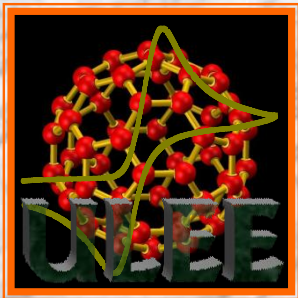


VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH BIOSENZORŮ V KLINICKÉ ANALÝZE

Vlastimil Vyskočil



Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí

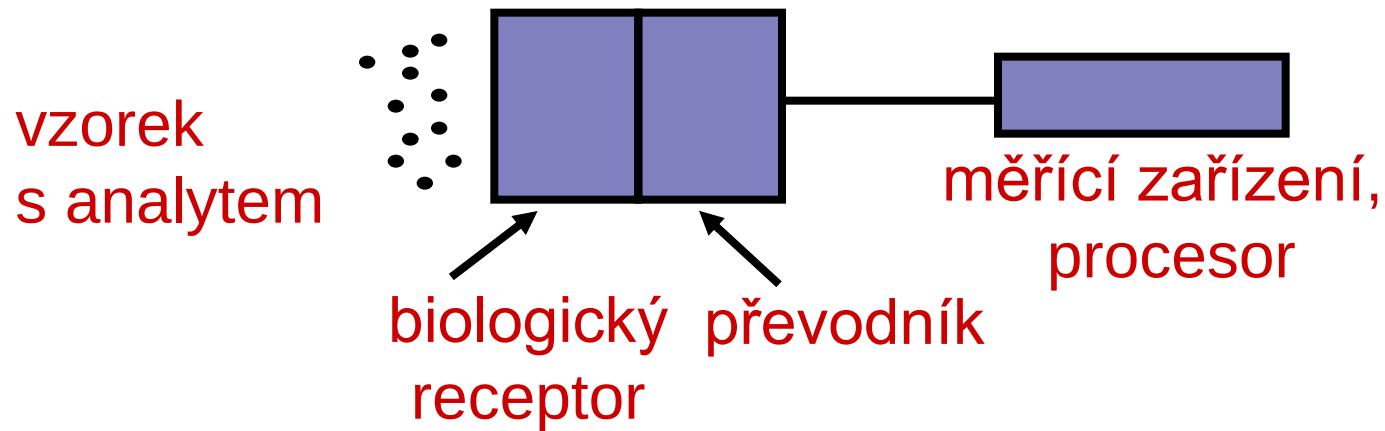
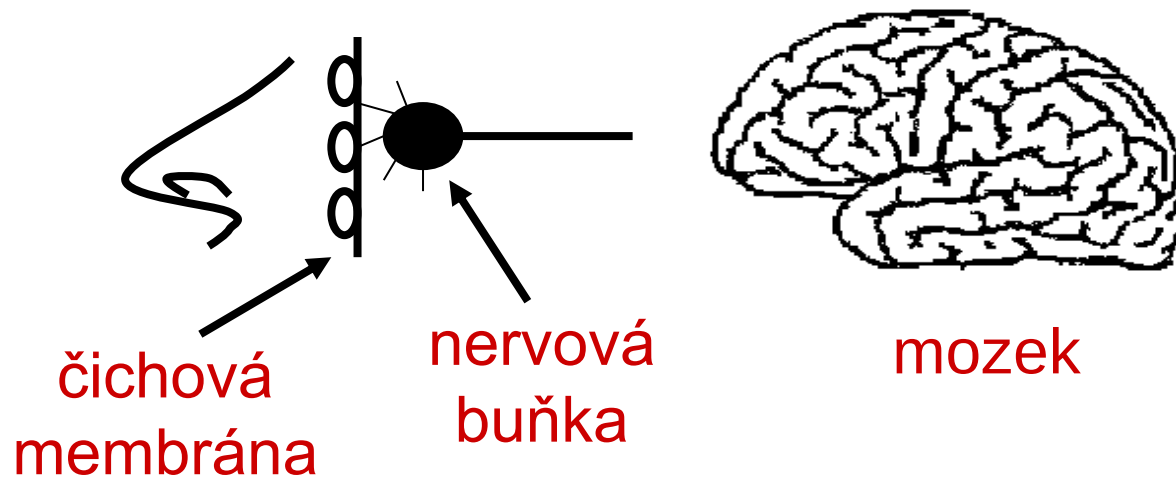


Klinická analýza

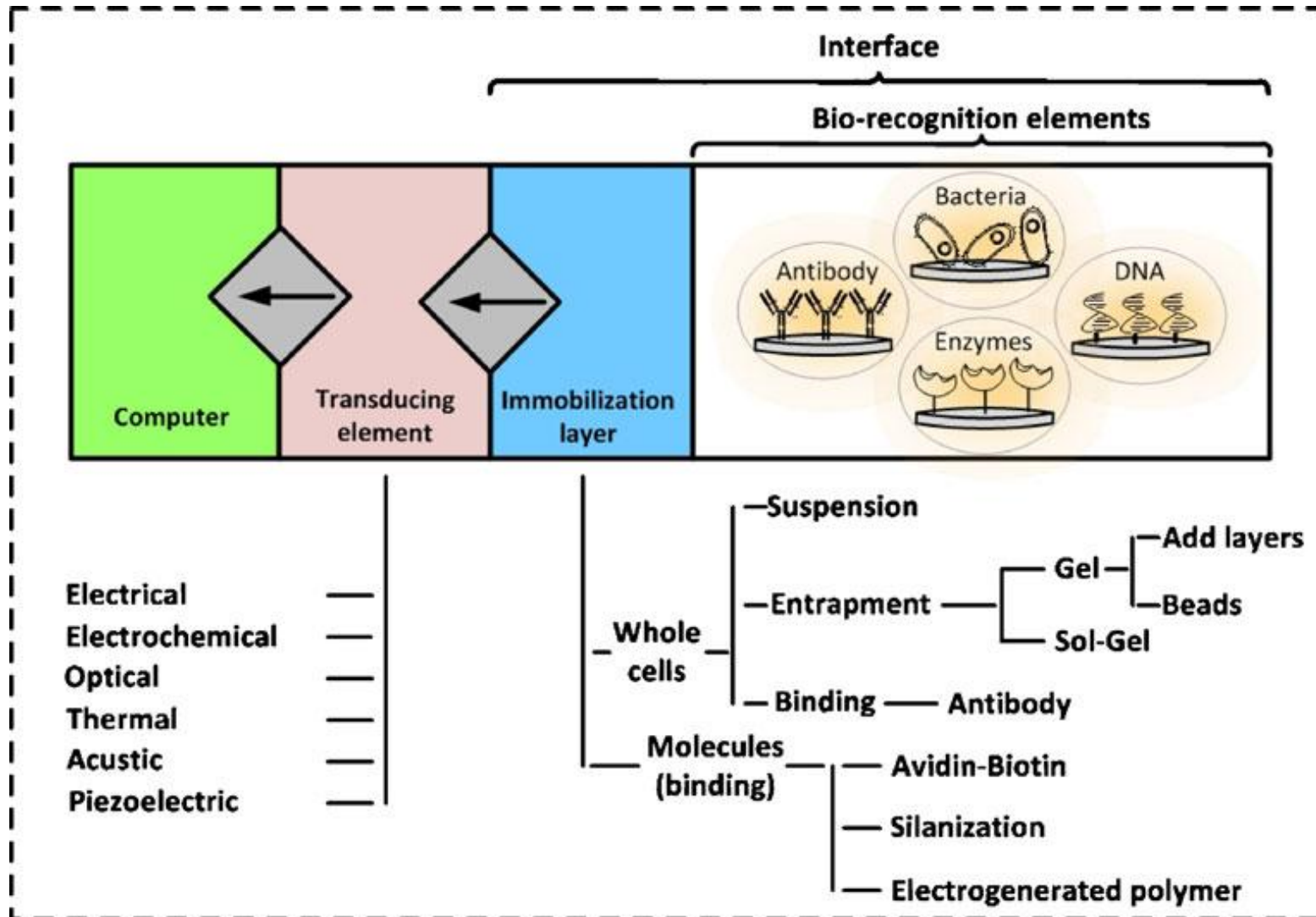
- ☑ Lékaři se spoléhají na klinické testy
- ☑ Testy rychlé, levné a „low-tech“
- ☑ Prováděné laboratorními techniky či pacienty
- ☑ Většina testů *in vitro*
- ☑ Avšak požadavky i na *in vivo* testy



Koncepce biosenzoru

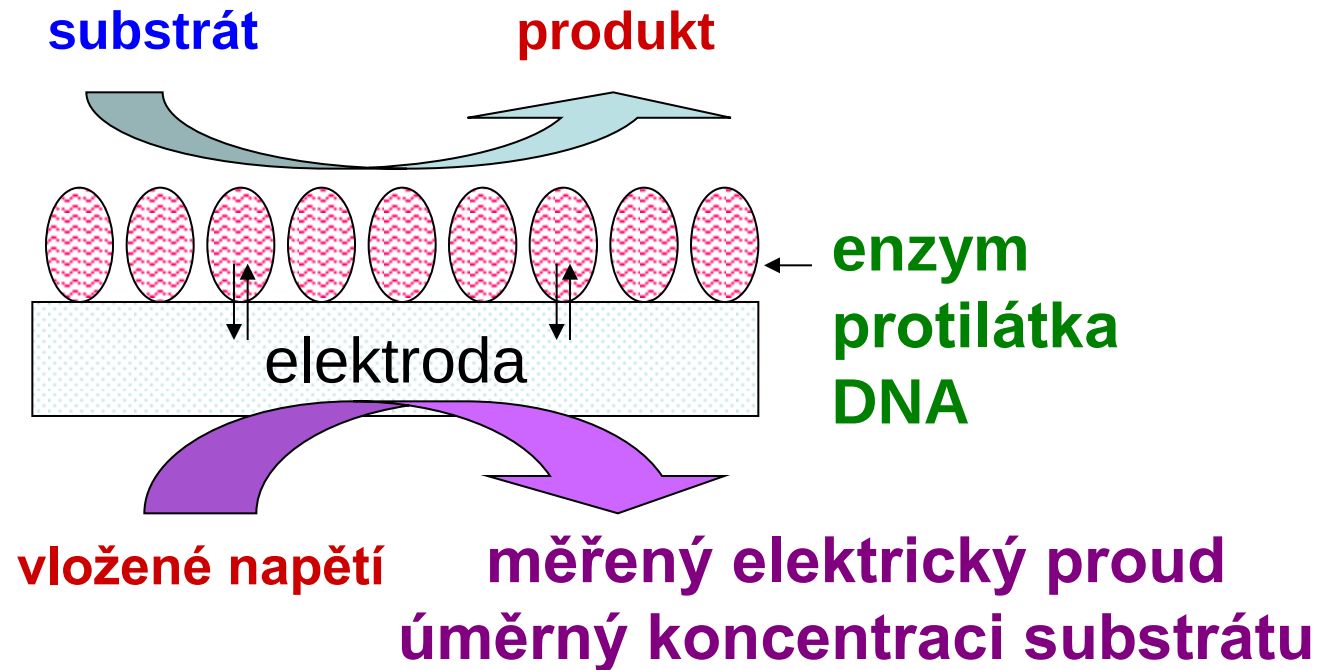


Popis biosenzorů

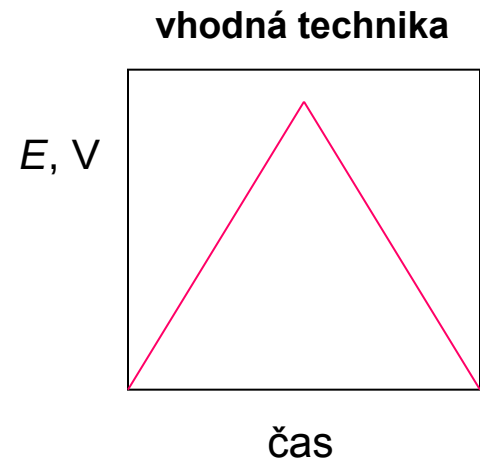
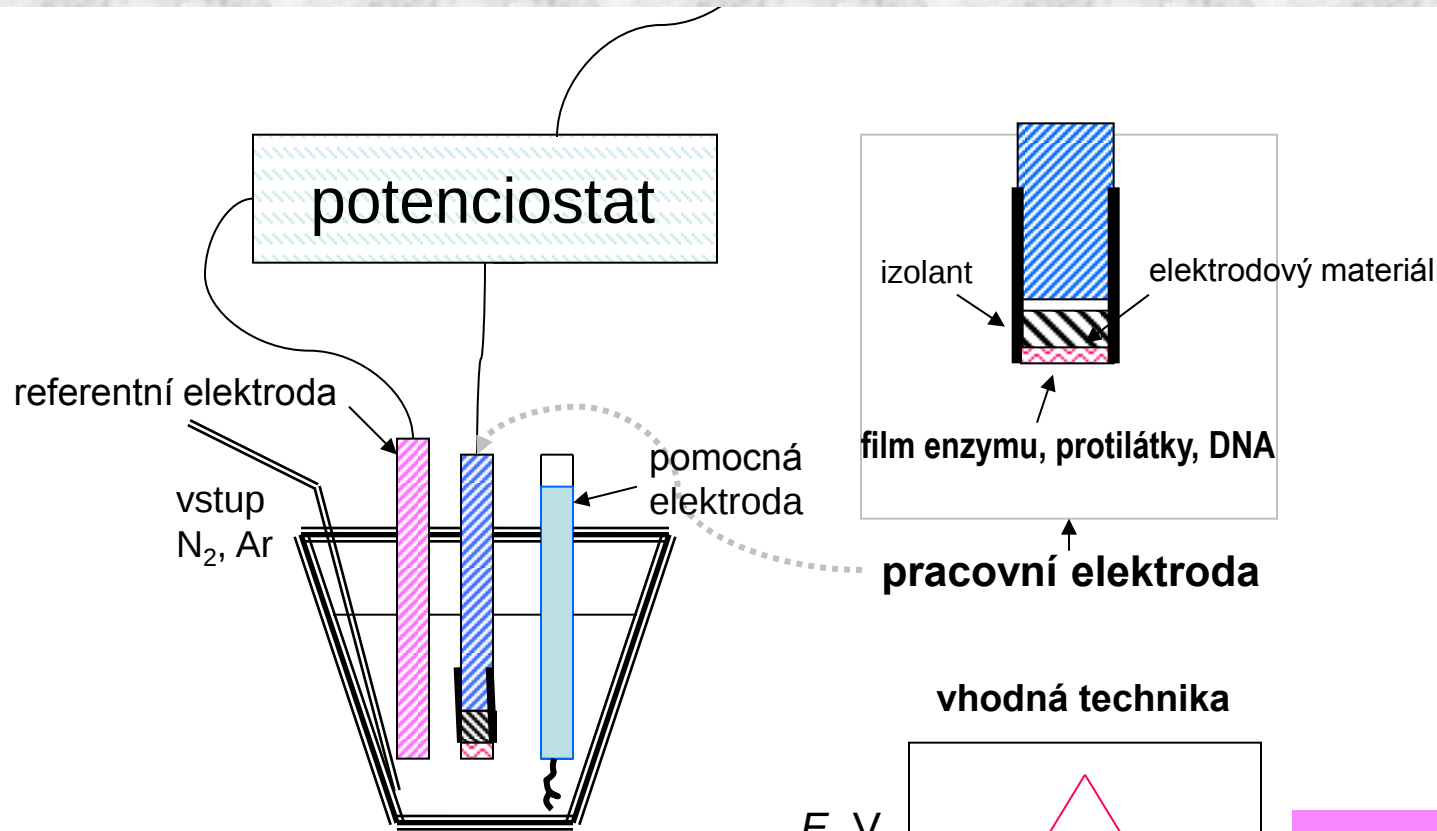


E. Eltzov, R. S. Marks: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2010) 895-913.

Princip elektrochemických biosenzorů



Vybavení pro vývoj elchem. biosenzorů

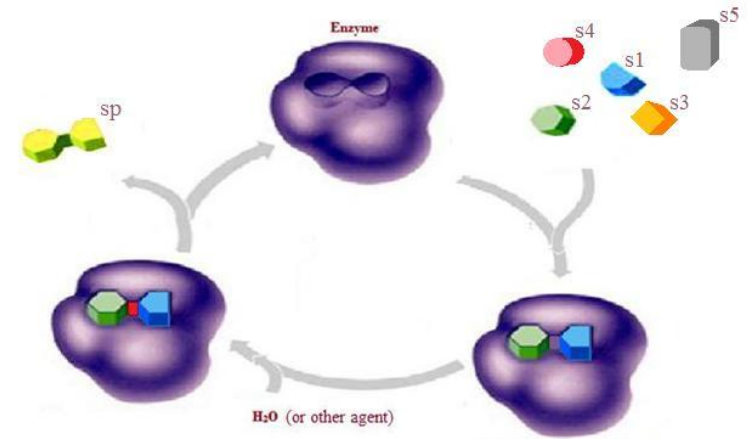


např. cyklická
voltametrie

Elektrochemické biosenzory

☑ Biokatalytické biosenzory

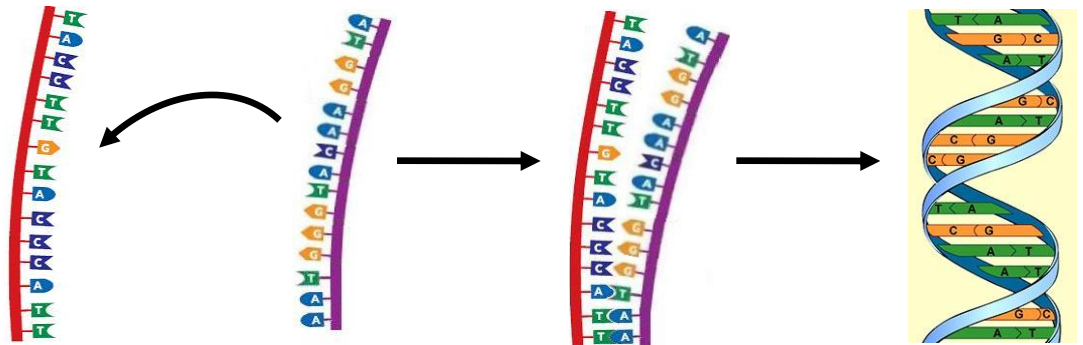
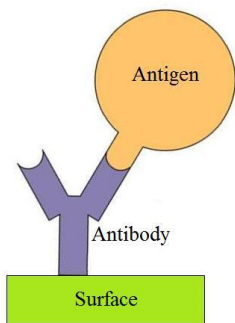
- enzymatické



☑ Afinitní biosenzory

- imunobiosenzory

- DNA biosenzory



Enzymatické biosenzory

☑ První enzymová elektroda

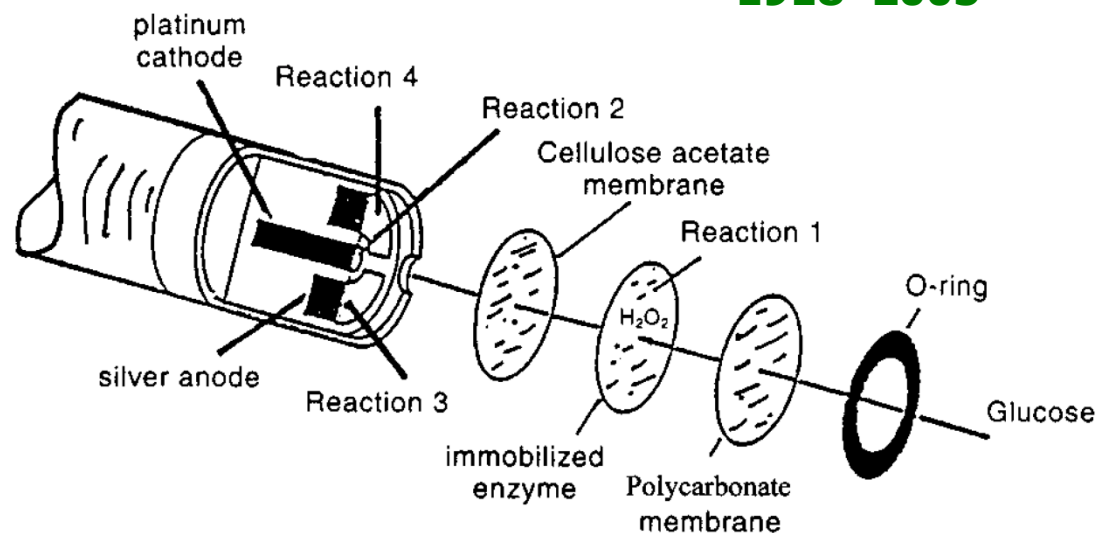
- 1962 (sympóziium N.Y. akademie věd)
- imobilizovaná glukóza oxidáza
- 1975 (první komerčně vyráběný biosenzor firmy Yellow Springs Instruments, USA)
- rychlé zjištění hladiny cukru v krevních vzorcích diabetiků



**Prof. Leland C. Clark
1918–2005**



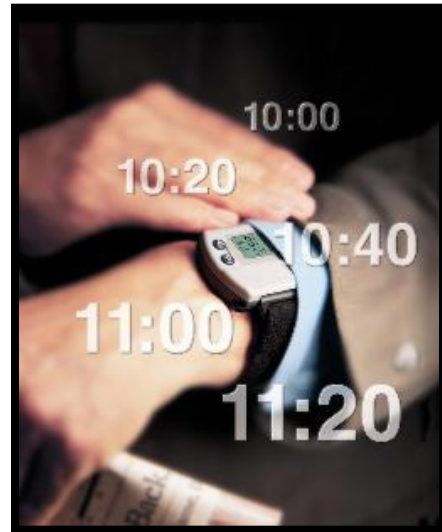
YSI analyzátor, Model 23A



Enzymatické biosenzory

☑ Další historický vývoj

- 1982 (představení monitorování glukózy *in vivo*)
- 1984 (vývoj ferrocenových mediátorů)
- 1987 (první osobní glukometr)
- 1999 (komerční *in vivo* glukometr)
- 2000 (nositelný neinvazivní glukometr)



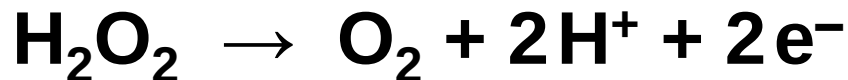
☑ Princip glukometru

- glukóza oxidáza ukotvena mezi polyuretan a permselektivní membránu na platinové elektrodě

glukóza oxidáza

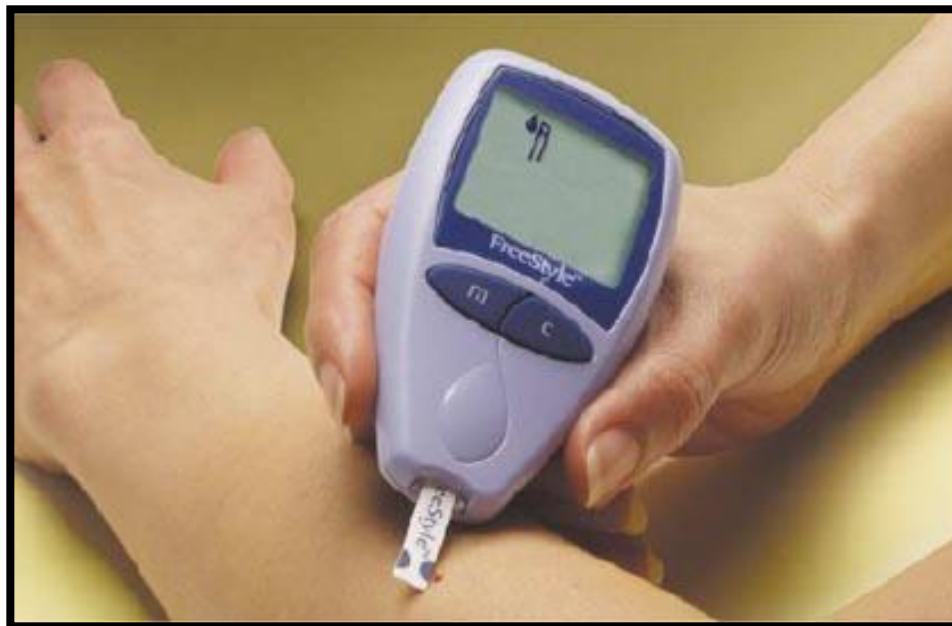


- uvolňovaný H_2O_2 je monitorován na povrchu elektrody



Enzymatické biosenzory

- ☑ Glukometry uvedené na trh v ČR v roce 2002



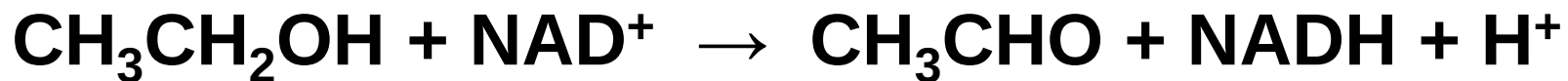
- ☑ Současný výzkum v oblasti glukometrů
 - neinvazivní biosenzory (kůže, sliny)
 - implantovatelné senzory na glukózu doprovázející „umělou slinivku“ – zpětná vazba pro dávkování inzulínu
 - většinou pracují 3 - 4 týdny (poruchy, záněty)

Enzymatické biosenzory

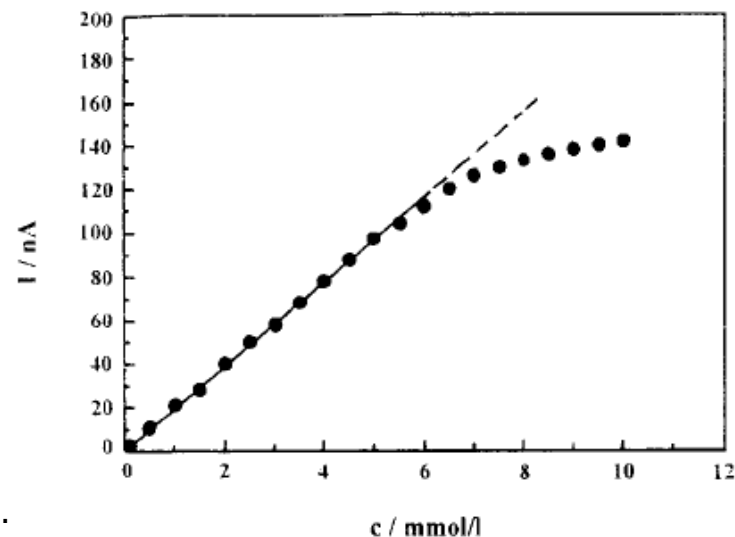
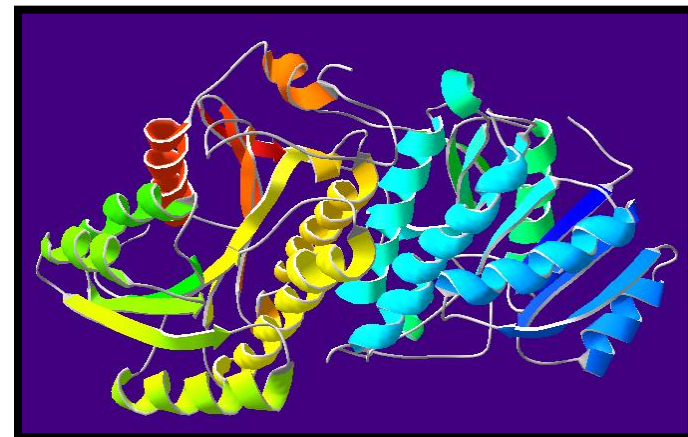
☑ Biosenzor pro ethanol (ampérometrický)

- využívá imobilizovanou ADH a NAD^+
- uhlíkový či platinový převodník

alkohol dehydrogenáza



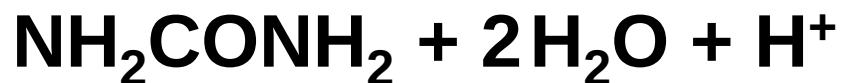
- NAD^+ je regenerovaný elektrochemickou oxidací NADH
- měřen výsledný anodický proud



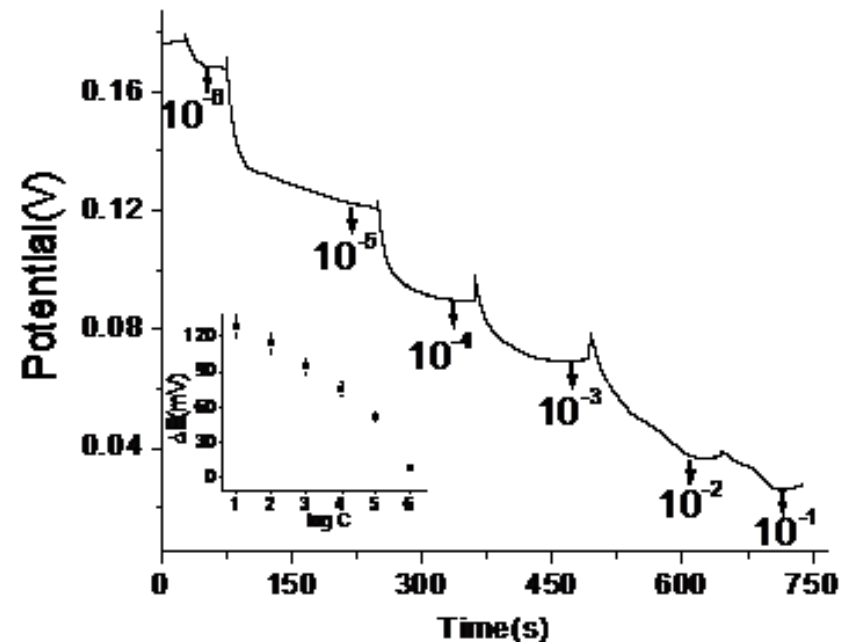
Enzymatické biosenzory

☑ Biosenzor pro močovinu (potenciometrický)

- využívá iontově selektivní elektrodu citlivou na amoniak
- elektroda je modifikovaná gelem obsahujícím ureázu



ureáza



☑ Další enzymatické biosenzory

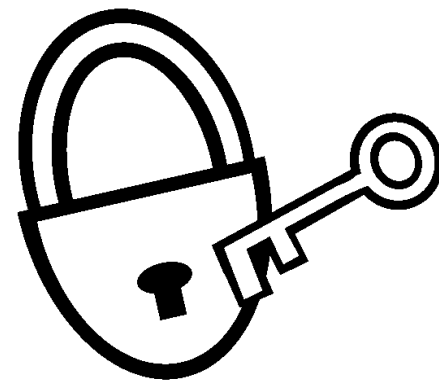
- cholestreol (cholesterol oxidáza + cholesterol esteráza)
- laktát (NADH dependentní laktátdehydrogenáza)
- penicilin, kyselina močová ...

Afinitní biosenzory

- ☑ Založené na selektivním vázání analytu do struktury biomolekuly
- ☑ Měření elektrický signál způsobený vznikem interakce či vazby
- ☑ Vysoce citlivé a selektivní

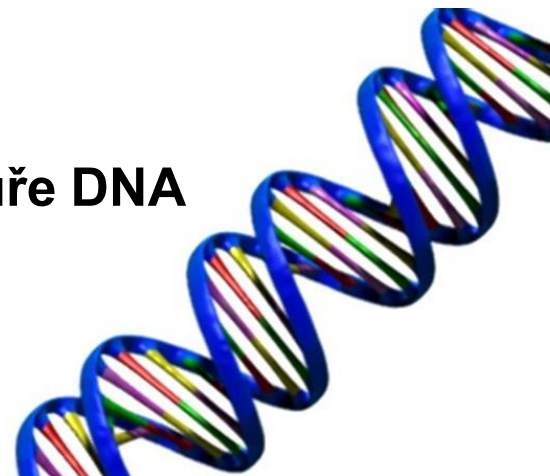
☑ Imunobiosenzory

- založené na imunologických reakcích
- identifikace a stanovení např. proteinů, toxických látek, patogenních bakterií

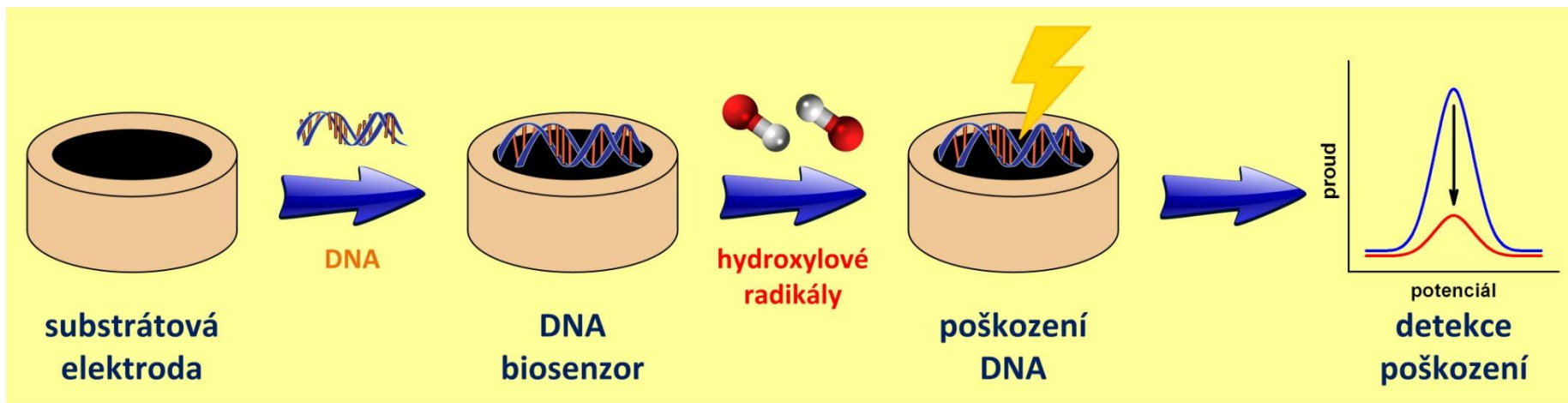
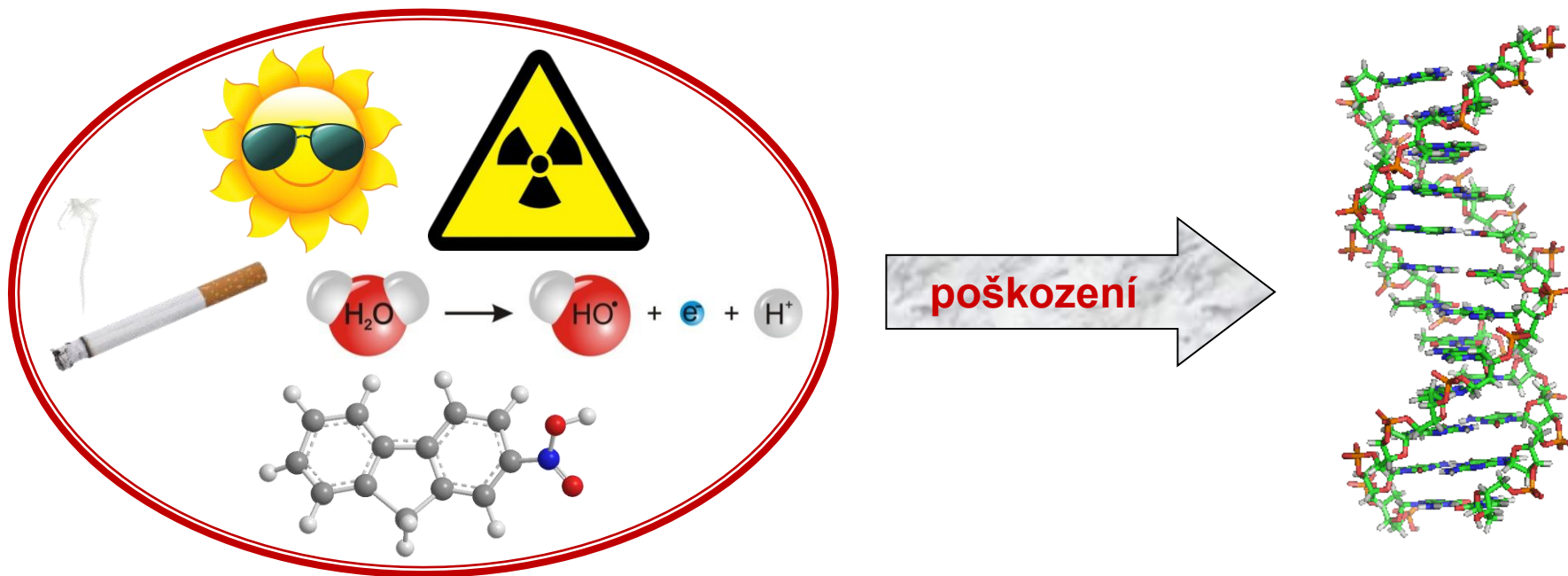


☑ DNA biosenzory

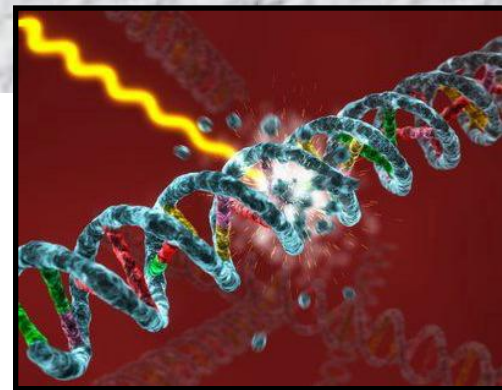
- získání informací o sekvenci DNA
- elektrochemická odezva silně závisí na struktuře DNA
- chemická diagnóza infekčních chorob
- environmentální monitoring, detekce léčiv, a karcinogenů, kriminalistická vyšetřování



Výzkum a detekce poškození DNA



Poškození DNA



☑ Mírné strukturální změny

- asociační interakce s cizorodými látkami

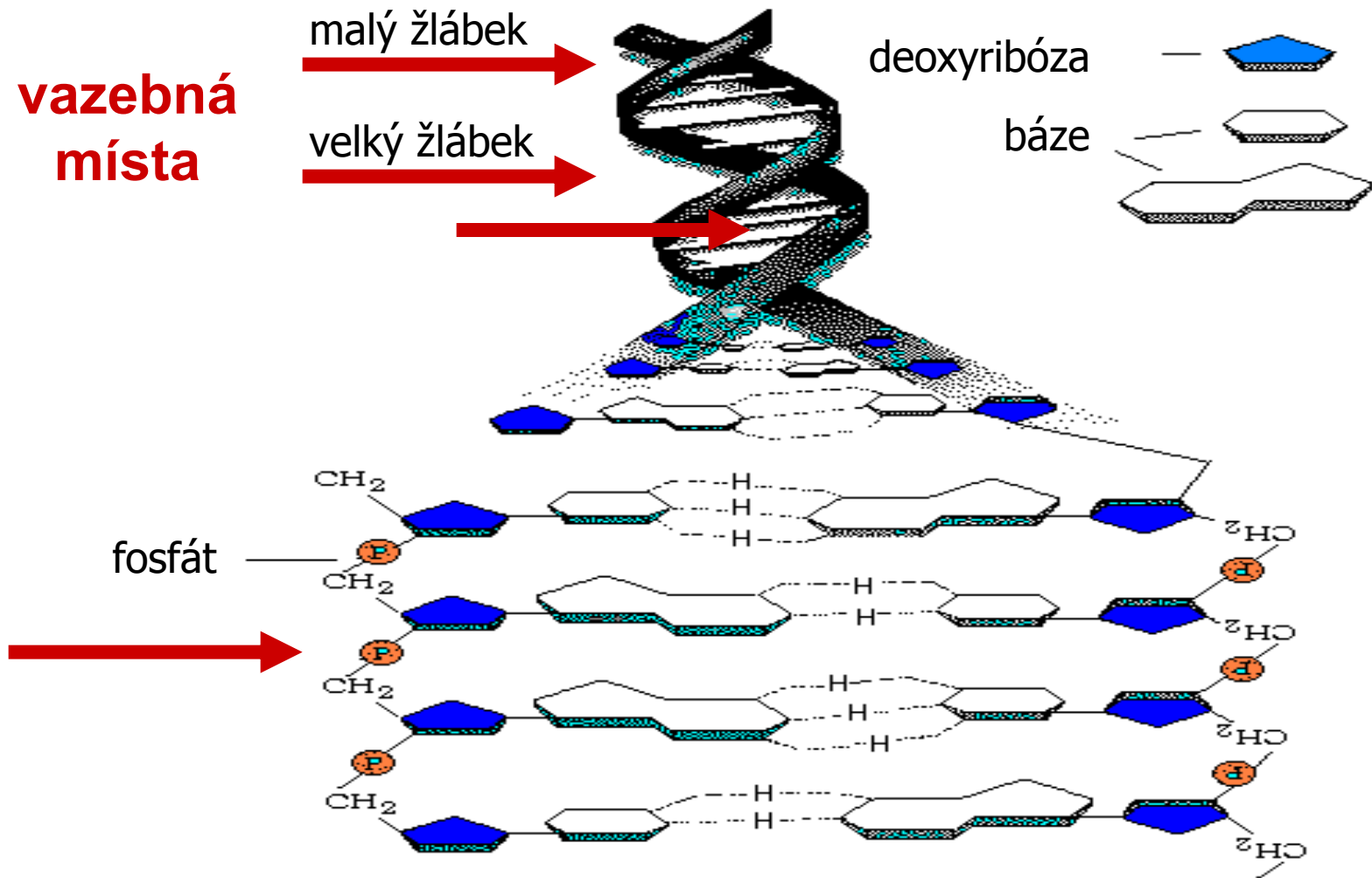
☑ Silná degradace (vznik zlomů vláken)

- reaktivní formy kyslíku (např. $\text{OH}^\bullet$) či dusíku (např. $\text{Ar}-\text{NO}_2^{\bullet-}$)
- UV záření, ionizující záření
- nukleázy

☑ Komplexní elektrochemická detekce poškození DNA

- detekce kombinující více elektrochemických technik a přístupů
- detailní výzkum interakcí mezi cizorodými látkami a DNA
- hledání vztahů a korelací mezi poznatky *in vitro* a *in vivo*
- vývoj DNA biosenzorů a postupů pro plošné testy genotoxicity

Asociační interakce s hostujícími molekulami



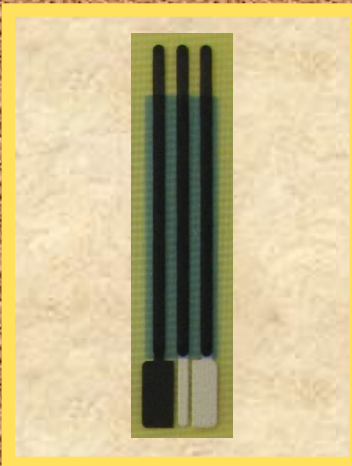
Netradiční elektrodové materiály



stříbrné amalgamové elektrody



uhlíkové pastové elektrody



sítotiskové elektrody



borem dopované diamantové elektrody

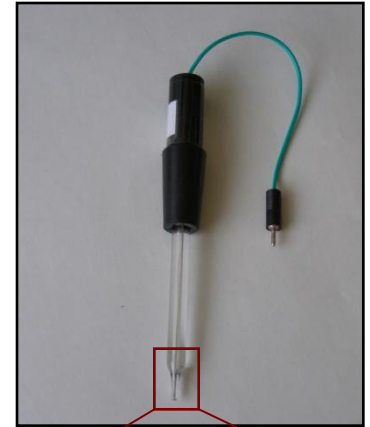
Rtuťové a amalgamové elektrody

☑ Možnosti

- použití pro katodické (redukční) potenciály
- rychlá modifikace kovového povrchu
- oxidovatelné analyty neruší
- generace radikálů s krátkou dobou života

☑ Poskytované informace

- vyhodnocení interakce analyt–DNA
- odlišení jedno- a dvouvláknové DNA
- detekce zlomů vláken
- sledování oxidačního stresu

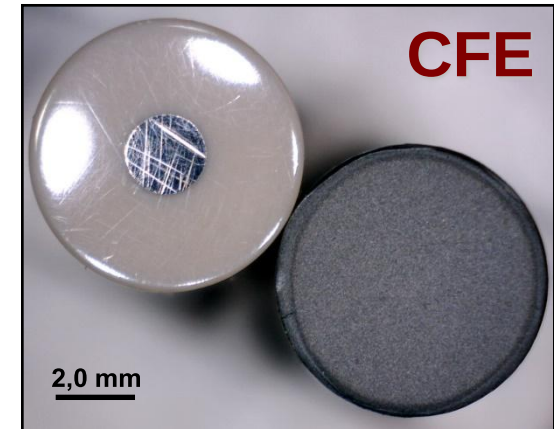


m-AgSAE

Jednorázové uhlíkové elektrody

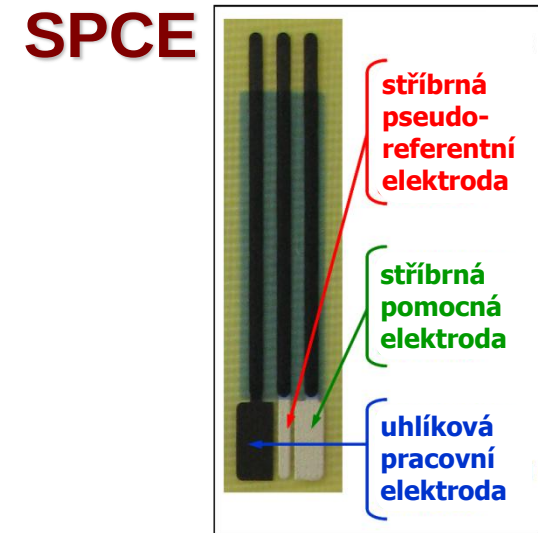
☑ Možnosti

- použití pro anodické (oxidační) potenciály
- trvalá modifikace vrstvou DNA
- detekce guanosinových, adenosinových a 8-oxoguanosinových odezev



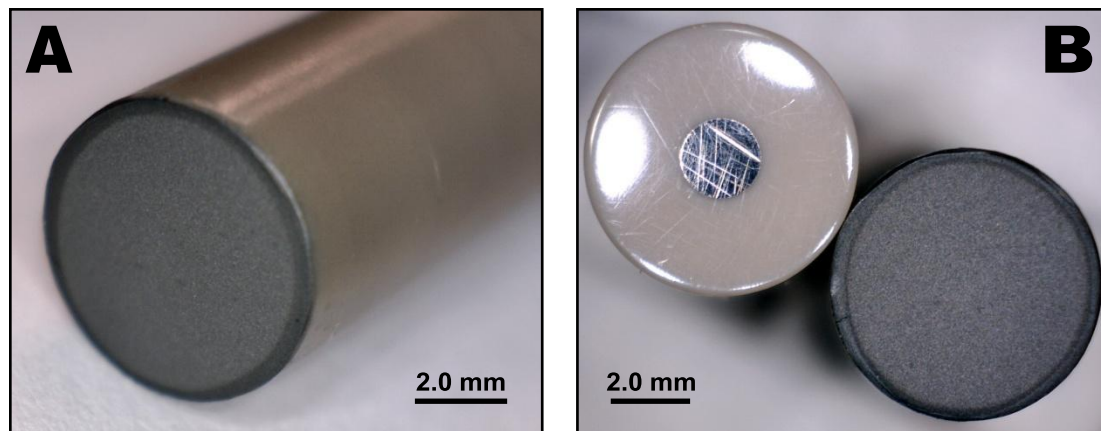
☑ Poskytované informace

- detekce rozpojení dvouvláknové DNA
- detekce zlomů vláken
- sledování oxidačního stresu a antioxidačních vlastností



Jednorázové uhlíkové elektrody

Velkoplošná uhlíková filmová elektroda (Is-CFE)



Složení uhlíkového filmu:

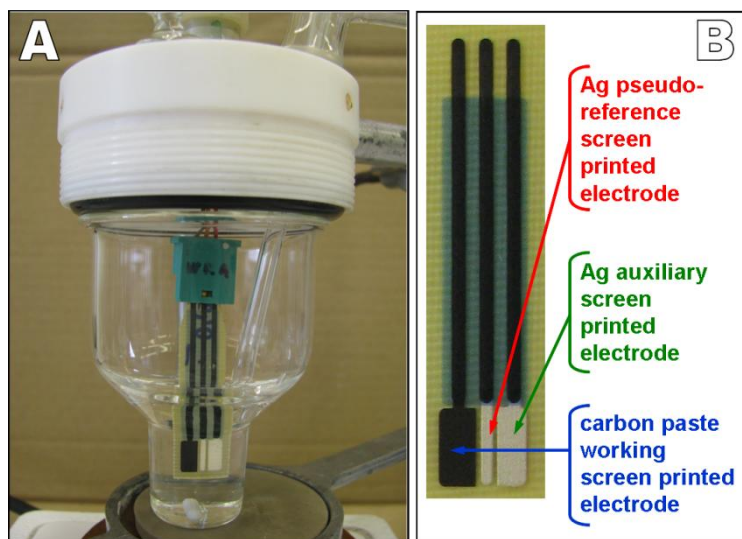
- mikromletý přírodní grafit – 90 wt%,
- polystyren – 10 wt%.

Podklad elektrody:

- platinový disk (Ø 7,0 mm),
- PEEK (polyether ether keton),
- Metrohm, Švýcarsko (6.1204.310).

Jednoduše obnovitelný povrch

Sítotisková uhlíková pastová elektroda (SPCPE)



Složení uhlíkové pasty:

- tuhá grafitová pasta – 95 wt%,
- organické pojivo – 5 wt%.

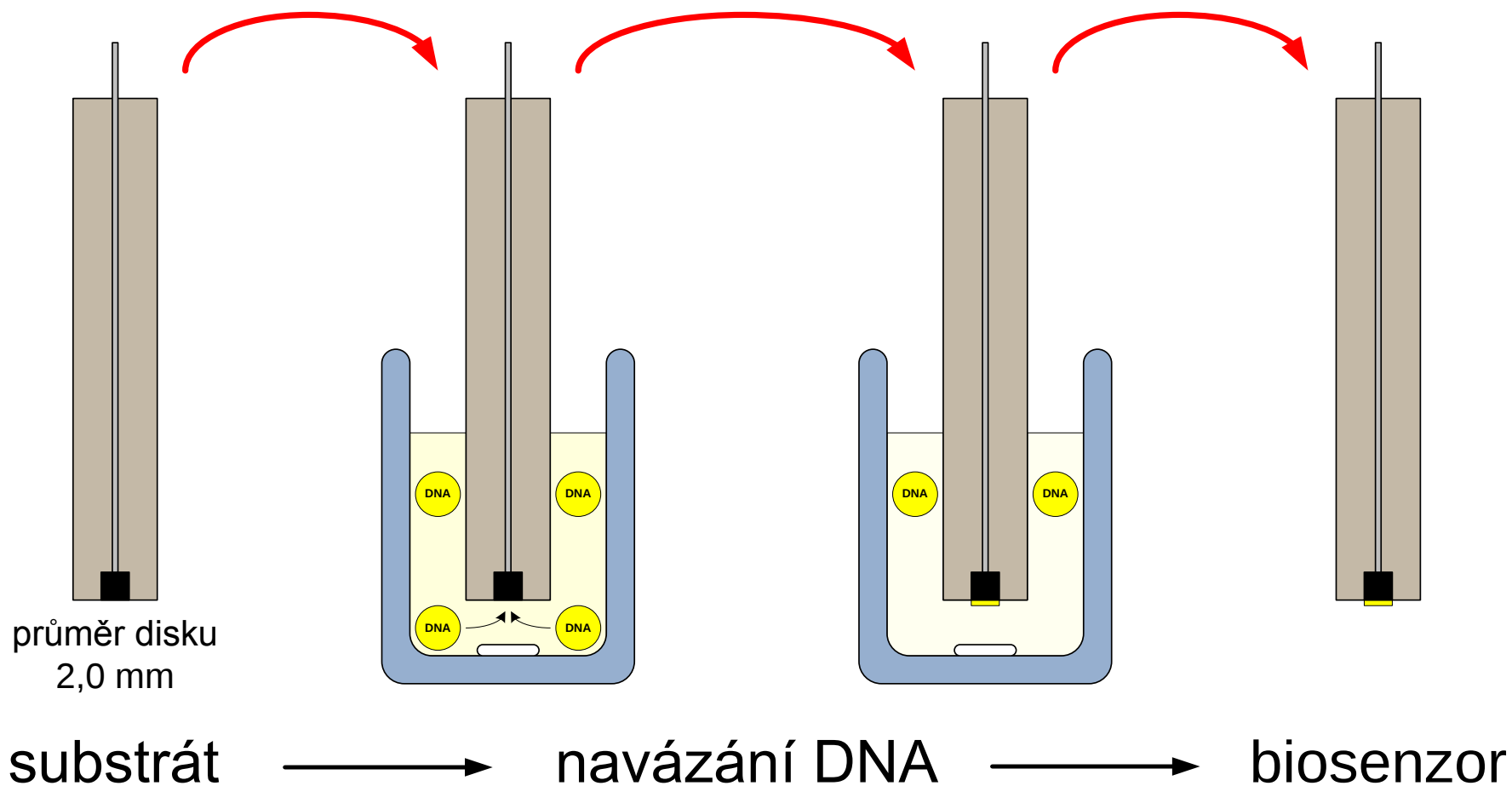
Podklad elektrody:

- plastová litografická matrice,
- Výzkumný ústav potravinářský, Slovensko

Jednorázový 3-elektrodivý systém

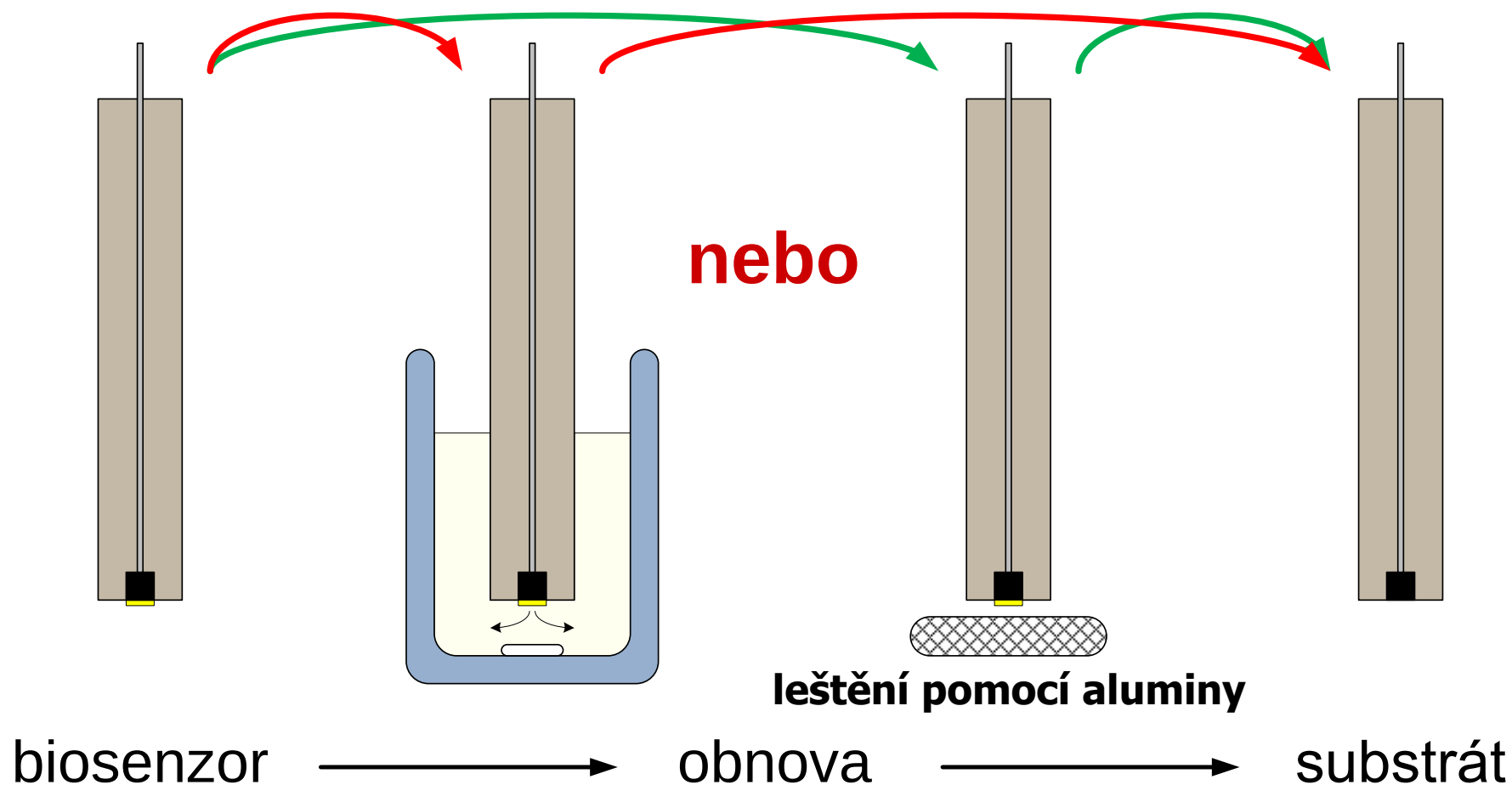
Příprava DNA biosenzoru

akumulační potenciál **+0,5 V** doba akumulace **1 min** • **míchání**
0,1 mg ml⁻¹ DNA v 0,1 mol l⁻¹ fosforečnanovém pufru o pH 7,0

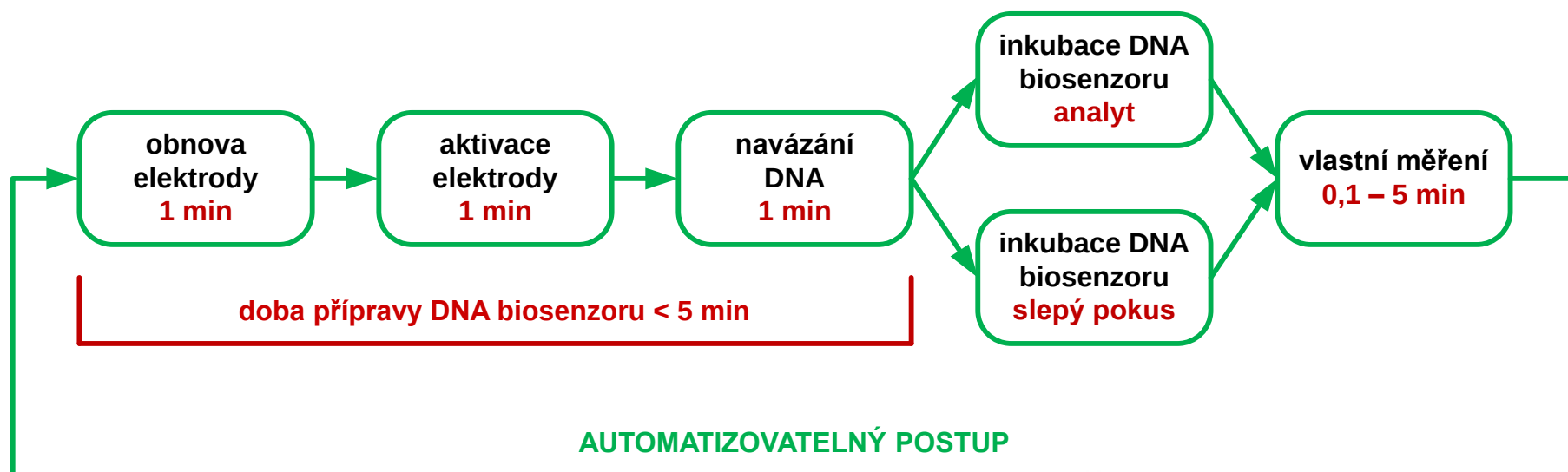


Obnova povrchu pracovní elektrody

čistící potenciál **$-0,5\text{ V}$** doba čištění **1 min** • **míchání**
v $0,1\text{ mol l}^{-1}$ fosforečnanovém pufru o pH 7,0



Rychlost procesu analýzy



Možnost automatizace měření:

- např. pomocí **programovatelné robotické paže**
- postupná kroková měření v mikrotitrační destičce
- potřeba **kompaktního tříelektrodevého systému**
- při obnově povrchu elektrody není třeba leštění

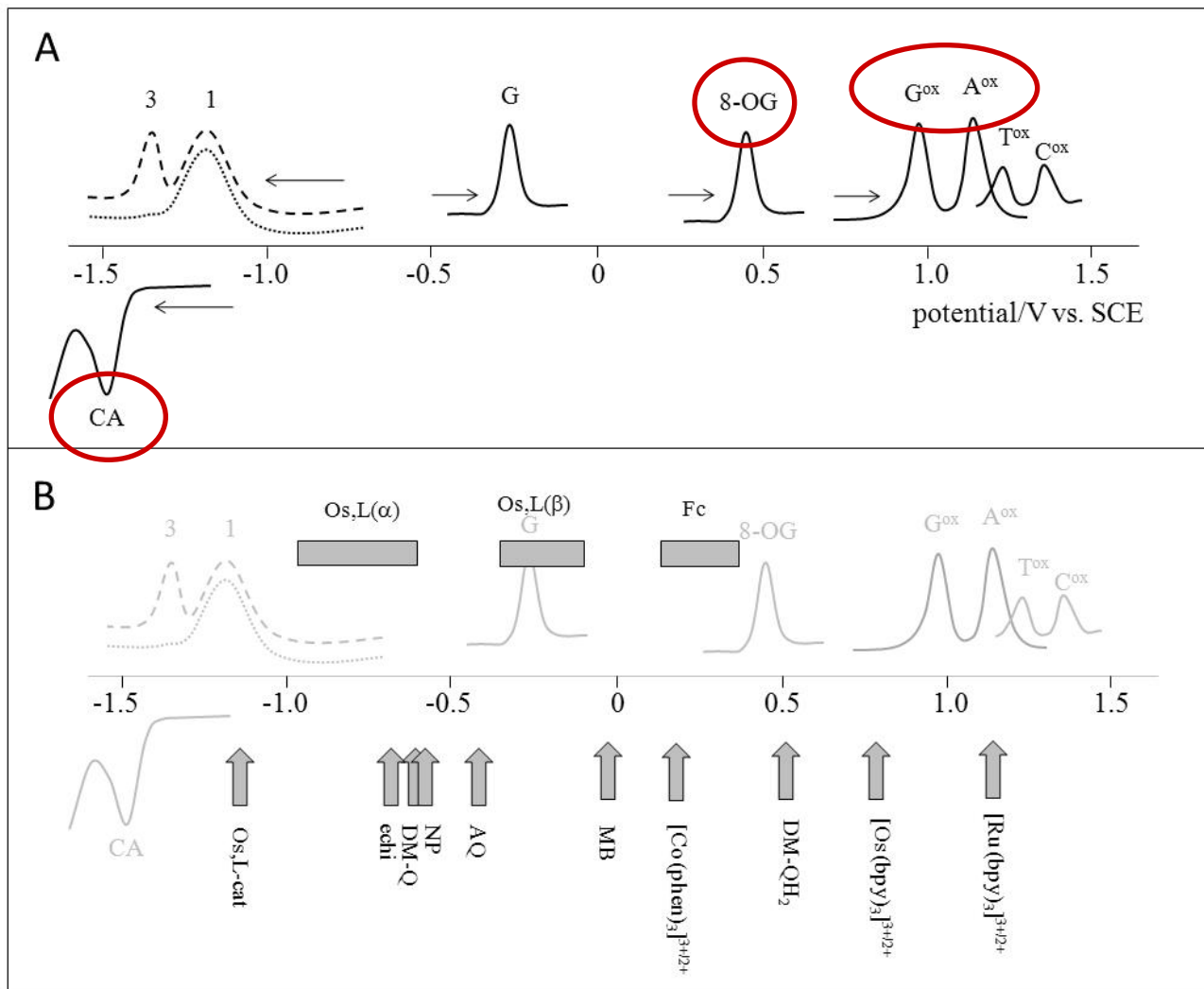


Detekce poškození DNA

☑ Způsoby detekce využívané u elektrických / elektrochemických DNA biosenzorů

- vlastní signály DNA – elektroaktivita bází (guanin a adenin)
- zprostředkování přenosu náboje při oxidaci guaninu redoxním mediátorem (např. komplexy Ru^{III})
- redoxní indikátor v roztoku (jako např. $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- kovalentně vázané redoxní značky DNA
- elektrochemická impedanční spektroskopie elektrodového povrchu modifikovaného DNA (impedimetrický DNA biosenzor)

Elektrochemické odezvy DNA

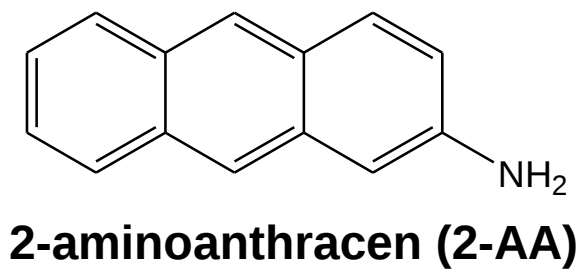
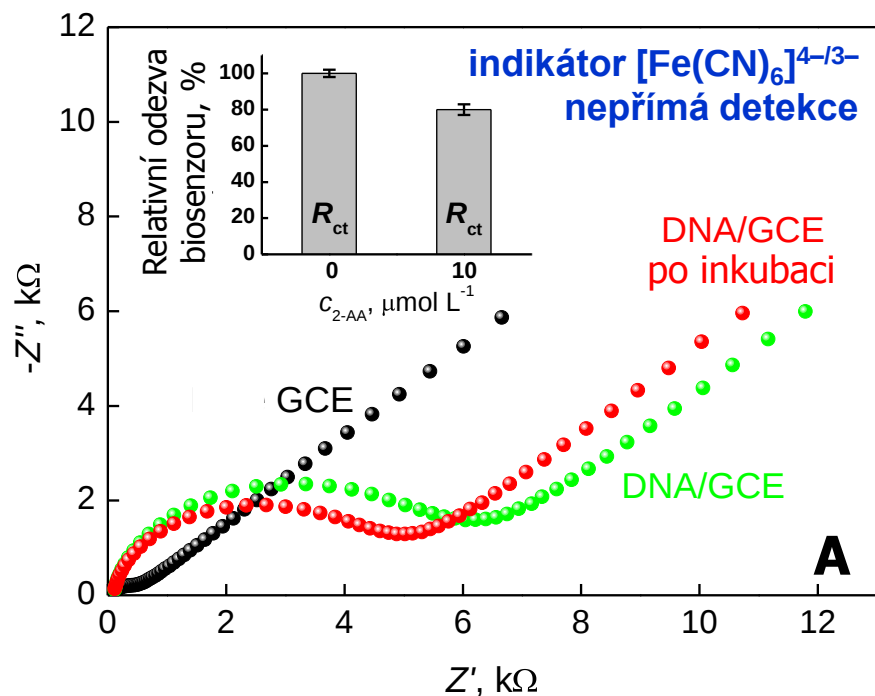


A) Elektrochemické odezvy DNA

B) Redoxní potenciály některých DNA značek a redoxních indikátorů

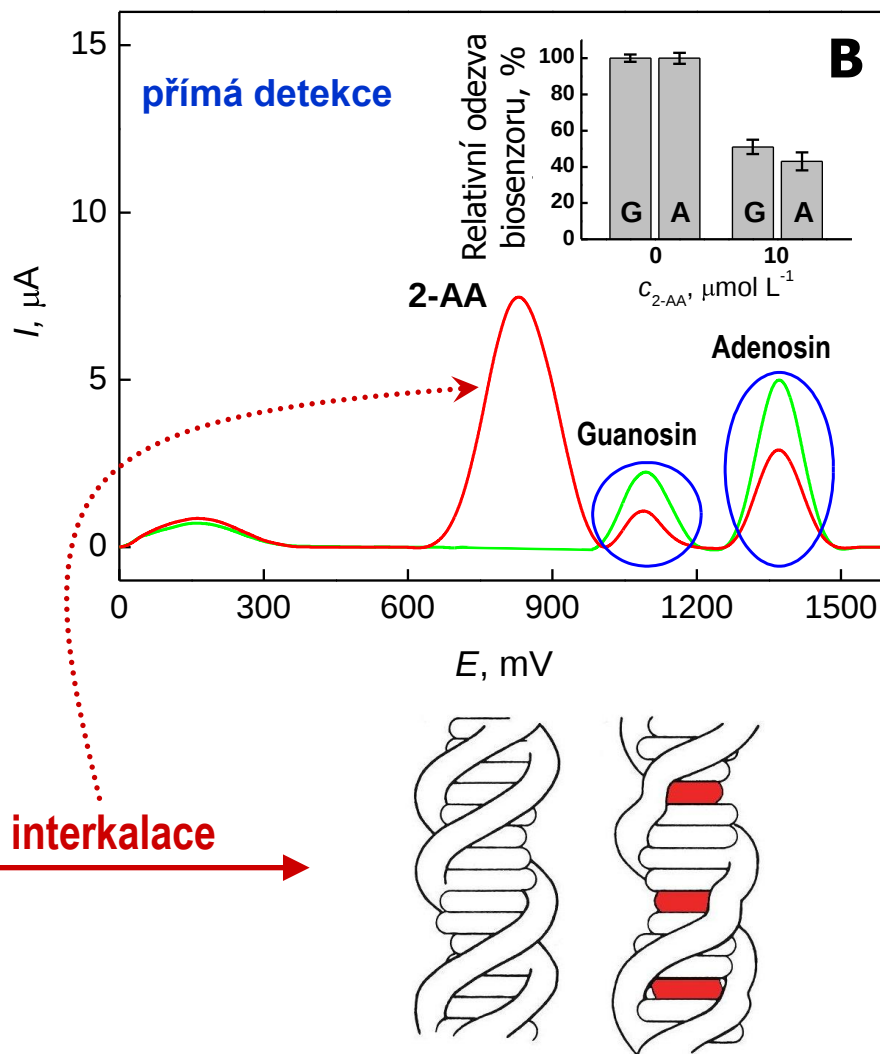
Měření poškození DNA

elektrochemická impedanční spektroskopie

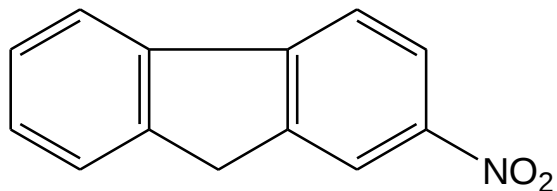


interkalace

square-wave voltametrie



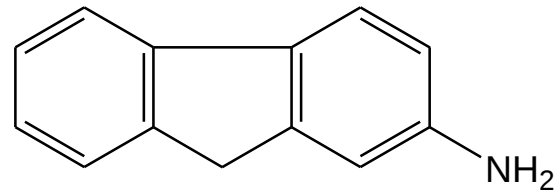
Přehled studovaných látek



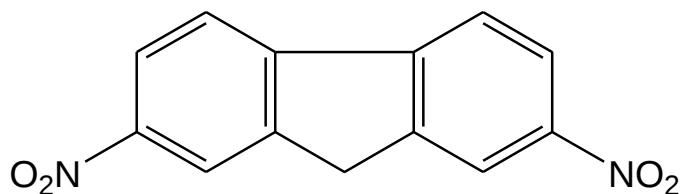
2-nitrofluoren



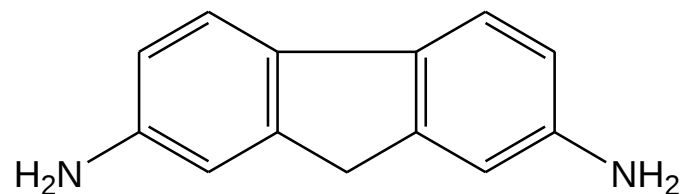
SPCE



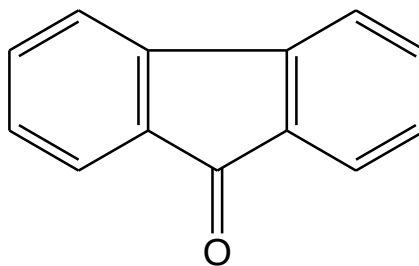
2-aminofluoren



2,7-dinitrofluoren

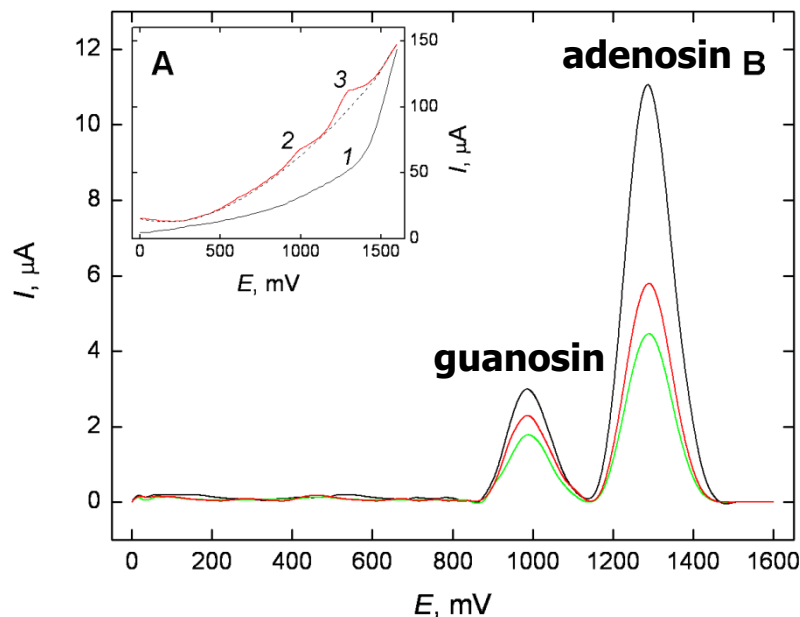


2,7-diaminofluoren

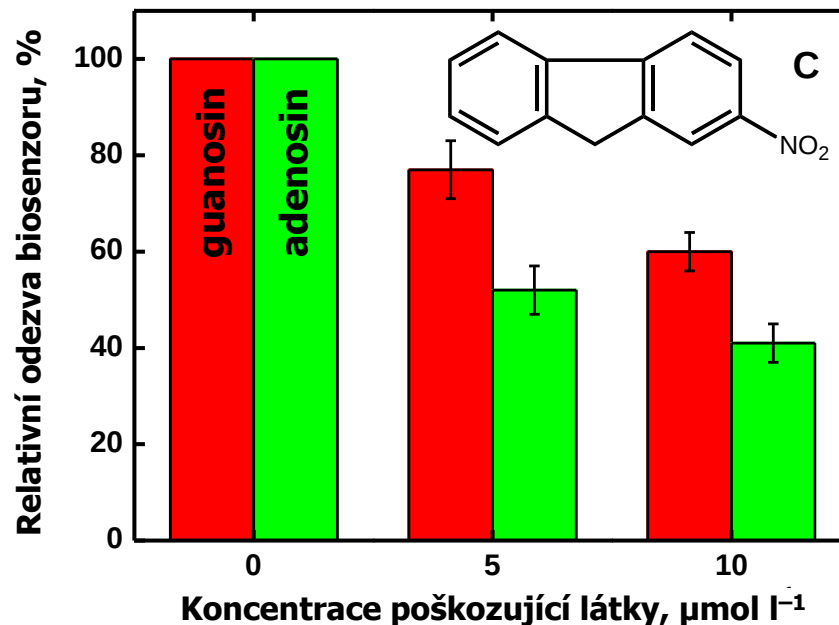


fluoren-9-on

Detekce vzniku zlomů vláken DNA

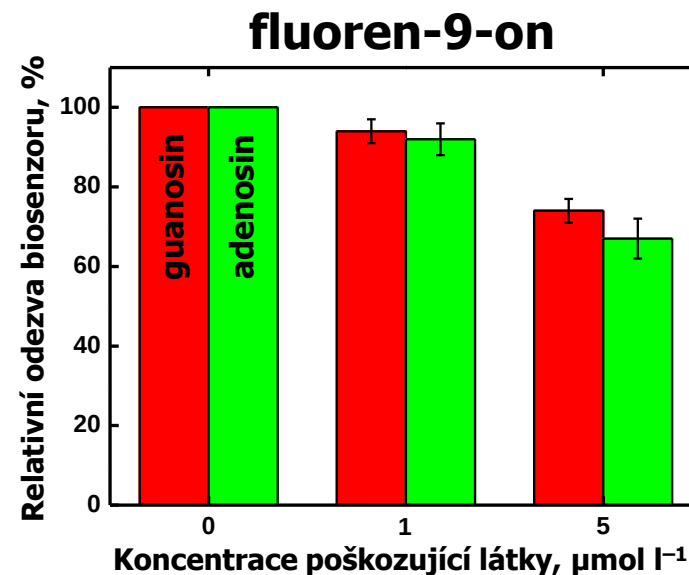
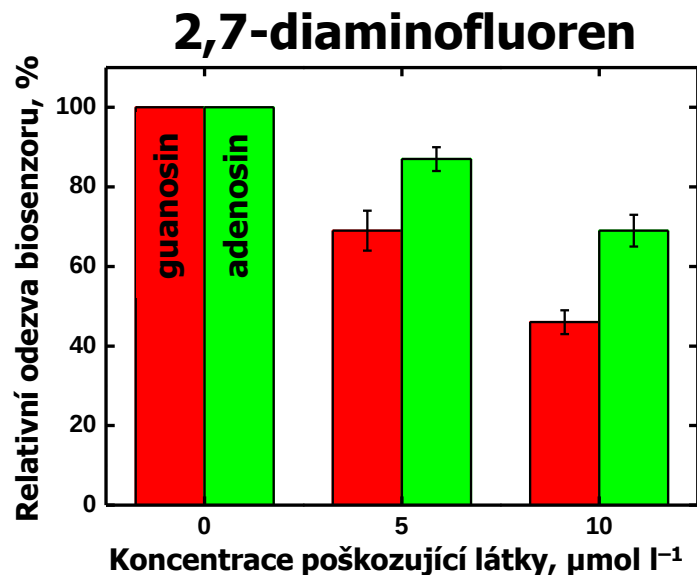
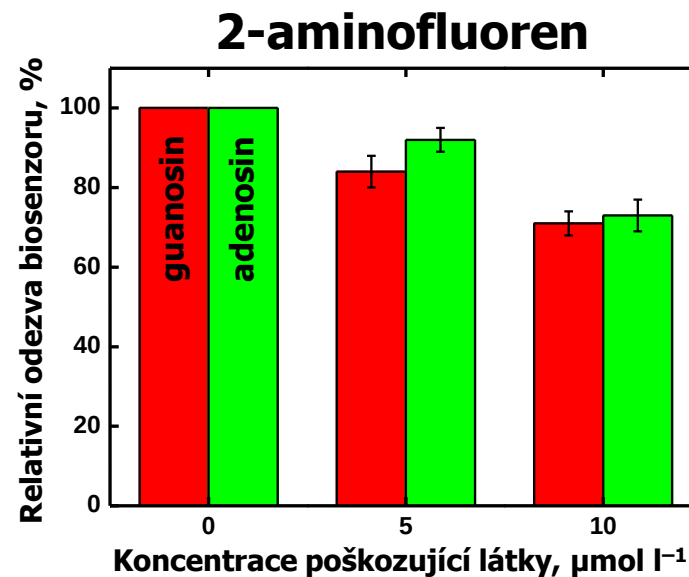
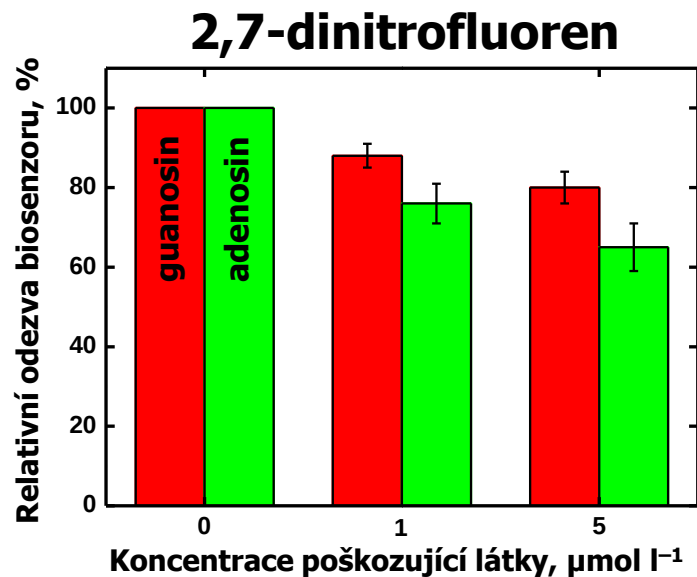


oxidační SWV píky DNA imobilizované na povrchu SPCE; měřeno v AcB při polarizační rychlosti 3 V s^{-1}



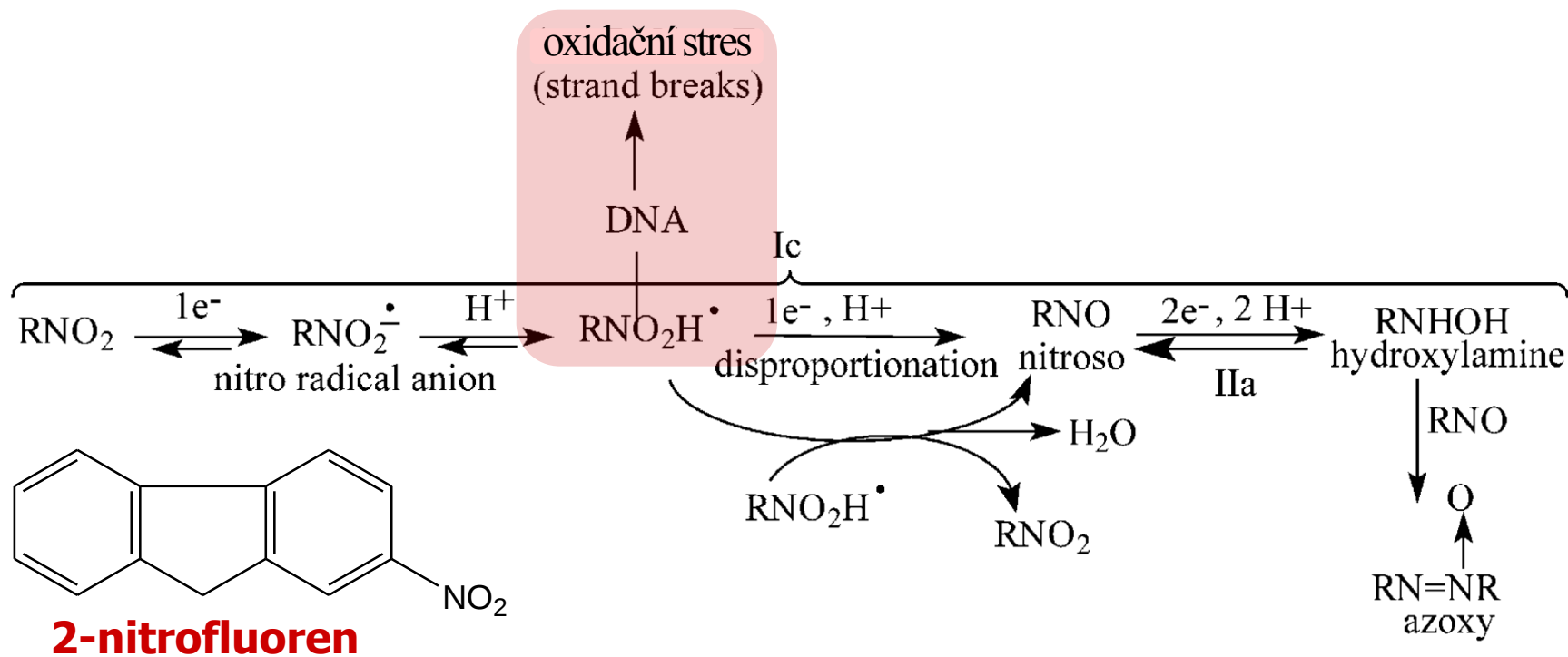
- (A) nemodifikovaná elektroda (**1**), píky guanosinu (**2**) a adenosinu (**3**) přítomných ve struktuře DNA
- (B) záznamy korigované na základní linii; DNA/SPCE inkubovaný 2 min ve směsi AcB – methanol (99:1); koncentrace **2-nitrofluorenu** v inkubačním roztoku (mol l^{-1}): **0** (—), **$5 \cdot 10^{-6}$** (—) a **$1 \cdot 10^{-5}$** (—)
- (C) relativní odezvy biosenzoru na poškození DNA způsobené **2-nitrofluorenem** ($n = 3$)

Detekce vzniku zlomů vláken DNA



Poškození DNA radikály $\text{Ar-NO}_2^{\bullet-}$

Redukce aromatických nitrosloučenin

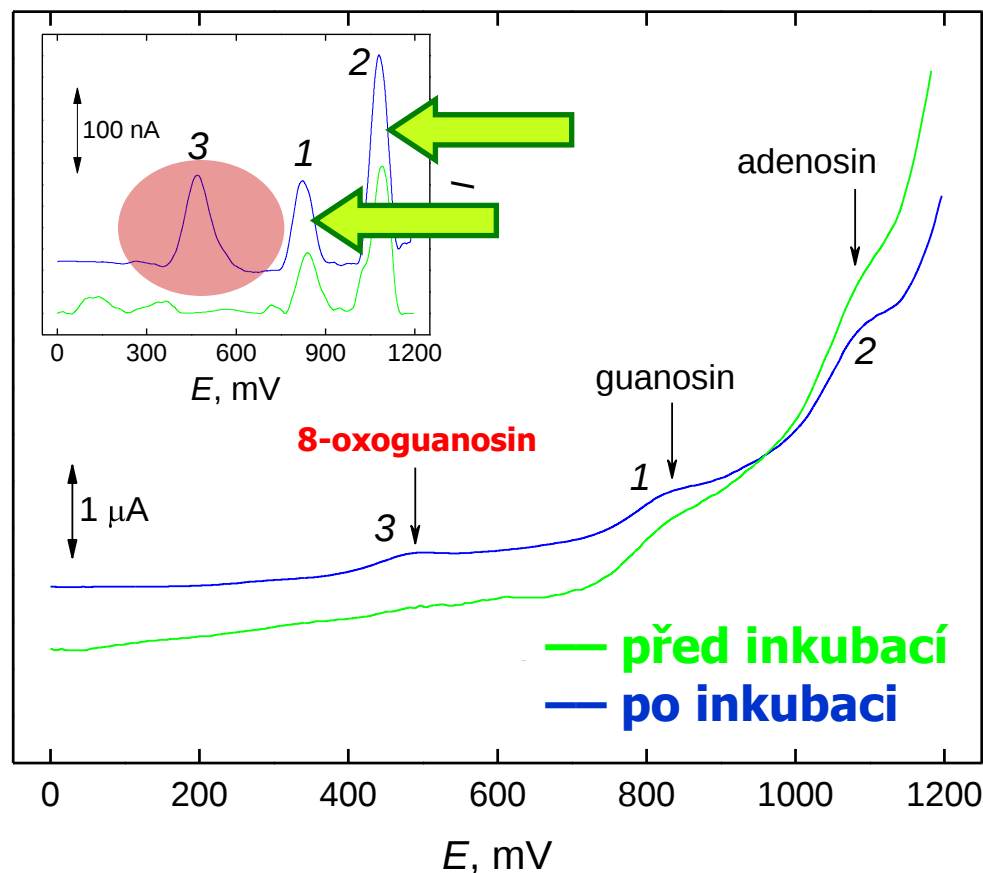


Způsoby elektrochemického generování reaktivních forem dusíku

- (A) postupné katodické/anodické cyklování mezi dvěma zvolenými potenciály
- (B) potenciostatická elektrolýza při zvoleném potenciálu

Detekce poškození DNA radikály $\text{Ar-NO}_2^{\bullet-}$

oxidační SWV píky
DNA imobilizované
na povrchu SPCE



Radikály generované při elektrochemické redukci Ar-NO_2 (oxidativní stres)

- detekce odezvy 8-oxoguanosinu (biomarker oxidativního stresu)
- detekce rozevření dvoušroubovice DNA

Detekce poškození DNA (UV záření a ROS)

Electrochimica Acta 71 (2012) 134–139



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Electrochimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/electacta

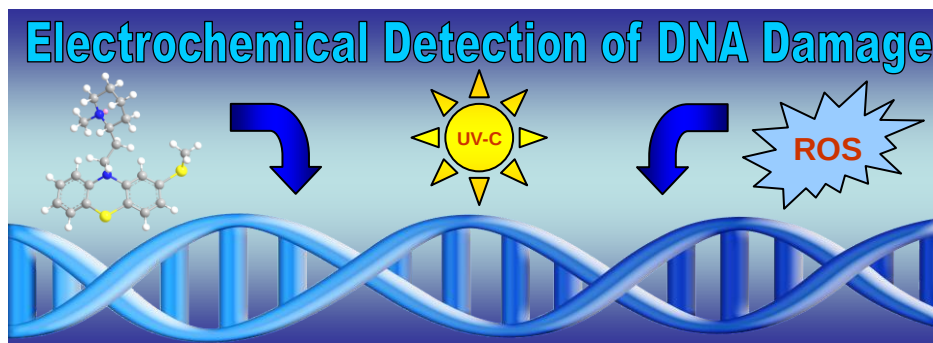


Evaluation of damage to DNA induced by UV-C radiation and chemical agents using electrochemical biosensor based on low molecular weight DNA and screen-printed carbon electrode

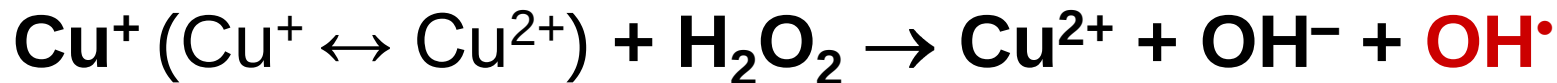
Lenka Hlavata^a, Katarina Benikova^a, Vlastimil Vyskocil^{b,1}, Jan Labuda^{a,*}

^a Slovak University of Technology in Bratislava, Institute of Analytical Chemistry, Radlinskeho 9, 81237 Bratislava, Slovakia

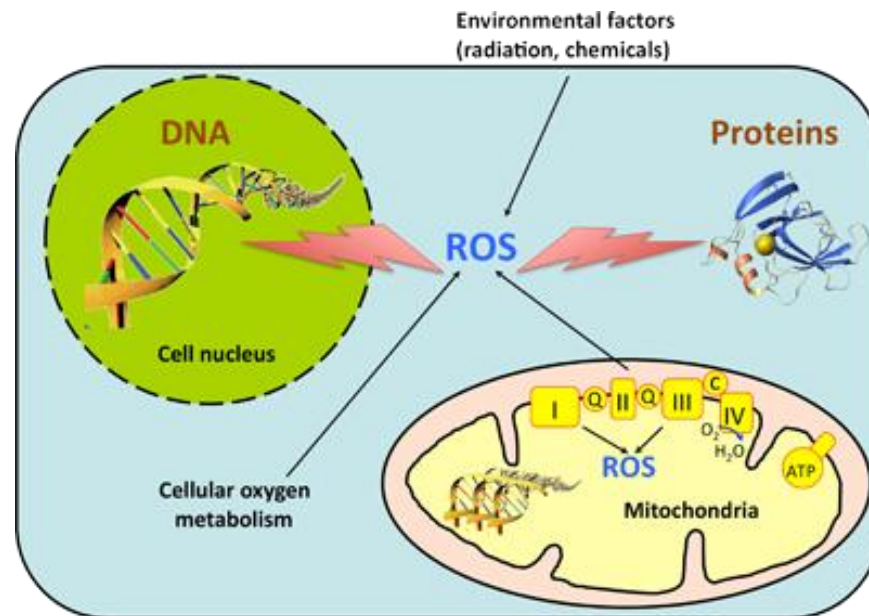
^b Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Hlavova 2030/8, 12843 Prague 2, Czech Republic



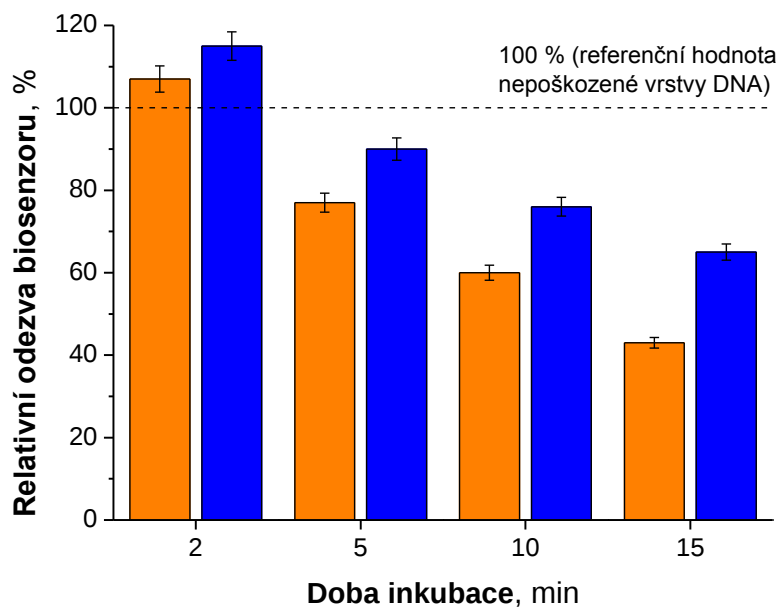
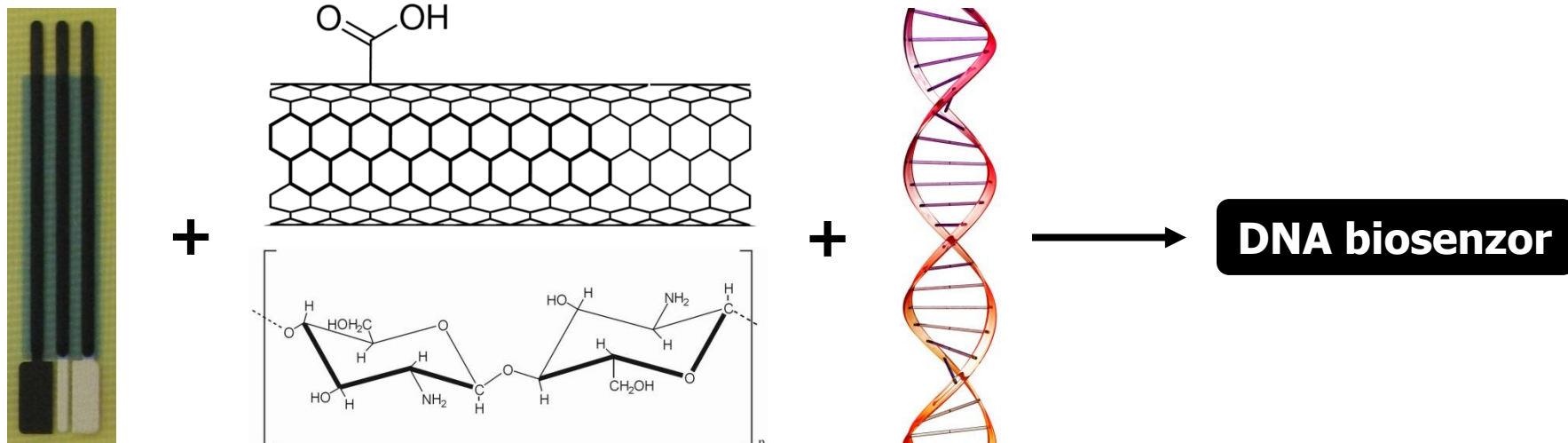
Reakce Fentonova typu



$1 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1} \text{ Cu}^{2+} + 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$
v $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ fosfátovém pufru o pH 7.0



Nanostrukturovaný DNA biosenzor



relativní odezvy biosenzoru na
poškození DNA způsobené
UV-C zářením a
hydroxylovými radikály
zobrazené v závislosti na době
trvání poškozující události ($n = 3$)

Elektrochemické DNA biosenzory

☑ Jako nástroje

- jednoduché, rychlé, levné, miniaturizovatelné, ...
- poskytující celou řadu užitečných informací
- předurčené pro rutinní použití v praxi

☑ Jako užitečné nástroje pro

- prvotní (plošné) testy genotoxicity
- výzkum interakcí nově připravených látek s DNA
(léčiv, proléčiv, složek kosmetiky, složek potravin, ...)

☑ Jako biosenzory budoucnosti

- aplikovatelné *in vivo* pro monitorování biologických dějů
- schopné nahradit některé biologické testy na zvířatech

Závěrečné shrnutí

- **Elektrochemické biosenzory**

- rychlé
- levné
- citlivé
- selektivní
- snadno automatizovatelné
a miniaturizovatelné

- Jejich budoucnost není pouze
v klinické analýze:

- základní výzkum
- biochemická diagnostika
- monitorování environmentálních polutantů





**Děkuji za
pozornost**