65-81, 1999.
- [203] M. J. Hannon, „The First Completely New Way Of Recognising DNA For 40 Years!," University of Birmingham, School of Chemistry, [Online]: <http://chemweb.bham.ac.uk/~hannonmj/Mike%20page/3wayjonction.htm>.
- [204] Y. C. Liaw, Y. G. Gao, H. Robinson, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom i A. H. J. Wang, „Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: molecular structure of nogalamycin-DNA complex," *Biochemistry*, tom 28, pp. 9913-9918, 1989.
- [205] C. Bailly, D. E. Graves, G. Ridge i M. J. Waring, „Use of a photoactive derivative of actinomycin to investigate shuffling between binding sites on DNA," *Biochemistry*, tom 33, pp. 8736-8745, 1994.
- [206] M. Hansen i L. Hurley, „Altromycin B threads the DNA helix interacting with both the major and the minor grooves to position itself for site-directed alkylation and guanine N7," *Journal of American Chemical Society*, tom 117, pp. 2421-2429, 1995.
- [207] R. Rohs, H. Sklenar, R. Lavery i B. Röder, „Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence: a modeling study," *Journal of American Chemical Society*, tom 122, pp. 2860-2866, 2000.
- [208] W. D. Wilson, T. A. Tanious, H. J. Barton, R. L. Jones, K. Fox, R. L. Wydra i L. Strekowski, „DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)," *Biochemistry*, tom 29, pp. 8452-8461, 1990.
- [209] A. Radi, M. A. El Ries i S. Kandil, „Electrochemical study of the interaction of levofloxacin with DNA," *Analytica Chimica Acta*, tom 495, pp. 61-67, 2003.
- [210] P. Uma Maheswari i M. Palaniandavar, „DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium (II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines – effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, tom 98, pp. 219-230, 2004.
- [211] N. Li, Y. Ma, L. Guo i X. Yang, „Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods," *Biophysical Chemistry*, tom 116, pp. 199-205, 2005.
- [212] P. Colson, C. Bailly i C. Houssier, „Electric linear dichroism as a new tool to study sequence preference in drug binding to DNA," *Biophysical Chemistry*, tom 58, pp. 125-140, 1996.
- [213] J. M. Kelly, A. B. Tossi, D. J. McConnell i C. OhUigin, „A study of the interactions of some polypyridylruthenium (II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation," *Nucleic Acids Research*, tom 13, pp. 6017-6034, 1985.
- [214] T. Banerjee i R. Mukhopadhyay, „Structural effects of nogalamycin, an antibiotic antitumour agent, on DNA," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 374, pp. 264-268, 2008.
- [215] D. Suh i J. B. Chaires, „Criteria for the mode of binding of DNA binding agents," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, tom 3, pp. 723-728, 1995.
- [216] C. Bailly, P. Colson, J.-P. Hénichart i C. Houssier, „The different binding modes of Hoechst 33258 to DNA studied by electric linear dichroism," *Nucleic Acids Research*, tom 21, pp. 3705-3709, 1993.

- [217] D. K. Jangira, S. K. Dey, S. Kundu i R. Mehrotra, „Assessment of amsacrine binding with DNA using UV-visible, circular dichroism and Raman spectroscopic techniques,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, tom 114, pp. 38-43, 2012.
- [218] F. Ahmadi, N. Jamali, S. Jahangard-Yekta, B. Jafari, S. Nouri, F. Najafi i M. Rahimi-Nasrabadi, „The experimental and theoretical QM/MM study of interaction of chloridazon herbicide with dsDNA,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, tom 79, pp. 1004-1012, 2011.
- [219] R. I. Zhdanova, N. B. Strazhevskaya, A. R. Jdanov i G. Bischoff, „Spectroscopic and surface plasmon resonance study of oleic acid/DNA complexes,” *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, tom 20, pp. 231-242, 2002.
- [220] C. Voinea, A. Ciucu, C. Ciucu i N. Voiculescu, „Voltammetric methods for determination of some anticancer drugs,” *Roumanian Biotechnological Letters*, tom 7, pp. 1031-1040, 2002.
- [221] A. Erdem i M. Ozsoz, „Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA,” *Turkish Journal of Chemistry*, tom 25, pp. 469-476, 2001.
- [222] A. M. Oliverira-Brett, S. H. P. Serrano, T. A. Macedo, D. Raimundo, M. H. Marques i M. A. La-Scalea, „Electrochemical determination of carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode,” *Electroanalysis*, tom 8, pp. 992-995, 1996.
- [223] O. Vrána i V. Brabec, „Electrochemical analysis of antitumour platinum drugs and their complexes with DNA,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 19, pp. 145-160, 1988.
- [224] M. S. Ibrahim, „Voltammetric behaviour and determination of the anthracycline antitumor drug nogalamycin,” *Analytica Chimica Acta*, tom 409, pp. 105-112, 2000.
- [225] J. Wang, M. Ozsoz, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, D. H. Grant, M. Chicharro, J. Fernandes i E. Paleček, „Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface,” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 45, pp. 33-40, 1998.
- [226] E. Calendi, A. Di Marco, M. Reggiano, B. Scarpinato i L. Valentini, „On physico-chemical interactions between daunomycin and nucleic acids,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Proteins Synthesis*, tom 103, pp. 25-49, 1965.
- [227] A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley i A. Rich, „Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2 Å resolution,” *Biochemistry*, tom 26, pp. 1152-1163, 1987.
- [228] J. B. Chaires, K. R. Fox, J. E. Herrera, M. Britt i M. J. Waring, „Site and sequence specificity of the daunomycin-DNA interaction,” *Biochemistry*, tom 26, pp. 8227-8236, 1987.
- [229] C. A. Frederick, L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich i A. H.-J. Wang, „Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin,” *Biochemistry*, tom 29, pp. 2538-2549, 1990.
- [230] H.-S. Shieh, H. M. Berman, M. Dabrow i S. Neidle, „The structure of drug-deoxydinucleoside phosphate complex: generalized conformational behavior of intercalation complexes with RNA and DNA fragments,” *Nucleic Acids Research*, tom 8, pp. 85-98, 1980.
- [231] J. B. Chaires, „Equilibrium studies on the interaction of daunomycin with deoxypolynucleotides,” *Biochemistry*, tom 22, pp. 4204-4211, 1983.
- [232] S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak i J. B. Chaires, „Neither delta- nor lambda-tris(phenanthroline)ruthenium (II) binds to DNA by classical intercalation,” *Biochemistry*, tom 31, pp. 9319-9324, 1992.
- [233] D. S. Pilch, M. J. Waring, J.-S. Sun, M. Rougée, C.-H. Nguyen, E. Bisagni, T. Garestier i C. Hélène, „Characterization of a triple helix-specific ligand: BePI {3-methoxy-7H-8-methyl-11-[(3'-amino)propylamino]-benzo[e]pyrido[4,3-b]indole} intercalates into both double-helical and triple-helical DNA,” *Journal of Molecular Biology*, tom 232, pp. 926-946, 1993.
- [234] K. R. Fox i N. R. Howarth, „Investigations into the sequence-selective binding of mithramycin and related ligands to DNA,” *Nucleic Acids Research*, tom 13, pp. 8695-8714, 1985.
- [235] K. R. Fox i M. J. Waring, „Footprinting reveals that nogalamycin and actinomycin shuffle between DNA binding sites,” *Nucleic Acids Research*, tom 14, pp. 2001-2014, 1986.
- [236] D.-L. Ma, D. S.-H. Chan, P. Lee, M. H.-T. Kwan i C.-H. Leung, „Molecular modeling of drug-DNA interactions: virtual screening to structure-based design,” *Biochimie*, tom 93, pp. 1252-1266,

- 2009.
- [237] R. Rohs, I. Bloch, H. Sklenar i Z. Shakked, „Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations,” *Nucleic Acids Research*, tom 33, pp. 7048-7057, 2005.
- [238] R. Ruiz, B. García, G. Ruisi, A. Silvestri i G. Barone, „Computational study of the interaction of proflavine with d(ATATATATAT)₂ and d(GCGCGCGCGC)₂,” *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, tom 915, pp. 86-92, 2009.
- [239] I. Szpakowska, B. Krassowka-Swiebocka, D. Maciejewska, P. Kazmierczak, W. Jemielita, M. Konrad, J. Trykowska i M. Maj-Zurawska, „Electrochemical DNA biosensors for testing pentamidine and its analogues as potential chemotherapeutics,” *Electroanalysis*, tom 18, pp. 1422-1430, 2006.
- [240] S. Kumar, P. Pandya, K. Pandav, S. P. Gupta i A. Chopra, „Structural studies on ligand–DNA systems: a robust approach in drug design,” *Journal of Biosciences*, tom 37, pp. 553-561, 2012.
- [241] F. A. Tanious, B. Nguyen i W. D. Wilson, „Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions,” *Methods in Cell Biology*, tom 84, pp. 53-77, 2008.
- [242] M. L. Ciolkowski, M. M. Fang i M. E. Lund, „A surface plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA–ligand interactions,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 22, pp. 1037-1045, 2000.
- [243] L. P. Lin, L. S. Huang, C. W. Lin, C. K. Lee, J. L. Chen, S. M. Hsu i S. Lin, „Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology,” *Current Drug Targets - Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, tom 5, pp. 61-72, 2005.
- [244] A. Guttman i N. Cooke, „Capillary gel affinity electrophoresis of DNA fragments,” *Analytical Chemistry*, tom 63, pp. 2038-2042, 1991.
- [245] M. Ryvolova, V. Adam, T. Eckschlager, M. Stiborova i R. Kizek, „Study of DNA-ellipticine interaction by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection,” *Electrophoresis*, tom 33, pp. 1545-1549, 2012.
- [246] J.-F. Wu, L.-X. Chen, G.-A. Luo, Y.-S. Liu, Y.-M. Wang, Z.-H. Jiang, „Interaction study between double-stranded DNA and berberine using capillary zone electrophoresis,” *Journal of Chromatography B*, tom 833, pp. 158-164, 2006.
- [247] F. Araya, G. Huchet, I. McGroarty, G. G. Skellern i R. D. Waigh, „Capillary electrophoresis for studying drug–DNA interactions,” *Methods*, tom 42, pp. 141-149, 2007.
- [248] X. He, D. Li, A. Liang i B. Lin, „Interaction between netropsin and double-stranded DNA in capillary zone electrophoresis and affinity capillary electrophoresis,” *Journal of Chromatography A*, tom 982, pp. 285-291, 2002.
- [249] M. Paul i V. Murray, „Use of an automated capillary DNA sequencer to investigate the interaction of cisplatin with telomeric DNA sequences,” *Biomedical Chromatography*, tom 26, pp. 350-354, 2012.
- [250] L. H. Pope, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler i P. M. Williams, „Probing DNA duplex formation and DNA-drug interactions by the quartz crystal microbalance technique,” *Langmuir*, tom 17, pp. 8300-8304, 2001.
- [251] L. Tian, W. Wei i Y. Mao, „Kinetic studies of the interaction between antitumor antibiotics and DNA using quartz crystal microbalance,” *Clinical Biochemistry*, tom 37, pp. 120-127, 2004.
- [252] Z. Liu, S. Tan, Y. Zu, Y. Fu, R. Meng i Z. Xing, „The interactions of cisplatin and DNA studied by atomic force microscopy,” *Micron*, tom 41, pp. 833-839, 2010.
- [253] L. H. Pope, M. C. Davies, C. A. Laughton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler i P. M. Williams, „Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure,” *Journal of Microscopy*, tom 199, pp. 68-78, 2000.
- [254] A. A. Hoffmann, S. L. P. Dias, J. R. Rodrigues, F. A. Pavan, E. V. Benvenuti i E. C. Lima, „Methylene blue immobilized on cellulose acetate with titanium dioxide: an application as sensor for ascorbic acid,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, tom 19, pp. 943-949, 2008.
- [255] „Alibaba.com,” Shenyang Xin Guang Chemical Factory, [Online]:

http://sychem.en.alibaba.com/product/503542878-213385995/Methylthionine_chloride.html.

- [256] „Karta danych bezpieczeństwa - Błękit metylenowy,” Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, 2003.
- [257] A. Slater, „Wikipedia, Wolna Encyklopedia,” 22 październik 2008. [Online]: http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Plik:Reflections_in_a_flask_of_Methylene_Blue.jpg&filetimestamp=20101004211620.
- [258] „Karta charakterystyki substancji/preparatu - Błękit metylenowy,” POCH S.A., Gliwice, 2002.
- [259] J. Cenens i R. A. Schoonheydt, „Visible spectroscopy of methylene blue on hectorite,” *Clay and Clay Minerals*, tom 36, pp. 214-224, 1988.
- [260] M. N. Usacheva, M. C. Teichert i M. A. Biel, „The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, tom 71, pp. 87-98, 2003.
- [261] O. Yazdani, M. Irandoust, J. B. Ghasemi i S. Hooshmand, „Thermodynamic study of the dimerization equilibrium of methylene blue, methylene green and thiazole orange at various surfactant concentrations and different ionic strengths and in mixed solvents by spectral titration and chemometric analysis,” *Dyes and Pigments*, tom 92, pp. 1031-1041, 2012.
- [262] R. A. Floyd, J. E. Schneider i D. P. Dittmer, „Methylene blue photoactivation of RNA viruses,” *Antiviral Research*, tom 61, pp. 141-151, 2004.
- [263] J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielii, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. D. F. Turchiello i M. S. Baptista, „Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications,” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, tom 2, pp. 175-191, 2005.
- [264] E. M. Tuite i J. M. Kelly, „New trends in photobiology: Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrate,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, tom 21, pp. 103-124, 1993.
- [265] Y. Wang i A. Zhou, „Spectroscopic studies on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramolecular systems,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, tom 190, pp. 121-127, 2007.
- [266] A. Palinska, A. Grodzka, E. Elzanowska, B. Kepska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz i M. Maj-Zurawska, „Methylene blue interactions with chromosomal and plasmid DNA on screen-printed carbon electrodes,” *Electroanalysis*, tom 22, pp. 1306-1313, 2010.
- [267] E. Farjami, L. Clima, K. V. Gothelf i E. E. Ferapontova, „DNA interactions with a methylene blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific,” *Analyst*, tom 135, pp. 1443-1448, 2010.
- [268] Y. Zhang i N. Hu, „Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induces by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe,” *Electrochemistry Communications*, tom 9, pp. 35-41, 2007.
- [269] S. O. Kelley i J. K. Barton, „Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode,” *Bioconjugate Chemistry*, tom 8, pp. 31-37, 1997.
- [270] P. de-los-Santos Álvarez, P. Rodríguez-Granda, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres i P. Tuñón-Blanco, „New scheme for electrochemical detection of DNA based on electrocatalytic oxidation of NADH,” *Electrochemistry Communications*, tom 5, pp. 267-271, 2003.
- [271] S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault i H.-A. Tajmir-Riahi, „Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue,” *Journal of Molecular Structure*, tom 827, pp. 35-43, 2007.
- [272] A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, U. S. Akarca i M. Ozsoz, „Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus,” *Analytica Chimica Acta*, tom 422, pp. 138-149, 2000.
- [273] M. Enescu, B. Levy i V. Gheorghe, „Molecular dynamics simulation of methylene blue-guanine complex in water: the role of solvent in stacking,” *Journal of Physical Chemistry B*, tom 104, pp. 1073-1077, 2000.
- [274] A. Erdem, K. Kerman, Meric B i M. Ozsoz, „Methylene blue as a novel electrochemical

- hybridization indicator," *Electroanalysis*, tom 13, pp. 219-223, 2001.
- [275] P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, A. Erdem, Z. Ozkan i M. Ozsoz, „Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA," *Electrochemistry Communications*, tom 4, pp. 705-709, 2002.
- [276] E. Tuite i B. Norden, „Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA: a spectroscopic study," *Journal of American Chemical Society*, tom 116, pp. 7548-7556, 1994.
- [277] Z. Hu i C. Tong, „Synchronous fluorescence determination of DNA based on the interaction between methylene blue and DNA," *Analytica Chimica Acta*, tom 587, pp. 187-193, 2007.
- [278] M. Ortiz, A. Fragoso, P. J. Ortiz i C. K. O'Sullivan, „Elucidation of the mechanism of single-stranded DNA interaction with methylene blue: a spectroscopic approach," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, tom 218, pp. 26-32, 2011.
- [279] N. Zhu, A. Zhang, Q. Wang, P. He i Y. Fang, „Electrochemical detection of DNA hybridization using methylene blue and electro-deposited zirconia thin films on gold electrodes," *Analytica Chimica Acta*, tom 510, pp. 163-168, 2004.
- [280] W. Yang, M. Ozsoz, D. B. Hibbert i J. J. Gooding, „Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-modified carbon paste electrode," *Electroanalysis*, tom 14, pp. 129-1302, 2002.
- [281] D. Ozkan, P. Kara, K. Kerman, B. Meric, A. Erdem, F. Jelen, P. E. Nielsen i M. Ozsoz, „DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label," *Bioelectrochemistry*, tom 58, pp. 119-126, 2002.
- [282] S. N. Kassam i A. J. Rainbow, „Deficient base excision repair of oxidative DNA damage induced by methylene blue plus visible light in xeroderma pigmentosum group C fibroblasts," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 359, pp. 1004-1009, 2007.
- [283] R. A. Floyd, M. S. West, K. L. Eneff i J. E. Schneider, „Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, tom 273, pp. 106-111, 1989.
- [284] H. Ju, J. Zhou, C. Cai i H. Chen, „The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode," *Electroanalysis*, tom 7, pp. 1165-1170, 1995.
- [285] E. Barou, M. Bouvet, O. Heintz i R. Meunier-Prest, „Electrochemistry of methylene blue at an alkanethiol modified electrode," *Electrochimica Acta*, tom 75, pp. 387-392, 2012.
- [286] F. S. Damos, R. C. S. Luz i L. T. Kubota, „Study of poly(methylene blue) ultrathin films and its properties by electrochemical surface plasmon resonance," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 581, pp. 231-240, 2005.
- [287] A. A. Karyakin, A. K. Strakhova, E. E. Karyakina, S. D. Varfolomeyev i A. K. Yatsimirsky, „The electrochemical polymerization of methylene blue and bioelectrochemical activity of the resulting film," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, tom 32, pp. 35-43, 1993.
- [288] Y. Dilgin, D. G. Dilgin, Z. Dursun, H. I. Gökçel, D. Gligor, B. Bayrak i B. Ertek, „Photoelectrocatalytic determination of NADH in a flow injection system with electropolymerized methylene blue," *Electrochimica Acta*, tom 56, pp. 1138-1143, 2011.
- [289] K.-C. Lin, C.-Y. Yin i S.-M. Chen, „An electrochemical biosensor for determination of hydrogen peroxide using nanocomposite of poly(methylene blue) and FAD hybrid film," *Sensors and Actuators B*, tom 157, pp. 202-210, 2011.
- [290] J. Liu i S. Mu, „The electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue," *Synthetic Metals*, tom 107, pp. 159-165, 1999.
- [291] D. D. Schlereth i A. A. Karyakin, „Electropolymerization of phenothiazine, phenoxazine and phenazine derivatives: characterization of the polymers by UV-visible difference spectroelectrochemistry and Fourier transform IR spectroscopy," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 395, pp. 221-232, 1995.
- [292] G.-C. Zhao, J.-J. Zhu, J.-J. Zhang i H.-Y. Chen, „Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of beta-cyclodextrin," *Analytica Chimica Acta*, tom 394, pp. 337-344, 1999.
- [293] K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, B. Meric, J. J. Gooding i M. Ozsoz, „Voltammetric determination

- of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes," *Analytica Chimica Acta*, tom 462, pp. 39-47, 2002.
- [294] H. F. Teh, H. Gong, X.-D. Dong, X. Zeng, A. L. K. T. Tan, X. Yang i S. N. Tan, „Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface,” *Analytica Chimica Acta*, tom 551, pp. 23-29, 2005.
- [295] A. J. Wain i F. Zhou, „Scanning electrochemical microscopy imaging of DNA microarrays using methylene blue as a redox-active intercalator,” *Langmuir*, tom 24, pp. 5155-5160, 2008.
- [296] D. Pan, X. Zuo, Y. Wan, L. Wang, J. J. Zhang, S. Song i C. Fan, „Electrochemical interrogation of interactions between surface confined DNA and methylene blue,” *Sensors*, tom 7, pp. 2671-2680, 2007.
- [297] F. Yan, A. Erdem, B. Meric, K. Kerman, M. Ozsoz i O. A. Sadik, „Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species,” *Electrochemistry Communications*, tom 3, pp. 224-228, 2001.
- [298] J. Chen, J. ZHANG, K. Wang, X. Lin, L. Huang i G. Chen, „Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene using locked nucleic acids on 4-aminobenzenesulfonic acid-modified glassy carbon electrode,” *Analytical Chemistry*, tom 80, pp. 8028-8034, 2008.
- [299] Y. Jin, X. Yao, Q. Liu i J. Li, „Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 22, pp. 1126-1130, 2007.
- [300] H. Ma, Q. Zhuo i B. Wang, „Electro-catalytic degradation of methylene blue wastewater assisted by Fe₂O₃-modified kaolin,” *Chemical Engineering Journal*, tom 155, pp. 248-253, 2009.
- [301] P. A. R. Tafulo, R. B. Queirós i G. González-Aguilar, „On the “concentration-driven” methylene blue dimerization,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, tom 73, pp. 295-300, 2009.
- [302] C. Tong, Z. Hu i J. Wu, „Interaction between methylene blue and calf thymus deoxyribonucleic acid by spectroscopic technologies,” *Journal of Fluorescence*, tom 20, pp. 261-267, 2010.
- [303] Mudasir, E. T. Wahyuni, D. T. Tjahjono, N. Yoshioka i H. Inoue, „Spectroscopic studies on the thermodynamic and thermal denaturation of the ct-DNA binding of methylene blue,” *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, tom 77, pp. 528-534, 2010.
- [304] A. Di Marco, M. Gaetani, B. Orezzi, B. M. Scarpinato, M. Silverstrini, M. Soldati, T. Dasdia i L. Valentini, „'Daunomycin', a new antibiotic of the rhodomycin group,” *Nature*, tom 201, pp. 706-707, 1964.
- [305] M. Dubost, P. Ganter, R. Maral, L. Ninet, S. Pinnert, J. Preud'homme i G. H. Werner, „Rubidomycin: a new antibiotic with cytostatic properties,” *Cancer Chemotherapy Reports*, tom 41, pp. 35-45, 1964.
- [306] T. Korzybski, Z. Kowszyk-Gindifer i W. Kuryłowicz, *Antybiotyki. Pochodzenie, rodzaje i właściwości* tom I, Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1977.
- [307] A. Szuławska i M. Czyż, „Molekularne mechanizmy działania antracyklin,” *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, tom 60, pp. 78-100, 2006.
- [308] „Daunorubicin - Compound Summary,” PubChem, National Center for Biotechnology Information - NCBI, [Online]: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=30323#x27>.
- [309] „Doxorubicin - Compound Summary,” PubChem, National Center for Biotechnology Information - NCBI, [Online]: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=31703#x27>.
- [310] „A.H.A International Co., Ltd.,” Alibaba.com, [Online]: http://ahaint.en.alibaba.com/product/282579033-210402123/Adriamycin_Doxorubicin_.html.
- [311] „The drug substance manufacturing,” Synbias Pharma, [Online]: <http://synbiaspharma.com/index-4.html>.
- [312] D. S. Richardson i S. A. Johnson, „Anthracyclines in hematology: preclinical studies, toxicity

- and delivery systems," *Blood Reviews*, tom 11, pp. 201-223, 1997.
- [313] D. A. Gewirtz, „A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumour effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin," *Biochemical Pharmacology*, tom 57, pp. 727-741, 1999.
- [314] J. A. P. Piedade, I. R. Fernandes i A. M. Oliveira-Brett, „Electrochemical sensing of DNA-adriamycin interactions," *Bioelectrochemistry*, tom 56, pp. 81-83, 2002.
- [315] C. Cullinane, S. M. Cutts, C. Panousis i D. R. Phillips, „Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells," *Nucleic Acids Research*, tom 28, pp. 1019-1025, 2000.
- [316] N. Ashley i J. Poulton, „Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracyclines drugs," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 378, pp. 450-455, 2009.
- [317] M. Gorczyca, „Chemioterapia chorób nowotworowych. Leki przeciwnowotworowe," w *Chemia leków*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1999, pp. 703-731.
- [318] C. M. Nunn, L. Van Meervelt, S. Zhang, M. H. Moore i O. Kennard, „DNA-drug interactions: the crystal structures of d(TGTACA) and d(TGATCA) complexed with daunomycin," *Journal of Molecular Biology*, tom 222, pp. 167-177, 1991.
- [319] X. Zhao, D. Lu, S. Jiang, C. Mao, Y. Fan, C. An i Z. Li, „Interaction between intercalation type anticancer drugs and DNA studied by ultraviolet resonance Raman spectroscopy," *Science in China*, tom 38, pp. 555-563, 1995.
- [320] V. H. DuVernay, Jr., J. A. Pachter i S. T. Crooke, „Deoxyribonucleic acid binding studies on several new anthracyclines antitumour antibiotics. Sequence preference and structure-activity relationships of marcellomycin and its analogues as compared to adriamycin," *Biochemistry*, tom 18, pp. 4024-4030, 1979.
- [321] A. Wochner, M. Menger, D. Orgel, B. Cech, M. Rimmele, V. A. Erdmann i J. Glöcker, „A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines," *Analytical Biochemistry*, tom 373, pp. 34-42, 2008.
- [322] D. R. Phillips, A. Di Marco i F. Zunino, „The interaction of daunomycin with polydeoxynucleotides," *European Journal of Biochemistry*, tom 85, pp. 487-492, 1978.
- [323] P. Agrawal, S. K. Barthwal, G. Govil i R. Barthwal, „Studies on the interaction of adriamycin with d(TGATCA)₂ by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, time-resolved fluorescence measurement, diffusion ordered spectroscopy followed by structural refinement using restrained molecular dynamics approach," *Journal of Molecular Structure*, tom 932, pp. 67-83, 2009.
- [324] R. Barthwal, U. Sharma, S. Srivastava, M. Jain, P. Awashti, M. Kaur, S. K. Barthwal i G. Govil, „Structure of daunomycin complexed to d-TGATCA by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy," *European Journal of Medicinal Chemistry*, tom 41, pp. 27-39, 2006.
- [325] J. B. Chaires, J. E. Herrera i M. J. Waring, „Preferential binding of daunomycin to 5'ATCG and 5'ATGC sequences revealed by footprinting titration experiments," *Biochemistry*, tom 29, pp. 6145-6153, 1990.
- [326] A. M. Oliveira-Brett, M. Vivan, i R. Fernandes i J. A. P. Piedade, „Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA," *Talanta*, tom 56, pp. 959-970, 2002.
- [327] J. Wang, M. S. Lin i V. Villa, „Adsorptive stripping voltammetric determination of low levels of daunorubicin," *Analyst*, tom 112, pp. 1303-1307, 1987.
- [328] Š. Komorsky-Lovrić, „Redox kinetics of adriamycin adsorbed on the surface of graphite and mercury electrodes," *Bioelectrochemistry*, tom 69, pp. 82-87, 2006.
- [329] A. M. Oliveira-Brett, J. A. P. Piedade i A.-M. Chiorcea, „Anodic voltammetry and AFM imaging of picomoles of adriamycin adsorbed onto carbon surfaces," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 538-539, pp. 267-276, 2002.
- [330] X. Chu, G.-L. Shen, J.-H. Jiang, T.-F. Kang, B. Xiong i Yu R.-Q, „Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications," *Analytica Chimica Acta*, tom 373, pp. 29-38, 1998.
- [331] J. Hui i X.-M. Wang, „Highly sensitive detection of daunorubicin based on carbon nanotubes-drug supramolecular interaction," *Electrochemistry Communications*, tom 11, pp. 126-129,

2009.

- [332] Y. Yang, Z. Wang, M. Yang, J. Li, F. Zheng, G. Shen i R. Yu, „Electrical detection of deoxyribonucleic acid hybridization based on carbon-nanotubes/nano zirconium dioxide/chitosan-modified electrodes,” *Analytica Chimica Acta*, tom 584, pp. 268-274, 2007.
- [333] G.-F. Cheng, J. Zhao, Y.-H. Tu, P.-G. He i Y.-Z. Fang, „Study of the interaction between antitumour drug daunomycin and DNA,” *Chinese Journal of Chemistry*, tom 23, pp. 576-580, 2005.
- [334] A. M. Oliveira-Brett, A. M. Chiorcea Paquim, V. C. Diculescu i J. A. P. Piedade, „Electrochemistry of nanoscale DNA surface films on carbon,” *Medical Engineering and Physics*, tom 28, pp. 963-970, 2006.
- [335] M. Mascini, I. Palchetti i G. Marrazza, „DNA electrochemical biosensors,” *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, tom 369, pp. 15-22, 2001.
- [336] G. Marrazza, I. Chianella i M. Mascini, „Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 14, pp. 43-51, 1999.
- [337] H. Cai, X. Cao, Y. Jiang, P. He i Y. Fang, „Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, tom 375, pp. 287-293, 2003.
- [338] X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye i Y. Fang, „Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor application,” *Talanta*, tom 47, pp. 487-495, 1998.
- [339] N. Zhu, Z. Chang, P. He i Y. Fang, „Electrochemical DNA biosensors based on platinum nanoparticles combined carbon nanotubes,” *Analytica Chimica Acta*, tom 545, pp. 21-26, 2005.
- [340] H. Laatsch i S. Fotso, „Naturally occurring anthracyclines,” *Topics in Current Chemistry*, tom 282, pp. 3-74, 2008.
- [341] D. Depan i R. D. K. Misra, „Hybrid nanostructured drug carrier with tunable and controlled drug release,” *Materials Science and Engineering: C*, tom 32, pp. 1704-1709, 2012.
- [342] M. Than Htun, „Photophysical study on daunorubicin by fluorescence spectroscopy,” *Journal of Luminescence*, tom 129, pp. 344-348, 2009.
- [343] A. Das, K. Bhadra, B. Achari, P. Chakraborty i G. S. Kumar, „Interaction of aristololactam- β -D-glucoside and daunomycin with poly(A): spectroscopic and calorimetric studies,” *Biophysical Chemistry*, tom 155, pp. 10-19, 2012.
- [344] G. Zagotto, B. Gatto, S. Moro, C. Sissi i M. Palumbo, „Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation,” *Journal of Chromatography B*, tom 764, pp. 161-171, 2001.
- [345] G. Madej, Chemoterapia onkologiczna dzieci i dorosłych, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
- [346] F. Zunino, G. Pratesi i P. Perego, „Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthracyclines: development of a novel series of disaccharide analogs,” *Biochemical Pharmacology*, tom 61, pp. 933-938, 2001.
- [347] B. Jollès, A. Laigle, W. Priebe i A. Garnier-Suillerot, „Comparison of DNA sequence selectivity of anthracycline antibiotics and their 3'-hydroxylated analogs,” *Chemico-Biological Interactions*, tom 100, pp. 165-176, 1996.
- [348] C. Temperini, M. Cirilli, M. Aschi i G. Ughetto, „Role of amino sugar in the DNA binding of disaccharide anthracyclines: crystal structure of the complex MAR70/d(CGATCG),” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, tom 13, pp. 1673-1679, 2005.
- [349] C. Kelso, V. Tillott, J. D. Rojas, R. L. A. Furlan, G. Padilla i J. L. Beck, „Mass spectrometric investigation of the DNA-binding properties of an anthracycline with two trisaccharide chains,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, tom 477, pp. 348-355, 2008.
- [350] H. Tayeb-Bel Haj, M. Salerno, W. Priebe, H. Kozłowski i A. Garnier-Suillerot, „New findings in the study on the intercalation of bisdaunorubicin and its monomeric analogues with naked and nucleus DNA,” *Chemico-Biological Interactions*, tom 145, pp. 349-358, 2003.
- [351] I. Oszczapowicz, M. Wąsowska, J. Oszczapowicz, E. Dominiczak, A. Owoc, A. Opolski i J.

- Wietrzyk, „Nowe pochodne antybiotyków antrycynowych, sposób ich wytwarzania, zawierający je środek farmaceutyczny i ich zastosowanie”. Polska Patent 381387, 2005.
- [352] E. Ciesielska, K. Studzian, M. Wąsowska, I. Oszczapowicz i L. Szmigiero, „Cytotoxicity, cellular uptake and DNA damage by daunorubicin and its new analogues with modified daunosamine moiety,” *Cell Biology and Toxicology*, tom 21, pp. 139-147, 2005.
- [353] M. Wasowska, I. Oszczapowicz, J. Wietrzyk, A. Opolski, J. Madej, S. Dzimira i J. Oszczapowicz, „Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties,” *Anticancer Research*, tom 25, pp. 2043-2048, 2005.
- [354] M. Wasowska, J. Wietrzyk, A. Opolski, J. Oszczapowicz i I. Oszczapowicz, „Effect of structural modifications of anthracyclines on the ability to overcome drug resistance of cancer cells,” *Anticancer Research*, tom 26, pp. 2009-2012, 2006.
- [355] M. Czyz, A. Szulawska, A. K. Bednarek i M. Döchler, „Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation,” *Biochemical Pharmacology*, tom 70, pp. 1431-1442, 2005.
- [356] J. Jakubowska, M. Wasowska-Lukawska i M. Czyz, „STI1571 and morpholine derivative of doxorubicin collaborate in inhibition of K562 cell proliferation by inducing differentiation and mitochondrial pathway of apoptosis,” *European Journal of Pharmacology*, tom 596, pp. 41-49, 2008.
- [357] K. Studzian, M. Wąsowska, M. K. Piestrzeniewicz, D. Wilmańska, L. Szmigiero, I. Oszczapowicz i M. Gniazdowski, „Inhibition of RNA synthesis in vitro and cell growth by anthracycline antibiotics,” *Neoplasma*, tom 48, pp. 412-418, 2004.
- [358] A. Szulawska, M. Gniazdowski i M. Czyz, „Sequence specificity of formaldehyde-mediated covalent binding of anthracycline derivatives to DNA,” *Biochemical Pharmacology*, tom 69, pp. 7-18, 2005.
- [359] M. K. Piestrzeniewicz, D. Wilmańska, J. Szemraj, K. Studzian i M. Gniazdowski, „Interactions of novel morpholine and hexamethylene derivatives of anthracycline antibiotics with DNA,” *Zeitschrift für Naturforschung*, tom 59, pp. 739-748, 2004.
- [360] J. Pawłowska, J. Tarasiuk, E. Borowski, M. Wąsowska, I. Oszczapowicz i C. R. Wolf, „The ability of new formamidine sugar-modified derivatives of daunorubicin to stimulate free radical formation in three enzymatic systems: NADH dehydrogenase, NADPH cytochrome P450 and xanthine oxidase,” *Acta Biochimica Polonica*, tom 47, pp. 141-147, 2000.
- [361] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst i G. S. Wilson, „International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical Chemistry Division, Analytical Chemistry Division, Commission V.5, Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification, Synopsis of the report,” *Sensors and Actuators B*, tom 30, p. 81, 1996.
- [362] J. J. Gooding, „Electrochemical DNA hybridization biosensors,” *Electroanalysis*, tom 14, pp. 1149-1156, 2002.
- [363] J. Wang, „Towards genelectronics: electrochemical biosensing of DNA hybridization,” *Chemistry - A European Journal*, tom 5, pp. 1681-1685, 1999.
- [364] M. Fojta, „Electrochemical sensors for DNA interactions and damage,” *Electroanalysis*, tom 14, pp. 1449-1463, 2002.
- [365] P. de-los-Santos-Álvarez, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres i P. Tuñón-Blanco, „Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, tom 378, pp. 104-118, 2004.
- [366] J. Wang, „Electrochemical DNA biosensors,” w *Electroanalytical methods for biological materials*, New York, Basel, Marcel Dekker, Inc., 2002, pp. 27- 41.
- [367] M. I. Pividori, A. Merkoçi i S. Alegret, „Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 15, pp. 291-303, 2000.
- [368] J. Wang, „Electrochemical nucleic acid biosensors,” *Analytica Chimica Acta*, tom 469, pp. 63-71, 2002.
- [369] A.-M. Chiorcea i A. M. Oliveira-Brett, „Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA-biosensor,” *Bioelectrochemistry*, tom 63, pp. 229-232, 2004.

- [370] A. Ramanaviciene i A. Ramanavicius, „Pulsed amperometric detection of DNA with an ssDNA/polypyrrole-modified electrode,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, tom 379, pp. 287-293, 2004.
- [371] A. Tiwari i S. Gong, „Electrochemical detection of a breast cancer susceptible gene using cDNA immobilized chitosan-co-polyaniline electrode,” *Talanta*, tom 77, pp. 1217-1222, 2009.
- [372] J. Galandová i J. Labuda, „Polymer interfaces used in electrochemical DNA-based biosensors,” *Chemical Papers*, tom 63, pp. 1-14, 2009.
- [373] I. Mannelli, M. Minunni, S. Tombelli, R. Wang, M. M. Spiriti i M. Mascini, „Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors,” *Bioelectrochemistry*, tom 66, pp. 129-138, 2005.
- [374] M. E. Napier i H. H. Thorp, „Modification of electrodes with dicarboxylate self-assembled monolayers for attachment and detection of nucleic acids,” *Langmuir*, tom 13, pp. 6342-6344, 1997.
- [375] M. Guo, J. Chen, D. Liu, L. Nie i S. Yao, „Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes,” *Bioelectrochemistry*, tom 62, pp. 29-35, 2004.
- [376] A. M. Oliveira-Brett, „DNA-based biosensors,” w *Biosensors and modern biospecific analytical techniques, Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 44*, Amsterdam, Elsevier B.V., 2005, pp. 179-207.
- [377] C. Teijeiro, E. de la Red i D. Marín, „Electrochemical analysis of anthramycin: hydrolysis, DNA-interactions and quantitative determination,” *Electroanalysis*, tom 12, pp. 963-968, 2000.
- [378] F. Wang, Y. Wu, J. Liu i B. Ye, „DNA Langmuir-Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determinate of methotrexate,” *Electrochimica Acta*, tom 54, pp. 1408-1413, 2009.
- [379] J. Xu, J.-J. Zhu, Y. Zhu, K. Gu i H.-Y. Chen, „A novel biosensor of DNA immobilization on nano-gold modified ITO for the determination of mifepristone,” *Analytical Letters*, tom 34, pp. 503-512, 2001.
- [380] E. Paleček, R. Kizek, L. Havran, S. Billova i M. Fojta, „Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor,” *Analytica Chimica Acta*, tom 469, pp. 78-83, 2002.
- [381] H. Ju, Y. Ye i Y. Zhu, „Interaction between Nile blue and immobilized single- or double-stranded DNA and its application in electrochemical recognition,” *Electrochimica Acta*, tom 50, pp. 1361-1367, 2005.
- [382] F. Lucarelli, A. Kicela, I. Palchetti, G. Marrazza i M. Mascini, „Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples,” *Bioelectrochemistry*, tom 58, pp. 113-118, 2002.
- [383] H. Karadeniz, B. Gulmez, F. Sahinci, A. Erdem, G. I. Kaya, N. Unver, B. Kivcak i M. Ozsoz, „Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 33, pp. 295-302, 2003.
- [384] H. Heli, S. Z. Bathaie i M. F. Mousavi, „An electrochemical study of neutral red-DNA interaction,” *Electrochimica Acta*, tom 51, pp. 1108-1116, 2005.
- [385] K. Hashimoto, K. Ito i Y. Ishimori, „Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA,” *Sensors and Actuators B*, tom 46, pp. 220-225, 1998.
- [386] A. Kowalczyk, A. M. Nowicka, R. Jurczakowski, P. Niedziałkowski, T. Ossowski i Z. Stojek, „New anthraquinone derivatives as electrochemical redox indicators for the visualization of the DNA hybridization process,” *Electroanalysis*, tom 22, pp. 49-59, 2010.
- [387] X.-H. Fu, „Electrochemical measurements of DNA hybridization using nanosilver as label and horseradish peroxidase as enhancer,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, tom 31, pp. 69-73, 2008.
- [388] C. Berggren, P. Stålhandske, J. Brundell i G. Johansson, „A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridization,” *Electroanalysis*, tom 11, pp. 156-160, 1999.
- [389] F. Lucarelli, I. Palchetti, G. Marrazza i M. Mascini, „Electrochemical DNA biosensor as a

- screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples," *Talanta*, tom 56, pp. 949-957, 2002.
- [390] „Historia sitodruku,” Centrum Informacji Sitodrukowej, [Online]: <http://www.sitodruk.pl/>.
- [391] „Sitodruk,” [magia.reklamy.pl](http://www.magiareklamy.pl), [Online]: http://www.magiareklamy.pl/zdobienia_nadruki.html.
- [392] „Andy Warhol's Marilyn Prints,” *Color Vision and Art*, [Online]: <http://www.webexhibits.org/colorart/marilyns.html>.
- [393] L. Casagrande, M. Friboulet, A. Nouet i J. Vignaud, „La société de consommation à travers ces deux mouvements artistiques,” *Popart & nouveau réalisme*, [Online]: <http://popartnouvreal.free.fr/andy.html>.
- [394] J. Dziak (tłumacz), *Sitodruk, część I*, Warszawa: Inter Commerce - Poligrafia Sp. z o. o., 1993.
- [395] „Sitodruk,” [naukowy.pl](http://www.naukowy.pl), [Online]: <http://www.naukowy.pl/encyklo.php?title=Sitodruk>.
- [396] „Sitodruk,” *Pracownia sita*, 10 maj 2011. [Online]: http://pracowniasita.blogspot.com/2011_05_01_archive.html.
- [397] „Uruchomienie doświadczalnej linii dla realizacji prac badawczych i opracowania technologii wytwarzania mikroukładów LTCC,” Instytut Technologii Elektronowej, 30 wrzesień 2008. [Online]: <http://www.ite.waw.pl/pl/wiadomosc.php?klawisz=1000006>.
- [398] „Realizacje,” *Sitodruk Magda. Nadruki Reklama*, [Online]: <http://www.magda-nadruki.pl/?realizacje,17>.
- [399] J. P. Metters, R. O. Kadara i C. E. Banks, „New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments,” *Analyst*, tom 136, pp. 1067-1076, 2011.
- [400] „Electrodes, Transducers & Accessories,” eDAQ, [Online]: http://www.edaq.com/electrodes_transducers_accessories.php.
- [401] „More “Work-in-Solution” Screen-Printed Electrodes,” DropSens, [Online]: http://www.dropsens.com/en/newsletters/2009/dropsens_december_news.htm.
- [402] „Probes & Electrodes,” Uniscan instruments, [Online]: <http://www.uniscan.com/electrochemical-accessories/probes-electrodes/>.
- [403] „Customize,” Quasense, [Online]: <http://www.quasense.co.th/322188/customize>.
- [404] „Products,” Electrochemical Methods Laboratory, The Karyakin Group, [Online]: <http://analyt.chem.msu.ru/electrochemistry/karyakin/rusenseng.html>.
- [405] „Screen Printed Electrodes (Carbon),” Pine Researchers Instrumentation, [Online]: <http://www.pineinst.com/echem/viewproduct.asp?ID=46564>.
- [406] I. Palchetti, M. Mascini, M. Minunni, A. R. Bilia i F. F. Vincieri, „Disposable electrochemical sensor for rapid determination of heavy metals in herbal drugs,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, tom 32, pp. 251-256, 2003.
- [407] A. Morrin, A. J. Killard i M. R. Smyth, „Electrochemical characterization of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes,” *Analytical Letters*, tom 36, pp. 2021-2039, 2003.
- [408] J. Wang, B. Tian, V. B. Nascimento i L. Angnes, „Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated with different carbon inks,” *Electrochimica Acta*, tom 43, pp. 3459-3465, 1998.
- [409] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernia i A. Costa-García, „Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes,” *Electrochimica Acta*, tom 53, pp. 3635-3642, 2008.
- [410] O. Dominguez Renedo, M. A. Alonso-Lomillo i M. J. Arcos Martínez, „Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications,” *Talanta*, tom 73, pp. 202-219, 2007.
- [411] J. Krejčí, J. Prášek, L. Fajcik, S. Khatib, E. Hejátková, L. Jakubka i L. Giannoudi, „Screen-printed sensors with graphite electrodes - comparison of properties and physical method of sensitivity enhancement,” *Microelectronics International*, tom 21, pp. 20-24, 2004.
- [412] B. Šljukić, N. A. Malakhova, K. Z. Brainina, C. E. Banks i R. G. Compton, „Screen printed electrodes and screen printed modified electrodes benefit from insonation,” *Electroanalysis*,

tom 18, pp. 928-930, 2006.

- [413] M. Pravda, C. O'Meara i G. G. Guilbault, „Polishing of screen-printed electrodes improves IgG adsorption,” *Talanta*, tom 54, pp. 887-892, 2001.
- [414] H. Wei, J.-J. Sun, Y. Xie, C.-G. Lin, Y.-M. Wang, W.-H. Yin i G.-N. Chen, „Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure,” *Analytica Chimica Acta*, tom 588, pp. 297-303, 2007.
- [415] M. Diaz-González, C. Fernández-Sánchez i A. Costa-García, „Comparative voltammetric behavior of indigo carmine at screen-printed carbon electrodes,” *Electroanalysis*, tom 14, pp. 665-670, 2002.
- [416] A. Cagnini, I. Palchetti, I. Lioni, M. Mascini i A. P. F. Turner, „Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides biosensors,” *Sensors and Actuators B*, tom 24-25, pp. 85-89, 1995.
- [417] I. Palchetti, A. Cagnini, M. Mascini i A. P. F. Turner, „Characterisation of screen-printed electrodes for detection of heavy metals,” *Microchimica Acta*, tom 131, pp. 65-73, 1999.
- [418] A. Schmidt, I. Rohm, P. Rüger, W. Weise i U. Bilitewski, „Application of screen printed electrodes in biochemical analysis,” *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, tom 349, pp. 607-612, 1994.
- [419] K. Elmorsy, H. N. A. Hassan i R. Metelka, „Chitosan modified screen-printed carbon electrode for sensitive analysis of heavy metals,” *International Journal of Electrochemical Science*, tom 5, pp. 158-167, 2010.
- [420] P. Masawat i J. M. Slater, „The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE),” *Sensors and Actuators B*, tom 124, pp. 127-132, 2007.
- [421] M. Trojanowicz, A. Mulchandani i M. Mascini, „Carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes for chemical sensors and biosensors,” *Analytical Letters*, tom 37, pp. 3185-3204, 2004.
- [422] M. Tudorache i C. Bala, „Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, tom 388, pp. 565-578, 2007.
- [423] J. Labuda, M. Bučková, S. Jantová, I. Štěpánek, I. Surugiu, B. Danielsson i M. Mascini, „Modified screen-printed electrodes for the investigation of the interaction of non-electroactive quinazoline derivatives with DNA,” *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, tom 367, pp. 364-368, 2000.
- [424] G. Chiti, G. Marrazza i M. Mascini, „Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring,” *Analytica Chimica Acta*, tom 427, pp. 155-164, 2001.
- [425] L. D. Mello, S. Hernandez, G. Marrazza, M. Mascini i L. T. Kubota, „Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 21, pp. 1374-1382, 2006.
- [426] A. Huczko, Nanorurki węglowe. Czarne diamenty XX wieku, Warszawa: BEL Studio, 2004.
- [427] A. Oberlin, M. Endo i T. Koyama, „Filamentous growth of carbon through benzene decomposition,” *Journal of Crystal Growth*, tom 32, pp. 335-349, 1976.
- [428] S. Iijima, „Helical microtubules of graphitic carbon,” *Nature*, tom 354, pp. 56-58, 1991.
- [429] A. Huczko i P. Byszewski, Wiadomości chemiczne. Biblioteka. Fulereny i nanorurki węglowe, Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1998.
- [430] A. Merkoçi, „Carbon nanotubes in analytical sciences,” *Microchimica Acta*, tom 152, pp. 157-174, 2006.
- [431] G. A. Rivas, M. D. Rubianes, M. C. Rodriguez, N. F. FRerrea, G. L. Luque, M. L. Pedano, S. A. Miscoria i C. Parrado, „Carbon nanotubes for electrochemical biosensing,” *Talanta*, tom 74, pp. 291-307, 2007.
- [432] W. Przygocki i A. Włochowicz, Fulereny i nanorurki, Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2001.
- [433] V. Choudhary i A. Gupta, „Polymer/carbon nanotube nanocomposites,” w *Carbon Nanotubes -*

- Polymer Nanocomposites*, InTech, 2011, pp. 65-90.
- [434] C. Jin, K. Suenaga i S. Iijima, „Plumbing carbon nanotubes,” *Nature Nanotechnology*, tom 3, pp. 17-21, 2008.
- [435] Y. Satio, „Atomic detail observation of adsorbed molecules and metal clusters on carbon nanotube electron emitters,” *Coordination Chemistry Reviews*, tom 253, pp. 2912-2919, 2009.
- [436] S. Daniel, T. P. Rao, K. S. Rao, S. U. Rani, G. R. K. Naidu, H.-Y. Lee i T. Kawai, „A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization,” *Sensors and Actuators B*, tom 122, pp. 672-682, 2007.
- [437] P. J. F. Harris, „A carbon nanotube page,” 20 kwiecień 2010. [Online]: <http://www.personal.reading.ac.uk/~scscharip/tubes.htm>.
- [438] J. J. Gooding, „Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: a review on electrochemistry and applications for sensing,” *Electrochimica Acta*, tom 50, pp. 3049-3060, 2005.
- [439] C. N. R. Rao, FRS i H. Craighead, *Nanotubes and nanowires*, Cambridge: RSC Publishing, 2005.
- [440] E. Zipper, „Niezwykłe właściwości nanorurek węglowych,” *Postępy Fizyki*, tom 57, pp. 114-117, 2006.
- [441] A. G. Mamalis, L. O. G. Vogtländer i A. Markopoulos, „Nanotechnology and nanostructured materials: trends in carbon nanotubes,” *Precision Engineering*, tom 28, pp. 16-30, 2004.
- [442] S. Bandov, S. Asaka, X. Zhao i Y. Ando, „Purification and magnetic properties of carbon nanotubes,” *Applied Physics A*, tom 67, pp. 23-27, 1998.
- [443] H. Hisona, „IBM researchers revealed new technological breakthrough called Nanotube,” *The Droid Guy*, 2012 październik 2012. [Online]: <http://thedroidguy.com/2012/10/ibm-researchers-revealed-new-technological-breakthrough-called-nanotube/>.
- [444] „Chi Mei displays novel CNT touch panel,” Free Press Release, 22 listopad 2010. [Online]: <http://www.free-press-release.com/news-chi-mei-displays-novel-cnt-touch-panel-1290420762.html>.
- [445] J. P. F. Harris, „Probes and Sensors,” w *Carbon Nanotube Science: Synthesis, Properties and Applications*, New York, Cambridge University Press, 2009, pp. 275-288.
- [446] W. Van Paepegem, „Composites in daily life,” HomMaCom, [Online]: http://www.composites.ugent.be/home_made_composites/composites_in_daily_life.html.
- [447] M. Trojanowicz, „Analytical applications of carbon nanotubes: a review,” *Trends in Analytical Chemistry*, tom 25, pp. 480-489, 2006.
- [448] P. He, Y. Xu i Y. Fang, „Applications of carbon nanotubes in electrochemical DNA biosensors,” *Microchimica Acta*, tom 152, pp. 175-186, 2006.
- [449] M. D. Rubianes i G. A. Rivas, „Carbon nanotubes paste electrode,” *Electrochemistry Communications*, tom 5, pp. 689-694, 2003.
- [450] F. Valentini, A. Amine, S. Orlanducci, M. L. Terranova i G. Palleschi, „Carbon nanotube purification: preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes,” *Analytical Chemistry*, tom 75, pp. 5413-5421, 2003.
- [451] J. Wang i M. Musameh, „Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors,” *Analyst*, tom 129, pp. 1-2, 2004.
- [452] W.-J. Guan, Y. Li, Y.-C. Chen, X.-B. Zhang i Q.-H. Hu, „Glucose biosensor based on multi-wall carbon nanotubes and screen printed electrodes,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 21, pp. 508-512, 2005.
- [453] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li i Z. Gu, „Electrocatalytic oxidation of norepinephrine at a glassy carbon electrode modified with single wall carbon nanotubes,” *Electoanalysis*, tom 14, pp. 225-230, 2002.
- [454] K. Gong, Y. Dong, S. Xiong, Y. Chen i L. Mao, „Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 20, pp. 253-259, 2004.
- [455] S. G. Wang, R. Wang, P. J. Sellin i Q. Zhang, „DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, tom 325, pp. 1433-1437,

2004.

- [456] K. Wu, J. Fei, W. Bai i S. Hu, „Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at a nanostructured film-modified electrode,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, tom 376, pp. 205-209, 2003.
- [457] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li i Z. Gu, „Electrochemistry of DNA at single-wall carbon nanotubes,” *Electroanalysis*, tom 16, pp. 140-144, 2004.
- [458] J. Li, Q. Liu, Y. Liu, S. Liu i S. Tao, „DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes,” *Analytical Biochemistry*, tom 346, pp. 107-114, 2005.
- [459] M. Guo, J. Chen, L. Nie i S. Yao, „Electrostatic assembly of calf thymus DNA on multi-walled carbon nanotube modified electrode and its interaction with chlorpromazine hydrochloride,” *Electrochimica Acta*, tom 49, pp. 2637-2643, 2004.
- [460] H. Jiang i X.-M. Wang, „Highly sensitive detection of daunorubicin based on carbon nanotubes-drug supramolecular interaction,” *Electrochemistry Communications*, tom 11, pp. 126-129, 2009.
- [461] K. Kerman, Y. Morita, Y. Takamura, M. Ozsoz i E. Tamiya, „DNA-directed attachment of carbon nanotubes for enhanced label-free electrochemical detection of DNA hybridization,” *Electroanalysis*, tom 16, pp. 1667-1972, 2004.
- [462] A. Merkoçi, M. Aldavert, S. Marin i S. Alegret, „New materials for electrochemical sensing V: nanoparticles for DNA labeling,” *Trends in Analytical Chemistry*, tom 24, pp. 341-350, 2005.
- [463] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler i S. R. Crouch, *Podstawy chemii analitycznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2007.
- [464] A. Cygański, *Podstawy metod elektroanalitycznych*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, 1999.
- [465] J. Barek i J. Zima, „Eighty years of polarography - history and future,” *Electroanalysis*, tom 15, pp. 467-472, 2003.
- [466] Z. Stojek, *Bioelektrochemia - wykład specjalizacyjny dla studentów studiów II stopnia*, Warszawa: Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, 2006.
- [467] R. G. Compton i C. E. Banks, *Understanding voltammetry*, London: Imperial College Press, 2011.
- [468] J. G. Osteryoung i R. A. Osteryoung, „Square wave voltammetry,” *Analytical Chemistry*, tom 57, pp. 101A-110A, 1985.
- [469] J. Osteryoung i J. J. O'Dea, „Square-wave voltammetry,” w *Electroanalytical Chemistry: A series of advances, Vol. 14*, New York, Marcel Dekker Inc., 1986, pp. 209-308.
- [470] „Unit 7 Voltammetry,” Vedyadhara Open Learning Environment, [Online]: http://vedyadhara.ignou.ac.in/wiki/images/c/ca/Unit_07-Voltammetry.pdf.
- [471] Z. Marczenko i M. Balcerzak, *Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej*, Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 1998.
- [472] Y. Ye i H. Ju, „Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 21, pp. 735-741, 2005.
- [473] H. Karadeniz, A. Erdem i A. Caliskan, „Electrochemical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbon nanotube based screen printed electrodes,” *Electroanalysis*, tom 20, pp. 1932-1938, 2008.
- [474] J. Wang, M. Musameh i Y. Lin, „Solubilization of carbon nanotubes by nafion toward the preparation of amperometric biosensors,” *Journal of American Chemical Society*, tom 125, pp. 2408-2409, 2003.
- [475] P. Fanjul-Bolado, P. Queipo, P. J. Lamas-Ardisana i A. Costa-Garcia, „Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools,” *Talanta*, tom 74, pp. 427-433, 2007.
- [476] „Multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes,” DropSens, [Online]: http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html.
- [477] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, Erensoy S, U. S. Akarca, M. Mascini i M. Ozsoz,

- „Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue,” *Talanta*, tom 56, pp. 837-846, 2002.
- [478] G. S. Bank, S. Cho i B.-G. Kim, „A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, tom 21, pp. 863-870, 2005.
- [479] J. Wang, F. Wang i S. Dong, „Methylene blue as an indicator for sensitive electrochemical detection of adenosine based on aptamer switch,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, tom 626, pp. 1-5, 2009.
- [480] J. Liu, C. Roussel, G. Lager, P. Tacchini i H. H. Girault, „Antioxidant sensors based on DNA-modified electrodes,” *Analytical Chemistry*, tom 77, pp. 7687-7694, 2005.
- [481] K. Ito, S. Inoue, K. Yamamoto i S. Kawanishi, „8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin,” *Journal of Biological Chemistry*, tom 268, pp. 13221-13227, 1993.
- [482] L. Stempkowska, M. Liga, Jasnowska J, J. Langer i M. Filipiak, „Electrochemical response of oligonucleotides in carbon paste electrode,” *Bioelectrochemistry*, tom 70, pp. 488-494, 2007.
- [483] P. Nagababu i S. Satyanarayana, „DNA binding and cleavage properties of certain ethylenediamine cobalt (III) complexes of modified 1,10-phenanthrolines,” *Polyhedron*, tom 26, pp. 1686-1692, 2007.

ZAŁĄCZNIKI

ZAŁĄCZNIK 1 – Testy statystyczne porównujące sposoby przygotowania powierzchni elektrod sitodrukowanych według procedury I i procedury IV.

GUANINA

Test F: z dwiema próbami dla wariancji

	Zmienna 1 Procedura IV	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	7,173	1,154
Wariancja	1,080	0,024
Obserwacje	30	17
df	29	16
F	45,907 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	8,77E-11	
Test F jednostronny	2,200 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje

	Zmienna 1 Procedura IV	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	7,173	1,154
Wariancja	1,080	0,024
Obserwacje	30	17
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	31	
t Stat	31,133 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	2,97E-25	
Test T jednostronny	1,696	
P(T<=t) dwustronny	5,94E-25	
Test t dwustronny	2,040 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ADENINA

Test F: z dwiema próbami dla wariancji

	Zmienna 1 Procedura IV	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	13,416	2,145
Wariancja	3,230	0,026
Obserwacje	30	17
df	29	16
F	126,67 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	3,04E-14	
Test F jednostronny	2,200 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje

	Zmienna 1 Procedura IV	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	13,416	2,145
Wariancja	3,230	0,026
Obserwacje	30	17
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	30	
t Stat	34,113 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	7,37E-26	
Test T jednostronny	1,697	
P(T<=t) dwustronny	1,47E-25	
Test t dwustronny	2,042 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 2 – Testy statystyczne porównujące sposoby przygotowania powierzchni elektrod sitodrukowanych według procedury I i procedury II.

GUANINA**Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 Procedura II	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	1,997	1,154
Wariancja	0,899	0,024
Obserwacje	25	17
df	24	16
F	38,230 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	4,75E-10	
Test F jednostronny	2,235 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje**

	Zmienna 1 Procedura II	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	1,997	1,154
Wariancja	0,899	0,024
Obserwacje	25	17
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	26	
t Stat	4,360 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	9,099E-05	
Test T jednostronny	1,706	
P(T<=t) dwustronny	1,82E-04	
Test t dwustronny	2,056 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA****Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 Procedura II	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	2,239	2,145
Wariancja	0,137	0,026
Obserwacje	25	17
df	24	16
F	5,385 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	5,32E-04	
Test F jednostronny	2,235 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje**

	Zmienna 1 Procedura II	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	2,239	2,145
Wariancja	0,137	0,026
Obserwacje	25,000	17,000
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	35	
t Stat	1,125 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,134	
Test T jednostronny	1,690	
P(T<=t) dwustronny	0,268	
Test t dwustronny	2,030 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 3 – Testy statystyczne porównujące sposoby przygotowania powierzchni elektrod sitodrukowanych według procedury I i procedury III.

GUANINA

Test F: z dwiema próbkami dla wariancji

	Zmienna 1 Procedura I	Zmienna 2 Procedura III
Średnia	1,154	1,093
Wariancja	0,024	0,020
Obserwacje	17	21
df	16	20
F	1,197 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,347	
Test F jednostronny	2,184 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbkami zakładający równe wariancje

	Zmienna 1 Procedura I	Zmienna 2 Procedura III
Średnia	1,154	1,093
Wariancja	0,024	0,020
Obserwacje	17	21
Wariancja sumaryczna	0,021	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	36	
t Stat	1,282 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,104	
Test T jednostronny	1,688	
P(T<=t) dwustronny	0,208	
Test t dwustronny	2,028 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ADENINA

Test F: z dwiema próbkami dla wariancji

	Zmienna 1 Procedura III	Zmienna 2 Procedura I
Średnia	1,875	2,145
Wariancja	0,067	0,026
Obserwacje	21	17
df	20	16
F	2,610 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,028	
Test F jednostronny	2,276 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbkami zakładający nierówne wariancje

	Zmienna 1 Procedura I	Zmienna 2 Procedura III
Średnia	2,145	1,875
Wariancja	0,026	0,067
Obserwacje	17	21
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	34	
t Stat	3,943 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	1,90E-04	
Test T jednostronny	1,691	
P(T<=t) dwustronny	3,81E-04	
Test t dwustronny	2,032 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 4 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji polskiej niemodyfikowanych i modyfikowanych mieszaniną DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA**Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja DMF-H ₂ O
Średnia	2,248	1,892
Wariancja	0,083	0,056
Obserwacje	12	6
df	11	5
F	1,482 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,349	
Test F jednostronny	4,704 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja DMF-H ₂ O
Średnia	2,248	1,892
Wariancja	0,083	0,056
Obserwacje	12	6
Wariancja sumaryczna	0,074	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	16	
t Stat	2,609 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,010	
Test T jednostronny	1,746	
P(T<=t) dwustronny	0,019	
Test t dwustronny	2,120 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA****Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja DMF-H ₂ O
Średnia	3,191	1,972
Wariancja	0,170	0,083
Obserwacje	13	6
df	12	5
F	2,050 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,221	
Test F jednostronny	4,678 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja DMF-H ₂ O
Średnia	3,191	1,972
Wariancja	0,170	0,083
Obserwacje	13	6
Wariancja sumaryczna	0,144	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	17	
t Stat	6,508 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	2,6813E-06	
Test T jednostronny	1,740	
P(T<=t) dwustronny	5,36261E-06	
Test t dwustronny	2,110 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 5 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji polskiej niemodyfikowanych i modyfikowanych zawieszoną 1 mg/ml wielościennych nanorurek węglowych sporządzoną w mieszaninie DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT
Średnia	2,248	2,416
Wariancja	0,083	0,079
Obserwacje	12	7
df	11	6
F	1,054 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,500	
Test F jednostronny	4,027 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	2,416	2,248
Wariancja	0,079	0,083
Obserwacje	7	12
Wariancja sumaryczna	0,081	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	17	
t Stat	1,240 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,116	
Test T jednostronny	1,740	
P(T<=t) dwustronny	0,232	
Test t dwustronny	2,110 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA**

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,740	3,191
Wariancja	0,363	0,170
Obserwacje	5	13
df	4	12
F	2,138 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,139	
Test F jednostronny	3,259 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT
Średnia	3,191	1,740
Wariancja	0,170	0,363
Obserwacje	13	5
Wariancja sumaryczna	0,218	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	16	
t Stat	5,907 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	1,11E-05	
Test T jednostronny	1,746	
P(T<=t) dwustronny	2,21E-05	
Test t dwustronny	2,120 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 6 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji włoskiej niemodyfikowanych i modyfikowanych mieszaniną DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA**Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 modyfikacja DMF-H ₂ O	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	0,975	0,612
Wariancja	0,068	0,011
Obserwacje	5	11
df	4	10
F	6,227 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	8,81E-03	
Test F jednostronny	3,478 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje**

	Zmienna 1 modyfikacja DMF-H ₂ O	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	0,975	0,612
Wariancja	0,068	0,011
Obserwacje	5	11
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	5	
t Stat	2,996 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,015	
Test T jednostronny	2,015	
P(T<=t) dwustronny	0,030	
Test t dwustronny	2,571 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**A DENINA****Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 modyfikacja DMF-H ₂ O	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,710	1,326
Wariancja	0,047	0,035
Obserwacje	4	11
df	3	10
F	1,353 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,312	
Test F jednostronny	3,708 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 modyfikacja DMF-H ₂ O	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,710	1,326
Wariancja	0,047	0,035
Obserwacje	4	11
Wariancja sumaryczna	0,038	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	13	
t Stat	3,394 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	2,40E-03	
Test T jednostronny	1,771	
P(T<=t) dwustronny	4,80E-03	
Test t dwustronny	2,160 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 7 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji włoskiej niemodyfikowanych i modyfikowanych zawieszoną 1 mg/ml wielościennych nanorurek węglowych sporządzoną w mieszaninie DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,874	0,612
Wariancja	0,125	0,011
Obserwacje	9	11
df	8	10
F	11,39 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	4,10E-04	
Test F jednostronny	3,07 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,874	0,612
Wariancja	0,125	0,011
Obserwacje	9	11
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	9	
t Stat	10,353 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	1,34E-06	
Test T jednostronny	1,833	
P(T<=t) dwustronny	2,68E-06	
Test t dwustronny	2,262 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA**

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,852	1,326
Wariancja	0,138	0,035
Obserwacje	9	11
df	8	10
F	3,970 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,023	
Test F jednostronny	3,072 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający nierówne wariancje

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	1,852	1,326
Wariancja	0,138	0,035
Obserwacje	9	11
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	11	
t Stat	3,871 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	1,30E-03	
Test T jednostronny	1,796	
P(T<=t) dwustronny	2,61E-03	
Test t dwustronny	2,201 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 8 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji włoskiej modyfikowanych zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych i oczyszczonych wielościennych nanorurek węglowych sporządzoną w mieszaninie DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA**Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT nieoczy- szczonymi	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT oczyszczono- nymi
Średnia	1,874	1,335
Wariancja	0,125	0,018
Obserwacje	9	4
df	8	3
F	7,022 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,068	
Test F jednostronny	8,845 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT nieoczy- szczonymi	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT oczyszczono- nymi
Średnia	1,874	1,335
Wariancja	0,125	0,018
Obserwacje	9	4
Wariancja sumaryczna	0,096	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	11	
t Stat	2,904 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,007	
Test T jednostronny	1,796	
P(T<=t) dwustronny	0,014	
Test t dwustronny	2,201 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA****Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT nieoczy- szczonymi	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT oczyszczono- nymi
Średnia	1,852	1,763
Wariancja	0,138	0,043
Obserwacje	9	4
df	8	3
F	3,225 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,182	
Test F jednostronny	8,845 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 modyfikacja MWCNT nieoczy- szczonymi	Zmienna 2 modyfikacja MWCNT oczyszczono- nymi
Średnia	1,852	1,763
Wariancja	0,138	0,043
Obserwacje	9	4
Wariancja sumaryczna	0,112	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	11	
t Stat	0,446 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,332	
Test T jednostronny	1,796	
P(T<=t) dwustronny	0,664	
Test t dwustronny	2,201 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 9 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zarejestrowane na elektrodach produkcji polskiej niemodyfikowanych i elektrodach produkcji włoskiej modyfikowanych zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych wielościennych nanorurek węglowych sporządzoną w mieszaninie DMF i H₂O w stosunku 1:1.

GUANINA**Test F: z dwiema próbkami dla wariancji**

	Zmienna 1 SPE-IT modyfikowa- ne MWCNT	Zmienna 2 SPE-PL bez modyfikacji
Średnia	1,874	2,248
Wariancja	0,125	0,083
Obserwacje	9	12
df	8	11
F	1,506 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,259	
Test F jednostronny	2,948 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbkami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 SPE-PL bez modyfikacji	Zmienna 2 SPE-IT modyfikowa- ne MWCNT
Średnia	2,248	1,874
Wariancja	0,083	0,125
Obserwacje	12	9
Wariancja sumaryczna	0,100	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	19	
t Stat	2,669 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,008	
Test T jednostronny	1,729	
P(T<=t) dwustronny	0,015	
Test t dwustronny	2,093 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA****Test F: z dwiema próbkami dla wariancji**

	Zmienna 1 SPE-PL bez modyfikacji	Zmienna 2 SPE-IT modyfikowa- ne MWCNT
Średnia	3,191	1,852
Wariancja	0,170	0,138
Obserwacje	13	9
df	12	8
F	1,228 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,396	
Test F jednostronny	3,284 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbkami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 SPE-PL bez modyfikacji	Zmienna 2 SPE-IT modyfikowa- ne MWCNT
Średnia	3,191	1,852
Wariancja	0,170	0,138
Obserwacje	13	9
Wariancja sumaryczna	0,157	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	20	
t Stat	7,790 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	8,77E-08	
Test T jednostronny	1,725	
P(T<=t) dwustronny	1,75E-07	
Test t dwustronny	2,086 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 10 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA nakropionego na elektrody produkcji polskiej niemodyfikowane i zawierające 1 % MWCNT w warstwie grafitowej.

GUANINA**Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 MWCNT w graficie
Średnia	3,172	3,432
Wariancja	0,393	0,222
Obserwacje	5	6
df	4	5
F	1,769 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,272	
Test F jednostronny	5,192 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 MWCNT w graficie	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	3,432	3,172
Wariancja	0,222	0,393
Obserwacje	6	5
Wariancja sumaryczna	0,298	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	9	
t Stat	0,785 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,226	
Test T jednostronny	1,833	
P(T<=t) dwustronny	0,452	
Test t dwustronny	2,262 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA****Test F: z dwiema próbami dla wariancji**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 MWCNT w graficie
Średnia	4,660	4,303
Wariancja	0,372	0,227
Obserwacje	5	6
df	4	5
F	1,641 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,297	
Test F jednostronny	5,192 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje**

	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 MWCNT w graficie
Średnia	4,660	4,303
Wariancja	0,372	0,227
Obserwacje	5	6
Wariancja sumaryczna	0,291	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	9	
t Stat	1,091 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,152	
Test T jednostronny	1,833	
P(T<=t) dwustronny	0,304	
Test t dwustronny	2,262 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

ZAŁĄCZNIK 11 – Testy statystyczne porównujące sygnały utlenienia DNA zaadsorbowanego z roztworu na elektrodach produkcji polskiej niemodyfikowanych i zawierających 1 % MWCNT w warstwie grafitowej.

GUANINA

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 bez modyfikacji	Zmienna 2 MWCNT w graficie
Średnia	2,068	2,423
Wariancja	0,052	0,046
Obserwacje	5	6
df	4	5
F	1,129 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,437	
Test F jednostronny	5,192 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje

	Zmienna 1 MWCNT w graficie	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	2,423	2,068
Wariancja	0,046	0,052
Obserwacje	6	5
Wariancja sumaryczna	0,049	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	9	
t Stat	2,656 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,013	
Test T jednostronny	1,833	
P(T<=t) dwustronny	0,026	
Test t dwustronny	2,262 (obliczone)	

RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE**ADENINA**

Test F: z dwiema próbami dla wariancji		
	Zmienna 1 MWCNT w graficie	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	3,723	3,244
Wariancja	0,186	0,086
Obserwacje	6	5
df	5	4
F	2,158 (krytyczne)	
P(F<=f) jednostronny	0,238	
Test F jednostronny	6,256 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

Test t: z dwiema próbami zakładający równe wariancje

	Zmienna 1 MWCNT w graficie	Zmienna 2 bez modyfikacji
Średnia	3,723	3,244
Wariancja	0,186	0,086
Obserwacje	6	5
Wariancja sumaryczna	0,142	
Różnica średnich wg hipotezy	0	
df	9	
t Stat	2,103 (krytyczne)	
P(T<=t) jednostronny	0,032	
Test T jednostronny	1,833	
P(T<=t) dwustronny	0,065	
Test t dwustronny	2,262 (obliczone)	

NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE

SPIS ILUSTRACJI

RYS. 1 – James Watson i Francis Crick z oryginalnym modelem helisy DNA [1].	15
RYS. 2 – Prof. Ehuda Shapiro i Yaakov Benenson prezentują komputer DNA [7].	15
RYS. 3 – Wykorzystanie motywu DNA w różnych dziedzinach życia codziennego: A – Pomnik ku czci Francisca Cricka w Northampton projektu Lucy Glendinning [8], B – Indywidualny portret DNA wykonany przez firmę Artres [9], C – Most DNA w Marina Bay w Singapurze projektu australijskiej firmy Cox Group, firmy Arup i singapurskiej grupy Architects 61 [10], D – Wieża DNA w Kings Park w Zachodniej Australii [11], E – Lampa PiOLED w kształcie DNA produkcji firmy Osram [12], F – Elegancki stół z nogami inspirowanymi strukturą DNA projektu Paula Leobach [13], G – Koszulka z motywem DNA marki Gildan [14], H – Kolczyki w kształcie helisy DNA [15].	16
RYS. 4 – Budowa deoksyrybonukleotydu.	17
RYS. 5 – Elementy tworzące deoksyrybonukleotyd.	17
RYS. 6 – Wzory strukturalne zasad nukleinowych tworzących deoksyrybonukleotydy [18].	17
RYS. 7 – Budowa deoksyrybonukleozydów.	18
RYS. 8 – Budowa deoksyrybonukleotydów.	18
RYS. 9 – Fragment pojedynczej nici DNA.	19
RYS. 10 – Zdjęcia rentgenowskie uwodnionych włókien DNA w postaci soli litowej (A) i sodowej (B) wykonane przez M. Wilkinsa i R. Franklin [22].	20
RYS. 11 – Model potrójnej helisy DNA zaproponowany przez Linusa Paulinga [23].	20
RYS. 12 – Oryginalna podwójna helisa DNA skonstruowana przez J. Watsona i F. Ccricka [25].	20
RYS. 13 – Model podwójnej helisy DNA (A – adenina, T – tymina, C – cytozyna, G – guanina, D – deoksyryboza, P – fosforan) [26].	20
RYS. 14 – Komplementarne pary zasad azotowych [27].	21
RYS. 15 – Podwójna helisa DNA: A – komplementarność dwóch nici polinukleotydowych, B – model atomowy [27].	21
RYS.16 – Skręcenie względem siebie płaszczyzn dwóch komplementarnych zasad azotowych w dsDNA [16].	22
RYS. 17 – Usytuowanie komplementarnych par zasad względem bruzd dsDNA [16].	22
RYS.18 – Najpopularniejsze formy dsDNA [30].	22
RYS. 19 – Kolista cząsteczka DNA [32].	23
RYS. 20 – Kolista cząsteczka dsDNA: A - forma zrelaksowana, B - forma superhelikalna [33].	24
RYS. 21 – Upakowanie materiału genetycznego w jądrze komórkowym komórki eukariotycznej [36].	25
RYS. 22 – Centralny dogmat biologii molekularnej.	25
RYS. 23 – Organizacja DNA w komórce bakteryjnej [38].	25
RYS. 24 – Schematy i zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu elektronowego przedstawiające różne formy plazmidów: A – superhelikalną [37], B -zrelaksowaną z przerwą jedną nicią [37], C – liniową [41], D – pseudoliniową [37], E – katenanu [42].	27
RYS. 25 – Schemat wykrywania plazmidów metodą bezpośrednią.	28
RYS. 26 – Schemat procesu koniugacji bakterii [47].	29
RYS. 27 – Model ogólnej strategii inżynierii genetycznej z użyciem wektora plazmidowego [4].	34
RYS. 28 – Schemat pojedynczej nici DNA zawierającej tyminę i guaninę. Pola zakreskowanego wskazują na miejsca potencjalnego wiązania cząsteczek wody [57].	37
RYS. 29 – Denaturacja i renaturacja podwójnej helisy DNA [76].	38
RYS. 30 – Zmiana absorpcji przy 260 nm podczas denaturacji DNA [16].	38
RYS. 31 – Zależność temperatury topnienia DNA od procentowej zawartości G+C w cząsteczce DNA [37].	39
RYS. 32 – Schematyczne krzywe $dE/dt = f(E)$ natywnego DNA dwuniciowego (dsDNA) i zdenaturowanego termalnie jednoniciowego DNA (ssDNA) uzyskane metodą polarografii oscylograficznej przy kontrolowanym prądzie zmiennym. Katodowe wcięcie CA obrazuje redukcję cytozyny i adeniny, zaś wcięcie Cl-1 ma naturę pojemnościową. Wcięcie anodowe G odpowiada utlenieniu produktu redukcji guaniny [75].	40

RYS. 33 – Ilość prac na temat elektrochemicznych właściwości DNA opublikowana pomiędzy rokiem 1958 a 2010 [82].	40
RYS. 34 – Centra elektroaktywne w komplementarnych parach zasad azotowych [87].	40
RYS. 35 – Proces utleniania guaniny [95, 96].	41
RYS. 36 – Woltamperogramy DPV prezentujące utlenianie: A – 0,5 mM i B – 50 μ M guaniny w buforze octanowym o stężeniu 0,2 M (pH 4,5) na mikroelektrodzie z węgla szklanego. (—) piąty skan zarejestrowany w roztworze guaniny, (•••) pierwszy i (---) drugi skan zarejestrowany po przeniesieniu elektrody do roztworu elektrolitu podstawowego [97].	41
RYS. 37 – Proces utleniania adeniny [95, 96].	42
RYS. 38 – Woltamperogramy DPV prezentujące utlenianie: A – 1 mM i B – 10 μ M adeniny w buforze octanowym o stężeniu 0,2 M (pH 4,5) na mikroelektrodzie z węgla szklanego. (—) A – dwudziesty, B – pierwszy skan zarejestrowany w roztworze adeniny, (•••) pierwszy skan zarejestrowany po przeniesieniu elektrody do roztworu elektrolitu podstawowego [97].	42
RYS. 39 – Proces utleniania cytozyny [99].	43
RYS. 40 – Woltamperogramy cykliczne prezentujące utlenianie: A – 2,6 mM tyminy, B – 5 mM cytozyny w roztworze buforu boranowego o pH odpowiednio 10,0 oraz 10,8. (1)-(4) – kolejno zarejestrowane skany [98].	43
RYS. 41 – Proces utleniania tyminy [100, 101].	43
RYS. 42 – Woltamperogram DPV zarejestrowany w mieszaninie 20 μ M guaniny (G), 20 μ M adeniny (A), 200 μ M tyminy (T) i 200 μ M cytozyny (C) w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego (pH 7,4) na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) o średnicy 3 mm. (•••) zarejestrowany woltamperogram, (—) woltamperogram po korekcji linii podstawowej [102].	44
RYS. 43 – Woltamperogramy DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowane w roztworach: 20 μ M 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu (GMP), 20 μ M 2'-deoksyadenozyno-5'-monofosforanu (AMP), 500 μ M 2'-deoksytymidyno-5'-monofosforanu (TMP), 500 μ M 2'-deoksytydyno-5'-monofosforanu (CMP), oraz dla porównania w równomolowej (20 μ M) mieszaninie guaniny (G), adeniny (A), tyminy (T), cytozyny (C), w środowisku 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) [102].	45
RYS. 44 – Woltamperogram DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowany w 40 μ g/ml roztworze ssDNA w środowisku 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE). G _r – reszta guaninowa, A _r – reszta adeninowa, Py _r – reszty zasad pirymidynowych. Wstawienie: Woltamperogramy DPV po korekcji linii podstawowej zarejestrowany w 100 μ g/ml roztworach: poli(dT) (pT) i poli(dC) (pC) w środowisku 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,4 na elektrodzie z węgla szklanego (GCE) [102].	45
RYS. 45 – Woltamperogramy DPV zarejestrowane w 60 μ g/ml roztworach: (—) ssDNA (pierwszy skan), (•••) dsDNA (pierwszy skan), (---) dsDNA (czterdziesty skan) zarejestrowane w środowisku 0,1 M buforu octanowego o pH 4,5 [108].	46
RYS. 46 – Polarogramy zmiennoprądowe prezentujące procesy adsorpcji/desorpcji natywnego dsDNA (N) i zdenaturowanego ssDNA (D) na KER w roztworze o średniej sile jonowej i lekko zasadowym pH. Poprzeczne strzałki wskazują zakresy potencjału, w których w adsorpcję DNA zaangażowane są poszczególne jego elementy. Szczegóły dotyczące oznaczeń sygnałów znajdują się w tekście [88].	47
RYS. 47 – Schemat zmian zachodzących w strukturze dsDNA na elektrodzie rtęciowej wywołanych przyłożeniem negatywnego potencjału z zakresu U (ok. -1,2 V) [82].	47
RYS. 48 – Schemat różnych form plazmidów i ich sygnałów tensametrycznych zarejestrowanych zmiennoprądowymi metodami polarograficznymi lub woltamperometrycznymi [82, 88].	48
RYS. 49 – Porównanie oksydacyjnego transferu dziury elektronowej i redukcyjnego transferu elektronu w DNA (D – donator dziury/elektronu, A – akceptor dziury/elektronu, ET – transfer elektronu). Opracowano na podstawie [127].	49
RYS. 50 – Porównanie transferu ładunku na zasadzie nadwymiany elektronu oraz drutu molekularnego. Opracowano na podstawie [127].	50
RYS. 51 – Porównanie mechanizmów przeskoku dziury wzdłuż helisy DNA z udziałem guaniny (po lewej) lub adeniny (po prawej) jako pośredni nośnik ładunku. Opracowano na podstawie [127].	50
RYS. 52 – Porównanie mechanizmów przeskoku elektronu wzdłuż helisy DNA z udziałem cytozyny (po lewej) lub tyminy (po prawej) jako pośredni nośnik ładunku. Opracowano na podstawie [127].	51
RYS. 53 – Mechanizm przeskoku ładunku wzdłuż helisy DNA za pośrednictwem domen zawierających zdelokalizowany ładunek [156].	52

RYS. 54 – Porównanie trzech mechanizmów przepływu ładunku wzdłuż helisy DNA: A – mechanizm tunelowania (nadwymiany ładunku), B – mechanizm przeskoku ładunku (hopping ładunku), C – mechanizm przeskoku domeny (hopping domeny) [131].	52
RYS. 55 – Wpływ zaburzeń helisy DNA na przepływ ładunku: a – nadmiarowe zasady wystające poza powierzchnię helisy i zaburzające jej kształt blokują przepływ ładunku, b - błędne wstawienie cytozyny zamiast tyminy blokuje przepływ ładunku, podczas gdy błędne wstawienie guaniny zamiast tyminy usprawnia przepływ ładunku ze względu na zwiększenie asocjacji warstwowej zasad [143].	53
RYS. 56 – Widmo absorpcyjne UV-Vis DNA [168].	54
RYS. 57 – Widma absorpcyjne UV-Vis zasad azotowych [58].	55
RYS. 58 – Model różnych sposobów oddziaływania substancji chemicznych z helisą DNA [174].	56
RYS. 59 – Wyznaczona krystalograficznie trójwymiarowa struktura kompleksu DNA z hydratowanym jonem magnezu [176].	56
RYS. 60 – Interkalacja pochodnej 9-anilinoakrydyny do DNA [181].	56
RYS. 61 – Bisinterkalacja bisantrapirazolu do helisy DNA [174].	57
RYS. 62 – Wiązanie netropsyny w małej bruzdzie DNA [193].	57
RYS. 63 – Wiązanie dimerycznego kaliksa-renu w dużej bruzdzie DNA [198].	57
RYS. 64 – Kowalencyjne wiązanie cisplatyny z zasadami nukleinowymi DNA [195].	58
RYS. 65 – Deformacja helisy DNA wywołana krzyżowym łączeniem zasad nukleinowych (tzw. crosslinking) przez cisplatynę [176].	58
RYS. 66 – Oddziaływanie doksorubicyny z DNA poprzez interkalację i wiązanie w małej bruzdzie [203].	58
RYS. 67 – Wzór strukturalny błękitu metylenowego.	62
RYS. 68 – Błękit metylenowy w postaci sproszkowanej [255].	62
RYS. 69 – Roztwór błękitu metylenowego [257].	62
RYS. 70 – Schemat fotochemicznych reakcji błękitu metylenowego. Opracowano na podstawie [262].	63
RYS. 71 – Modele kompleksu DNA z błękitem metylenowym uzyskane przy pomocy metody obliczeniowej Monte Carlo. A – interkalacja MB do sekwencji nukleotydowej zawierającej pary GC, B – lokowanie MB w małym rowku helisy o sekwencji nukleotydowej zawierającej pary AT, C – oddziaływanie elektrostatyczne ze szkieletem cukrowo-fosforanowym [237].	63
RYS. 72 – Procesy redoks błękitu metylenowego w zależności od pH [284].	65
RYS. 73 – Woltamperogram cykliczny prezentujący procesy redoks błękitu metylenowego na elektrodzie z pasty zawierającej grafit, octan celulozy i TiO_2 zarejestrowany w 1 M roztworze KCl o pH 7,0 [254].	65
RYS. 74 – Woltamperogramy cykliczne (10 skanów) 0,05 mM MB zarejestrowane na elektrodzie z węgla szklanego w roztworze fosforanów o pH : A – 5,0, B – 10,0 zawierającym 0,1 M $NaNO_3$ [288].	66
RYS. 75 – Woltamperogramy cykliczne 5×10^{-5} M MB w buforze Tris-HCl o pH 7,2: a – bez DNA oraz w obecności b – 6×10^{-5} M DNA, c – $2,6 \times 10^{-4}$ M DNA [292].	66
RYS. 76 – Schemat możliwych sposobów ułożenia pojedynczych i podwójnych łańcuchów DNA na elektrodzie podczas oddziaływania z błękitem metylenowym: A – unieruchomienie DNA za pośrednictwem linkera, modyfikującego jeden z końców molekuly kwasu, B – elektrostatyczne przyciąganie molekuł DNA przez dodatnio naładowaną elektrodę, skutkujące płaskim ułożeniem molekuł kwasu, C – unieruchomienie DNA o strukturze „spinki do włosów” za pośrednictwem linkera alkilowo-tiolowego [175].	67
RYS. 77 – Widmo UV-Vis 0,9 mM MB w roztworze wodnym zawierającym NaCl [300].	68
RYS. 78 – Widmo UV-Vis MB o stężeniu: 1 – 7,5 μ M, 2 – 17 μ M, 3 – 24 μ M, 4 – 44 μ M, 5 – 375 μ M zarejestrowane w wodnym roztworze NaCl [260].	68
RYS. 79 – Widma UV-Vis: 1 – MB w roztworze 0,05 M tetraboranu sodu i 0,5 M KCl oraz 2 – poliMB spolimeryzowanego na platynie osadzonej na szkłe kwarcowym [290].	69
RYS. 80 – Widmo UV-Vis 4 μ M samego MB (a) i MB oddziałującego z DNA z grasicy cielęcej o różnym stężeniu (b-h – odpowiednio 2,78, 6,95, 13,9, 20,85, 27,8, 41,7, 55,6 μ M) zarejestrowane w buforze Tris o pH 7,3 [302].	69
RYS. 81 – Wzory strukturalne: A – daunorubicyny, B – doksorubicyny.	70
RYS. 82 – Doksorubicyna w postaci krystalicznej [310].	71
RYS. 83 – Roztwór doksorubicyny [311].	71
RYS. 84 – Zaangażowanie poszczególnych fragmentów cząsteczki DAU w tworzenie kompleksu z DNA.	73
RYS. 85 – Model kompleksu dwóch cząsteczek daunorubicyny z heksamerem DNA [193].	74

RYS. 86 – Procesy redoks antrycyn: DAU – R = H, DOX – R = OH. Struktura w kolorze niebieskim przedstawia formę podstawową [328, 329].	74
RYS. 87 – Woltamperogram cykliczny prezentujący procesy redoks 5 μ M doksorubicyny zarejestrowany na elektrodzie z węgla szklanego w roztworze buforu octanowego o pH 4,5 [326].	75
RYS. 88 – Woltamperogramy cykliczne 1,86 $\times 10^{-4}$ M DAU: 1 – 0,6546 mg ml ⁻¹ DNA bez DAU, 2 – sama DAU, 3 – DAU w obecności 0,6546 mg/ml DNA zarejestrowane w 1/15 M buforze fosforanowym o pH 7,0 [330].	75
RYS. 89 – Chronopotencjogramy 10 μ M DAU zarejestrowane na elektrodzie sitodrukowanej modyfikowanej 21-merowym oligonukleotydem z Chlamydia trachomatis w buforze o pH 7,4: a – bez dodatków oraz w obecności: b – 1 mg/ml niekomplementarnych łańcuchów oligonukleotydydowych, c – 0,5 mg/ml i d – 1 mg/ml komplementarnych łańcuchów oligonukleotydydowych [335].	76
RYS. 90 – Widmo UV-Vis DOX zarejestrowane w buforze fosforanowym [341].	76
RYS. 91 – Widmo UV-Vis 5,05 $\times 10^{-5}$ M DAU zarejestrowane w roztworze: 1 – niezawierającym DNA oraz 2 – zawierającym 0,534 mg/ml dsDNA z grasicy cielęcej [330].	76
RYS. 92 – Wzory strukturalne formamidynowych pochodnych daunorubicyny (R = H) i doksorubicyny (R = OH) zawierających: A – pierścień morfolinowy, B – pierścień heksametylenoiminowy.	78
RYS. 93 – Schemat działania elektrochemicznego bioczuJNIKA DNA.	80
RYS. 94 – Obrazy AFM wykonane w trybie kontaktowym Magnetic A/C przedstawiające powierzchnię elektrody z wysoce zorganizowanego grafitu pirolitycznego: A – czystą, B – z cienką warstwą dsDNA naniesioną na drodze wolnej adsorpcji z roztworu, C – grubą warstwą dsDNA nakroploną i wysuszoną [369].	81
RYS. 95 – Schemat immobilizacji DNA na elektrodzie złotej z wykorzystaniem warstw organotiolowych [160].	82
RYS. 96 – Schemat immobilizacji DNA na elektrodzie za pośrednictwem układu streptawidyna-biotyna.	83
RYS. 97 – Procedury elektrochemicznego badania oddziaływania DNA z różnymi substancjami chemicznymi. Opracowano na podstawie [170].	84
RYS. 98 – Schemat procesu hybrydyzacji DNA na powierzchni elektrody z zastosowaniem elektroaktywnego znacznika w celu detekcji.	85
RYS. 99 – Portrety Marylin Monroe wykonane przez Andy Warhola techniką sitodruku [393].	88
RYS. 100 – Siatka sitodrukowa pokryta utwardzoną matrycą światłoczułą [395].	88
RYS. 101 – Proces sitodruku.	89
RYS. 102 – Sitodruk ręczny (A) [396] oraz sitodrukarka automatyczna (B) [397].	89
RYS. 103 – Przedmioty z nadrukiem sitodrukowym [398].	90
RYS. 104 – Sitodrukowane czujniki elektrochemiczne różnych producentów [400-405].	90
RYS. 105 – Konstrukcja czujnika sitodrukowanego.	91
RYS. 106 – Proces sitodruku układów trójelektrodowych, składających się z grafitowej elektrody pracującej, grafitowej elektrody pomocniczej oraz srebrowej elektrody pseudoodniesienia. Zdjęcia wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie dzięki uprzejmości dr Elżbiety Zwierkowskiej i dr Selima Achmatowicza.	91
RYS. 107 – Przybliżona struktura sitodrukowanej warstwy grafitowej. (1) – zniszczenie warstwy substancji wiążącej na ziarnie grafitu w wyniku utleniania, (2) – pośredni kontakt ziaren grafitu, (3) – bezpośredni kontakt ziaren grafitu, (4) – wolne przestrzenie, (5) – substancja wiążąca tuszu, (6) – ziarno grafitu, (7) – ziarno grafitu pokryte zbyt grubą warstwą substancji wiążącej, S ₀ – powierzchnia nadrukowanego tuszu [411].	92
RYS. 108 – Mikrografie SEM przedstawiające powierzchnię grafitowej elektrody sitodrukowanej: a – bez modyfikacji mechanicznych, b – polerowaną zwykłym papierem, c – polerowaną papierem ściernym [413].	93
RYS. 109 – Schematy oraz mikrografie TEM nanorurek węglowych jednościenne (SWCNT) i wielościenne (MWCNT) [433-435].	95
RYS. 110 – Struktury SWCNT zależnie od sposobu zwinięcia warstwy grafenowej: A – forma fotelowa, B – forma zygzakowata, C – forma chiralna [437].	96
RYS. 111 – Mikrografie SEM ukazujące SWCNT na różnych etapach oczyszczania przez odwirowywanie: a – sadza zawierająca SWCNT otrzymana podczas syntezy elektrolytycznej katalizowanej Fe i Ni, b – osad otrzymany w wyniku odwirowania przy 5000 rpm zawiesiny sadzy sporządzonej w wodzie w obecności kationowego surfaktanta, c – osad i d – zawieszina uzyskane w wyniku wirowania przy 15000 rpm cieczy z nad osadu b [442].	99
RYS. 112 – Perspektywiczne zastosowania nanorurek węglowych. Opracowano na podstawie [426].	101
RYS. 113 – Fragment chipu skonstruowanego przy użyciu CNT [443].	101

RYS. 114 – Panel dotykowy z CNT skonstruowany przez firmę Chi Mei Optoelectronics [444].	102
RYS. 115 – Nanorurka węglowa przyczepiona do konwencjonalnego ostrza AFM [445].	102
RYS. 116 – Przyrządy sportowe wykonane z kompozytów CNT [446].	102
RYS. 117 – Woltamperogramy CV 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA calf thymus zarejestrowane w buforze fosforanowym o pH 7,0 na: a – czystej elektrodzie GCE, b – elektrodzie GCE modyfikowanej DHP, c – elektrodzie GCE modyfikowanej zawiesiną MWCNT-DHP, d – elektrodzie GCE modyfikowanej zawiesiną MWCNT-DHP po 2-minutowej akumulacji [456].	104
RYS. 118 – Krzywa zależności prądu od przyłożonego napięcia wykreślona przez Heyrovskyego [465].	105
RYS. 119 – Formy woltamperometrycznej odpowiedzi prądowej: A – fala, B – pik. Opracowano na podstawie [94].	106
RYS. 120 – Schemat analizatora woltamperometrycznego. Opracowano na podstawie [165].	107
RYS. 121 – Schemat naczynka elektrolitycznego. Opracowano na podstawie [94].	107
RYS. 122 – Woltamperometria cykliczna: A – schemat zmiany napięcia polaryzującego w czasie, B – woltamperogram cykliczny (E_1 – potencjał początkowy, E_2 – potencjał zawracania, E_{pa} – potencjał pików anodowego, E_{pc} – potencjał pików katodowego, I_{pa} – prąd pików anodowego, I_{pc} – prąd pików katodowego). Opracowano na podstawie [463].	109
RYS. 123 – Schemat zmiany napięcia polaryzującego w woltamperometrii fali prostokątnej (ΔE_s – wysokość schodka potencjału, ΔE_{SW} – połowa wysokości impulsu fali prostokątnej, t_s – czas trwania fali schodkowej, s_1, s_2 – miejsca próbkowania natężenia prądu. Opracowano na podstawie [463].	111
RYS. 124 – Sygnał prądowy rejestrowany podczas pomiaru z zastosowaniem woltamperometrii fali prostokątnej (krzywa czerwona) oraz prądy rejestrowane podczas pierwotnego i powrotnego przebiegu potencjału (krzywe niebieskie). Opracowano na podstawie [463].	111
RYS. 125 – Schemat częściowej absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu I_0 przez próbkę o stężeniu c i współczynnika absorpcji a , znajdującą się w kuwecie o grubości l , I oznacza część promieniowania, które nie zostało pochłonięte.	113
RYS. 126 – Schemat blokowy spektrofotometru. Opracowano na podstawie [471].	115
RYS. 127 – AUTOLAB sprzężony z komputerem.	119
RYS. 128 – Klasyczny trójelektrodowy układ pomiarowy.	119
RYS. 129 – Sitodrukowane układy pomiarowe: A – pojedyncze układy trójelektrodowe: a – włoskie firmy Palmsens, b – polskie wytwarzane w ITME w Warszawie, B – zestaw nadrukowanych włoskich układów sitodrukowanych, C – zestaw nadrukowanych polskich układów sitodrukowanych.	120
RYS. 130 – Analiza elektrod sitodrukowanych za pomocą profilografometru. Zdjęcie wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie dzięki uprzejmości dr Elżbiety Zwierkowskiej i dr Selima Achmatowicza.	120
RYS. 131 – Profile struktury i grubości poszczególnych warstw tworzących sitodrukowane układy elektrod.	121
RYS. 132 – Spektrofotometr UV-Vis Perkin Elmer sprzężony z komputerem.	121
RYS. 133 – Mikroskop AFM (A) sprzężony z komputerem (B). Zdjęcia wykonane w Środowiskowym Laboratorium Fizyki Biologicznej Instytutu Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie dzięki uprzejmości dr Joanny Grzyb.	122
RYS. 134 – Obróbka przykładowych woltamperogramów zarejestrowanych metodą SWV prezentujących linię podstawową elektrody (linia przerywana) oraz sygnały utlenienia DNA calf thymus i daunorubicyny w AcB-K (linia ciągła): A – przed obróbką, B – po wygładzeniu, C – po korekcji linii podstawowej.	128
RYS. 135 – Zdjęcia spod mikroskopu stereoskopowego (STEMI 2000, Zeiss, Niemcy) złożonej sitodrukowanej elektrody grafitowej produkcji polskiej: A – niemodyfikowanej, B – szlifowanej, wykonane w Zakładzie Materiałów Grubowarstwowych Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie przez dr Selima Achmatowicza i udostępnione dzięki Jego uprzejmości. 1 – obraz całej powierzchni elektrody w 32-krotnym powiększeniu, 2 – obraz jej wycinka w 100-krotnym powiększeniu.	129
RYS. 136 – Woltamperogramy po korekcji linii podstawowej zarejestrowane metodą SWV prezentujące utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss osadzonym na SPE-PL oczyszczonych: elektrochemicznie (Procedura I), NaOH i elektrochemicznie (Procedura II), H_2O_2 i elektrochemicznie (Procedura III), szlifowanych i oczyszczonych elektrochemicznie (Procedura IV). Dla każdej procedury czyszczenia przedstawiono po 3 reprezentacyjne krzywe zarejestrowane na osobnych elektrodach.	132
RYS. 137 – Woltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV w AcB-K prezentujące utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss osadzonym na SPE-PL oczyszczonych według: A – Procedury I, B –	

Procedury II, C – Procedury III, D – Procedury IV. Wszystkie przedstawione na diagramach krzywe woltamperometryczne zarejestrowane zostały na osobnych elektrodach – dla procedury I eksperyment powtarzany na 17 elektrodach, dla procedury II na 25, dla procedury III na 21, a dla procedury IV na 30.....	132
RYS. 138 – Powierzchnia polskiej elektrody pracującej: A – przed czyszczeniem, B – po czyszczeniu elektrochemicznym, C – po działaniu NaOH, D – po szlifowaniu, obrazowana za pomocą AFM: 1 – obraz w rzucie płaskim, 2 – obraz trójwymiarowy, 3 – profil powierzchni.	133
RYS. 139 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia G i A zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na SPE-PL w zależności od zastosowanej procedury przygotowania elektrod. Wartości średnie wyznaczone na podstawie 17 elektrod (Procedura I), 25 elektrod (Procedura II), 21 elektrod (Procedura III) lub 30 elektrod (Procedura IV).	135
RYS. 140 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu DMF (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji DMF (krzywe po korekcji linii podstawowej).	140
RYS. 141 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu mieszaniny DMF i H ₂ O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji mieszaniną DMF i H ₂ O 1:1 (krzywe po korekcji linii podstawowej).	140
RYS. 142 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu cellosolwu butylowego (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji cellosolwem butylowym (krzywe po korekcji linii podstawowej).	141
RYS. 143 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF-H ₂ O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).	143
RYS. 144 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 0,1 mg/ml MWCNT w cellosolwie butylowym (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).	143
RYS. 145 – Porównanie woltamperogramów po korekcji linii podstawowej zarejestrowanych metodą SWV, prezentujących utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakropionym na SPE-PL bez modyfikacji oraz modyfikowane: A – mieszaniną DMF-H ₂ O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT, B – cellosolwem butylowym oraz sporządzoną w nim zawiesiną 0,1 mg/ml MWCNT.	144
RYS. 146 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji włoskiej, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 1 mg/ml MWCNT w mieszaninie DMF-H ₂ O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).	146
RYS. 147 – Porównanie woltamperogramów po korekcji linii podstawowej zarejestrowanych metodą SWV, prezentujących utlenienie guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakropionym na SPE-IT bez modyfikacji, modyfikowane mieszaniną DMF-H ₂ O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.	147
RYS. 148 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia G i A zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na: A – SPE-IT, B – SPE-PL, bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H ₂ O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.	147
RYS. 149 – Schemat procedury oczyszczania wielościennych nanorurek węglowych.	148
RYS. 150 – Przykładowe woltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji włoskiej, prezentujące: A – linie podstawowe elektrod sitodrukowanych przed (linie przerywane) i po (linie ciągłe) nakropieniu zawiesiny 1 mg/ml oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H ₂ O 1:1 (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie dsDNA-ss nakropionego na elektrody po modyfikacji MWCNT (krzywe po korekcji linii podstawowej).	149
RYS. 151 – A – porównanie woltamperogramów po korekcji linii podstawowej, B – wykres zależności średnich sygnałów prądowych, zarejestrowanych metodą SWV dla utleniania guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakropionym na SPE-IT bez modyfikacji oraz modyfikowane zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych lub oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H ₂ O 1:1.	150

RYS. 152 – Wykres zależności średnich sygnałów prądowych utlenienia guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss zarejestrowanych metodą SWV na SPE-PL, bez modyfikacji oraz SPE-IT modyfikowanych zawieszoną 1 mg/ml nieoczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H ₂ O 1:1.	151
RYS. 153 – Przykładowe voltamperogramy zarejestrowane metodą SWV dla trzech różnych elektrod produkcji polskiej zawierających 1% MWCNT w graficie, prezentujące: A – ich linie podstawowe (krzywe po wygładzeniu), B – utlenianie nakropłonego na nie dsDNA-ss (krzywe po korekcji linii podstawowej).	153
RYS. 154 – A – porównanie voltamperogramów po korekcji linii podstawowej, B – wykres zależności średnich sygnałów prądowych, zarejestrowanych metodą SWV dla utleniania guaniny i adeniny zawartych w dsDNA-ss nakropłonym lub zaadsorbowanym z roztworu na SPE-PL bez modyfikacji oraz zawierających 1% MWCNT w warstwie grafitowej.....	154
RYS. 155 – A – Widma UV-Vis błękitu metylenowego o różnych stężeniach w AcB-K zarejestrowane w roztworach od razu po ich sporządzeniu, B – Zmiany absorbancji przy długości fali 665 nm roztworów błękitu metylenowego o różnych stężeniach, sporządzonych w AcB-K, w czasie 120 minut.....	159
RYS. 156 – Zależność absorbancji błękitu metylenowego w AcB-K przy długości fali 665 nm od jego stężenia, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu oraz po upływie 10 i 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.	159
RYS. 157 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane w 10 μM roztworze MB w AcB-K metodą: A – CV, B – SWV. Linią przerywaną oznaczono linię podstawową elektrody zarejestrowaną w AcB-K.....	162
RYS. 158 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą CV w roztworze: A – 40 μM MB w AcB-K, B – 30 μM MB i 9,1 ppm dsDNA-ss w AcB-K, w układzie poddanym wcześniej serii pomiarów SWV w roztworze o wzrastającym stężeniu MB.	163
RYS. 159 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE w roztworze AcB-Mg zawierającym błękit metylenowy o stężeniu wzrastającym stopniowo w zakresie: A – 0–9,7 μM pod nieobecność DNA, B – 0–11,0 μM w obecności 10 ppm dsDNA-ss, C – 0–9,8 μM w obecności 0,01 ppm scpUC19, D – 0–9,7 μM w obecności 0,72 ppm d(GC) ₄ , E – 0–9,8 μM w obecności 0,12 ppm d(AT) ₄ . Czerwone pionowe strzałki wskazują kierunek wzrostu stężenia MB. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg, zaś czarne linie ciągłe prezentują voltamperogramy zarejestrowane w roztworze AcB-Mg po dodatku danego rodzaju DNA.	168
RYS. 160 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE co 10 minut w roztworze AcB-Mg zawierającym: A – 1 ppm d(GC) ₄ , B – 0,1 ppm scpUC19. Czerwone pionowe strzałki wskazują kolejność krzywych rejestrowanych w równych odstępach czasu. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg.	169
RYS. 161 – Zależność prądów utleniania błękitu metylenowego przy potencjałach: A – -0,2 V, B – +0,05 V, C – +0,9 V od stężenia MB zawartego w roztworze AcB-Mg pod nieobecność DNA oraz w obecności różnych rodzajów DNA: 10 ppm dsDNA-ss, 0,01 ppm scpUC19, 0,72 ppm d(GC) ₄ , 0,12 ppm d(AT) ₄	170
RYS. 162 – Wzór strukturalny ryboflawiny.	171
RYS. 163 – Voltamperogramy po korekcji linii podstawowej zarejestrowane metodą SWV na grafitowej elektrodzie SPE w AcB-Mg zawierającym 10 ppm dsDNA-ss, 0,08 μM błękitu metylenowego oraz ryboflawinę o wzrastającym stężeniu.	172
RYS. 164 – Powierzchnia sitodrukowanej elektrody grafitowej produkcji polskiej obrazowana za pomocą AFM: 1 – obraz w rzucie płaskim, 2 – obraz trójwymiarowy, 3 – profil powierzchni, w kolejnych etapach procedury pomiarowej stosowanej podczas badania oddziaływania DNA z błękitem metylenowym: A – po oczyszczeniu elektrochemicznym, B – po osadzeniu dsDNA-ss, C – po oddziaływaniu dsDNA-ss z błękitem metylenowym.....	172
RYS. 165 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na elektrodzie GCE co 17 minut w roztworze AcB-Mg zawierającym różne rodzaje DNA: A – 4 pg/ml dsDNA-ct, B – 8 pg/ml scpUC19, C – 7 pg/ml scpGEX-4T-2, D – 0,6 pg/ml linpUC19, E – 4 pg/ml linpGEX-4T-2. Różowe pionowe strzałki wskazują kolejność krzywych rejestrowanych w równych odstępach czasu. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg.....	177
RYS. 166 – Voltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą SWV na elektrodzie GCE w roztworze AcB-Mg zawierającym błękit metylenowy o stężeniu wzrastającym stopniowo w zakresie: A – 0–4,6 μM pod nieobecność DNA, B – 0–5,0 μM w obecności 4 pg/ml scpUC19, C – 0–4,6 μM w obecności 7 pg/ml scpGEX-4T-2, D – 0–4,6 μM w obecności 2 pg/ml linpUC19, E – 0–5,4 μM w obecności 4 pg/ml linpGEX-4T-2. Różowe pionowe strzałki wskazują kierunek wzrostu stężenia MB. Czarne linie przerywane stanowią linie podstawowe zarejestrowane w samym AcB-Mg, zaś czarne linie ciągłe prezentują voltamperogramy	

zarejestrowane w roztworze AcB-Mg po dodatku danego rodzaju DNA. Wstawienia: Zależność prądów utlenienia sygnałów MB(I) i MB(III) od stężenia MB w roztworze pomiarowym.....	181
RYS. 167 – Zależność stosunku wysokości sygnałów MB(III)/MB(I) od stężenia błękitu metylenowego pod nieobecność plazmidów oraz w obecności: A – 4 pg/ml scpUC19 i 7 pg/ml scpGEX-4T-2, B – 2 pg/ml linpUC19 i 4 pg/ml linpGEX-4T-2.....	183
RYS. 168 – Zależność różnic potencjału piku MB(I) przy 4,6 μ M i innym dowolnym stężeniu błękitu metylenowego od stężenia MB uzyskanych pod nieobecność plazmidów oraz w obecności: A – 4 pg/ml scpUC19 i 7 pg/ml scpGEX-4T-2, B – 2 pg/ml linpUC19 i 4 pg/ml linpGEX-4T-2.....	184
RYS. 169 – Widma UV-Vis daunorubicyny o różnych stężeniach w AcB-K zarejestrowane w roztworach od razu po ich sporządzeniu.....	189
RYS. 170 – Zmiana absorbancji przy długości fali 481 nm roztworów DAU, DOX i ich formamidynowych pochodnych o różnych stężeniach, sporządzonych w AcB-K, w czasie 120 minut.....	190
RYS. 171 – Zależność absorbancji przy długości fali 481 nm DAU i jej formamidynowych pochodnych w AcB-K od stężenia danej antracykliny, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu i po upływie 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.....	191
RYS. 172 – Zależność absorbancji przy długości fali 481 nm DOX i jej formamidynowych pochodnych w AcB-K od stężenia danej antracykliny, rejestrowanej bezpośrednio po sporządzeniu roztworu i po upływie 120 minut. Punkty niewypełnione oznaczają punkty odbiegające od prostoliniowości zależności, które zostały pominięte przy wyznaczaniu krzywej.....	191
RYS. 173 – Woltamperogramy po wygładzeniu zarejestrowane metodą CV w: AcB-K – linia podstawowa elektrody (linia przerywana) oraz 0,5 mM roztworze DAU w AcB-K (linia ciągła).....	194
RYS. 174 – Woltamperogramy: A – po wygładzeniu, B – po korekcji linii podstawowej, zarejestrowane metodą SWV w AcB-K na: czystej elektrodzie – linia podstawowa (linia przerywana) oraz elektrodzie z zaadsorbowaną DAU (linia ciągła).....	195
RYS. 175 – Woltamperogramy: A – po wygładzeniu, B – po korekcji linii podstawowej, zarejestrowane metodą SWV w AcB-K na: czystej elektrodzie – linia podstawowa (linia przerywana) oraz elektrodzie z osadzonym dsDNA-ct po oddziaływaniu z 0,1 mM DAU-Fmor (linia ciągła).....	200
RYS. 176 – A – Woltamperogram po korekcji linii podstawowej, zarejestrowany metodą SWV w AcB-K na elektrodzie z osadzonym d(AT) ₄ po oddziaływaniu z 0,25 mM DAU-Fhex. B – Zależność wysokości sygnału utleniania przy potencjale ok. +1 V zarejestrowanego metodą SWV w AcB-K na elektrodzie z osadzonym d(AT) ₄ po oddziaływaniu z różnymi antracyklinami od ich stężenia.....	201
RYS. 177 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	202
RYS. 178 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	203
RYS. 179 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	204
RYS. 180 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny, B – adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.....	205
RYS. 181 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	206
RYS. 182 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	207
RYS. 183 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	208
RYS. 184 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny, B – adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.....	209
RYS. 185 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w d(GC) ₄ i adeniny zawartej w d(AT) ₄ w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	210
RYS. 186 – Procentowa zmiana sygnału utleniania adeniny zawartej w (A) ₈ w zależności od stężenia daunorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.....	212

RYS. 187 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	213
RYS. 188 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej daunorubicyny DAU-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	214
RYS. 189 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny zawartej w $d(GC)_4$, B – adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.	215
RYS. 190 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia doksorubicyny. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	216
RYS. 191 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej doksorubicyny DOX-Fmor. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	217
RYS. 192 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny zawartej w $d(GC)_4$ i adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia pochodnej doksorubicyny DOX-Fhex. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	218
RYS. 193 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania: A – guaniny zawartej w $d(GC)_4$, B – adeniny zawartej w $d(AT)_4$ w zależności od stężenia doksorubicyny i jej formamidynowych pochodnych. Linie przerywane odpowiadają sygnałowi ślepej próby.	219
RYS. 194 – A – Widma UV-Vis, B – zmiana absorbancji w czasie 60 minut przy długości fali 496 nm mieszaniny 10 μ M doksorubicyny i różnych stężeń $d(GC)_4$ w AcB-K-H ₂ O (1:1) zarejestrowane po 15 minutach od zmieszania składników.	226
RYS. 195 – Zmiany długości fali maksimum absorpcji daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych przy ok. 497 nm, wywołane różnymi stężeniami $d(GC)_4$ i $d(AT)_4$	227
RYS. 196 – Procentowa zmiana absorbancji daunorubicyny i jej formamidynowych pochodnych wywołana wzrastającym stężeniem: A – $d(GC)_4$, B – $d(AT)_4$. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	228
RYS. 197 – Procentowa zmiana absorbancji doksorubicyny i jej formamidynowych pochodnych wywołana wzrastającym stężeniem: A – $d(GC)_4$, B – $d(AT)_4$. Linia przerywana odpowiada sygnałowi ślepej próby.	229

SPIS TABEL

<i>Tabela 1 – Potencjalne centra akceptorowe i donorowe wiązań wodorowych w dużej i małej bruzdzie dsDNA.....</i>	22
<i>Tabela 2 – Porównanie charakterystycznych cech podstawowych form dsDNA [16].....</i>	23
<i>Tabela 3 – Cechy fenotypowe determinowane obecnością plazmidów [48].</i>	31
<i>Tabela 4 – Zmodyfikowane zasady nukleinowe mogące zastępować typowe zasady w helisie DNA [56].</i>	35
<i>Tabela 5 – Ogólny wzór strukturalny antracyklin oraz przykłady konkretnych związków.....</i>	70
<i>Tabela 6 – Rodzaje przejść elektronowych wywoływanych przez promieniowanie o różnej długości [471].</i>	113
<i>Tabela 7 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny DNA ze spermy łososia zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej według czterech procedur.....</i>	131
<i>Tabela 8 – Przygotowanie zawiesin nanorurek węglowych w różnych rozpuszczalnikach.....</i>	137
<i>Tabela 9 – Sposób modyfikacji elektrody pracującej rozpuszczalnikami oraz rezultaty tego procesu.</i>	139
<i>Tabela 10 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.</i>	145
<i>Tabela 11 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji włoskiej bez modyfikacji, modyfikowanych mieszaniną DMF-H₂O 1:1 oraz sporządzoną w niej zawiesiną 1 mg/ml MWCNT.</i>	146
<i>Tabela 12 – Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss zarejestrowane na elektrodach sitodrukowanych produkcji włoskiej bez modyfikacji oraz modyfikowanych zawiesiną 1 mg/ml nieoczyszczonych lub oczyszczonych MWCNT w mieszaninie DMF-H₂O 1:1.</i>	149
<i>Tabela 13 - Sygnały utlenienia guaniny i adeniny dsDNA-ss nakropionego lub zaadsorbowanego z roztworu na elektrodach sitodrukowanych produkcji polskiej bez modyfikacji oraz zawierających 1% MWCNT w warstwie grafitowej.</i>	154
<i>Tabela 14 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów błękitu metylenowego o określonym stężeniu.....</i>	158
<i>Tabela 15 – Sposób przygotowania roztworów różnych rodzajów DNA o określonym stężeniu, stosowanych w analizie ich oddziaływania z błękitem metylenowym.</i>	166
<i>Tabela 16 – Kolejne dodatki błękitu metylenowego do roztworu pomiarowego podczas analizy jego oddziaływania z dsDNA-ss w obecności ryboflawiny.</i>	167
<i>Tabela 17 – Kolejne dodatki ryboflawiny do roztworu pomiarowego podczas analizy oddziaływania błękitu metylenowego z dsDNA-ss w jej obecności.....</i>	167
<i>Tabela 18 – Sposób przygotowania roztworów pomiarowych różnych rodzajów DNA o określonym stężeniu, stosowanych w analizie ich właściwości elektrochemicznych.</i>	175
<i>Tabela 19 – Dodatki różnych rodzajów DNA plazmidowego o określonym stężeniu do roztworu pomiarowego, stosowanych w analizie ich oddziaływania z błękitem metylenowym.....</i>	180
<i>Tabela 20 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych o określonym stężeniu.</i>	188
<i>Tabela 21 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach voltamperometrycznych roztworów daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych o określonym stężeniu.</i>	197
<i>Tabela 22 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach voltamperometrycznych z (A)₈ roztworów daunorubicyny o określonym stężeniu.....</i>	198
<i>Tabela 23 – Sygnały procentowe utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia daunorubicyny.</i>	202
<i>Tabela 24 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.</i>	203
<i>Tabela 25 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ss w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.....</i>	204
<i>Tabela 26 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia daunorubicyny.</i>	206

<i>Tabela 27 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.....</i>	<i>207</i>
<i>Tabela 28 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny i adeniny dsDNA-ct w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.....</i>	<i>208</i>
<i>Tabela 29 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia daunorubicyny.....</i>	<i>210</i>
<i>Tabela 30 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania adeniny (A)₈ w zależności od stężenia daunorubicyny.....</i>	<i>211</i>
<i>Tabela 31 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ morfolinowy.....</i>	<i>212</i>
<i>Tabela 32 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej daunorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.....</i>	<i>213</i>
<i>Tabela 33 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia doksorubicyny.....</i>	<i>215</i>
<i>Tabela 34 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.....</i>	<i>216</i>
<i>Tabela 35 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ heksametylenoiminowy.....</i>	<i>218</i>
<i>Tabela 36 – Wpływ daunorubicyny, doksorubicyny i ich formamidynowych pochodnych na sygnały utlenienia guaniny i adeniny zawartej w różnych rodzajach DNA zależnie od zakresu stężenia antracyklin.....</i>	<i>220</i>
<i>Tabela 37 – Sposób przygotowania stosowanych w pomiarach spektrofotometrycznych roztworów pomiarowych, stanowiących mieszaniny poszczególnych antracyklin i oligonukleotydów.....</i>	<i>224</i>
<i>Tabela 38 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.....</i>	<i>227</i>
<i>Tabela 39 – Procentowa zmiana sygnałów utleniania guaniny d(GC)₄ i adeniny d(AT)₄ w zależności od stężenia formamidynowej pochodnej doksorubicyny zawierającej układ morfolinowy.....</i>	<i>228</i>

WYKAZ PUBLIKACJI I KONFERENCJI NAUKOWYCH

Wykaz publikacji, w których wykorzystano wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej

1. **A. Palińska**, I. Szpakowska, M. Wyderka, W. Jemielita, M. Konrad, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Electrochemical methods in investigation of methylene blue interaction with DNA using screen printed graphite sensor*”, Proceedings of the 2007 WSEAS Int. Conference on Cellular & Molecular Biology, Biophysics & Bioengineering, Athens, Greece, August 26-28, 2007, 117-120
2. **A. Palińska**, A. Grodzka, H. Elżanowska, B. Kępska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Methylene blue interactions with chromosomal and plasmid DNA on screen-printed carbon electrodes Electroanalysis*”, *Electroanalysis* 22 (2010) 1306-1313
3. A. Gniazdowska, **A. Palińska-Saadi**, E. Krawczyk, H. Elżanowska, M. Maj-Żurawska, „*Supercoiled and linear plasmid DNAs interactions with methylene blue*”, *Bioelectrochemistry* 92 (2013) 32-41
4. **A. Palińska-Saadi**, E. Krawczyk, K. Michalska, H. Elżanowska, M. Maj-Żurawska „*Electrochemical detection of supercoiled and linear plasmid DNA*”, *Bioelectrochemistry* (wysłane do druku: BIOELECHEM-D-11-00376R1)

Wykaz konferencji, na których prezentowano wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej

1. **A. Palińska**, I. Szpakowska, M. Wyderka, W. Jemielita, M. Konrad, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Electrochemical methods in investigation of methylene blue interaction with DNA using screen printed graphite sensor*” (wystąpienie ustne), 3rd WSEAS International Conference, 26-28 sierpnia 2007, Ateny, Grecja
2. **A. Palińska**, I. Szpakowska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Voltammetric methods in investigation of interaction between methylene blue and DNA using screen printed graphite electrodes*” (poster), SMBCS 2007 (Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing), the 3th International Workshop, 4-8 listopada 2007, Włodowice, Polska
3. **A. Palińska**, A. Grodzka, H. Majewska-Elżanowska, B. Kępska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Investigation of the electrochemistry of DNA plasmid using screen-printed electrodes*” (poster), Mátrafüred 2008, International Conference on Electrochemical Sensors, 5-10 października 2008, Dobogókő, Węgry
4. **A. Palińska**, J. Gręda, K. Miecznikowski, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, P. Kulesza, M. Maj-Żurawska, „*Application of multi-walled carbon nanotubes in electrochemical screen-printed graphite DNA biosensors*” (poster), Mátrafüred 2008, International Conference on Electrochemical Sensors, 5-10 października 2008, Dobogókő, Węgry

5. H. Elżanowska, B. Kępska, **A. Palińska**, K. Staroń, M. Maj-Żurawska, „*Electrochemical detection of plasmid DNA*” (poster), 7th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, 22- 25 marca 2009, Szczyrk, Polska
6. **A. Palińska**, H. Elżanowska, A. Ogórek, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*The interactions between methylene blue and various types of DNA at screen-printed electrodes*” (poster), SMBCS 2009 (Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing), the 4th International Workshop, 6-10 listopada 2009, Przegorzały koło Krakowa, Polska
7. **A. Palińska**, M. Łukasiewicz, M. Łukawska, I. Oszczapowicz, J. Oszczapowicz, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Electrochemical analysis of chromosomal DNA and oligonucleotides interactions with daunorubicin and its promising novel amidino derivatives*” (poster), Biosensors 2010, 20th Anniversary World Congress on Biosensors, 26-28 maja 2010, Glasgow, Wielka Brytania
8. A. Radomyski, **A. Palińska**, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska „*Sitodrukowane bioczuJNIKI DNA w analizie toksyczności całkowitej ścieków*” (poster), VIII Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Analityka dla społeczeństwa XXI wieku, 4-9 lipca 2010, Kraków, Polska
9. **A. Palińska**, M. Łukasiewicz, A. Żarnowska, M. Łukawska, I. Oszczapowicz, J. Oszczapowicz, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska, „*Electrochemical analysis of oligonucleotides interactions with daunorubicin, doxorubicin and their novel amidino derivatives*” (poster), XXI Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society [BES], 8-12 maja 2011, Kraków, Polska
10. **A. Palińska**, A. Łomża, H. Elżanowska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Żurawska „*Screen-printed electrodes in investigations of interactions between DNA and methylene blue*” (poster), XXI Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society [BES], 8-12 maja 2011, Kraków, Polska
11. H. Elżanowska, E. Krawczyk, **A. Palińska**, M. Maj-Żurawska „*Supercoiled and linear plasmid DNA probed by slow accumulation on glassy carbon electrode and interactions with methylene blue*” (poster), XXI Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society [BES], 8-12 maja 2011, Kraków, Polska
12. **A. Palińska**, E. Krawczyk, H. Elżanowska, M. Maj-Żurawska, „*Detection of supercoiled and linear plasmid DNA*” (poster), SMBCS 2011 (Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing), the 5th International Workshop, 4-8 listopada 2011, Łochów, Polska
13. H. Elżanowska, A. Gniazdowska, **A. Palińska-Saadi**, A. Banasiak, D. Janiszek, M. Maj-Żurawska, „*Opposing effects of riboflavin and methylene blue on DNA oxidation*” (poster), Bioelectrochemistry 2013 (12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry & XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society), 17-21 marca 2013, Bochum, Niemcy
14. M. Maj-Żurawska, **A. Palińska-Saadi**, A. Szajerska, P. Kozłowski, H. Elżanowska, „*Screen-printed electrodes (SPEs) in investigation of DNA interactions with Ethidium Bromide and Methylene Blue*” (poster), Bioelectrochemistry 2013 (12th Topical Meeting of the International Society of Electrochemistry & XXII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society), 17-21 marca 2013, Bochum, Niemcy

*"Czujemy, że nasza działalność to tylko kropla w morzu,
ale bez niej ocean byłby uboższy."*

Matka Teresa z Kalkuty