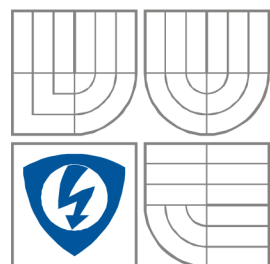


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND
COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM INTERKALACE A KOVALENTNÍ VAZBY DOXORUBICINU DO DEOXYRIBONUKLEOVÉ Kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie

STUDY OF INTERCALATION AND COVALENT BOND OF DOXORUBICIN INTO
DEOXYRIBONUCLEICACID USING VOLTAMMETRY AND IMPEDANCE
SPECTROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

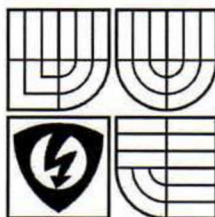
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Hana Kynclová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

BRNO, 2010



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Hana Kynclová

Ročník: 3

ID: 119724

Akademický rok: 2009/10

NÁZEV TÉMATU:

**Studium interkalace a kovalentní vazby doxorubicinu do
deoxyribonuklové
kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie**

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

Doxorubicin je protinádorové léčivo využívané pro léčbu řady nádorových onemocnění převážně u terapie zhoubných nádorů mozku jako neuroblastom. Mechanismus jeho účinku je úzce spojen se vznikem kyslíkových radikálů a interakcí doxorubicinu s DNA. Vzniklé interakaláty a kovalentní addukty vedou k ovlivnění buněčného dělení.

Cílem práce je využít cyklické voltametrie a impedanční spektroskopie k charakterizaci a především rozpoznání změny ve struktuře DNA bez a s kovalentně vázaným doxorubicinem. Voltametrická měření proběhnou na rtuťové pracovní elektrodě při různých rychlostech polarizace. Kromě toho budou vzorky DNA analyzovány na hřebíkových mikroelektrodách pomocí impedanční analýzy a výsledky budou validovány. V experimentu bude využita aplikace naprogramovaná v prostředí LabView ve spojení s analyzátozem Agilent 4284A. Na základě dalšího bioinformatického vyhodnocení dat bude možné sledovat změny způsobené vazbou doxorubicinu do DNA.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] Diamond, D., Principles of Chemical and Biological Sensors. Chemical Analysis, Vol. 150, J. Wiley & Sons, Inc. New York, 1998

Termín zadání: 8.2.2010

Termín odevzdání: 31.5.2010

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Studium interkalace a kovalentní vazby doxorubicinu do deoxyribonukleové kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

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

V Brně dne 31. května 2010

.....
podpis autora

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Jaromíru Hubálkovi, Ph. D. a doc. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych velmi ráda poděkovala Daliboru Húskovi za ochotnou pomoc při měření a zpracování dat a užitečné rady při zpracování práce. Také bych chtěla poděkovat Dušanovi Pavlíkovi za statistické zpracování dat. Poděkovat bych chtěla také Prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc., za experimenty s tkáňovými kulturami a izolace genomové DNA. Velký dík patří i mé rodině a blízkým za vytváření rodinného zázemí a podporu ve studiu.

V Brně dne 31. května 2010

.....
podpis autora

Abstrakt:

Doxorubicin patří k jedněm z nejvíce využívaných protinádorových léčiv současné doby. Využitím metod elektrochemické impedanční spektroskopie a cyklické voltametrie byl zkoumán vliv doxorubicinu na buňky senzitivní k doxorubicinu a buňky rezistentní.

Abstract:

Doxorubicine is one of the most used anticancer medicaments nowadays. Improvement of Electrochemical Impedance Spectroscopy and cyclic voltammetry was investigated influence of doxorubicine to sensitive cells and resistibility cells.

Klíčová slova:

impedance, impedanční spektroskopie, DNA, hřebínkové elektrody, doxorubicin, voltametrie, neuroblastom

Keywords:

impedance, impedance spectroscopy, DNA, comb-like electrode, doxorubicine, voltammetry, neuroblastom

Bibliografická citace práce

KYNCLOVÁ, H. *Studium interkalace a kovalentní vazby doxorubicinu do deoxyribonuklové kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010. 48 s., 3 příl. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jaromír Hubálek, Ph.D.

Obsah

I.	Úvod.....	7
II.	Cíle práce	7
III.	Teoretická část.....	8
1.	Deoxyribonukleová kyselina - DNA.....	8
	Primární struktura	8
	Sekundární struktura	10
	Analýza sekvencí DNA.....	12
	Exprese genu	12
	Genové mutace nukleových kyselin.....	12
	Repetice.....	12
2.	Metody analýzy DNA	12
	Elektroforéza.....	12
	RFLP – restrikční štěpení.....	13
	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
	Elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin.....	13
3.	Doxorubicin	14
	Historie a vývoj léku	14
	Mechanismus účinku antracyklinů	15
	Nežádoucí účinky	15
	Neuroblastom.....	16
4.	Impedanční spektroskopie	16
	Impedance	16
	Impedanční spektroskopie v elektrochemickém systému	17
	Elektrodová dvouvrstva	19
	Odvození impedanční funkce v elektrochemickém systému.....	21
5.	Voltametrie	22
	Proces na pracovní elektrodě	23
	Faradaický a kapacitní proud.....	23
	Voltamogram	24
	Cyklická voltametrie	24
6.	Fyzikálně chemická charakteristika použitých pracovních elektrod	25
	Konstrukce elektrody	25
	Charakterizace elektrod pomocí EIS	26
IV.	Materiál a metody.....	30
1.	Pufr	30
2.	Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě	30
3.	Buněčné kultury.....	30
4.	Elektrody a přístroj pro spektroskopická měření	30

V.	Výsledky a diskuse.....	31
1.	Charakterizace čidel pomocí EIS	31
2.	Cyklická voltametrie	34
	Voltamogram	34
	Vliv cytostatik.....	36
	Statistické vyhodnocení	37
3.	Elektrochemická impedanční spektroskopie	40
	EIS-závislost na koncentraci.....	40
	Impedance DNA senzitivních a rezistentních buněk	41
VI.	Závěr	46
VII.	Literatura.....	47
VIII.	Příloha A	49
IX.	Příloha B	51
X.	Příloha C	53

I. Úvod

V poslední době stále více roste zájem o vývoj biosenzorových metod, které by napomohly zkoumání a analýze vlatností molekuly deoxyribonuklové kyseliny (DNA). Biosenzory všeobecně jsou analyzační zařízení skládající se z biorekogničního prvku (molekula sloužící k detekci jiných molekul se kterými specificky reaguje – nukleová kyselina, protilátka, receptor), prvku tvořícího citlivou vrstvu na povrchu senzoru a fyzikálního převodníku signálu.

Příčinou velkého rozvoje DNA biosenzorů byl i celosvětový projekt přečtení lidského genomu. Víme, že lidský genom obsahuje 3 miliardy párů dusíkatých bází. Bylo tedy potřeba velkého rozvoje a úsilí v oblasti sekvenačních metod. Celý lidský genom byl poprvé přečten roku 2000 za 3 miliardy amerických dolarů a účasti stovek vědeckých týmů. „Pár bází za dolar“. S postupem rozvoje technologií včetně nových senzorů se postupně snižovala i cena přečtení celého lidského genomu. V roce 2003 se cena snížila na 300 milionů USD, v roce 2007 1 milion USD, roku 2008 cena velmi poskočila a celý genom byl přečten za 60 tisíc USD. V roce 2009 byl lidský genom přečten za neuvěřitelných 5000 dolarů. Nyní probíhá soutěž o to, kdo přečte lidský genom za 1000 USD. Jak je tedy vidět během posledních deseti let od prvního přečtení genomu člověka do dnešních dní se cena sekvenace snížila téměř 600 tisíckrát. Z tohoto můžeme vidět, jak vývoj technologií a především senzorové techniky jde rychle vpřed.

Dalším účelem rozvoje biosensingu byla potřeba získat citlivé, selektivní a levné možnosti detekce DNA sekvencí nebo mutovaných genů zodpovědných za nemoci, které jsou podmíněné geny. Jsou to právě dusíkaté báze DNA, které jsou silně ovlivňovány vnějšími škodlivými faktory jako jsou ionizační záření, interkalační a kovalentně se vážající molekuly.

Pro takové účely se jako vhodné metody pro zkoumání DNA ukázaly i metody elektrochemické detekce. Poskytují totiž přímo elektrický signál a není proto potřeba převodníků, které by zvyšovaly cenu senzorů. [1]

II. Cíle práce

- a) Sumarizovat literární data o impedanci nukleových kyselin, impedanční spektroskopii a voltametii
- b) Ověření hřebíkových elektrod a jejich charakterizace pro detekci DNA
- c) Analýza genomové DNA na hřebíkových elektrodách
- d) Analýza genomové DNA využitím voltametrie
- e) Porovnání DNA s kovalentně vázaným protinádorovým léčivem doxorubicinem a DNA rezistentní k doxorubicinu

III. Teoretická část

1. Deoxyribonukleová kyselina - DNA

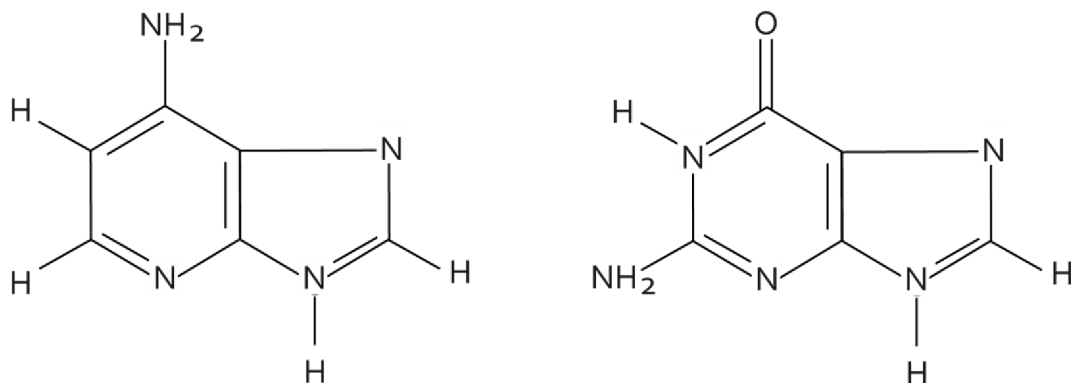
Deoxyribonukleová kyselina (DNA) se řadí mezi nukleové kyseliny a je základní nositelkou genetické informace u všech známých organismů (eukaryotických, prokaryotických i virů). Doposud se pouze nepodařilo odhalit nukleovou kyselinu u onemocnění vznikající agregací proteinů označených jako priony. Její hlavní úlohou je dlouhodobé uchování genetické informace a především její předání do dceřiných buněk. Molekula DNA v organismu kóduje všechny instrukce pro kompletní vývoj organismu (tvar těla, orgány) a všechny jeho vlastnosti (kognitivní funkce, ale i chování). [2] Molekula DNA byla poprvé objevena v roce 1869, kdy ji švýcarský lékař Mischer izoloval z buněk lidských bílých krvinek, ale nepřisuzoval jí žádné významné biologické vlastnosti. Teprve ve dvacátých letech 20. století pak byla prokázána role DNA v oblasti dědičnosti.

Charakteristická struktura DNA byla objevena roku 1953 američanem Jamesem Watsonem a britek Francisem Crickem, kteří využili změřené difrakční vzory DNA od Rosalyn Franklinové ze kterých vyvodili helicitu molekuly, jejíž motiv se opakuje po 0,2 nm. Watson a Crick sestavili model DNA, což je dvojitá šroubovice s antiparalelní orientací řetězců, kde uvnitř molekuly se nachází dusíkaté báze. Dusíkaté báze jsou spojeny vodíkovými vazbami a párují se adenin s thyminem a cytosin s guaninem. Roku 1962 obdrželi Crick, Watson a Wilkins Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. [3] Kostru DNA tvoří cukerná složka s navázaným zbytkem kyseliny fosforečné, připojeným esterovou vazbou na 5' konci molekuly. Blízko k sestavení modelu DNA byl Linus Pauling, který sestrojil trojšroubovicový model DNA, aniž by znal difraktogramy Franklinové.

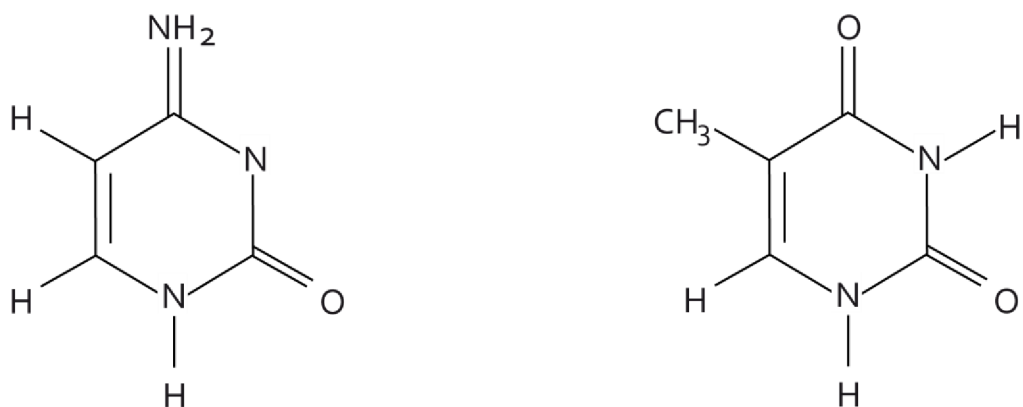
Primární struktura

Primární struktura je určena pořadím nukleotidů v polynukleotidovém řetězci. Podle konvence se pořadí nukleotidů zapisuje směrem 5' → 3' a 3' → 5' [2].

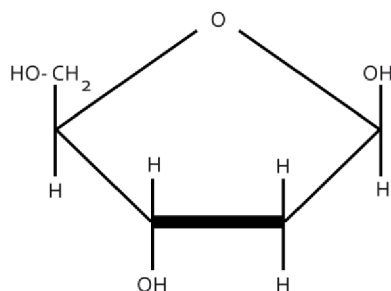
Nukleotidy obsahující cukr deoxyribózu, se nazývají deoxyribonukleotidy. Nukleosid je sloučenina vzniklá spojením dusíkaté (purinové nebo pyrimidinové) báze N – glykosidickou vazbou s deoxyribózou (ribózou v případě RNA). Na Obr. 1 můžeme vidět vzorce purinových bází adeninu a guaninu. Na Obr. 2 vzorce pyrimidinových bází cytosinu a thyminu. Obr. 3 ukazuje cukernou složku DNA 2 – deoxyribózu. Obr. 4 ukazuje číslování uhlíků u purinových a pyrimidinových bází.



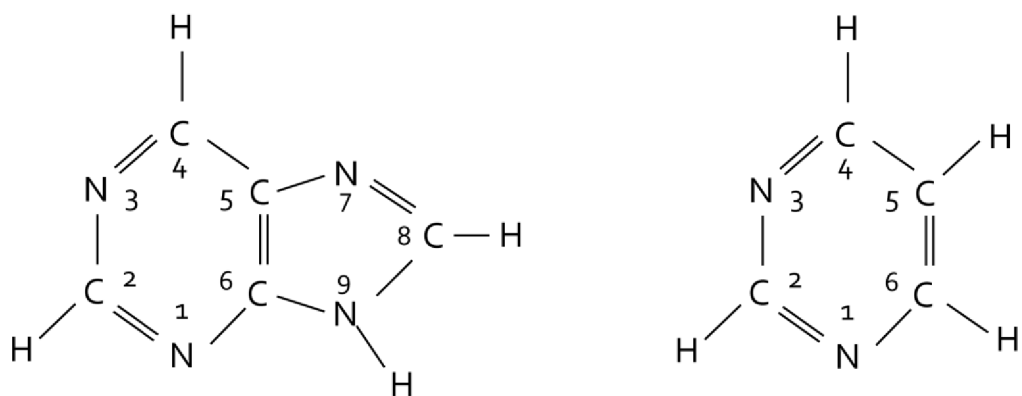
Obr. 1 Purinové báze, vlevo adenin, vpravo guanin



Obr. 2 Pyrimidinové báze, vlevo cytosin, vpravo thymin



Obr. 3 Deoxyriboza



Obr.4 Číslování purinů (vlevo) a pyrimidinů (vpravo)

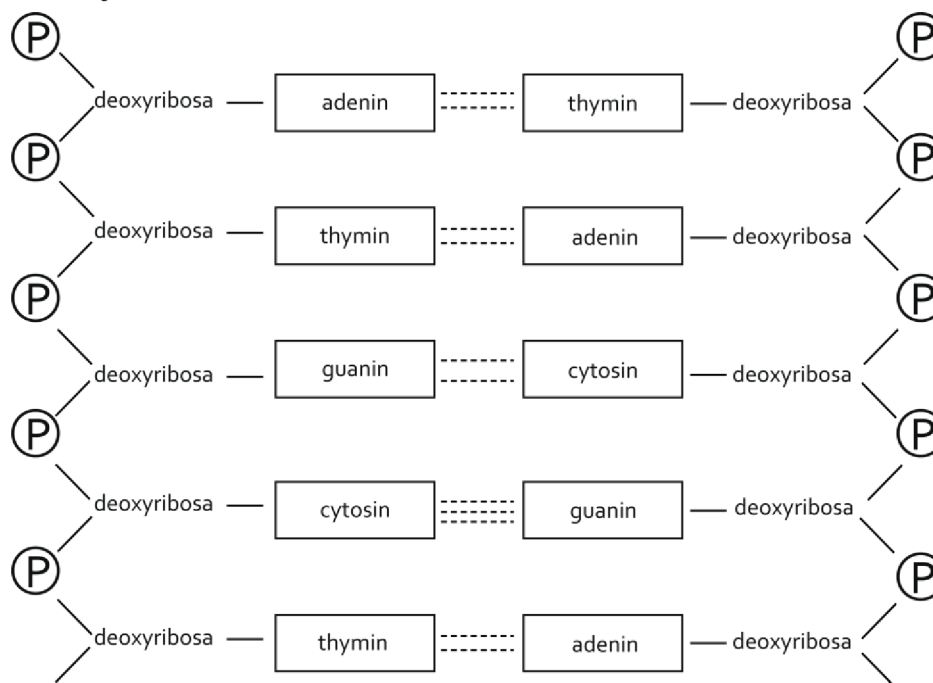
V polynukleotidovém řetězci jsou nukleotidy spojeny 3', 5'- fosfodiesterovou vazbou, která je mezi C3'deoxyribozou a C5'deoxyribózou následujícího nukleotidu. Jeden konec řetězce je proto označován jako 3'- konec a druhý 5'- konec. Druhý konec je tvořen fosfátovou skupinou. Nukleotidy se vzájemně spojují vodíkovými vazbami nebo se tyto vazby tvoří uvnitř stejného nukleotidového řetězce a tak vzniká sekundární vazba.

Strukturní typy nukleových kyselin

Párování bází umožňuje několik strukturních typů. Prvním typem jsou lineární molekuly nukleových kyselin, které můžeme dále rozdělit na jednořetězové molekuly DNA a dvouřetězové molekuly DNA nebo RNA. Druhým typem jsou kružnicové molekuly nukleových kyselin a ty se opět dělí na jednořetězové a dvouřetězové. Jednořetězové molekuly se označují zkratkou ss (single stranded) a dvouřetězové zkratkou ds (double stranded). Potom zapisujeme ve formě: ssDNA, dsDNA.

Sekundární struktura

Základním pravidlem pro vytvoření sekundární vazby je Watsonovo–Crickovo pravidlo párování bází. Podle tohoto pravidla se adenin páruje s thyminem a guanin se páruje s cytosinem prostřednictvím vodíkových vazeb. Mezi adeninem a thyminem se tvoří dvě vodíkové vazby a mezi cytosinem a guaninem tři vodíkové vazby. Schéma sekundární struktury DNA ukazuje Obr. 5.



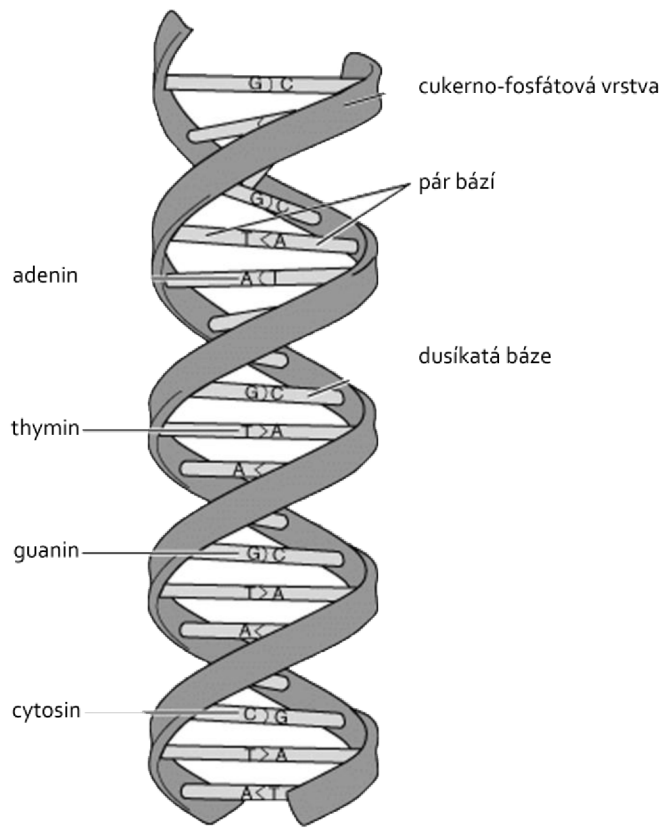
Obr. 5 Schéma sekundární struktury DNA

Nejčastější podobou sekundární struktury DNA je dvoušroubovice. Skládá se ze dvou polydeoxyribonukleotidových řetězců, které se otáčejí okolo společné osy. Oba řetězce jsou vzájemně komplementární (řídí se pravidlem párování bází). Jeden závit dvoušroubovice tvoří 10,5 párů bází (3,4 nm). Vzdálenost dvou párů je 0,34 nm. Vzdálenost fosfoglycidové vrstvy od osy šroubovice je 1 nm. Komplementární řetězce jsou antiparalelní, což znamená, že na jednom řetězci je směr fosfodiesterových vazeb $3' \rightarrow 5'$ a na druhém řetězci $5' \rightarrow 3'$. Na jednom řetězci tedy směřují vazby od $C5'$ k $C3'$ a na druhém naopak. Pro dvoušroubovici dále platí Chargaffovo pravidlo, které říká, že počet bází adeninu v molekule DNA je roven počtu bází thyminu a množství cytosinu je rovno množství guaninu. Zároveň množství purinů je rovno množství pyrimidinů. Vzdálenost mezi všemi možnými páry bází (GC, CG, AT, TA) mezi $C1'$ atomem a atomem v protilehlém řetězci je přibližně stejná. U dvoušroubovice také označujeme úhel zkrutu, který udává, o jaký úhel jsou báze daného páru pootočený.

Vnější vzhled šroubovice není hladký, ale jsou na něm zřetelné dva žlábků rozdílné šířky a hloubky. Důvodem je, že spojnice $C1'$ atomů a komplementárních nukleotidů neproniká osou dvoušroubovice a není na ni kolmá. Menší žlábek obsahuje pyrimidinovou $C2$ a purinovou $N3$ stranu páru báze. Větší žlábek obsahuje $C4$ pyrimidinovou a $C6$ purinovou stranu páru báze. Větší žlábek je hlubší než menší a oba jsou schopné vytvářet vodíkové vazby s proteiny v důsledku přítomnosti atomů schopných tyto vazby tvořit. Větší žlábek vodíkové vazby vytváří ve větší míře než žlábek menší.

Ve dvoušroubovici se uplatňuje tzv. dvoušroubovicové vinutí, které dělíme na levotočivé a pravotočivé. Pravotočivé vinutí se řídí pravidlem pravé ruky, které říká, že

umístíme-li palec pravé ruky ve směru osy dvoušroubovice, pak prsty ukazují směr jejího stoupání. Pravotočivou šroubovici ukazuje Obr. 6. [4]



Obr.6 Pravotočivá dvoušroubovice [4]

Konformace DNA

V různých podmínkách hydratace molekuly DNA vznikají různá uspořádání dvoušroubovicových molekul DNA. Pravotočivé šroubovice tvoří konformace A a B, levotočivé konformace Z. Konformace B je stabilní při množství vody kolem 95 % a jedná se o dvoušroubovici, která byla popsána Watsonem a Crickem. Konformace A se vyskytuje při množství vody kolem 75 %. U B-DNA se vyskytuje větší žlábek hluboký a široký a menší žlábek je také hluboký, ale úzký. V A-DNA je větší žlábek úzký a hluboký, menší je široký a mělký. U Z-DNA je větší žlábek plochý a menší úzký a hluboký. Dále A-DNA tvoří dlouhou a plochou molekulu, B-DNA je tenčí a vyšší, Z-DNA je polodlouhá.

Za zvýšené teploty dochází k rozvolnění vodíkových vazeb a tak k rozpadu dvoušroubovice na dva polynukleotidové řetězce. Tento proces se nazývá denaturace DNA. Teplota potřebná k denuraci DNA roste s množstvím CG párů bází obsažených v DNA. Rozmezí denaturačních teplot se pohybuje v rozmezí od 30°C do 100°C. Proces renaturace znamená znovuobnovení dvoušroubovicové struktury a uskuteční se postupným snižováním teploty. Hybridizace molekul DNA je proces, při kterém dochází k renaturaci řetězců z různých molekul DNA. Jedná se o spojování částečně nebo úplně komplementárních řetězců, které pochází z různých dvouřetězových molekul DNA. Molekuly vzniklé tímto procesem nazýváme hybridní molekuly DNA [5].

Analýza sekvencí DNA

Sekvenace DNA je termín pro metody, kterými zjišťujeme pořadí nukleových bází v sekvencích DNA. Sekvenování je důležité pro výzkum biologických procesů, v diagnostice některých nemocí. Dále se uplatnilo při čtení lidského genomu a mnoha jiných organismů. K sekvenování se užívá dvou základních sekvenačních metod a to Maxam-Gilbertova sekvenování a Sangerova sekvenování [6]. Cílem sekvenačních metod je tedy stanovení primární struktury DNA. První metoda je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin. Tuto metodu nazýváme jako chemickou metodu. Druhá metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA a nazýváme ji enzymovou metodou. Základem obou metod je příprava molekul DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji se užívají restriční fragmenty nebo fragmenty získané z PCR [7].

Exprese genu

Expresí genu je proces, kdy je informace uložená v genu převáděna v reálnou buněčnou strukturu. Dochází k několikanásobné syntéze proteinu, který danému genu, nebo úseku odpovídá, což znamená, že je jím kódován [8]. Funkční jednotka DNA se nazývá gen. Gen se v procesu transkripce přepíše do molekuly mRNA a slouží jako přenašeč informace od DNA k ribozomům, kde probíhá translace. Translace je tvorba primární struktury bílkovin dle mRNA.

Genové mutace nukleových kyselin

Mutace je dědičná změna genotypu, jejíž molekulární podstatou je nukleotidová substituce, delece nebo inserce. Genové mutace jsou také nazývány bodovými mutacemi nebo-li SNP (single nucleotide polymorphism). Nukleotidová substituce je výměna nukleotidů v jednořetězových nukleových kyselinách nebo výměna nukleotidových párů v dvouřetězových kyselinách. Nukleotidovou substitucí dělíme na transici, kdy dochází k záměně purinového nukleotidu za purinový a pyrimidinového za pyrimidinový, a na transverzi. Při transverzi dochází k výměně purinového nukleotidu za pyrimidinový a naopak. Nukleotidová substituce mění význam kódonu (triplet za sebou jdoucích bází v mRNA). Delece je ztráta jednoho nebo více nukleotidů ze sekvence. Mutace způsobené delecí nebo insercí jsou nazývány jako posunové mutace. Inserce je vložení nukleotidu nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence [9].

Repetice

DNA repetice jsou opakující se sekvence v nukleotidové sekvenci DNA. Genom takových repetitivních sekvencí obsahuje až 5 %. Repetice se liší počtem a svou velikostí a rozlišujeme dva typy: tandemové repetice a roztroušené repetice. První jsou spojeny s dědičnými onemocněními jako je například Huntingtonova nemoc, syndrom fragilního X chromozomu a svalové ataxie [10].

2. Metody analýzy DNA

Elektroforéza

Elektroforéza je jednou z nejběžnějších separačních metod molekulární biologie. Slouží k izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Elektroforéza je založena na pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Nukleové kyseliny obsahují negativně nabitě fosfátové skupiny a proto se molekuly nukleových kyselin pohybují směrem ke kladné elektrodě

(anodě). Z praktických důvodů se elektroforéza provádí v gelovém nosiči. Elektroforetický gel používaný pro separaci je polyakralamidový nebo agaróza. Tyto gely vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Agarozové gely jsou vhodnější pro separaci nukleových kyselin od zhruba 100 bp (100 párů bází) do 50 kb. Polyakrylamidové gely jsou používány k separaci menších molekul od 10 bp do 1000 bp. Rychlost pohybu molekul v gelu se nazývá jako elektroforetická pohyblivost [11].

RFLP – restriční štěpení

Polymorfismus délky restričních fragment (restriction fragment length polymorphism) je proces, při kterém se pomocí enzymů rozstříhá několik vzorků DNA z různých zdrojů. Poté se projeví rozdíly ve vzniklých restričních fragmentech. Tento polymorfismus je způsoben rozdíly ve stavbě DNA a právě na to reagují restriční enzymy. RFLP se využívá k určení genetických rozdílů mezi jedinci. Dále pak k prenatálním testům na srpkovou anémii [12].

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (Polymerase chain reaction) umožňuje získat specifický úsek sekvence genomové DNA. Princip je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem živých organismů. Při PCR se cyklicky opakuje enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězové DNA a to směrem od 5'-3' prostřednictvím DNA polymerázy. Studovaný úsek sekvence je vymezen připojením dvou krátkých oligonukleotidů (primerů). Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza primery určené sekvence DNA [13].

Elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin

Elektrochemie nukleových kyselin byla objevena roku 1960 na rtuťové pracovní elektrodě Emilem Palečkem na Biofyzikálním ústavu AV ČR. Od té doby je dané problematice věnována velká pozornost. Pro elektrochemické zkoumání nukleových kyselin využil polarografických metod a zjistil, že velké polymerní molekuly (DNA, RNA) poskytují elektrochemické signály. Dále bylo zjištěno, že elektrochemické signály přinášejí informaci o typu molekuly (DNA, RNA), o její struktuře a změnách struktury. Také se takto dají určit interakce molekul, poškození a chemické modifikace [14].

Elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin jsou v tom, že molekula je schopna přijímat elektrony od elektrody a nebo je elektrodě odevzdávat, případně se adsorbovat na její povrch.

Nukleové kyseliny můžeme polarograficky, voltametriky a chronopotenciometriky analyzovat pomocí signálů, které vznikají při interakci s povrchem nabitě pracovní elektrody. Pro analýzu nukleových kyselin jsou nejčastěji užívány rtuťové elektrody (kapající elektroda – DME dropping mercury electrode, stacionární elektroda – HMDE hanging mercury drop electrode) nebo uhlíkové elektrody. Rtuťové elektrody jsou schopné měřit při negativnějším potenciálu a užívají se k redukci nukleových kyselin. Uhlíkové elektrody měří při pozitivnějších potenciálech a užívají se především k oxidaci nukleových kyselin. Pro měření na uhlíkových elektrodách je však potřeba více koncentrovaných roztoků než u rtuťových elektrod a proto se začalo užívat amalgámových elektrod, což jsou pevné elektrody obsahující rtuť. [14,15,16]

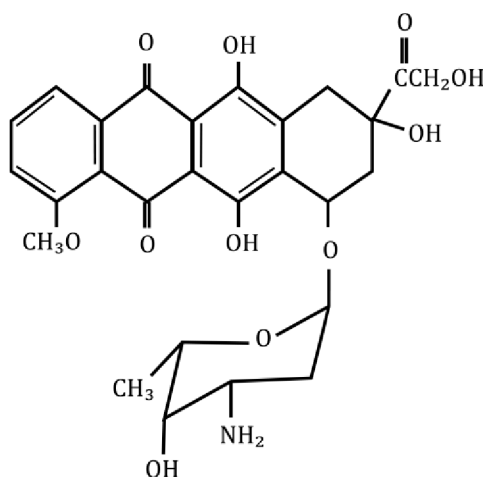
Emil Paleček objevil, že signal poskytovaný oscilografickou metodou závisí na struktuře DNA. Ukázal, že dusíkaté báze cytosin a adenin poskytují redukční signal (CA pik) na negativním potenciálu okolo -1,4V. Guanin poskytuje oxidační signal redukčního produktu přibližně při potenciálu -0,3V. [15]

Dále byly zjištěny rozdíly mezi signály ssDNA (jednořetězová) a dsDNA (dvouřetězová), které byly měřeny na rtuťových elektrodách. Jednořetězové molekuly DNA poskytují silné polarografické signály, protože báze nejsou párovány a proto jsou přístupnější povrchu elektrody. Dvouřetězové molekuly DNA poskytují pouze malé signály [14]. Rozdíly mohou být způsobené i vyšší flexibilitou ssDNA, která se tak lépe adsorbuje na povrch elektrody.

Rozdíly jsou i v měřeních dlouhých nebo krátkých řetězců DNA. U dlouhých řetězců nemusí dojít k adsorbci celého řetězce a mohou tam zůstat volné úseky. Pokud jsou tyto volné úseky ve velké vzdálenosti od elektrody, neprojeví se v měření [16].

3. Doxorubicin

Doxorubicin je protinádorové léčivo využívané pro chemoterapii a to především v léčbě různých druhů maligních tumorů jako je především neuroblastom. Dále se využívá například v léčbě akutní myeloidní leukemie, akutní lymfoidní leukemie, non - Hodgkinského a Hodgkinského lymfomu a dalších. Využívá se i v léčení nádorů močového měchýře, žaludku, štítné žlázy, vaječníků, prsu, plic a kůže [17]. Řadí se mezi antracyklinová antibiotika a jeho strukturu můžeme vidět na Obr. 7.



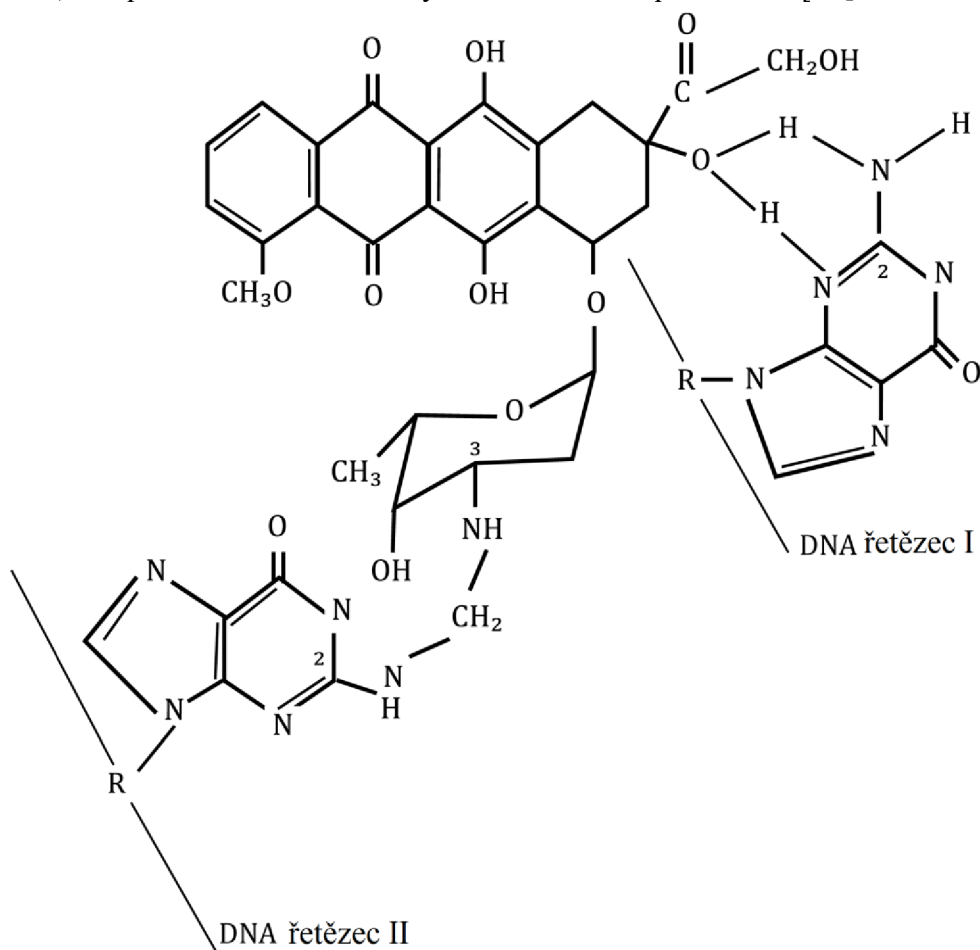
Obr. 7 Doxorubicin

Historie a vývoj léku

Doxorubicin byl poprvé izolován na počátku roku 1960 z houby *Streptomyces peucetius* ve Farmitalia Research Laboratories of Milane. Tento objev nastal ihned po objevu prvního antracyklinu, daunorubicinu, který se od doxorubicinu liší pouze OH skupinou. Daunorubicin je však oproti doxorubicinu vhodný pouze k léčbě akutní leukémie. Na konci roku 1960 byla v klinických studiích prokázána protinádorová aktivita, ale také toxicita pro další zdravé buňky. Roku 1974 byl schválen pro léčbu ve Spojených státech a dále se výzkum zaměřoval na vývoj derivátů doxorubicinu, které by měly stejné nebo lepší protinádorové účinky a menší toxicitu pro jiné buňky, především srdeční. Základní struktura dnešních léků je stejná, menší rozdíly jsou pouze v antracyklinovém kruhu. V posledních třiceti letech bylo testováno více než dva tisíce analogů, ale doxorubicin stále patří mezi jedno z nejpoužívanějších léčiv. Další výzkumy měly za cíl snížit toxicitu léku. Například podávat neaktivní léčivo, které se aktivuje, když dosáhne cílových buněk nebo zapouzdření léku do fosfolipidového transportního systému. Dále se zkoumaly léky, které by měly snížit toxicitu doxorubicinu [18].

Mechanismus účinku antracyklinů

Mechanismus účinku doxorubicinu je navzdory velkému využití stále ještě nejistý. Je však jisté, že primárním cílem antracyklinů je buněčná DNA. Jednou z možností účinku je interkalace (vmezeření) doxorubicinu do struktury DNA, což vede k zastavení syntézy makromolekuly. Dochází k inhibici enzymu topoisomerázy II, který odvíjí molekulu DNA pro přepis. Dále může dojít ke vzniku volných radikálů, které vedou ke zničení DNA nebo peroxidaci lipidů. Může dojít k tzv. „cross-linking“ struktury DNA. Na Obr. 8 můžeme vidět doxorubicin interkalovaný mezi komplementární řetězce DNA. Antrachinonový kruh vložený mezi DNA stabilizuje komplex vodíkovou vazbou [19]. Vmezeřením struktury mezi řetězce dvoušroubovice dochází i k zpevnění, prodloužení, změně stoupavosti závitů a částečnému odvinutí řetězce, což pak vede k inhibici enzymů na molekulu působících [20].



Obr.8 Doxorubicin interkalovaný do DNA

Nežádoucí účinky

Mezi nežádoucí účinky doxorubicinu patří nevolnost, zvracení, srdeční arytmie, možné snížení počtu bílých krvinek (neutropenie), ztátu vlasů (alopecie). Při překročení kumulativní dávky látky (550 mg/m²) se zvyšuje riziko srdečních onemocnění jako je například městnavé srdeční selhání, dilatační kardiomyopatie. Kardiotoxicita doxorubicinu je charakterizována jako na dávce závislý pokles mitochondriální oxidativní fosforylace. Reaktivní formy kyslíku vzniklé interakcí doxorubicinu s železem mohou způsobit poškození srdečních buněk myocytů, což způsobuje snížení počtu myofibril. Dále se může u některých

pacientů vyskytnout plantární erytrodysestézie projevující se otokem dlaní a chodidel, bolestivostí a zarudnutím.[21]

Neuroblastom

Neuroblastom je nejčastější extrakraniální (mimolební) nádor dětských pacientů. V padesáti procentech případů se jedná o děti mladší dvou let. Neuroblastom je neuroendokrinní nádor vznikající ze sympatického nervového systému.[22] Nejčastější je neuroblastom původem z nadledvin, pak krku, hrudníku, míchy nebo pánve. Nemoc se vyznačuje velkou rozmanitostí a podle závažnosti onemocnění se dělí do tří skupin: nízké, střední a vysoké riziko. Onemocnění s nižšími riziky se řeší chirurgickou cestou a jsou dobře vyléčitelné. Středně rizikové případy se léčí chirurgicky a chemoterapií (například doxorubicin). Více rizikové nemoci se léčí více způsobovou léčbou (chemoterapie, chirurgie, radioterapie, autologní transplantace kostní dřeně). Příčiny vzniku neuroblastomu jsou stále nejisté, uvažují se faktory mající vliv na plod během těhotenství a faktory dědičné [23].

Symptomy doprovázející nádor se liší v závislosti na umístění primárního nádoru a metastáz. Všeobecně se projevuje únava, ztráta chuti k jídlu, horečka a bolest spojená s místem nádoru. Padesát až šedesát procent neuroblastomů metastazuje do jiných částí těla a to většinou ještě před přítomností příznaků [24].

Diagnostika probíhá využíváním metod chirurgické patologie, sérologie (neuroblastomy bývají doprovázeny zvýšenou hladinou katecholaminů a jejich metabolitů v krvi nebo moči), zobrazovacích metod (MRI, CT) a histologie (buňky neuroblastomů pod mikroskopem jsou popsány jako modré, malé, kulaté a obsahující růžicovitý vzor)[25].

4. Impedanční spektroskopie

Impedance

Pojem impedance popisuje zdánlivý odpor obvodu a fázový posuv napětí oproti proudu při průchodu harmonického střídavého proudu. Je důležitým parametrem pro charakteristiku elektrických obvodů, součástek a materiálů pro jejich výrobu. Impedance je definována jako frekvenčně závislá a je určena jako komplexní veličina s reálnou a imaginární složkou. Jednotkou impedance je ohm (Ω). V kartézském tvaru se zapisuje jako

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

$$R = |Z| \cdot \cos \phi, \quad (2)$$

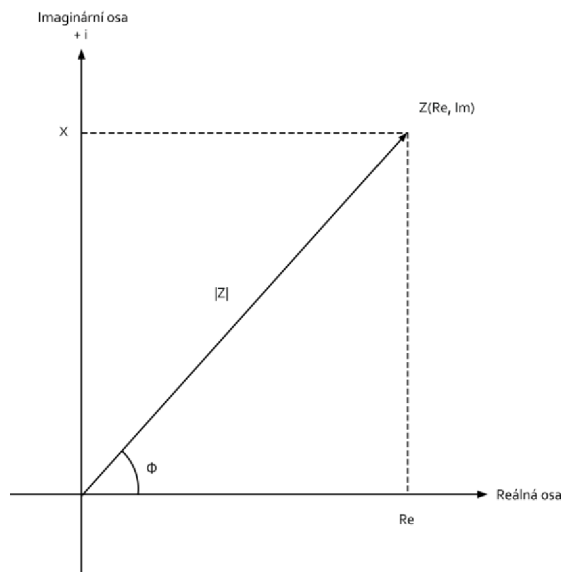
$$\text{Im} = |Z| \cdot \sin \phi, \quad (3)$$

$$|Z| = \sqrt{\text{Re}^2 + \text{Im}^2}, \quad (4)$$

kde Z je označení celkové impedance, Re je reálná složka impedance, Im imaginární složka impedance a ϕ je úhel, který svírá Z s osou Re [26]

Vztah (1) můžeme zapsat i v polárních souřadnicích

$$Z = Z e^{j\phi}. \quad (5)$$



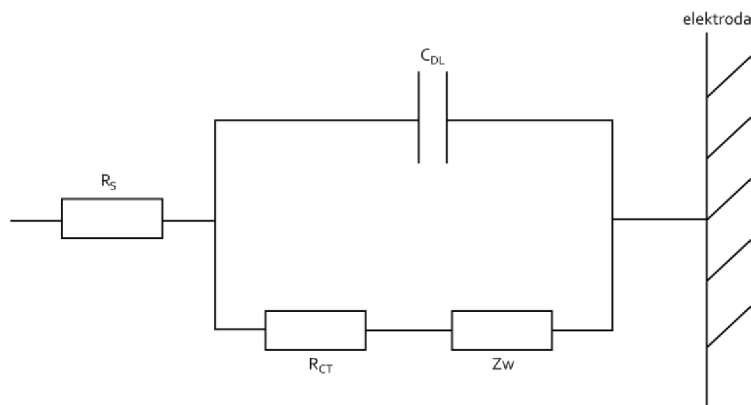
Obr.9 Komplexní rovina impedance

Impedanční spektroskopie v elektrochemickém systému

Je známo, že měření elektrochemické impedanční spektroskopie je důležité pro studium dějů na povrchově upravených elektrodách. Je měřena odpověď proudu na aplikování sinusového napěťového signálu na elektrochemický článek. Impedance je počítána ze vztahu mezi napětím $U(j\omega)$ a proudem $I(j\omega)$, kde $j = \sqrt{-1}$ a ω a f jsou budící frekvence s jednotkami rad. s^{-1} a Hz . Komplexní impedance je reprezentována součtem reálné $Z_{\text{Re}}(\omega)$ a imaginární složky $Z_{\text{Im}}(\omega)$.

$$Z(j\omega) = \frac{U(j\omega)}{I(j\omega)} = Z_{\text{Re}}(\omega) + jZ_{\text{Im}}(\omega), \quad \omega = 2\pi \cdot f. \quad (6)$$

V případě nezávislosti Z_{Re} na frekvenci je vztah lineární, v opačném případě je nelineární jako například v případě elektrochemického článku. Elektrochemické přeměny na rozhraní elektroda–elektrolyt může být modelována náhradním elektrickým obvodem odpovídajícím impedanci. Náhradní elektrický obvod (Obr. 10), který je užíván k modelování mezifázového jevu, obsahuje odpor elektrolytu R_S , který je dán Ohmovým zákonem, Warburgovou impedancí Z_W , danou difuzí iontů v elektrolytu k elektrodovému rozhraní a tudíž i závislou na koncentraci, kapacitu dvouvrstvy C_{DL} a odpor přenosu náboje R_{CT} .

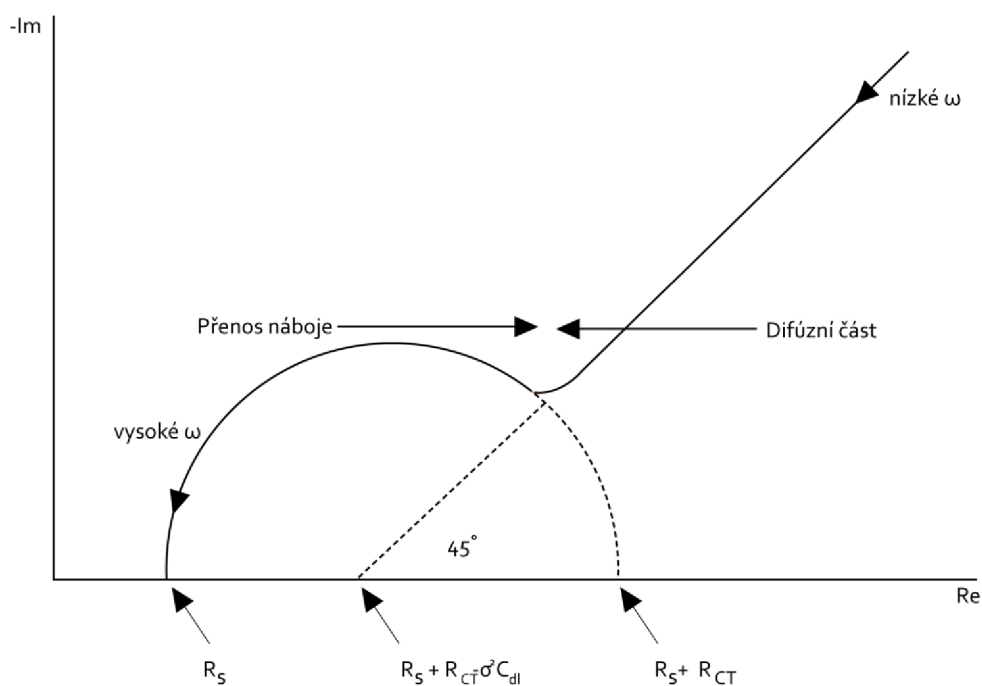


Obr.10 Náhradní elektrický model impedance

Paralelně zapojené součástky jsou kapacita dvouvrstvy C_{DL} a v druhé větvi Warburgova impedance Z_w a odpor přenosu náboje R_{CT} . Tyto prvky jsou uvedené do celkového proudu přes pracovní rozhraní. Celkový proud je součtem příspěvků z Faradayových dějů I_F a nabíjení dvouvrstvy I_C . Celkový proud musí projít přes odpor roztoku R_S , který je vložen jako sériový prvek náhradního obvodu. Odpor elektrolytu R_S a Warburgova impedance Z_w jsou prvky charakterizující vlastnosti elektrolytického roztoku a difuzní vlastnosti roztoku. Proto tyto prvky neovlivňují chemické přeměny na povrchu elektrody. Kapacita dvouvrstvy C_{DL} a odpor přenosu náboje R_{CT} se podílí na dielektrických a izolačních vlastnostech na rozhraní elektroda–elektrolyt a jsou společně v paralelním zapojení. Kapacita dvouvrstvy závisí na dielektrické permitivitě představené do dvoj nábojové vrstvy molekul. Pro méně polární molekuly je kapacita menší. Odpor přenosu náboje popisuje redoxní děj probíhající při přenosu elektronu na rozhraní elektrody. Na izolačně upravené elektrodě se očekává snížený přenos náboje přes rozhraní a odpor přenosu náboje poroste.

Charakteristický tvar Faradaického impedančního spektra je určen komplexní rovinou impedance. Tento průběh je také nazýván Nyquistův diagram (Obr.11). Toto zobrazení zahrnuje polokruhovitý úsek a přímkovou část. Polokruhová část je pozorována na rozsahu vysokých frekvencí a je dána procesem přenosu náboje – lineární část impedance. Přímková část je charakteristická pro rozsah nízkých frekvencí a dána difúzně limitujícím elektrochemickým procesem – nelineární část impedance. Pokud dochází k velmi rychlému přenosu náboje (silně koncentrované roztoky), impedanční spektrum obsahuje především difuzní část a minimální polokruhovitou část. Naopak, v případě pomalého přenosu náboje přes rozhraní, obsahuje spektrum hlavně polokruhovitou část a menší přímkový úsek (slabě koncentrované roztoky).

Z Nyquistova grafu můžeme v ideálním případě určit přenosové a difuzní charakteristiky. Poloměr půlkruhu je roven přenosu náboje R_{CT} . Průsečík půlkruhu ve vysokých frekvencích s reálnou osou je roven odporu roztoku R_S . Dokreslením kruhu do nízkých frekvencí a jeho průniku s reálnou osou dostaneme hodnotu, která udává součet $R_S + R_{CT}$. [27]

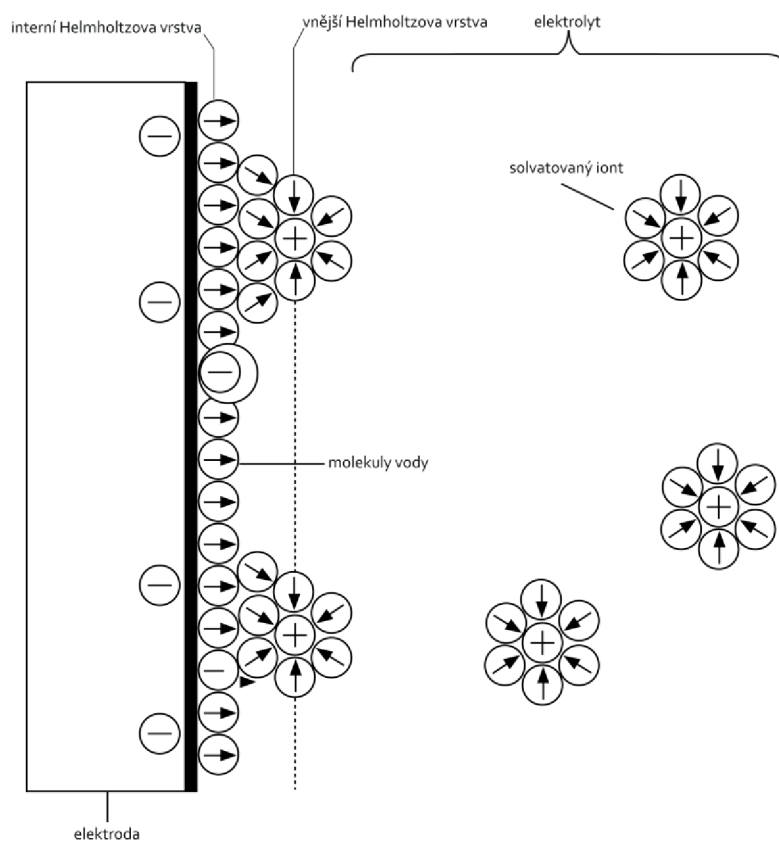


Obr.11 Frekvenční charakteristika v komplexní rovině

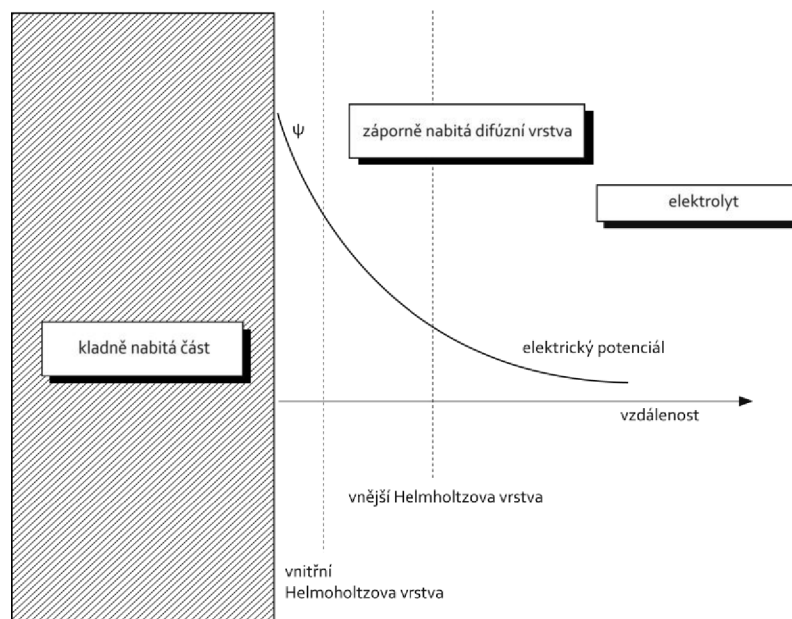
Elektrodová dvouvrstva

Elektrodová dvouvrstva vzniká na rozhraní pevné elektrody, většinou kovové, a na rozhraní vhodného elektrolytického roztoku. Kapacita dvouvrstvy odráží rozložení náboje na rozhraní povrchu elektrody a elektrolytu. Každé elektrodové rozhraní je tvořeno dvěma částmi. První část tvoří pevná elektroda z kovu nebo jiného vodivého materiálu. Náboj na povrchu elektrody je určen množstvím elektronů nebo jejich nedostatkem (pozitivní náboj elektrody). Vliv na hustotu náboje na elektrodě mají i adsorbované ionty. Druhou částí rozhraní je elektrolyt, který tvoří vrstvu iontů nebo dipólů hromadící náboje na elektrodě. Výsledkem procesu oddělování náboje je vytvoření elektrodové dvouvrstvy, která je charakterizována kapacitou dvouvrstvy [28]. Elektrický model kapacity dvouvrstvy je dán více vrstevným elektrickým rozhráním. První vrstva je dána pevnou elektrodou. Druhou částí je inertní vrstva mezi pevnou elektrodou a Helmholtzovou vrstvou. Třetí vnější vrstva je tvořena elektrolytem, ve kterém dochází k difúzi iontů k elektrodě. Rozhraní elektroda – elektrolyt je ukázáno na Obr.12

V ideálním případě je inertní Helmholtzova vrstva složena z dipólů vody, mezi kterými mohou výjimečně být adsorbovány ionty roztoku. Solvatované ionty, které elektrostaticky interagují s kovovým povrchem elektrody zabírají vnější Helmholtzovu vrstvu. Ve větších vzdálenostech od elektrody máme difúzní část elektrické dvouvrstvy, ve které klesá potenciál postupně na nulu, což zobrazuje Obr.13.



Obr.12 Rozhraní elektroda - elektrolyt



Obr.13 Průběh potenciálu na dvouvrstvě

Výsledná kapacita dvouvrstvy je dána sériovým zapojením kapacity spojitě vrstvy (Helmholtzovy) a kapacity difúzní vrstvy. Výsledná kapacita je pak dána vztahem

$$\frac{1}{C_{DL}} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{Dif}}, \quad (7)$$

$$C_{DL} = \frac{C_H \cdot C_{Dif}}{C_H + C_{Dif}}. \quad (8)$$

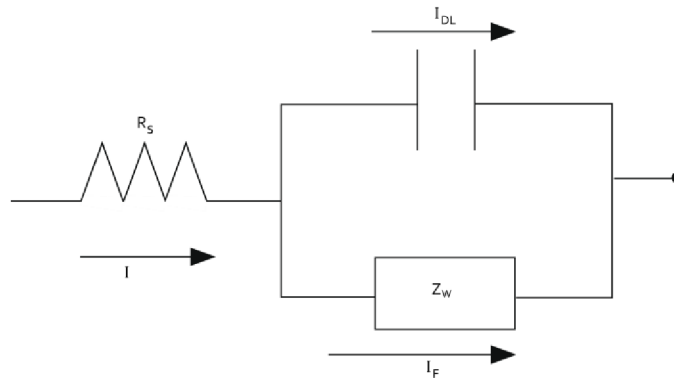
Helmholtzova kapacitance je velká pro vysoce koncentrované roztoky. Difúzní kapacita vzrůstá v nižších koncentracích.

Dělení proudů na dvouvrstvě

Mezi Faradayovým proudem I_F a nábojovým proudem I_{DL} na dvouvrstvě je blízká vazba. Hodnota celkového proudu je dána vztahem

$$I = I_{DL} + I_F. \quad (9)$$

Na rozhraní můžeme celkový proud ukázat v náhradním obvodu v případě malé změny proudu (Obr.14).



Obr.14 Rozdělení proudů na dvouvrstvě

Odvození impedanční funkce v elektrochemickém systému

Mezifázová impedance elektrochemického systému je frekvenčně závislá. Chování systému můžeme popsat rovnicí odvozenou z Ohmova zákona

$$E(t) = Z(p)I(t), \quad (10)$$

kde $E(t)$ a $I(t)$ jsou napětí a proud. Obě jsou funkcí času. $Z(p)$ je impedanční funkce a p je impedanční operátor definovaný vztahem

$$p = \frac{d}{dt}. \quad (11)$$

Rovnice (10) může být vyjádřena algebraickou rovnicí

$$E(s) = Z(s)I(s), \quad (12)$$

kde $E(s)$ je Laplaceova transformace $E(t)$, přesněji

$$E(s) = \int_0^{\infty} E(t)e^{-st} dt. \quad (13)$$

Impedanční funkce $Z(s)$ má stejné algebraické vyjádření jako odpovídající $Z(p)$. Operátor p je nahrazen Laplaceovou proměnou s , která je vyjádřena ve formě

$$s = \sigma + j\omega, \quad (14)$$

kde $j = \sqrt{-1}$ a ω je úhlová frekvence. Reálná část se značí σ a musí být dostatečně velká, aby následující integrál měl řešení

$$F(s) = \int_0^{\infty} F(t)e^{-st} dt. \quad (15)$$

Rovnice (14) má důležité důsledky v tom, že dvě formy transformace $F(t)$ do Laplaceovy roviny vyjadřují transformaci reálné osy – $F(\sigma)$ a transformaci imaginární osy $F(j\omega)$.

$$F(\sigma) = \int_0^{\infty} F(t)e^{-\sigma t} dt, \omega = 0. \quad (16)$$

$$F(j\omega) = \int_0^{\infty} F(t)e^{-j\omega t} dt, \sigma = 0 \quad (17)$$

Tyto dvě rovnice vedou k vyjádření reálné a imaginární osy impedance

$$Z(\sigma) = E(\sigma)/I(\sigma), \quad (18)$$

$$Z(j\omega) = E(j\omega)/I(j\omega). \quad (19)$$

Impedanční funkce je odvozena z Fickových zákonů. První Fickův zákon je proudově závislý a druhý Fickův zákon je difúzně závislý. Jejich vyjádření je následující

$$I = D.n.F.A.(\partial C_O / \partial x) = n.F.A.(k_f C_O - k_b C_R), \quad (20)$$

$$D(\partial C_x / \partial x) + D_R(\partial C_R / \partial x) = 0, \quad (21)$$

kde D je difuzní konstanta, C_O je koncentrace oxidované formy, C_R je koncentrace redukované formy, k_f a k_b jsou rychlostní (rate) konstanty, F Faradayova konstanta, n počet elektronů a X je definováno jako součet koncentrace redukované formy a koncentrace oxidované formy.

Proud procházející rozhraním elektroda – elektrolyt je dán reakcí



kde R je redukovaná část, O je oxidovaná část. Rychlost průběhu reakce je dána rychlostními konstantami. Proud je dán rovnicí

$$I = n.F.A.[k_f C_R(x=0) - k_b C_O(x=0)]. \quad (23)$$

Faradaycký proud je funkcí tří proměnných a to změně potenciálu ΔE, C_O(x=0) a C_R(x=0). Změny v jedné nebo ve všech těchto veličinách vyvolají změnu proudu, která je dána celkovým diferenciálem

$$dI = \left(\frac{\partial I}{\partial E} \right)_{C_O, C_R} dE + \left(\frac{\partial I}{\partial C_O} \right)_{E, C_R} dC_O + \left(\frac{\partial I}{\partial C_R} \right)_{E, C_O} dC_R. \quad (24)$$

Postupnými úpravami a pomocí Laplaceovy transformace dospějeme ke vztahu impedance ve frekvenční závislosti (s=jω)

$$Z_f = \frac{1}{\left(\frac{\partial I}{\partial E} \right)_{C_O, C_R}} + \frac{\left(\frac{\partial I}{\partial C_O} \right)_{E, C_R}}{nFAD_O^{1/2} \omega^{1/2} \left(\frac{\partial I}{\partial E} \right)_{C_O, C_R} j^{1/2}} + \frac{\left(\frac{\partial I}{\partial C_R} \right)_{E, C_O}}{nFAD_R^{1/2} \omega^{1/2} \left(\frac{\partial I}{\partial E} \right)_{C_O, C_R} j^{1/2}}. \quad (25)$$

Užitím Demoivrova teorému můžeme rovnici převést do běžnější formy [29]

$$Z_f(j\omega) = R_{CT} + \sigma \omega^{-1/2} - j\sigma \omega^{-1/2}. \quad (26)$$

Takto jsme získali výraz pro Faradayovu impedanci. Faradayova impedance se skládá z odporu přenosu náboje R_{CT} a Warburgovy impedance (Z_w = σω^{-1/2} - jσω^{-1/2}) zapojené v sérii. Faradayova impedance je zapojena paralelně s kapacitou dvouvrstvy a sériově s odporem roztoku. Celková impedance je pak dána vztahem

$$Z = R_s + \frac{1}{(R_{CT} + Z_w)^{-1} + j\omega C_{DL}}. \quad (27)$$

5. Voltametrie

Voltametrie je elektroanalytická metoda odvozená z polarografie a využívaná analytickou chemií. Jedná se o techniku založenou na měření proudu protékajícího přes elektrodu ponořenou v elektroaktivním roztoku v závislosti na přiloženém napětí. Pro měření je zapotřebí minimálně dvou elektrod, ale dnešní moderní přístroje již využívají tři

elektrodový systém. První elektrodou je elektroda pracovní. Může být pevná (zlatá, platinová, sklo-uhlíková) nebo rtuťová, formovaná do tvaru kapky pověšené na tenké skleněné kapiláře. Druhá je elektroda referenční, nejčastěji kalomelová nebo argentchloridová, se stálou hodnotou potenciálu. Poslední elektrodou je pomocná elektroda z platiny. Potenciostat zajišťuje, aby mezi pracovní a pomocnou elektrodou protékal takový proud, aby mezi pracovní a referenční elektrodou byl dodržen požadovaný napěťový průběh. [30]

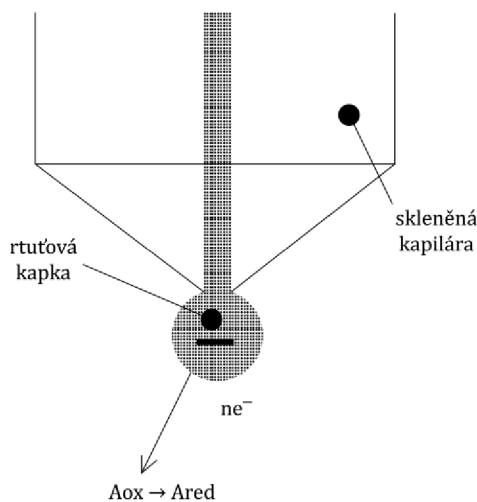
Voltametrie nachází využití v některých oblastech průmyslu. Například v korozní vědě, zkoumání nových elektrodových vlastností v chemickém průmyslu a ve vývoji nových typů baterií, které jsou schopné rychle akumulovat velké množství elektrické energie, ve výzkumu. Nejdůležitější aplikací je však kvantitativní analýza kovů vyskytujících se ve stopovém množství. Například analýza těžkých kovů nebo organických sloučenin v roztoku.

Proces na pracovní elektrodě

Předpokládáme, že pracovní elektroda je ponořena do roztoku obsahujícího elektroaktivní sloučeniny A_{ox} , které se mohou redukovat (přijmout elektron od elektrody), jak je ukázané rovnicí (28).



Elektroda je záporně nabitá a elektrony tečou směrem k A_{ox} , které se redukuje a elektroda se tak vybíjí. Tento proces ukazuje Obr. 15.



Obr.15 Proces vybíjení rtuťové kapkové elektrody

Aby došlo k vybíjení elektrody, je nezbytné, aby A_{ox} obsažené v roztoku dosáhlo elektrody a přijalo elektron. Na to mají vliv dva kinetické faktory. Prvním je rychlost v_d , kterou sloučenina z roztoku dosáhne elektrody. Druhým faktorem je rychlost v_e , což je rychlost výměny náboje mezi elektrodou a roztokem. Je důležité zajistit, aby první rychlost byla daleko vyšší než rychlost druhá nebo aby výměna náboje probíhala okamžitě a vybíjení by záviselo pouze na rychlosti v_d a na způsobu jakým A_{ox} dosáhne elektrody (vedení, migrace, difúze).

Faradaický a kapacitní proud

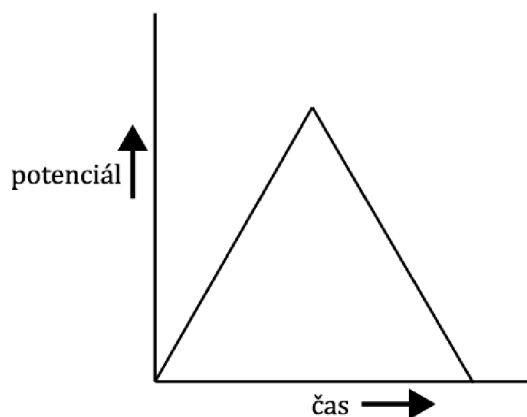
Proud protékající přes pracovní elektrodu má dvě složky. Faradaický proud je dán ději na elektrodě při vybíjení. Kapacitní proud je dán růstem elektrodové dvouvrstvy na rozhraní elektrody a roztoku. Při vysoké koncentraci roztoku se dvouvrstva chová jako kondensátor s vysokou kapacitou. Výsledný proud tekoucí přes pracovní elektrodu je dán součtem těchto dvou složek. [30]

Voltamogram

Výstupem voltametrického měření je voltamogram nebo-li graf závislosti proudu na napětí. Voltimetrii můžeme podle druhu přiloženého napětí dělit například na cyklickou voltimetrii, pulzní, diferenčně pulzní a podobně.

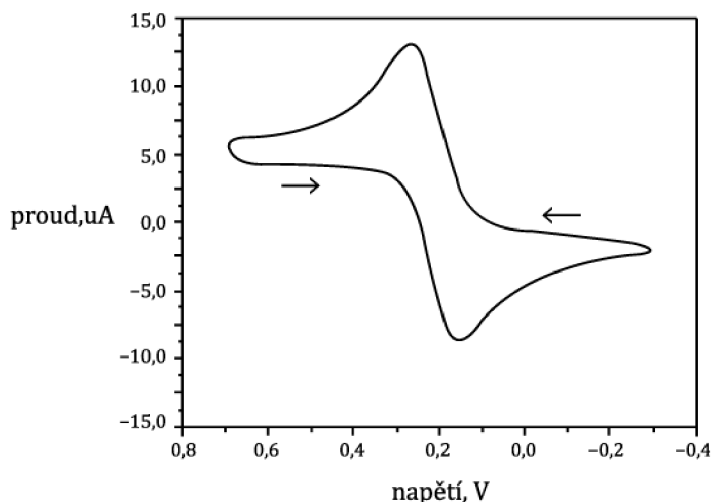
Cyklická voltetrie

Cyklická voltetrie patří mezi běžně užívanou elektrochemickou metodu. Její hlavní předností je schopnost charakterizovat elektrochemický systém. Méně vhodná je pro kvantitativní analýzu a to pro její nízkou senzitivitu. Metoda spočívá v tom, že na pracovní elektrodu je přiloženo postupně stoupající napětí (forward scan), které po dosažení tzv. zlomového potenciálu (vertex) začne klesat k počáteční hodnotě (reverse scan).[31] Průběh přiloženého napětí v čase je na Obr.16.



Obr.16 Křivka přiloženého napětí pracovní elektrody

Během průběhu napětí se potenciostatem měří výsledný proud. Naměřené hodnoty se zpracovávají do grafu, který vyjadřuje závislost proudu na napětí. Příklad cyklického voltamogramu je na Obr.17.



Obr.17 Cyklický voltamogram

Graf se skládá z uzavřené křivky, na které můžeme pozorovat katodický a anodický pík. Oba píky můžeme vidět pouze při reverzibilní reakci (dochází nejdříve k oxidaci redoxního páru a pak redukci nebo naopak). Můžeme hodnotit výšku píku (velikost proudu) a polohu píku (velikost napětí v místě vrcholu). Katodický pík (redukční) má kladnou hodnotu proudu a anodický pík (oxidační) má hodnotu proudu zápornou.[30]

Pro výpočet standardního klidového napětí můžeme využít vztah (29).

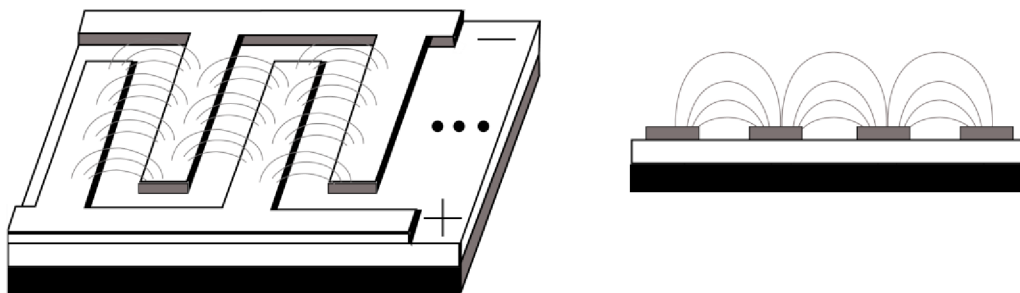
$$E_0 \cong E_{1/2} \cong \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}, \quad (29)$$

kde E_{pa} je hodnota napětí pro anodický pík a E_{pc} je hodnota napětí pro katodický pík. [30] Podle potřeby se měří jeden nebo více cyklů. Cyklická voltametrie se využívá ke studiu elektrochemických vlastností roztoků, zjišťování kinetiky přenosu náboje a reakcí které přenos náboje následují a nebo jej předcházejí.

6. Fyzikálně chemická charakteristika použitých pracovních elektrod

Konstrukce elektrody

Měření bylo prováděno na planární formě elektrod a to na hřebínkových elektrodách. Planární forma elektrod má tu výhodu, že při zachování malé vzdálenosti elektrod a velké plochy elektrod je celková plocha čipu malá a proto je citlivost elektrodového převodníku dostatečná. Rozložení hustoty proudů je však jiné, než u standardních elektrod. Rozložení hustoty proudů probíhá sféricky a hemisféricky a se vzdáleností od elektrody se snižuje (Obr.18). Pak se jedná o poměrných proudech, kdy 90% proudu probíhá ve velkých vzdálenostech od elektrody. To závisí na vodivosti roztoku, poměru vzdáleností elektrod a šířky hřebínku. [32]



Obr.18 Průběh proudů na hřebínkových elektrodách

Pro naše měření DNA bylo využito sensorového pole s 12 x 8 elektrodami. Jedná se o zlaté elektrody uspořádané do hřebínků. Jednotlivé hřebínky mají tvar „kuliček navlečených na nit“. Foto sensorového pole a detailu elektrod je na Obr. 19.



Obr.19 Zlaté elektrody, vlevo sensorové pole elektrod, vpravo detail hřebínků elektrod

Charakterizace elektrod pomocí EIS

Člávková konstanta je u ideálních elektrod určena z rozměrů chemického článku

$$K_{CELL} = \frac{d}{A}, \quad (30)$$

$$\kappa = G \frac{d}{A} = G \cdot K_{CELL}, \quad (31)$$

kde K_{CELL} je člávková konstanta, d [cm] je vzdálenost mezi elektrodami a A [cm²] je povrch elektrody, κ [S/cm] je měrná vodivost a G [1/Ω, S] vodivost.

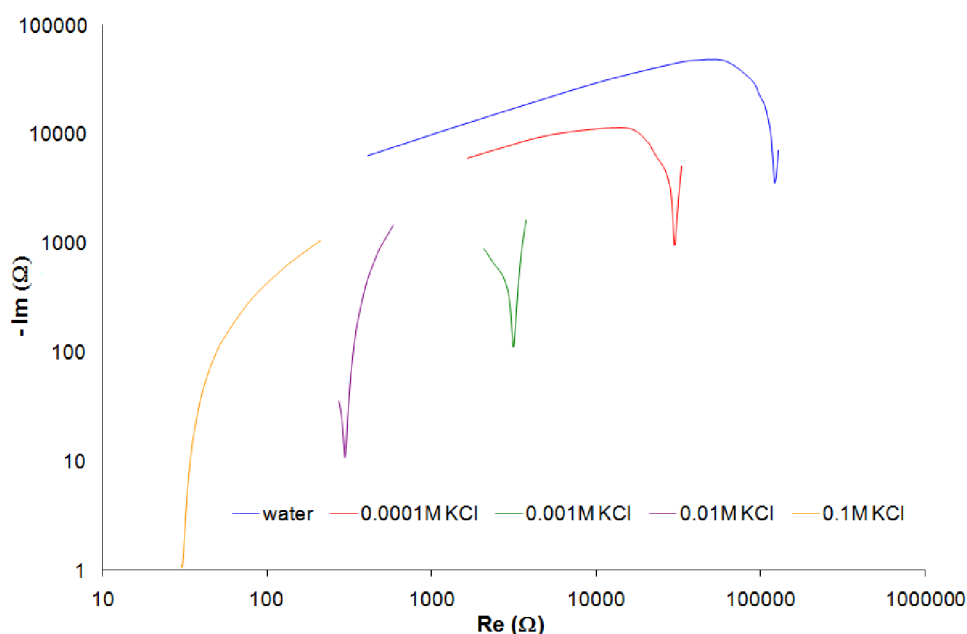
Ze změřené vodivosti či odporu článku, se za pomoci této konstanty vypočítá hledaná měrná vodivost elektrolytu. U běžných přístrojů pro širší rozsahy měrných vodivostí je nutné zvolit elektrody s vhodnou člávkovou konstantou. Obecně platí, že pro velké vodivosti se užívají velké člávkové konstanty a naopak pro nízké vodivosti, malé hodnoty člávkové konstanty. Každé elektrody s danou člávkovou konstantou měří tedy přesně pouze v omezeném rozsahu vodivostí, a proto se využívá více elektrod podle měřeného elektrolytu. Při špatně zvolených elektrodách dochází k velké chybě měření. Po určitém čase je nutné elektrody kalibrovat, protože jejich přesnost klesá. To se provádí stanovením korekce člávkové konstanty.

$$K_{real} = \alpha \cdot K_{CELL}, \quad (32)$$

$$\alpha = \frac{K_{real}}{K_{CELL}}, \quad (33)$$

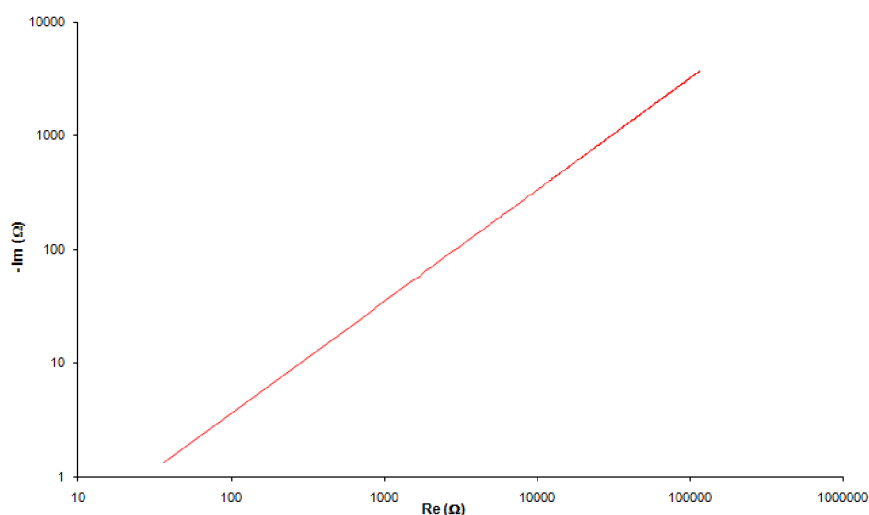
U planárního integrovaného systému nelze elektrody měnit podle potřeby, proto je nutné stanovit korekci člávkové konstanty, respektive závislost člávkové konstanty na koncentraci. Je zřejmé, že člávková konstanta v reálných podmínkách není konstantou v celém rozsahu měřených vodivostí. Obzvláště u planárních elektrod byla zjištěna silná závislost člávkové konstanty na měřené vodivosti při konstantní měřicím kmitočtu. Charakterizací těchto elektrod Elektrochemickou impedanční spektroskopií se ukázalo, že je možné najít frekvenci, pro kterou chyba, způsobená člávkovou konstantou, je poměrně malá.

Frekvenční charakteristika senzoru závisí na vodivosti a na koncentraci roztoku.



Obr.20 Frekvenční charakteristiky na celém rozsahu měrných vodivostí

Pro charakterizaci planárních elektrod byla využita metodika zpracovaná v [33,34]. Pro zpracování použijeme pouze hodnoty frekvencí, které odpovídají lokálním maximům na imaginární ose komplexní rovině impedance. K odpovídající frekvenci byly odečteny příslušné hodnoty impedancí. V dalším grafu jsou vykreslena lokální maxima v celé šířce rozsahu vodivostí.



Obr.21 Vrcholy frekvenčních charakteristik v celém rozsahu měrných vodivostí

Hodnoty vrcholů frekvenční charakteristiky elektrod lze vynést do závislosti, což může být vyjádřeno vztahem

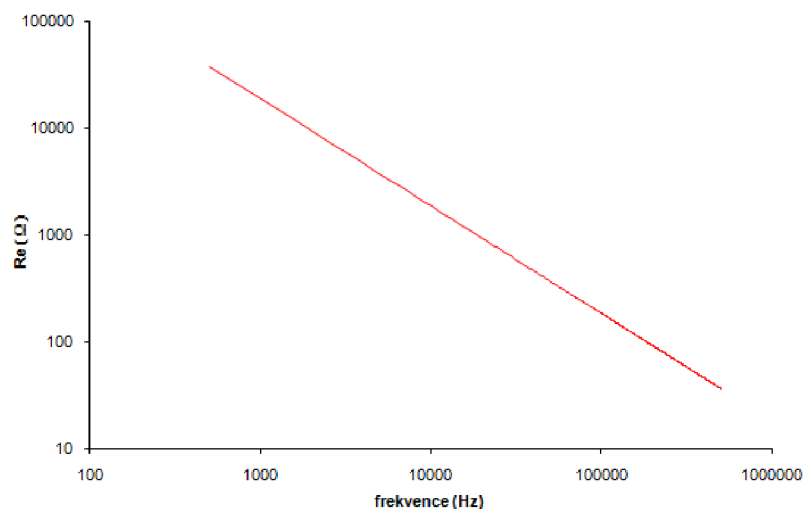
$$\text{Im} = c_0 \cdot \text{Re}^\delta, \quad (34)$$

kde c_0 je konstanta a exponent δ se blíží jedné.

Reálná část rozhraní impedance má obdobný vztah s vodivostí. Tato závislost je vyjádřena jako

$$\text{Re} = c_1 \cdot \kappa^{-\nu}, \quad (35)$$

kde c_1 je konstanta.

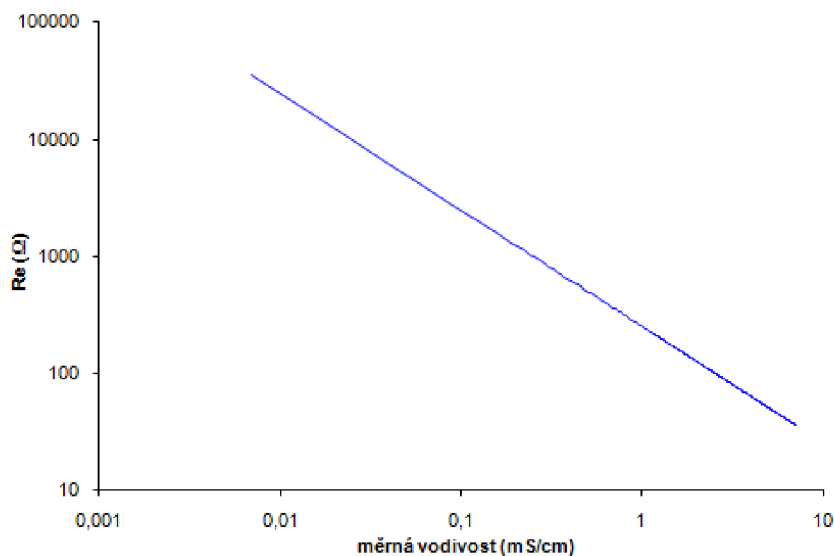


Obr. 22 Reálná část vrcholů frekvenční charakteristiky v závislosti na frekvenci

Závislost je také ve vztahu mezi frekvencí v maximech a reálnou částí impedance a je popsána vztahem

$$\text{Re} = c_2 f^{-\tau}, \quad (36)$$

kde c_2 je konstanta.



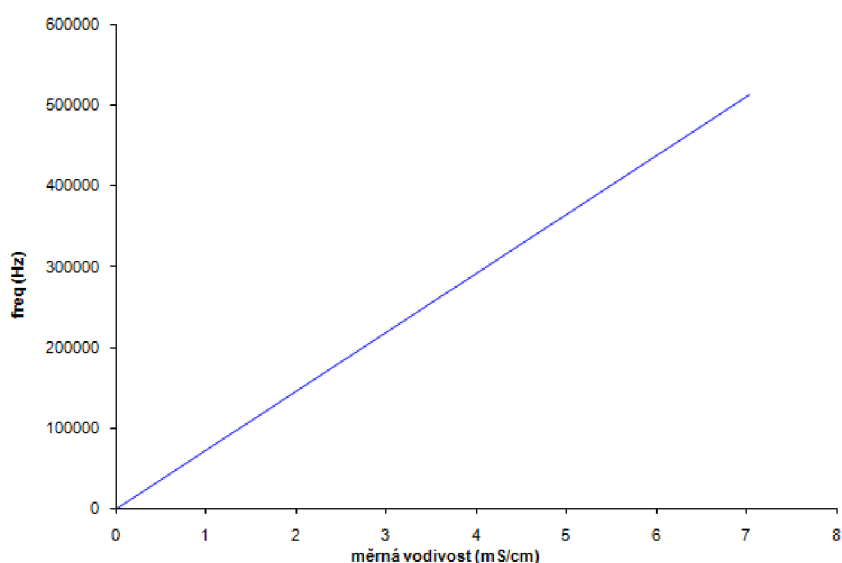
Obr.23 Závislost reálné části impedance na vodivosti

Z rovnice (34) vyplývá, že reálná část impedance závisí na vodivosti, což je určeno vrcholem frekvence. Z toho můžeme odvodit vztah pro obě proměnné porovnáním rovnic (36) a (35)

$$c_2 f^{-\tau} = c_1 \kappa^{-\nu}, \quad (37)$$

$$f = \left(\frac{c_1}{c_2} \right)^{-\tau} \cdot \kappa^{\frac{\nu}{\tau}} = c_c \kappa + c_{OFF}. \quad (38)$$

Exponent ν/τ je přibližně roven 1.

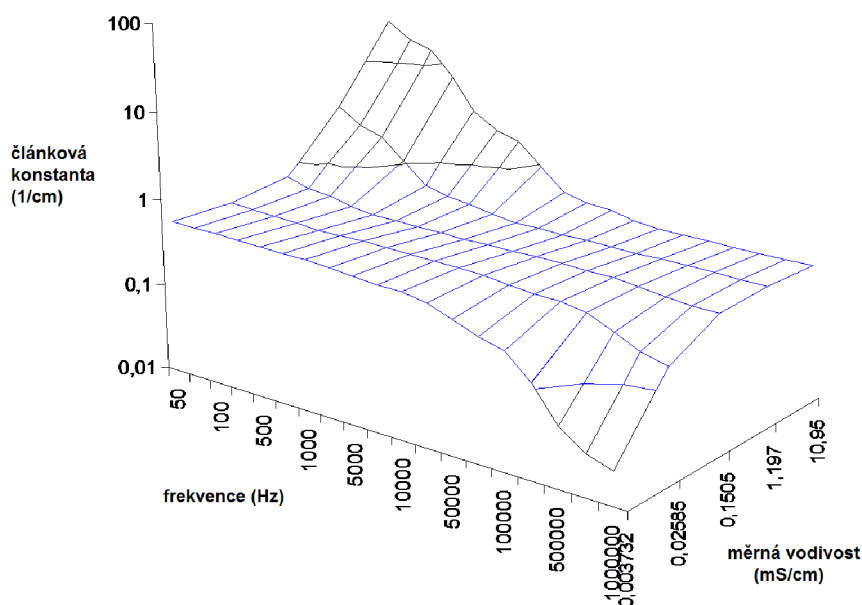


Obr.24 Závislost frekvence na vodivosti

Konstanta musí být experimentálně určena pro každý typ senzoru. Konstanta c_{OFF} určuje malou kompenzaci charakteristiky. Průběh je lineární a je velmi jednoduché její užití pro zpřesnění měření výběrem vhodné měřicí frekvence.

Vyjádříme-li frekvenci, vodivost a reálnou článkovou konstantu do 3D grafu (Obr.25), můžeme najít frekvenci při které se článková konstanta příliš nemění. Můžeme říci, že spojením dvou bodů mezi levým a pravým rohem roviny v tomto grafu nalezneme přímkou z Obr. 24. Článková konstanta byla vypočtena z rovnice (31) za pomoci použitého vodivostního standardu a změřené odporu.

$$K_{CELL} = Re \cdot \kappa . \quad (39)$$



Obr.25 3D graf – charakteristika článkové konstanty

IV. Materiál a metody

Používané chemikálie byly ACS čistoty a společně s parafilmem zakoupeny od firmy (Sigma-Aldrich, USA). Koncentrace zásobních roztoků byla stanovena spektrofotometriky při vlnové délce 260 nm na přístroji Spectronic Unicam (Anglie). Deionizovaná voda byla demineralizovaná pomocí reversní osmosy za použití přístroje Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká Republika) a následně purifikována za použití Millipore RG (Millipore Corp., USA, 18 M Ω) – MiliQ voda. Měření pH bylo provedeno na přístroji WTW inoLab (Weilheim, Germany).

1. Pufr

Acetátový pufr: 0,2 M CH₃COOH + 0,2 M CH₃COONa. Ostatní použité chemikálie v čistotě ACS byly získány od společnosti Sigma- Aldrich.

2. Elektrochemická detekce na rtuťové elektrodě

Elektrochemické stanovení s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE; s plochou kapky 0,4 mm²) jako pracovní elektrodou bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Holandsko), ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla používána pracovní cela s tříelektrodovým zapojením. Referenční elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla uhlíková tyčinka. Základní elektrolyt acetátový pufr (pH 4,6 - 5,0). LSV parametry: počátek a konec potenciálového okna: 0 V, a -1,65 V, potenciálový krok: 5 mV, rychlost polarizace: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 160, 320, 400, 640, 800, 1280, 2560 mV/s.

3. Buněčné kultury

Buněčné linie IMR-32 byly získány z izolací z tkáňových buněčných kultur neuroblastomu. Pro měření byla použita DNA izolovaná z buněk senzitivních k doxorubicinu a buněk rezistentních k doxorubicinu.

4. Elektrody a přístroj pro spektroskopická měření

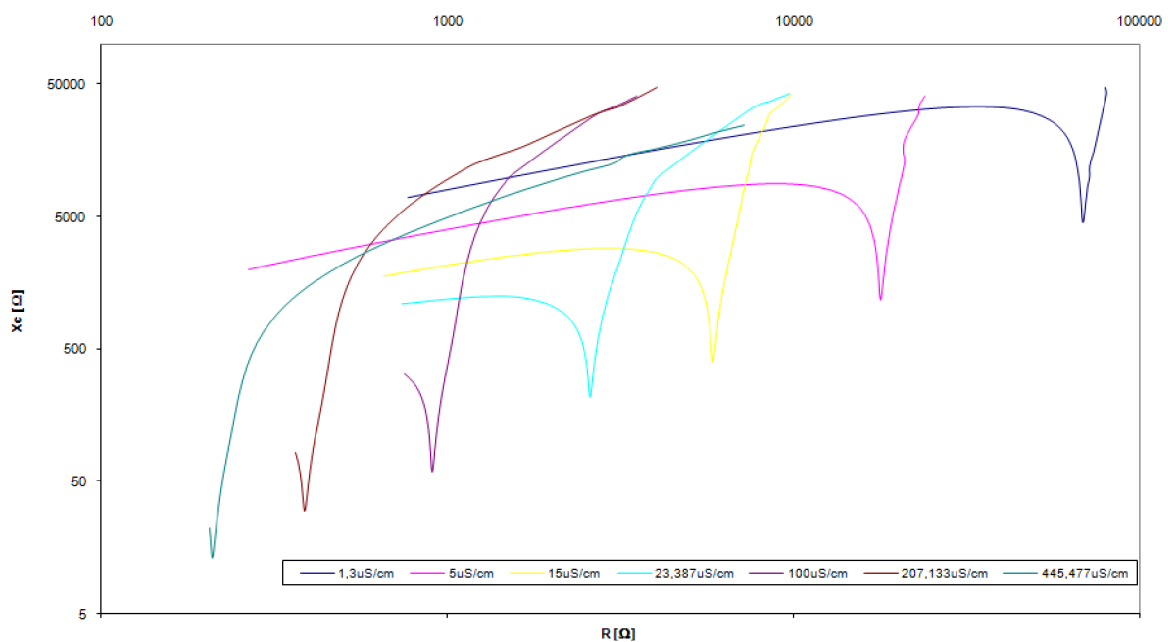
Impedanční spektroskopie byla měřena pomocí impedančního analyzátoru Agilent 4284A měřícího na frekvencích od 20 Hz do 1 MHz. K charakterizaci elektrod byly použity standardní roztoky KCL s přesně danou vodivostí (od 1,3 μ S/cm do 445,477 μ S/cm) od firmy Chromservis s.r.o.. Použité elektrody byly od firmy Roche. Pro přepínání mezi jednotlivými políčky sensorového pole bylo využito přepínače vyrobeného na Ústavu mikroelektroniky, FEKT.

V. Výsledky a diskuse

1. Charakterizace čidel pomocí EIS

Pro každé čidlo používané k měření byla určena hodnota frekvence, pro kterou je článková konstanta přibližně neměnná. Měřila se impedance postupně pro různé koncentrace roztoků.

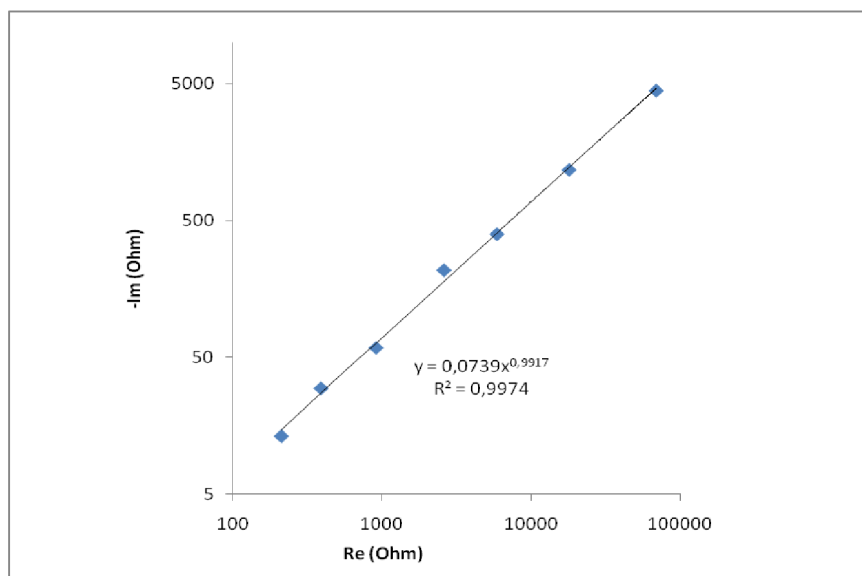
Charakterizace byla provedena pro jednu řadu sensorového pole (8 polí). Jednotlivé řady pole by se od sebe neměly lišit.



Obr.26 Frekvenční závislost v celém rozsahu měrných vodivostí standardů KCl (logaritmické osy)

Obr.26 ukazuje průběhy impedancí pro jednotlivé měrné vodivosti. Pro další zpracování byly použity hodnoty frekvencí a reálných složek impedance v lokálních maximech impedančních funkcí. Na Obr.27 jsou vykresleny body lokálních maxim a proloženy mocninnou závislostí dle (34), která je dána rovnicí

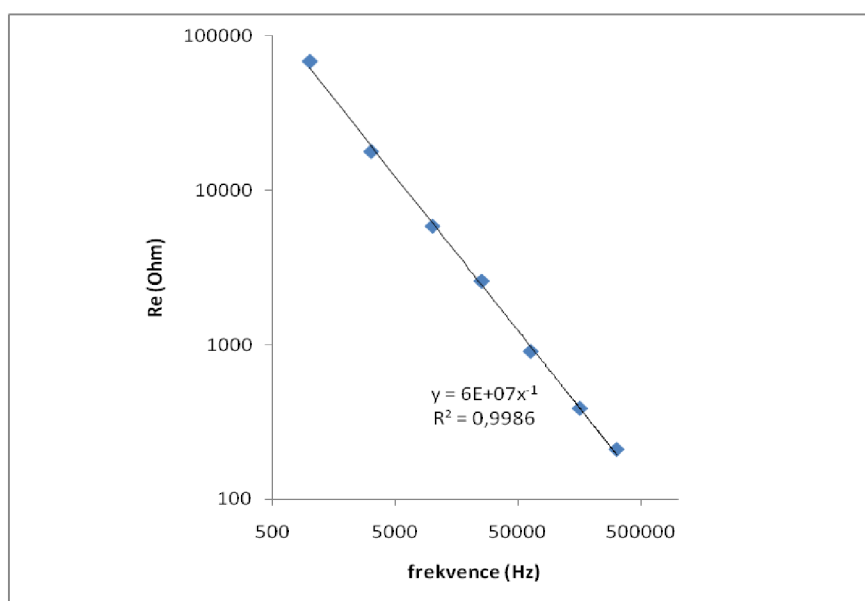
$$y = 0,0739x^{0,9917}. \quad (40)$$



Obr.27 Vrcholy frekvenčních charakteristik v celém rozsahu měrných vodivostí standardů KCl

Obr.28 vyjadřuje závislost reálné složky impedance a frekvence. Body byly proloženy dle (36) mocninnou funkcí danou rovnicí

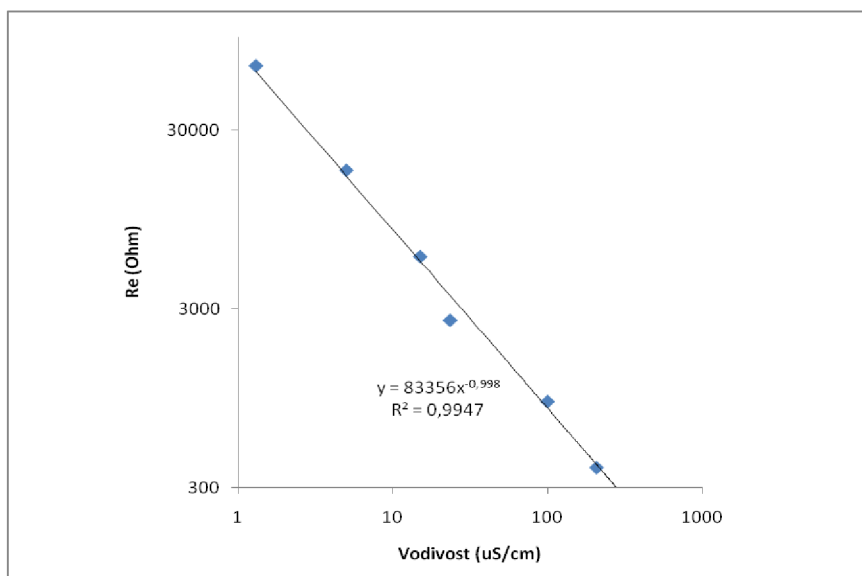
$$y = 6 \cdot 10^7 \cdot x^{-1} \quad (41)$$



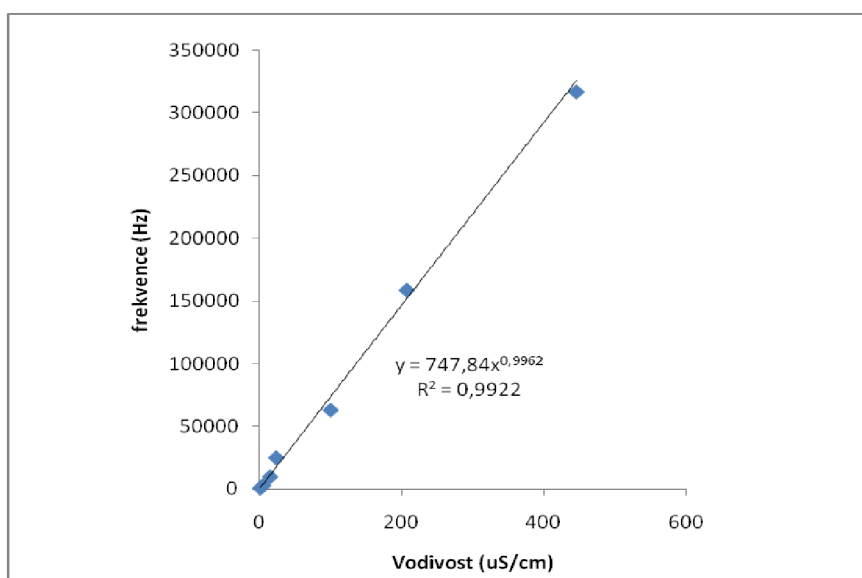
Obr.28 Reálná část vrcholů frekvenční charakteristiky v závislosti na frekvenci

Závislost z Obr.29 mezi měrnou vodivostí a reálnou složkou impedance byla obdobně proložena dle (35):

$$y = 83356 \cdot x^{-0,998} \quad (42)$$



Obr.29 Závislost reálné části impedance na vodivosti standardů KCl

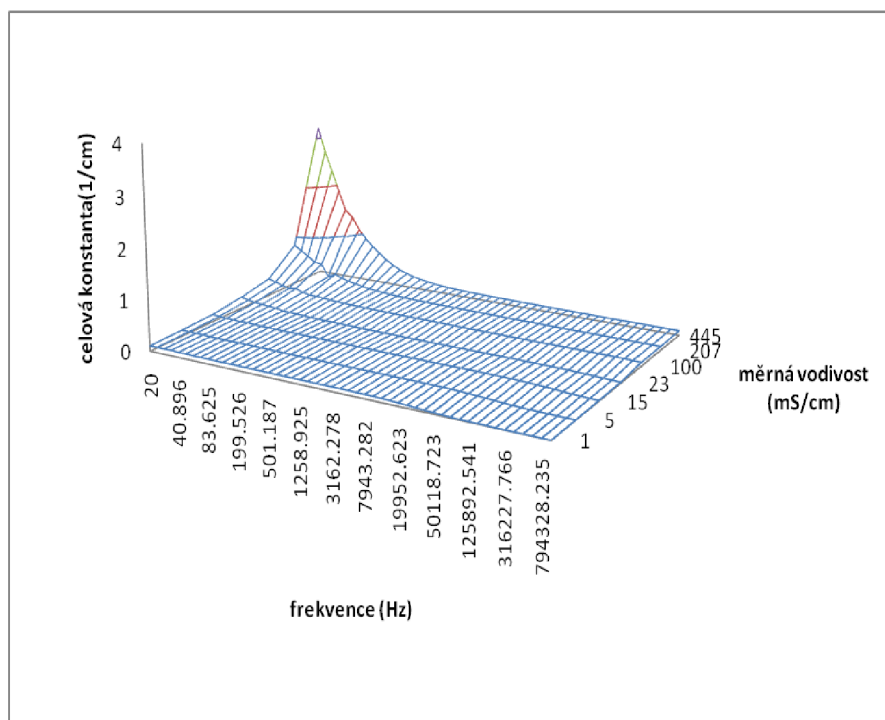


Obr.30 Závislost frekvence na vodivosti standardů KCl

Závislost měrné vodivosti na frekvenci (Obr. 30) byla opět proložena dle (36) rovnicí

$$y = 747,84 \cdot x^{0,9962}. \quad (43)$$

Vyjádříme-li frekvenci, vodivost a reálnou článkovou konstantu do 3D grafu (Obr. 31), můžeme najít frekvenci při které se článková konstanta příliš nemění. Můžeme říci, že spojením dvou bodů mezi levým a pravým rohem roviny v tomto grafu nalezneme přímkou z Obr. 24. Článková konstanta byla vypočtena z rovnice (31) za pomoci použitého vodivostního standardu a změřené odporu.



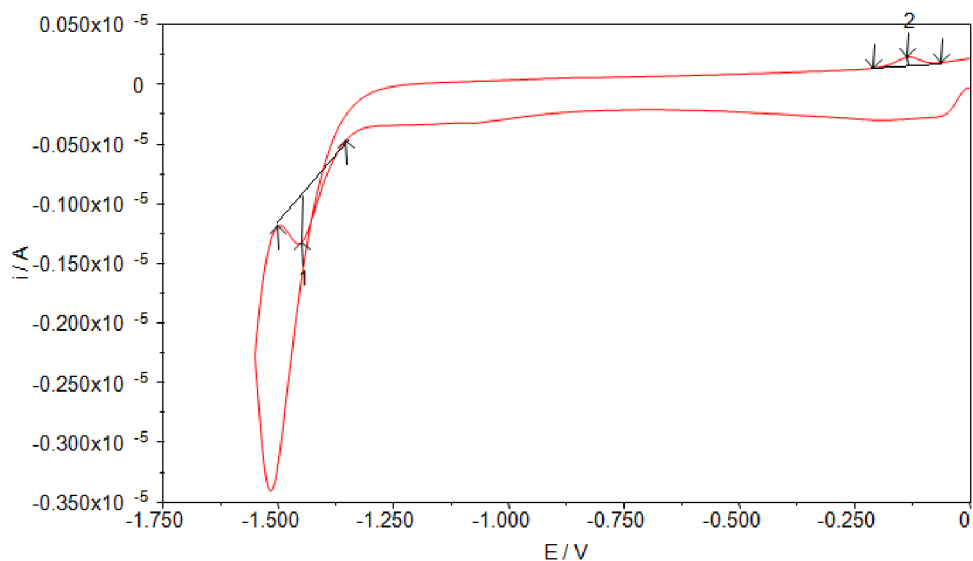
Obr.31 3D graf – charakteristika člankové konstanty použitých elektrod

2. Cyklická voltametrie

Voltamogram

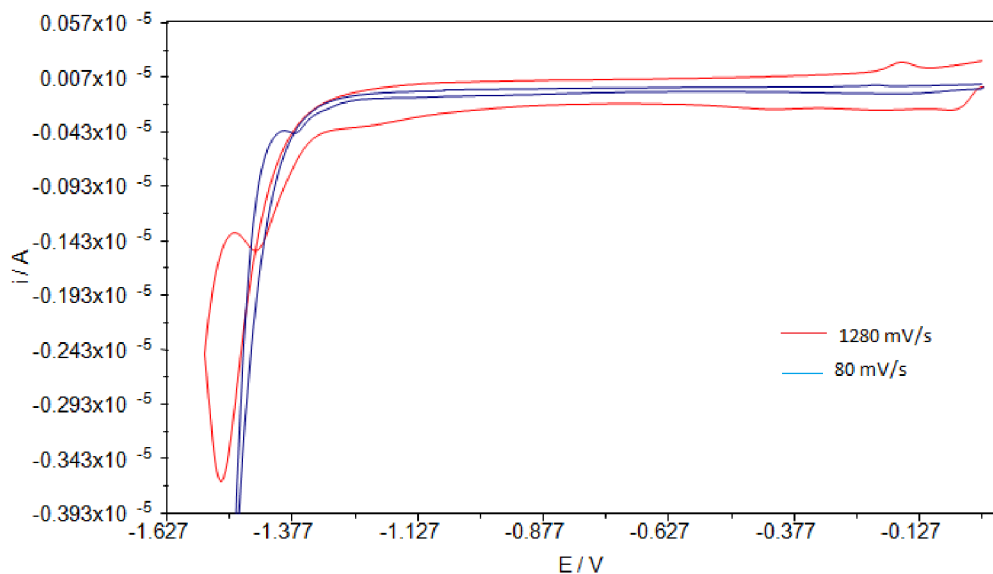
Metodou cyklické voltametrie s visící rtuťovou elektrodou byly změřeny signály DNA z buněčných tkáňových kultur neuroblastomu. Měřili jsme DNA z buněk senzitivních a rezistentních. Senzitivní buňky jsou citlivé k cytostatikům, protože jejich obranné mechanismy nejsou vyselektovány k účinkům doxorubicinu. Resistentní buňky jsou schopny dlouhodobě přežít ve zvýšené koncentraci doxorubicinu.

Charakteristický voltamogram DNA izolované z buněčných kultur je ukázán na Obr. 32. Na průběhu záznamu můžeme pozorovat dva píky. První pík (1) odpovídá redukčnímu signálu cytosinu a adeninu (kolem potenciálu -1.5 V), druhý pík (2) odpovídá oxidačnímu signálu guaninu (kolem potenciálu -0.2 V). Na signálu DNA s navázaným doxorubicinem můžeme pozorovat ještě pík doxorubicinu (kolem potenciálu -0.3 V).

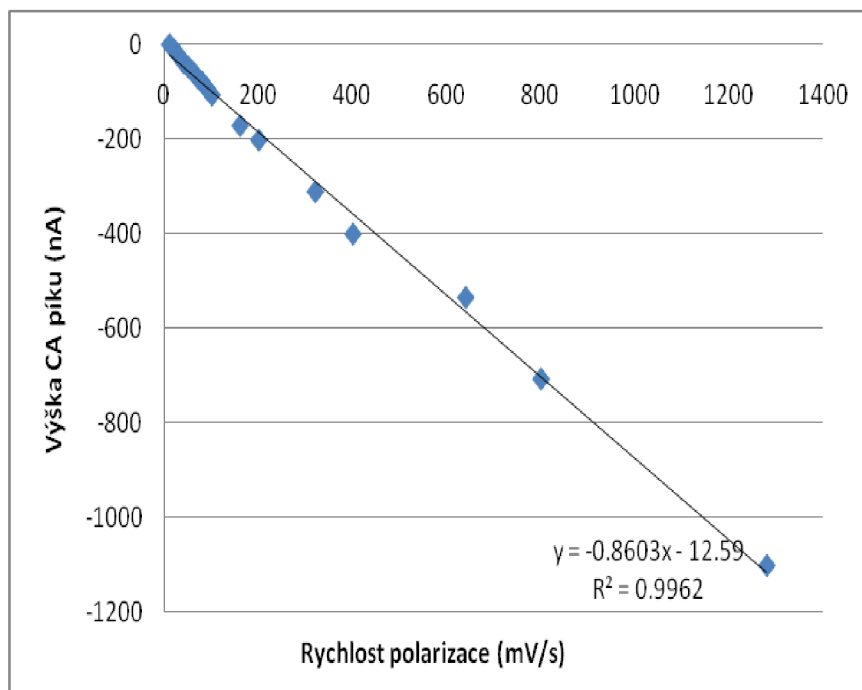


Obr.32 Cyklický voltamogram, 1-CA pík, 2-G pík

Každý vzorek DNA byl měřen při různých rychlostech polarizace (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 160, 320, 400, 640, 800, 1280, 2560 mV/s). Pro další zpracování dat se vyhodnocovaly výšky píků v závislosti na těchto rychlostech. Voltamogram na Obr. 33 ukazuje vliv polarizace na signál měřený na tomtéž vzorku. Tato závislost je přibližně lineární, jak můžeme vidět na Obr. 34. Pro tyto lineární závislosti jsme určili rovnice přímek a z nich směrnice závislostí, které jsme dále statisticky porovnávali.



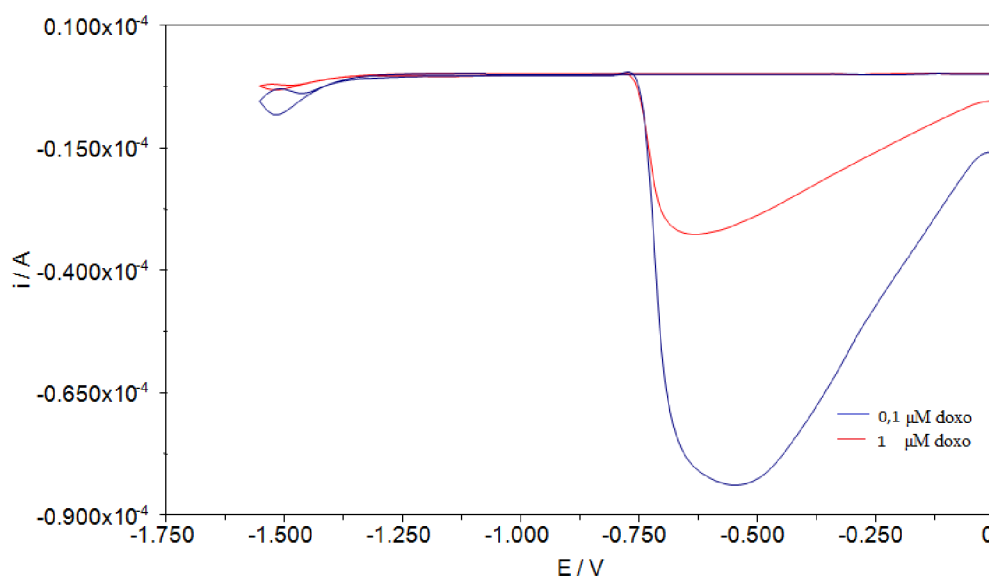
Obr.33 Vliv rychlost polarizace na průběh signálu.



Obr. 34 Závislost výšky CA píku na rychlosti polarizace

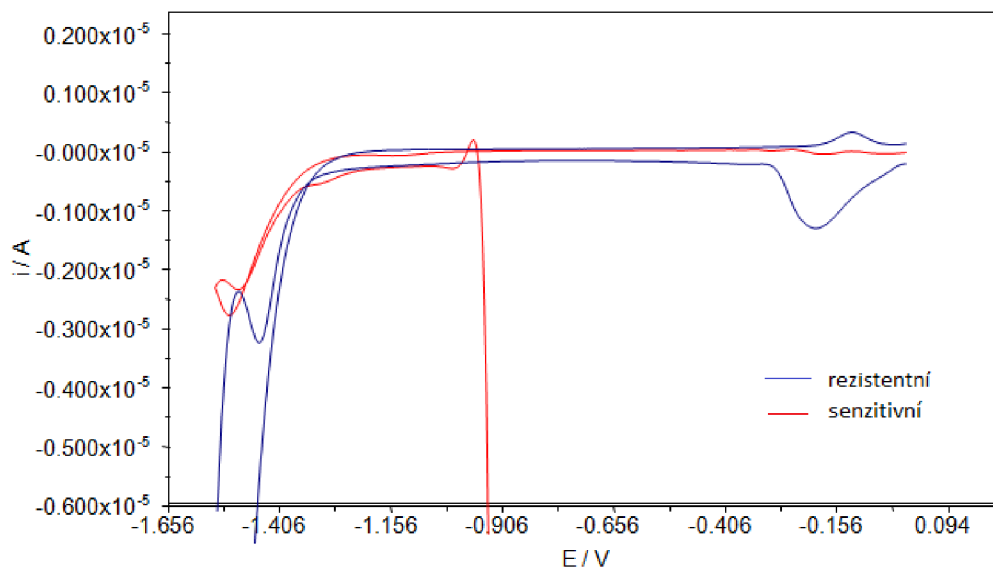
Vliv cytostatik

Na Obr. 35 můžeme vidět rozdíl signálu mezi koncentrací 0,1 – 1 μM doxorubicinu. Oba signály jsou měřeny při rychlosti polarizace 1280 mV/s.



Obr. 35 Rozdíl signálu mezi 0,1 μM a 1 μM koncentrací doxorubicinu při rychlosti polarizace 1280 mV/s.

Dále jsme pozorovali změny signálů DNA izolovaných z rezistentních a senzitivních buněk při stejné koncentraci doxorubicinu. Porovnání průběhů při koncentraci doxorubicinu 0,25 μM a rychlosti polarizace 1280 mV/s, je na Obr. 36.



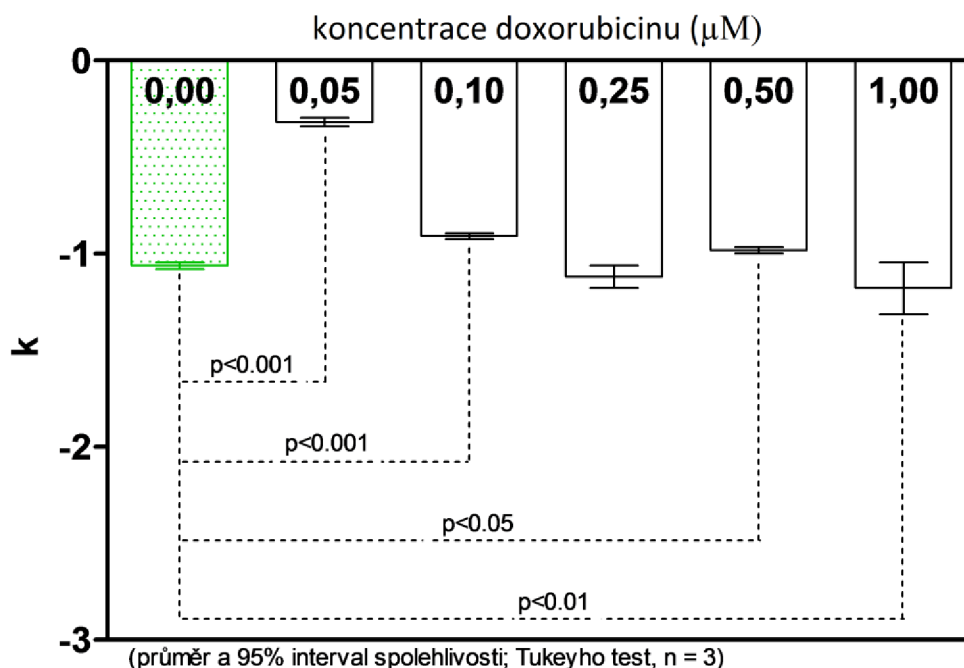
Obr. 36 Změny signálu senzitivních a rezistentních buněk při koncentraci doxorubicinu 0,25 μM a rychlosti polarizace 1280 mV/s.

Na Obr. 35 a 36 můžeme vidět, že se při vyšší koncentraci doxorubicinu dochází ke snižování signálu CA píku i G píku a nárůstu píku doxorubicinu. Stejně tak můžeme vidět, že senzitivní buňky jsou citlivější k účinkům doxorubicinu než buňky rezistentní. Signál rezistentních buněk dává výrazně větší CA i G pík a nižší pík doxorubicinu. Naopak signál senzitivních buněk poskytuje oproti rezistentním buňkám menší CA a G pík a výrazně vyšší pík doxorubicinu.

Statistické vyhodnocení

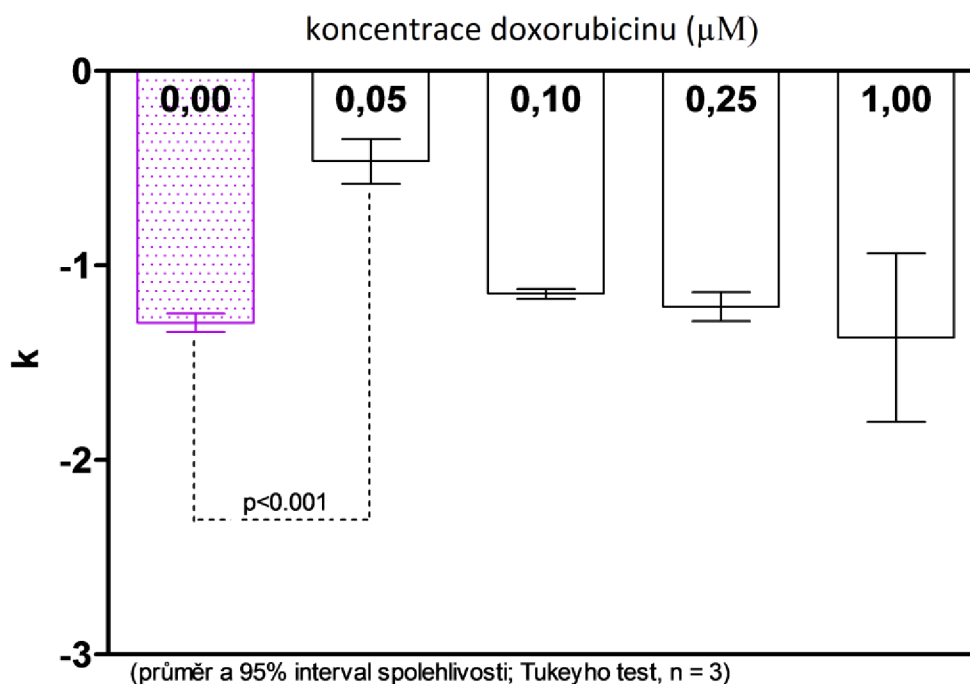
Pomocí statistického vyhodnocování jsme porovnávali rozdíly mezi signály DNA z buněk senzitivních a rezistentních. Ze závislosti výšek CA píků na rychlostech polarizace jsme určili směrnice přímk, které jsme porovnávali se směrnicemi kontrolního vzorku (bez přidaného doxorubicinu). Na Obr. 37 jsou vyneseny průměrné hodnoty směrnic, které byly s kontrolním vzorkem porovnávány statistickým Turkeyho testem. Výstupem testu je p-hodnota, která vypovídá o podobnosti mezi průměrnými směrnicemi jednotlivých koncentrací doxorubicinu a průměrnou směrnicí kontrolního vzorku. Je-li p-hodnota menší než 0,05, můžeme rozdíly považovat za statisticky významné. Dále je v grafu vyznačen 95% interval spolehlivosti (interval, ve kterém leží 95% porovnávaných hodnot a který nesmí přesáhnout nulovou hodnotu směrnice-k, abychom mohli rozdíly považovat za statisticky významné).

Obr. 37, 38 ukazuje průměrné hodnoty směrnic v závislosti na koncentraci doxorubicinu pro senzitivní, respektive rezistentní buňky. Na svislé ose jsou vyneseny hodnoty směrnic (k), jednotlivé sloupce odpovídají daným koncentracím. První sloupec odpovídá kontrolnímu vzorku (bez doxorubicinu).



Obr.37 Porovnání průměrných hodnot směrnic s kontrolním vzorkem pro DNA ze senzitivních buněk

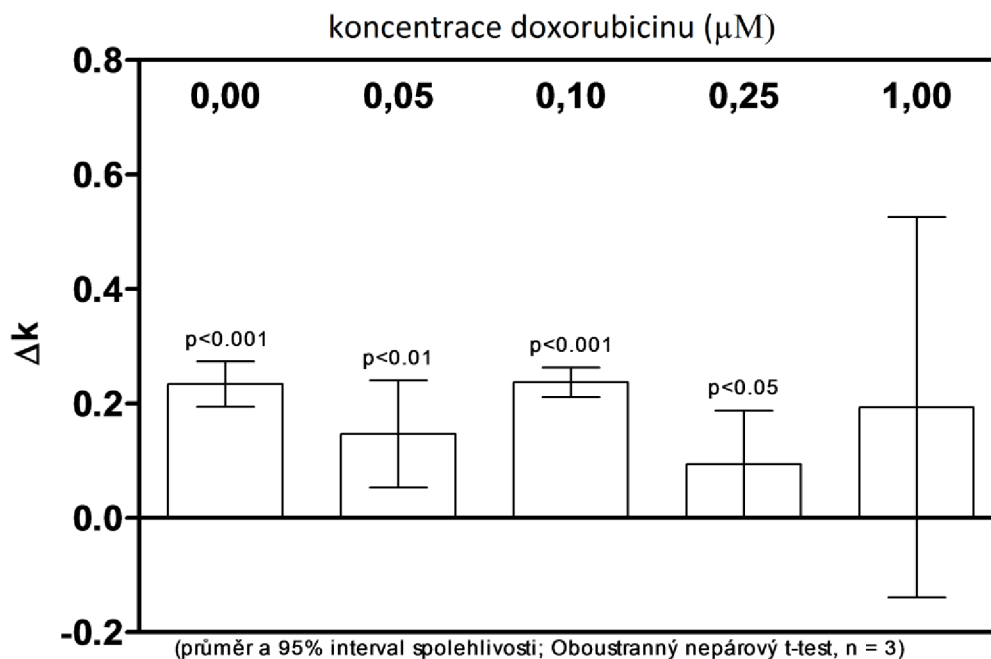
38. Stejný test se aplikoval i u DNA izolované z buněk rezistentních k doxorubicinu-Obr.



Obr.38 Porovnání průměrných hodnot směrnic s kontrolním vzorkem pro rezistentní vzorky

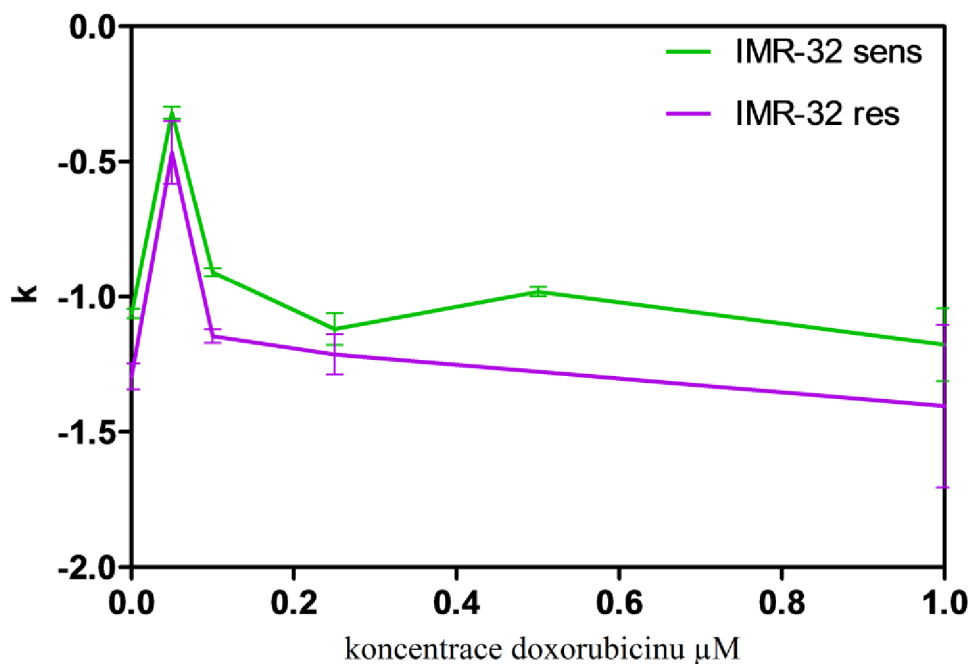
Na Obr. 38 můžeme pozorovat statistický rozdíl mezi vzorkem s koncentrací doxorubicinu 0,05 a kontrolním vzorkem. Pro ostatní koncentrace není rozdíl směrnic statisticky významný. Tím se potvrdila rezistence buněk, protože změna hodnoty průměrných směrnic se nemění v závislosti na koncentraci doxorubicinu.

Dále jsme porovnávali statistické rozdíly mezi senzitivními buňkami a rezistentními. Porovnání můžeme vidět na Obr. 39.



Obr. 39 Statistické porovnání rezistentních a senzitivních buněk

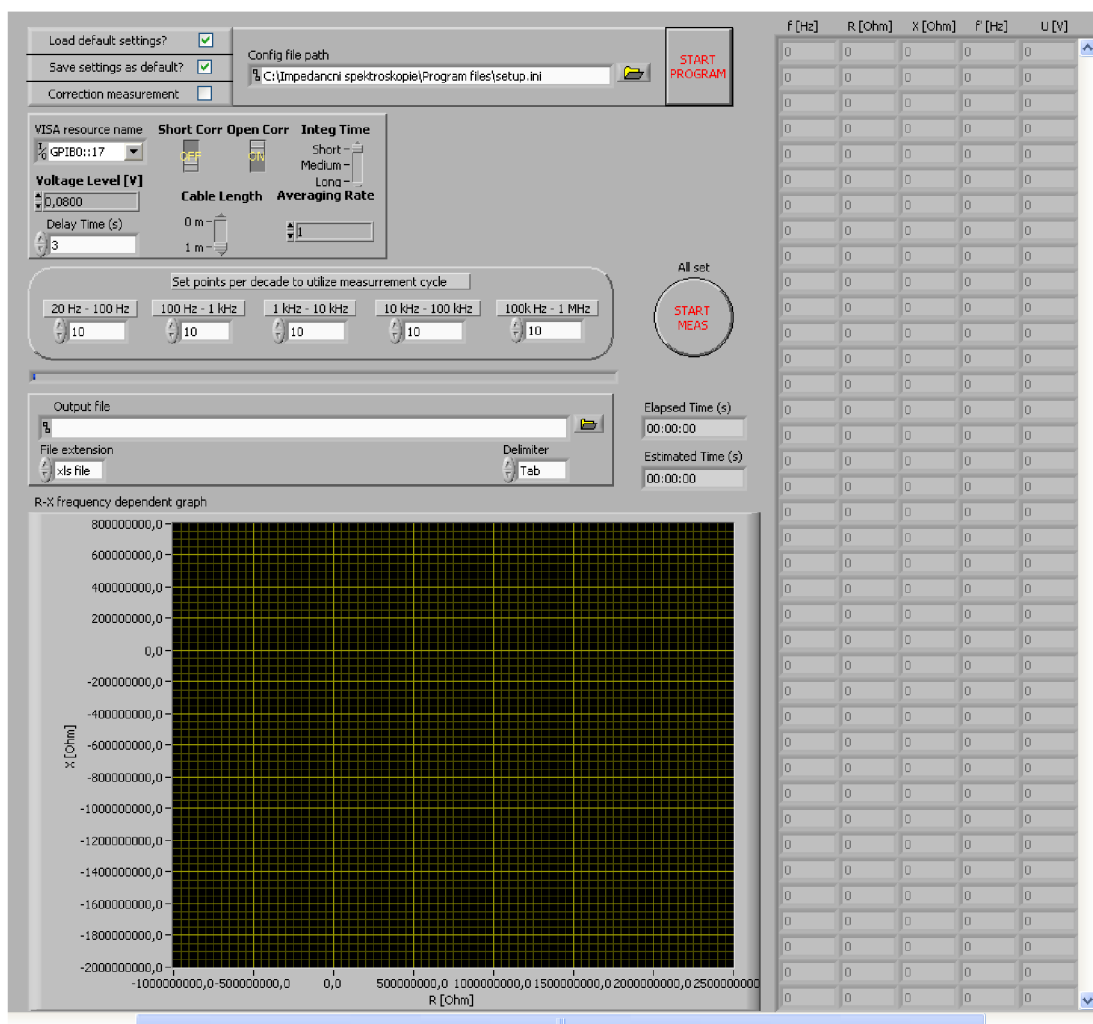
Z Obr. 39 můžeme pozorovat, že průměrné hodnoty směrnic senzitivních a rezistentních buněk se statisticky liší (p-hodnota je menší než 0,05). Průměrný rozdíl hodnot směrnic mezi senzitivními a rezistentními buňkami je $\Delta k = 0,167 \pm 0,083$. Můžeme tedy říct, že senzitivní buňky se od rezistentních statisticky liší. To ukazuje obdobně i Obr. 40, kde je vynesena hodnota směrnic v závislosti na koncentraci doxorubicinu. Jediná koncentrace, pro kterou není rozdíl statisticky významný je koncentrace doxorubicinu 1,00 μM. Interval spolehlivosti (95%) tam přesahuje nulovou linii, což znamená, že rozptyl hodnot získaných směrnic by byl větší, než jejich rozdíl. Proto je nemůžeme považovat za statisticky významné.



Obr. 40 Závislost hodnot směrnic na koncentraci doxorubicinu

3. Elektrochemická impedanční spektroskopie

Pro měření elektrochemické impedanční spektroskopie bylo využito naprogramované aplikace v prostředí LabView [autor Dr. Jiří Stehlík]. Čelní panel aplikace je na Obr. 41.



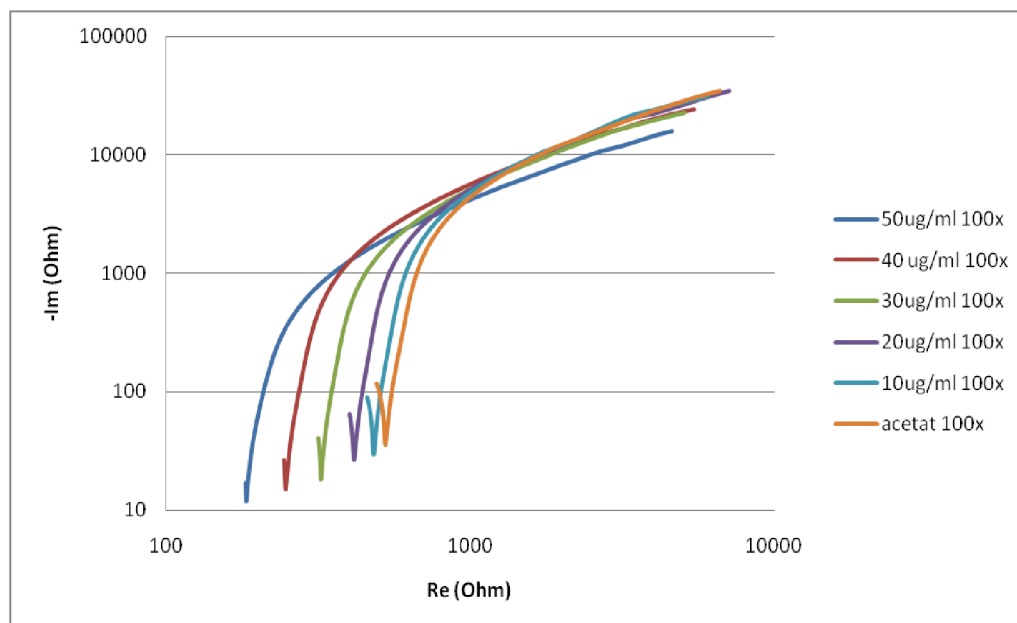
Obr.41 Aplikace prostředí LabView pro měření EIS

EIS-závislost na koncentraci

Na Obr.42 je průběh impedancí v celém frekvenčním rozsahu pro rostoucí koncentrace DNA v acetátovém pufru. Měřili jsme koncentrace DNA: 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$ v acetátovém pufru. Pro vysokou vodivost acetátového pufru jsme všechny roztoky museli 100x zředit, přístrojem by nebylo možno správně vyhodnotit tak vysoké naměřené vodivosti. Na grafu můžeme vidět, že se vzrůstající koncentrací klesá reálný odpor R_e i imaginární část impedance.

Pro další vyhodnocování byly vzaty dva body jako významné: lokální maximum průběhu impedance a poslední bod, měřený při nejvyšší frekvenci (10MHz, měření probíhá zprava doleva-v Obr.42). V lokálním maximum jsme pro další vyhodnocování dat vybrali

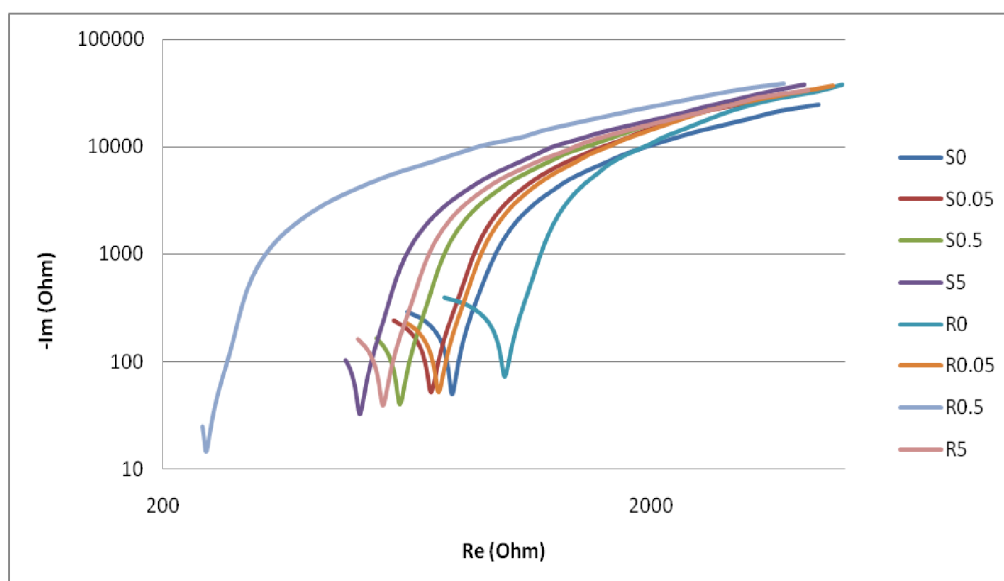
závislosti reálných odporů Re na frekvenci a koncentrace na Re v maximum. V posledním bodě pak především závislost reálného odporu na koncentraci.



Obr. 42 Průběhy impedancí v celém frekvenčním rozsahu v závislosti na klesající koncentraci

Impedance DNA senzitivních a rezistentních buněk

Za využití metody elektrochemické impedanční spektroskopie jsme měřili průběhy impedancí DNA senzitivních a rezistentních buněk o stejných koncentracích DNA a to 100 $\mu\text{g/ml}$. Vzorčky se dále lišili koncentrací doxorubicinu (0 - kontrolní vzorek, 0.05, 0.5 a 5 μM). Na Obr.43 jsou průběhy impedancí všech senzitivních (S) a rezistentních (R) vzorků o různých koncentracích.



Obr. 43 Průběhy impedancí DNA senzitivních (S) a rezistentních (R) buněk

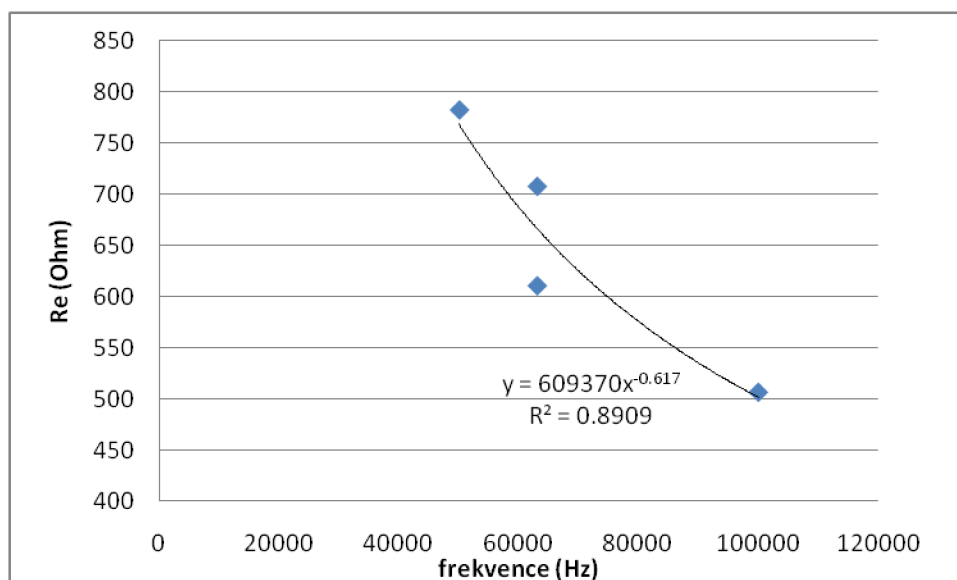
Na Obr.43 můžeme pozorovat, že se snižující se koncentrací doxorubicinu, klesá na dané frekvenci i reálný odpor Re . Můžeme si také všimnout, že senzitivní vzorky vykazují při stejné koncentraci vyšší reálný odpor. Vzorek R 0.5 považujeme za špatný, nebo chybně změřený a pro další měření ho neuvažujeme.

Pro porovnávání rozdílů DNA senzitivních a rezistentních buněk jsme zvolili oba významné body. Hodnoty jsou v Tab. 1.

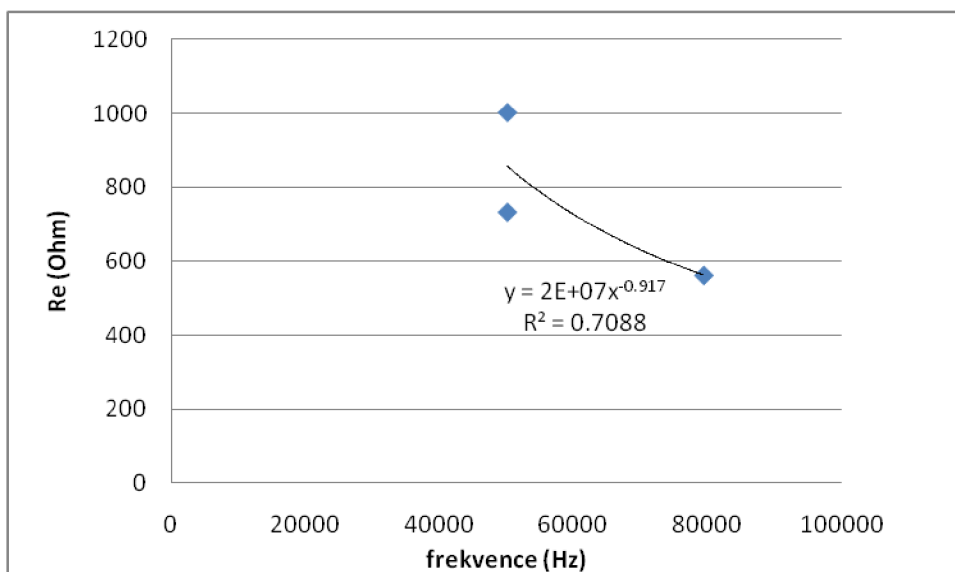
vzorek	konc. (uM)	maximum			poslední bod		
		frekv. (Hz)	Re (Ohm)	Im (Ohm)	frekv. (Hz)	Re (Ohm)	Im (Ohm)
S0	0	50118.723	782.948	-49.772	1000000	633.815	-291.72
S0,05	0.05	63095.734	8.131	-51.523	1000000	594.487	-239.248
S0,5	0.5	63095.734	610.834	-40.078	1000000	547.274	-164.469
S5	5	100000	506.607	-32.395	1000000	473.493	-103.282
R0	0	50118.723	1003.24	-72.374	1000000	755.389	-393.778
R0,05	0.05	50118.723	733.938	-51.644	1000000	626.711	-232.07
R0,5	0.5	199526.231	244.459	-14.569	1000000	240.592	-24.921
R5	5	79432.823	562.515	-39.604	1000000	500.235	-163.608

Tab. 1 Hodnoty pro bod maxima a poslední bod

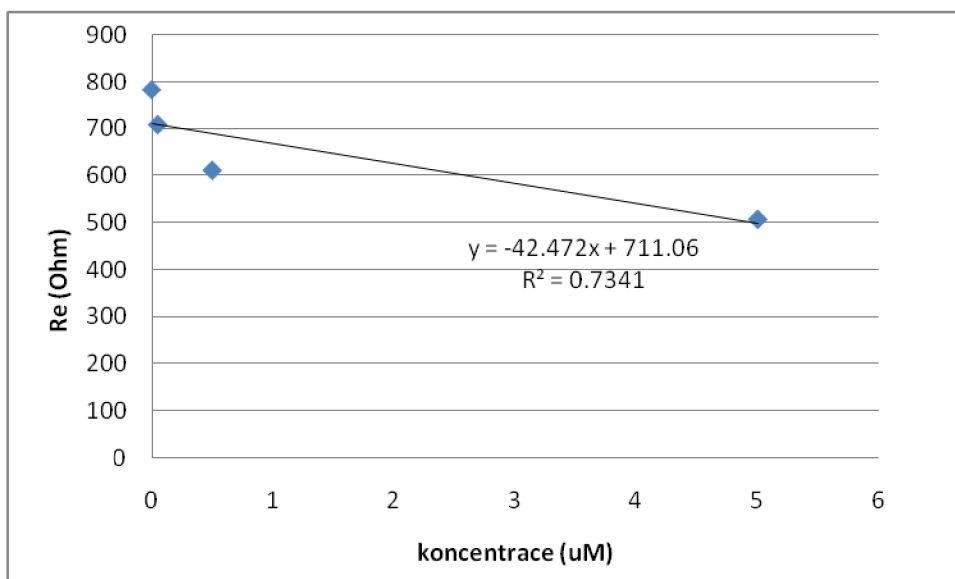
V bodě maxima jsme dali do závislosti hodnoty reálných odporů a frekvencí (Obr. 44, 45) a závislost reálných odporů na koncentracích (Obr. 46, 47). Závislost reálných odporů na frekvenci jsme proložili mocninovou závislostí. Druhá závislost (Reálných odporů na koncentraci) je přibližně lineární, určili jsme tedy rovnice závislostí, které jsme dále porovnávali. V posledním bodě byla nejvýznamnější závislost reálných odporů na koncentracích (Obr. 48, 49), která je přibližně lineární.



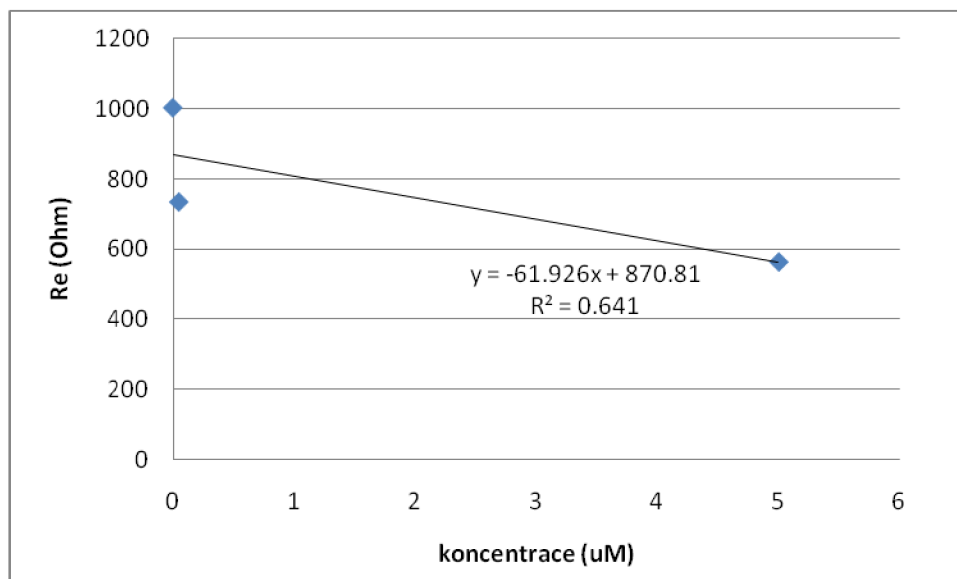
Obr.44 Závislost Re na frekvenci v bodě maxima, senzitivní vzorky



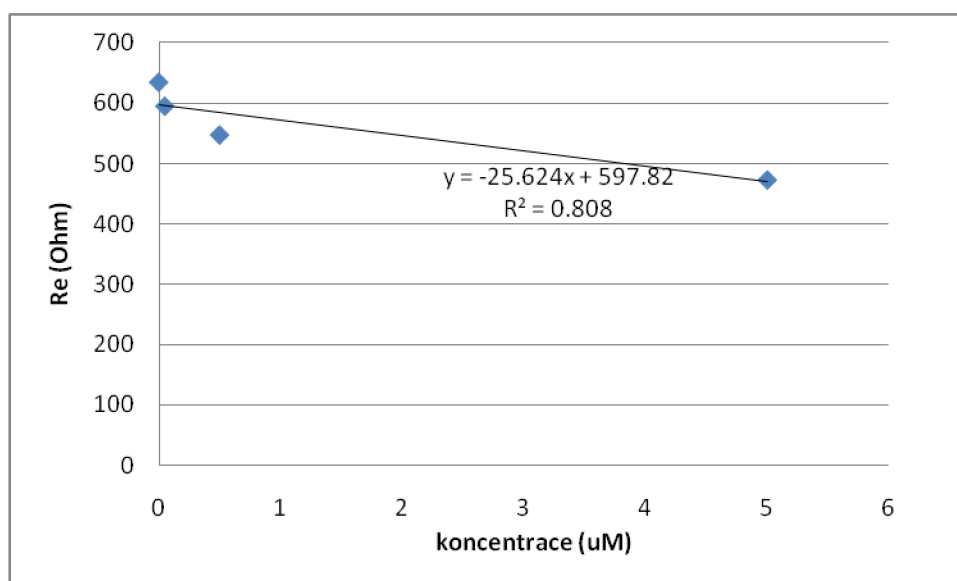
Obr.45 Závislost Re na frekvenci v bodě maxima, rezistentní vzorky



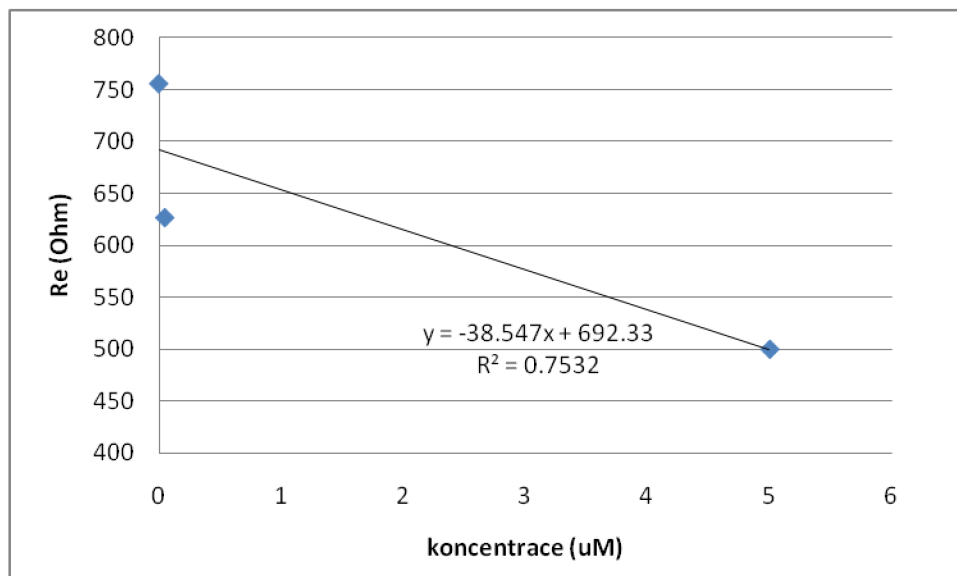
Obr.46 Závislost Re na koncentraci v bodě maxima, senzitivní vzorky



Obr. 47 Závislost Re na koncentraci v bodě maxima, rezistentní vzorky



Obr. 48 Závislost Re na koncentraci doxorubicinu v posledním bodě, senzitivní vzorky



Obr. 49 Závislost Re na koncentraci doxorubicinu v posledním bodě, rezistentní vzorky

Porovnávali jsme i závislost reálných odporů na imaginárních složkách impedance. Závislosti však pro vyhodnocování nebyly příliš vhodné (Příloha A). Pro porovnání jsou získané směrnice uvedené v Tab. 2.

		Senzitivní	Rezistentní
Maximum	Re-frekv.	$y = 609370x^{-0.617}$	$y = 2E+07x^{-0.917}$
	Re-Im	$y = -0,0702x + 2,3267$	$y = -0,0746x + 2,6359$
	konc-Re	$y = -42,472x + 711,06$	$y = -61,926x + 870,81$
Poslední bod	Re-Im	$y = -1,1881x + 468,35$	$y = -0,9031x + 303,5$
	konc-Re	$y = -25,624x + 597,82$	$y = -38,547x + 692,33$

Tab.2 Rovnice pro závislosti senzitivních a rezistentních linií k doxorubicinu

Další možností vyhodnocení je dávat do závislosti hodnoty rozdílů (diferenci) mezi oběma významnými body neboli rozdíl frekvence v posledním bodě a frekvence v maximum. Obdobně pak pro reálné odpory a imaginární složky impedance. Toto vyhodnocení však nemá takový význam jako jiné výše zmíněné závislosti a navíc je zatíženo velkou chybou v důsledku malého počtu vzorků (viz. Příloha B).

Pro určení druhu závislosti (lineární, mocninná, jiná) jsme využili hodnot z měření s acetátem z důvodu většího počtu vzorků a tím přesnějšího určení závislosti. Grafy z měření s acetátem (viz. Příloha C).

VI. Závěr

Doxorubicin patří mezi několik nejpoužívanějších protirakoviných léčiv dnešní doby. Využití nachází především v léčbě neuroblastomu, akutní myeloidní leukémie, akutní lymfoidní leukémie, Hodgkingského a non- Hodgkingského lymfomu, léčbě nádorů močového měchýře, prsu, kůže vaječníků a podobně. Vzhledem k četnosti jeho využití je důležité zkoumat jeho účinky a chování vzhledem k molekule DNA.

Pro měření jsme využívali metod cyklické voltametrie a elektrochemické impedanční spektroskopie. Bylo měřeno DNA ze senzitivních a rezistentních buněk k doxorubicinu. Senzitivní buňky jsou k účinkům léčiva citlivější. Na voltamogramech změřených metodou cyklické voltametrie jsme pozorovali snižování CA (cytosin, adenin) i G (guanin) píku v závislosti na koncentraci doxorubicinu u senzitivních buněk. Na rezistentní buňky přidaná koncentrace doxorubicinu neměla vliv. Průběhy signálů také závisí na rychlostech polarizace. Závislost výšky píku (CA nebo G) je závislá na rychlosti polarizace lineárně. Z takto sestrojených přímků jsme určili směrnice, které jsme dále pro CA pik statisticky zpracovávali a porovnávali senzitivní vzorky DNA a rezistentní vzorky DNA. Průměrné hodnoty směrnic vzorků o různých koncentracích doxorubicinu jsme porovnávali statistickým Turkeyho testem s průměrnou směrnicí kontrolního vzorku. To bylo provedeno pro senzitivní i rezistentní vzorky. U DNA senzitivních buněk. U senzitivních vzorků jsou rozdíly statisticky významné. U rezistentních vzorků rozdíly statisticky významné nejsou. Dále jsme porovnávali statistické rozdíly mezi senzitivními a rezistentními vzorky. Průměrný rozdíl směrnic je $\Delta k = 0,167 \pm 0,083$. Můžeme tedy říci, že účinky doxorubicinu na senzitivní a rezistentní vzorky se liší.

Před začátkem měření metodou elektrochemické impedanční spektroskopie byla provedena charakterizace zlatých elektrod měřením průběhů impedancí pro různě vodivé standarty KCl. Dále byly měřeny vzorky DNA rezistentních a senzitivních buněk. Pro vyhodnocení dat jsme využili dva významné body a to bod lokálního maxima a poslední bod průběhu impedance, který je změřen při nejvyšší frekvenci. Pro bod lokálního maxima jsme dávali do závislosti hodnoty reálných odporů na frekvenci (přibližně mocninná závislost) a závislost reálných odporů na koncentraci (přibližně lineární závislost). V posledním bodě jsme vzali závislost reálných odporů na koncentraci (přibližně lineární závislost). Rovnice křivek pro DNA senzitivních a rezistentních buněk se liší. Měření je ovšem zatíženo velkou chybou v důsledku malého počtu vzorků. Vzhledem k nižšímu počtu vzorků byly druhy závislostí určovány z měření DNA v acetátovém pufru, kde bylo změřeno více vzorků. Další možností vyhodnocení výsledků by mohlo být určení hodnot C_{DL} (kapacita dvouvrstvy vznikající na rozhraní elektroda-elektrolyt) a R_{CT} (odpor přenosu náboje přes dvouvrstvu) z průběhu impedance.

VII. Literatura

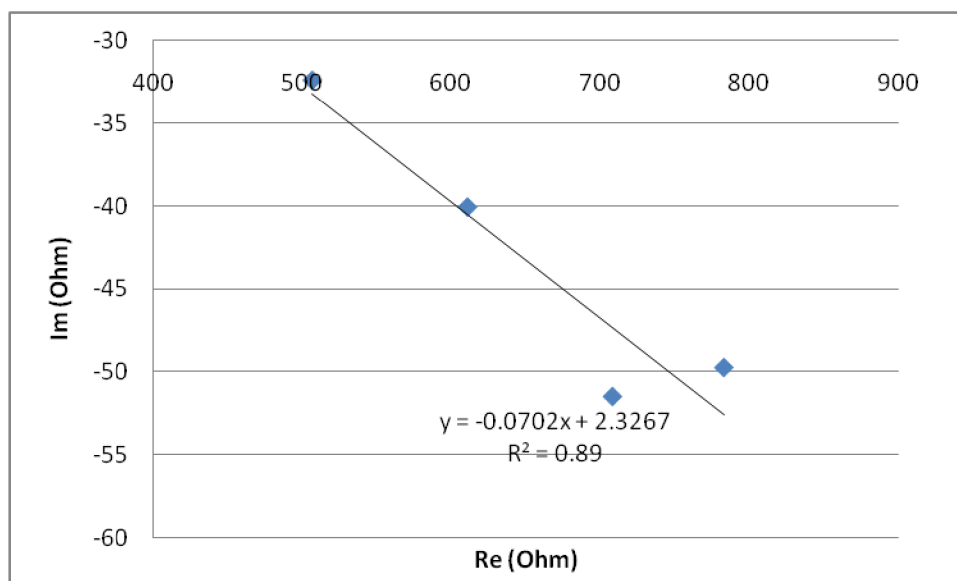
- [1] Drummond, TG., Hill, MG., Barton, JK., *Electrochemical DNA sensors*, Nature biotechnology. October 2003, roč. 21, č.10, s.1192-1199
- [2] Nečas, Oldřich - Svoboda, Augustin - Hejtmánek, Milan - Janisch, Roman - Červinka, Miroslav - Lenhart, Karel - Kolář, Zdeněk. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. přepracované, v H+H 1. Jinočany : H+H, 2000. 554 s. ISBN 80-86022-46-3
- [3] Oracle ThinkQuest.[online] Dostupné z URL <<http://library.thinkquest.org/20830/Textbook/HistoryofDNAResearch.htm> > [cit.16.12.2009]
- [4] Bruner, B.[online] překresleno dle URL < http://bbruner.org/bitn/bitn_fig/dna.gif >, [cit.16.12.2009]
- [5] Rozsypal, S., *Úvod do molekulární biologie*.1.vydání, Brno. GRAFEX 1996 s. 21 – 36
- [6] Raclavský, Vladislav. *Metody molekulární genetiky* [online]. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, 2003. Kapitola 8. Sekvenování DNA, dostupné z URL:< <http://biologie.upol.cz/metody/Sekvenovani%20DNA.htm>>,[cit. 16.12.2009]
- [7] Šmarda, J., Doškař J., Pantůček, R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie*. Coprint Brno, ISBN 978 – 80 – 210 – 3841 – 7 s. 56 – 63
- [8] Rozsypal, S., *Nový přehled biologie*. Scientia, 1.vydání Praha 2003, s.91, ISBN 80-7183-268-5
- [9] Rozsypal, S., *Úvod do molekulární biologie*. 1. Vydání, Brno. GRAFEX 1996 s. 406
- [10] Ústav buňčné biologie a patologie, 1. lékařská fakulta UK,[online] Dostupné z URL: <<http://lge.lf1.cuni.cz/heslo/priklady/files/dna%20chromosomes%20chromatin-complet%20with%20figures%20cz.htm>> [cit. 17.12.2009]
- [11] Šmarda, J., Doškař J., Pantůček, R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie*. Coprint Brno, ISBN 978–80–210–3841–7, s. 13 - 14
- [12] Saiki, RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science volume 230, s. 1350-1354,[online] dostupné z URL: <<http://sunsite.berkeley.edu/cgi-bin/ebind2html/pcr/034>> [cit. 17.12.2009].
- [13] Šmarda, J. , Doškař J., Pantůček, R., Růžičková V., Koptíková J. *Metody molekulární biologie*. Coprint Brno, ISBN 978 – 80 – 210 – 3841 – 7 s. 73
- [14] Nováková L., *Studium struktury a interakcí nukleových kyselin pomocí elektrochemických metod*: Diplomová práce, MU Přírodovědecká fakulta, Brno 2007
- [15] Paleček, E., *Past, present and future of nucleic acids electrochemistry*, Talanta, č. 56 2002, s. 809–819
- [16] Špaček, J. *Využití elektrochemicky aktivních značek a mikroseparačních metod při analýze poškození DNA a monitorování aktivity enzymů štěpicích a modifikujících nukleové kyseliny*:Bakalářská práce, Brno 2009, s. 27
- [17] Thomson Healthcare Inc., *MayoClinic* [online],aktualizace May 19, 2010, Dostupné z URL< <http://www.mayoclinic.com/health/drug-information/DR600581>>, [cit. 19.5.2010]

- [18] CancerQuest, *Emory University, Winship cancer institute*, [online] aktualizace November 29. 2006 Dostupné z URL: <<http://www.cancerquest.org/index.cfm?page=506>>,[cit. 13.3.2010]
- [19] Huska D., Adam V., Babula P., Stibrova M., Eckschlanger T., Trnkova L., Kizek R., *Square-Wave Voltammetry as a Tool for Investigation of Doxorubicin Interaction with DNA Isolated from Neuroblastoma Cells*, *Elektroanalysis* 2009, 21, No.3-5, 487-494.
- [20] Stibor I., Interakce planárních molekul s nukleovými kyselinami-interkalace, Ústav organické chemie, *VŠCHT*, [online] s. 193-218. Dostupné z URL: <http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/7_Stibor.pdf>, [cit.20.4.2010]
- [21] Ortho Biotech Products, L.P, *Doxil (doxorubicin HCl liposome injection)*, New Jersey,[online]
Dostupné z URL: <http://www.doxil.com/assets/DOXIL_PI_Booklet.pdf>, [cit.13.3.2010]
- [22] Lacayo Norman J, Kara,L. Davis, *eMedicine*[online], aktualizace April 8, 2010. Dostupné z URL <<http://emedicine.medscape.com/article/988284-overview>>, [cit.14.4.2010]
- [23] Olshan, AF, Bunin, GR (2000) Epidemiology of Neuroblastoma. In: Brodeur, GM, Sawada, T, Tsuchida, Y, Voute, PA eds. , *Neuroblastoma*, Elsevier, Amsterdam, pp 33-39, ISBN 044450222X
- [24] Macmillan, Cancer Support,[online] aktualizace 1 December, 2009 Dostupné z URL <<http://www.macmillan.org.uk/Cancerinformation/Cancertypes/Childrencancers/Typesofchildrencancers/Neuroblastoma.aspx#9216>>,[cit. 14.4.2010]
- [25] Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, *et al.* (2003). "Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular". *Cancer* 98 (10): 2274–2281.
- [26] Wikipedia,[online] aktualizace 30 November 2009. Dostupné z URL http://en.wikipedia.org/wiki/Electrical_impedance, [cit. 2.12.2009]
- [27] Katz E., Willner I., *Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors*. *Electroanalysis*,2003, roč.15, č. 11, s. 913-947
- [28] Kizza, A. ,*The capacitance of electric double layer of electrodes in molten salts*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, č. 534, Issue 2, 2002, s. 99-106
- [29] Mackdonald, D., McKubre,M., *Impedance Measurement in Electrochemical Systems*.Hardcover, 616 s., April 2005, ISBN: 978-0-471-64749-2
- [30] Protti,P. *Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques* [online], AMEL elektrochemie, IV. edition 2001, 35s. Dostupné z URL: <http://www.amelchem.com/download/items/voltammetry/manuals/eng/manual_eng.pdf>, [cit.19.3.2010]
- [31]AMETEK, *A Review of Techniques for Electrochemical Analysis* [online]. Dostupné z URL< <http://new.ametek.com/content-manager/files/PAR/App%20Note%20E-4%20-%20Electrochemical%20Analysis%20Techniques1.pdf>>, 12s. [cit.19.3.2010],.
- [32] Hubálek J., Adámek M. *Mikrosenzory a mikroelektromechanické systémy*.VUT, Brno
- [33] Hubálek J., Krejčí J., *Correction factors of IDEs for precise conductivity measurement*. *Sensors and Actuators B* 91 2003, s. 46–51
- [34] Hubálek J., *Chemical microsensor. Precise Conductivity Measurements using Planar Electrodes*, PhD Thesis, VUT v Brně, 2003, 111s.

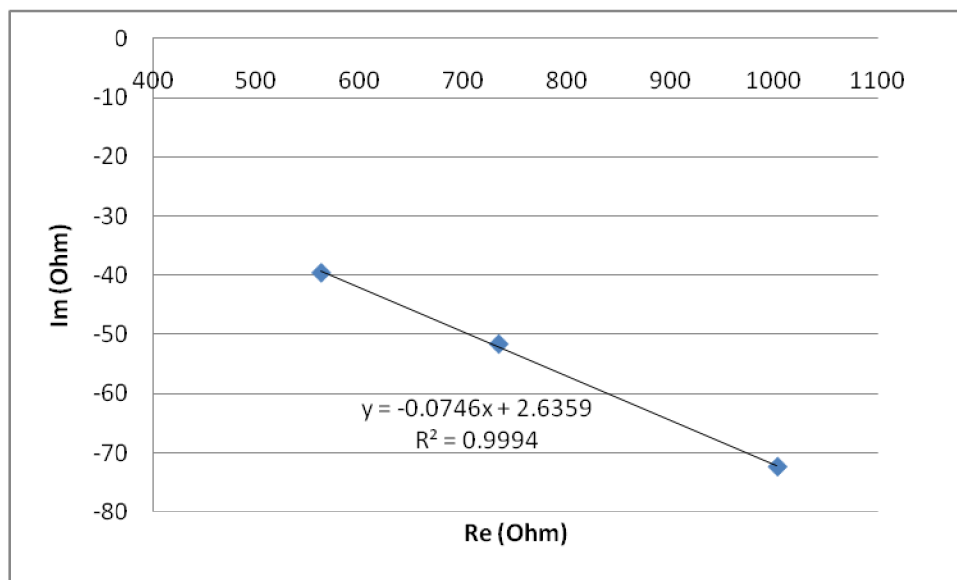
VIII. Příloha A

		senzitivní	rezistentní
maximum	Re-Im	$y = -0.0702x + 2.3267$	$y = -0.0746x + 2.6359$
poslední bod	Re-Im	$y = -0.0033x^2 + 2.4152x - 513.4$	$y = -0.0028x^2 + 2.6183x - 771.81$

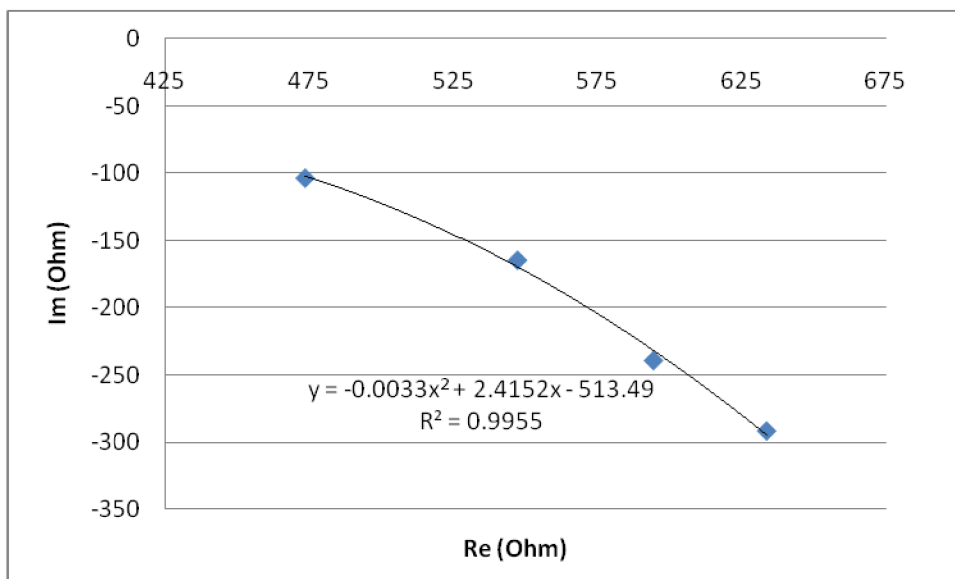
Tab.3 Rovnice pro závislosti senzitivních a rezistentních linií k doxorubicinu



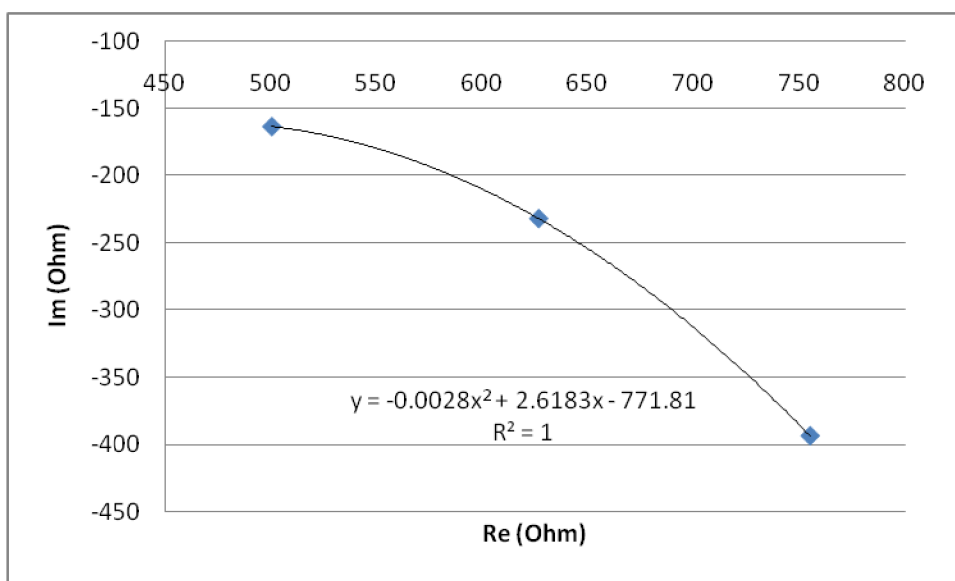
Obr. 50 Závislost reálných odporů na imaginární složce v bodě maxima, senzitivní vzorky, lineární proložení



Obr. 51 Závislost reálných odporů na imaginární složce v bodě maxima, rezistentní vzorky, lineární proložení



Obr. 52 Závislost reálných odporů na imaginární složce v posledním bodě, senzitivní vzorky, polynomičké proložení

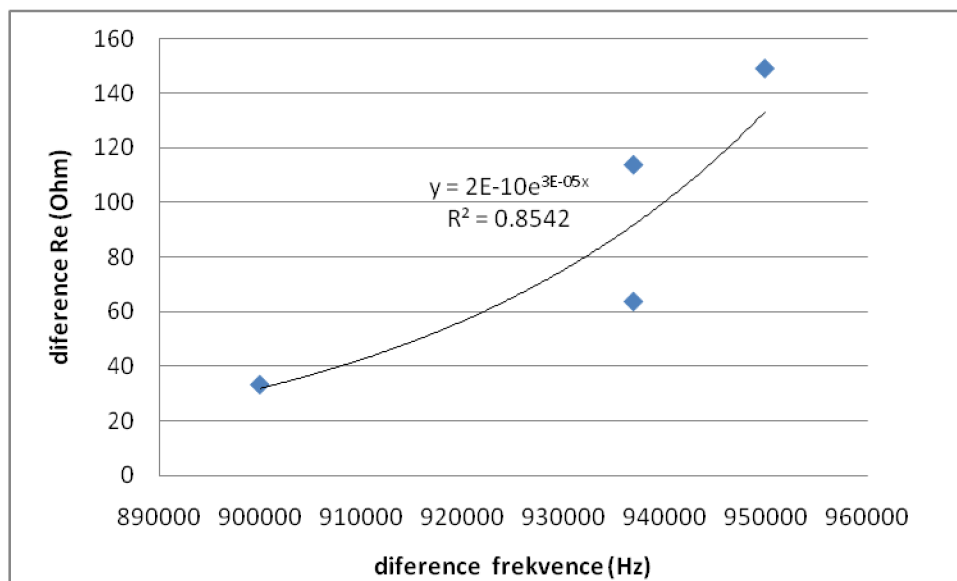


Obr. 53 Závislost reálných odporů na imaginární složce v posledním bodě, rezistentní vzorky, polynomičké proložení

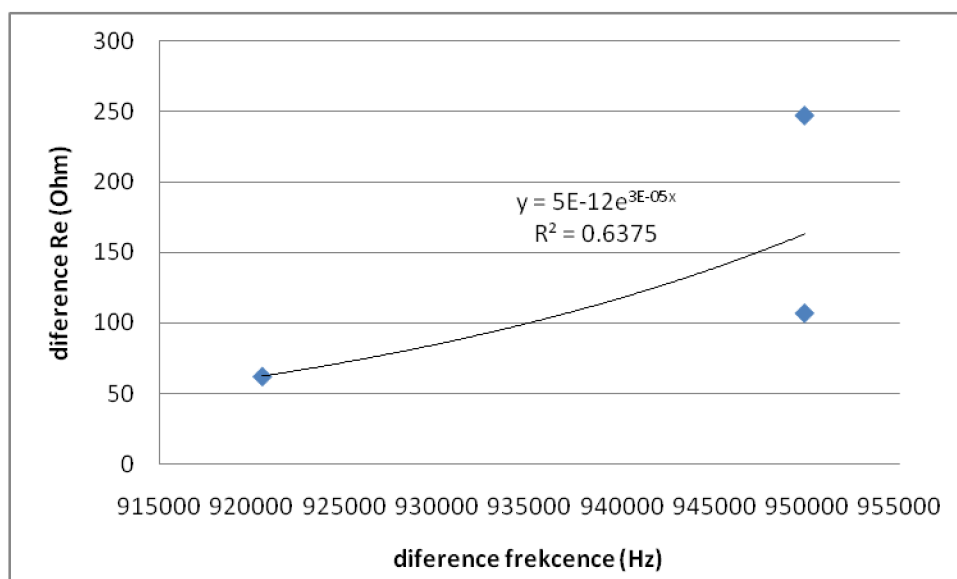
IX. Příloha B

	senzitivní	rezistentní
dif.Re-dif.Im	$y = 1.4404x + 26.797$	$y = 1.0491x + 62.662$
dif.Re-dif.frekv.	$y = 2E-10e^{3E-05x}$	$y = 5E-12e^{3E-05x}$

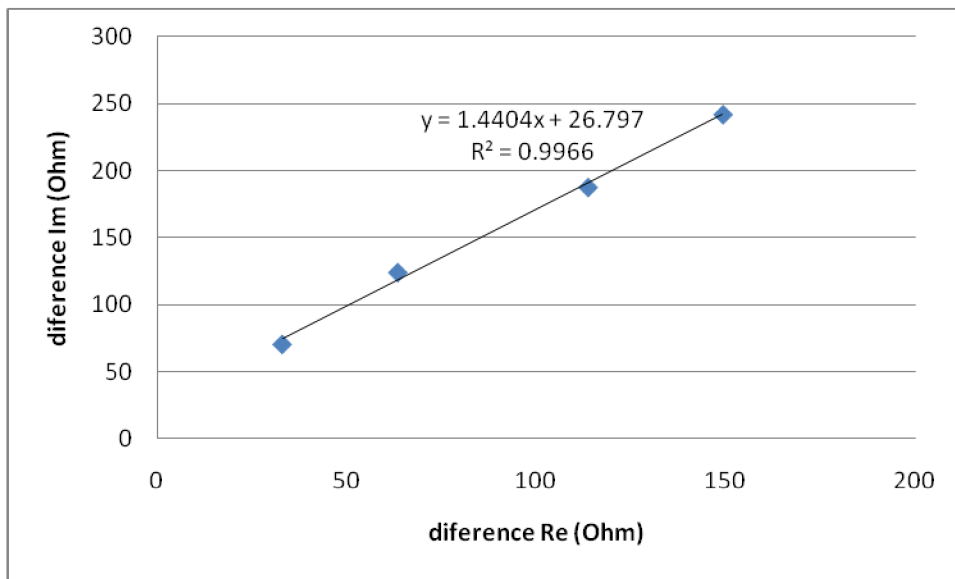
Tab. 4 Rovnice pro závislosti senzitivních a rezistentních linií k doxorubicinu



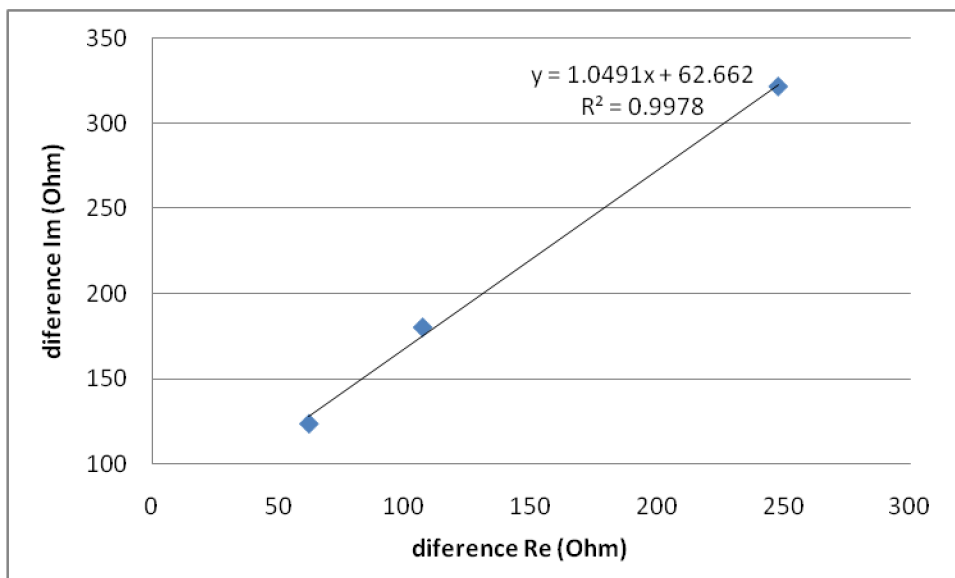
Obr. 54 Závislost difference reálných odporů na diferencích frekvencí, senzitivní vzorky, exponenciální proložení



Obr. 55 Závislost difference reálných odporů na diferencích frekvencí, rezistentní vzorky, exponenciální proložení

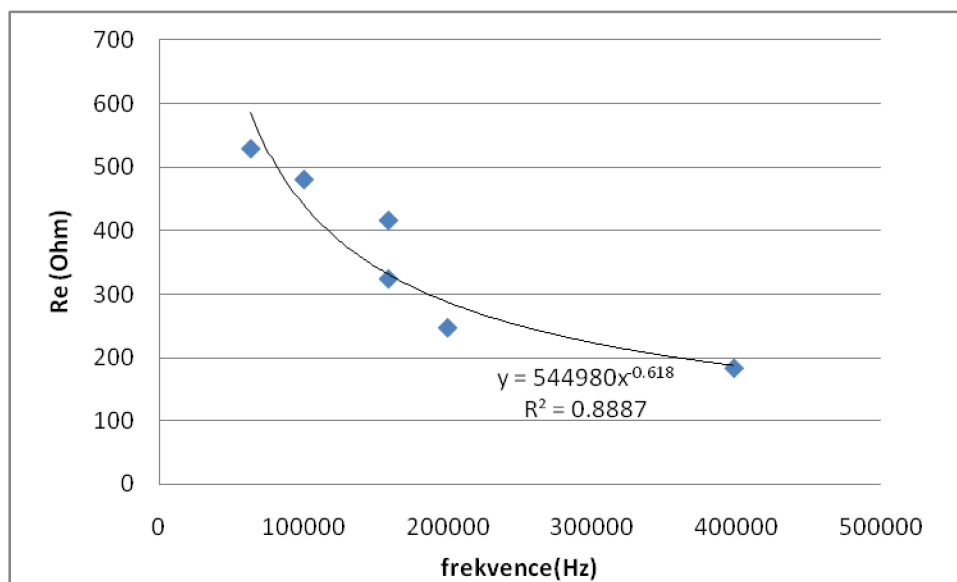


Obr. 56 Závislost difference reálných odporů na diferencích impedančních složek, senzitivní vzorky, lineární proložení

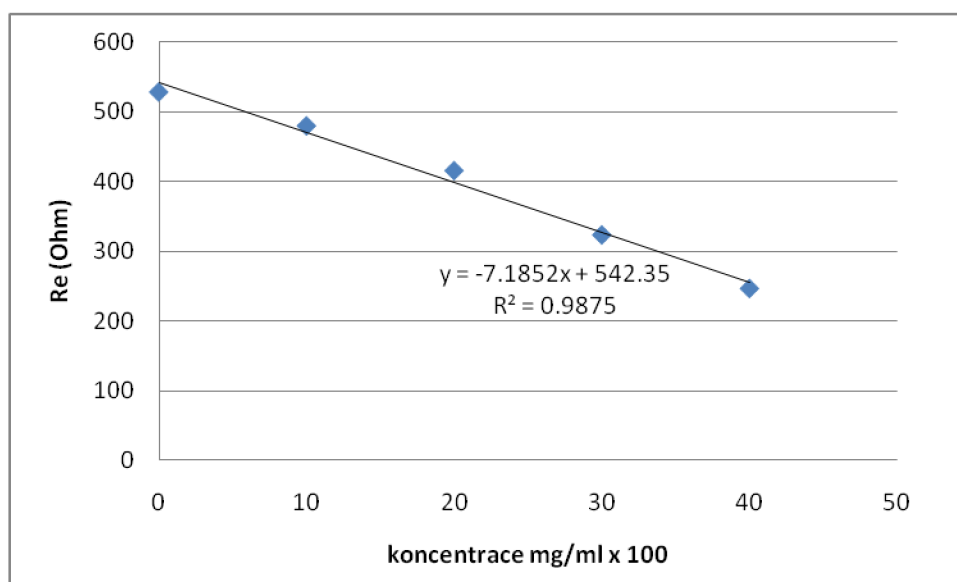


Obr. 57 Závislost difference reálných odporů na diferencích impedančních složek, rezistentní vzorky, lineární proložení

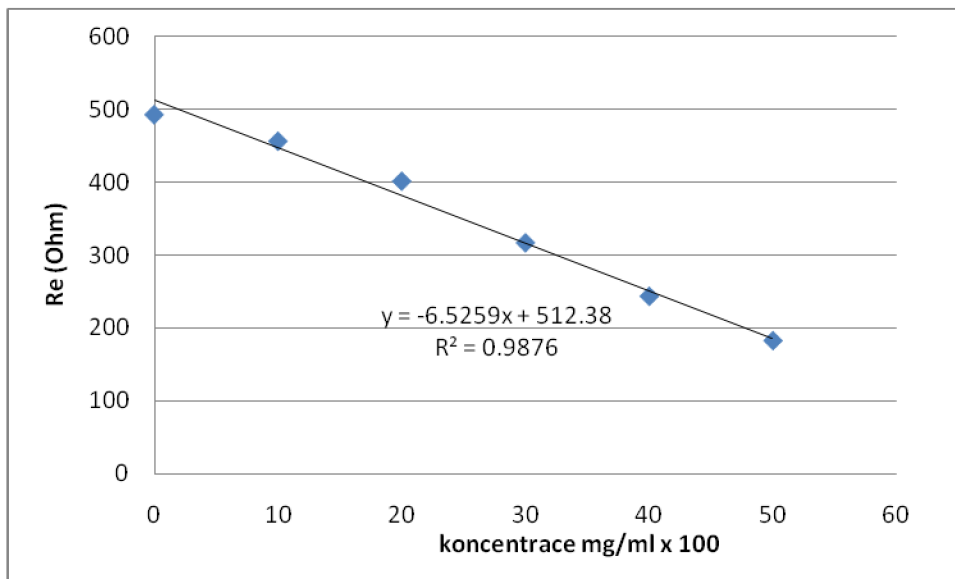
X. Příloha C



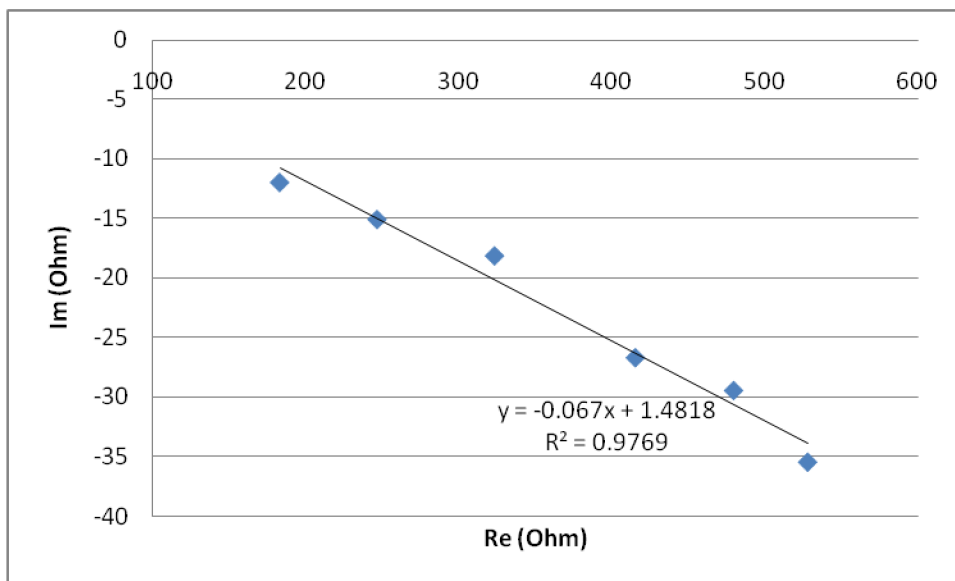
Obr. 58 Závislost reálných odporů na frekvenci v bodě maxima, DNA v acetátovém pufru, exponenciální proložení



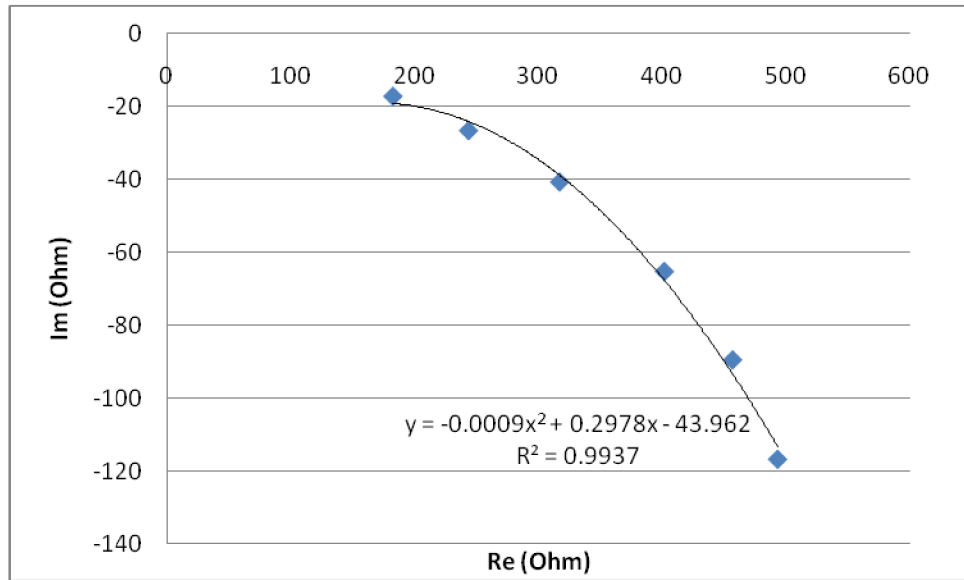
Obr. 59 Závislost reálných odporů na koncentraci v bodě maxima, DNA v acetátovém pufru, lineární závislost



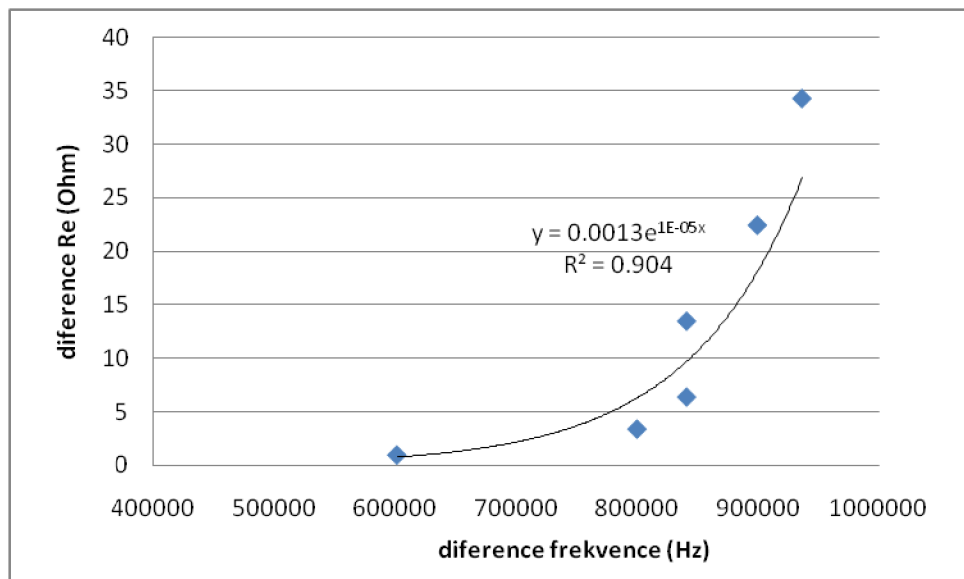
Obr. 60 Závislost reálných odporů na koncentraci v posledním bodě, DNA v acetátovém pufru, lineární proložení



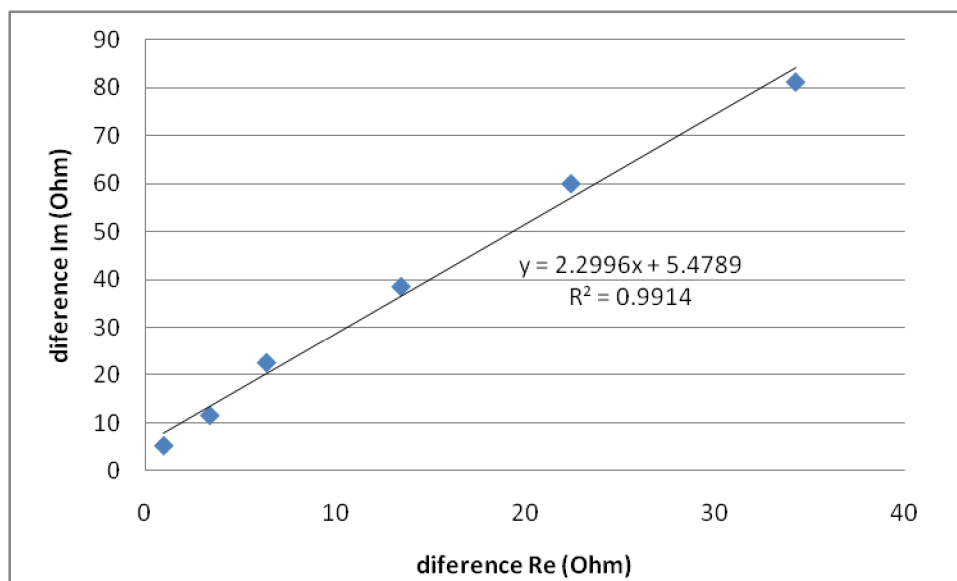
Obr. 61 Závislost reálných odporů na impedančních složkách v bodě maxima, DNA v acetátovém pufru, lineární závislost



Obr. 62 Závislost reálných odporů na impedančních složkách v posledním bodě, DNA v acetátovém pufru, polynomičká závislost



Obr. 63 Závislost diferencí reálných odporů na diferencích frekvencí, DNA v acetátovém pufru, exponenciální závislost



Obr. 64 Závislost diferencí reálných odporů na diferencích impedančních složek, DNA v acetátovém pufru, lineární závislost