

# PŮSOBENÍ GENOTOXICKÉHO 2-NITROFLUORENU A JEHO METABOLITŮ NA DNA *IN VIVO* A SLEDOVÁNÍ TOHOTO PŮSOBENÍ POMOCÍ ELEKTROCHEMICKÝCH DNA BIOSENZORŮ *IN VITRO*

ŠTĚPÁNKA SKALOVÁ<sup>a,b</sup>, KLÁRA STÁVKOVÁ<sup>a</sup>,  
ANDREA HÁJKOVÁ<sup>a</sup>, JIŘÍ BAREK<sup>a</sup>,  
JAN FISCHER<sup>a</sup>, JOSEPH WANG<sup>c</sup>  
a VLASTIMIL VYSKOČIL<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie, UNESCO laboratoř elektrochemie životního prostředí, Hlavova 8, 128 43 Praha 2, <sup>b</sup> Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, <sup>c</sup> Department of Nanoengineering, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, 92093-0448 La Jolla, CA, USA  
vlastimil.vyskocil@natur.cuni.cz

Došlo 9.12.15, přijato 30.6.16.

Klíčová slova: nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky, 2-nitrofluoren, DNA adukty, detekce poškození DNA, DNA biosenzory, uhlíkové elektrody, rtuťové elektrody

## Obsah

1. Úvod
2. Metabolismus 2-nitrofluorenu
3. Genotoxické účinky 2-nitrofluorenu
4. Elektrochemické DNA biosenzory a jejich využití při studiu interakce 2-nitrofluorenu a jeho metabolitů s DNA
  - 4.1. DNA biosenzory s převodníkem signálu na bázi uhlíku
  - 4.2. DNA biosenzory s převodníkem signálu na bázi rtuti
5. Závěr

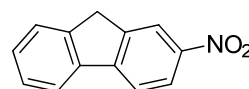
## 1. Úvod

Nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky (NPAH) patří mezi velmi rozšířené polutanty životního prostředí vznikající nedokonalým spalováním organických sloučenin, zejména fosilních paliv<sup>1</sup>. V ovzduší se běžně vyskytují v koncentracích desetin až stovek ng m<sup>-3</sup> a jejich množství je výrazně ovlivněno ročním obdobím. V letních měsících dochází k uvolnění těkavějších NPAH do plynné fáze ovzduší, zatímco v chladnějších měsících NPAH v ovzduší kondenzují na povrchu tuhých částic. Atmosférickým spadem se potom dostávají do vody a půdy<sup>2</sup>.

Jelikož jsou NPAH velmi dobře rozpustné v lipidech, jsou schopny se snadno vstřebávat do organismu savců, a to zejména z plic, tenkého střeva a kůže<sup>3</sup>. Jednotlivé NPAH se mezi sebou liší svými mutagenními a karcinogenními účinky. To je pravděpodobně dáno strukturální orientací nitroskupiny (snadněji redukovatelná nitroskupina vykazuje vyšší mutagenitu) nebo interakcí nitroskupiny s  $\pi$ -elektronovým systémem kondenzovaných aromatických kruhů (mutagenita je přímo úměrná síle interakce)<sup>4</sup>.

Jako modelový NPAH bývá v mnoha toxikologických studiích využit 2-nitrofluoren (2-NF; obr. 1), který je spolu s 1-nitropyrenem a 3-nitrofluoranthenem jedním z hlavních markerů výskytu NPAH (cit.<sup>4,5</sup>). Koncentrace 2-NF byly v České republice monitorovány v červenci roku 2000 pomocí selektivních vzorkovačů organických polutantů<sup>4</sup> (trubice z polyethylenu naplněná 1 ml trioleinu): organické látky z okolí prostupují semipermeabilní membránou a koncentrují se v trioleinu. Nejvyšší množství 2-NF (2,19 ng na 1 g trioleinu) bylo naměřeno v Teplicích. V Ostravě byla naměřena koncentrace 1,34 ng g<sup>-1</sup>, v Prachaticích 1,22 ng g<sup>-1</sup> a ve Strnojedech 0,27 ng g<sup>-1</sup>. V ostatních sledovaných městech (Valašské Meziříčí, Příhonice, Olomouc a Staňkov) nebylo zjištěno detekovatelné množství 2-NF. Při rozboru rakouských potravin byly nejvyšší koncentrace 2-NF zjištěny v uzených klobásách (19,6 ng g<sup>-1</sup>), v uzeném mase (2,0 ng g<sup>-1</sup>), v grilovaném mase (1,0 ng g<sup>-1</sup>) a v alpských sýrech (1,1 ng g<sup>-1</sup>)<sup>4</sup>.

Předkládaný přehledový referát shrnuje dosavadní poznatky o negativních účincích tohoto xenobiotika na živé organismy, především pak na jejich DNA. Tyto poznatky ze studií prováděných způsobem *in vivo* jsou v referátu dále porovnány s informacemi získanými pomocí elektrochemických DNA biosenzorů, které představují velmi slibnou *in vitro* alternativu pro studium dějů probíhajících v živých organismech při interakci jejich DNA s různými cizorodými látkami.



Obr. 1. Strukturální vzorec 2-nitrofluorenu

## 2. Metabolismus 2-nitrofluorenu

Do organismu člověka může 2-NF vstupovat dvěma cestami. První cesta je přímá inhalace vzduchu s tuhými částicemi, na jejichž povrchu je 2-NF adsorbovaný (orální

cesta). Větší částice se postupně uvolňují do trávicí soustavy z horních částí dýchacích cest a pomocí řasinkového epitelu z plic, kde byly předtím uloženy<sup>5</sup>. Toto uvolňování probíhá velmi pomalu, a proto jsou tuhé částice dlouhý čas uchovávány v dýchacím traktu<sup>6</sup>.

Druhá cesta je spojena s výskytem těchto částic v potravinách – v kontaminovaných zemědělských produktech a v rybách žijících ve znečištěných vodách<sup>7</sup>. 2-NF se vstřebává z gastrointestinálního traktu velice snadno, a to díky přítomnosti různých lipidů. Absorpce je pak následně usnadněna přítomností žlučových kyselin v lumenu tenkého střeva<sup>8</sup>.

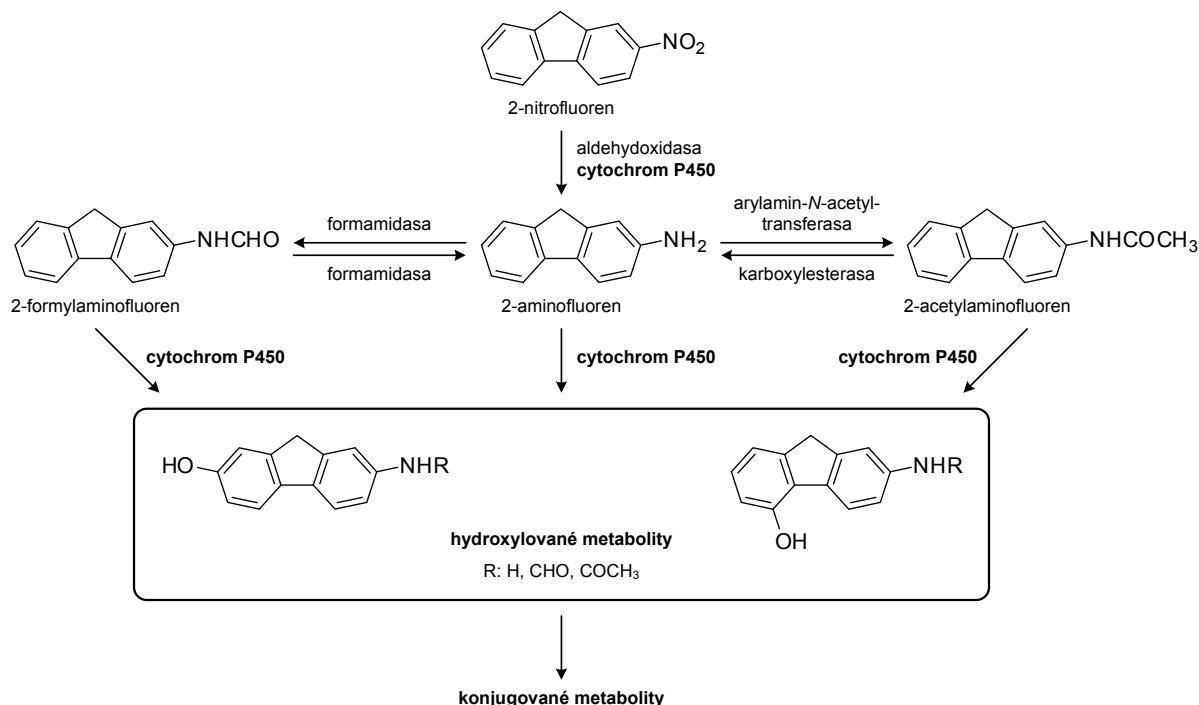
Metabolismus 2-NF (obr. 2), který proniká do těla orální cestou, byl zkoumán na krysách a psech. Jeho prvním krokem je redukce střevní mikroflórou na 2-aminofluoren (2-AF). 2-AF dále podléhá acetylaci za vzniku 2-acetylaminofluorenu (2-AAF). Byl popsán i další metabolit, a tím byl 2-formylaminofluoren (2-FAF), který vzniká formylací 2-AF v játrech<sup>9</sup>. Následně může docházet k hydroxylaci za vzniku hydroxylovaných derivátů 2-NF, 2-AAF a 2-FAF, které jsou vzhledem ke své polaritě vylučovány ledvinami a trávicí soustavou především jako konjugáty glukuronové kyseliny nebo kyseliny sírové<sup>9,10</sup>.

Metabolity 2-NF se vyskytují jak v moči, tak ve stolici a vykazují přímé mutagení účinky. Největší podíl na mutagenitě moči mají volné formy hydroxylovaného 2-NF

a 2-AAF. Pokud je hydroxylovaný 2-AAF z těla vylučován v konjugované formě, nevykazuje mutagení aktivitu<sup>5,11,12</sup>.

Působení 2-NF po jeho inhalaci bylo studováno na izolovaných prokrvených plicích<sup>14</sup>, ve kterých byl metabolizován za vzniku hydroxylovaného 2-NF (OH-2-NF) nebo byl v nezměněné podobě transportován do jater, ve kterých byl hydroxylován a vyloučen žlučí. V tračníku byl OH-2-NF uvolněn přítomnou  $\beta$ -glukuronidasou, a tím se mohly jeho genotoxické účinky projevit v tlustém střevě<sup>5</sup>. Volný OH-2-NF může být zpětně vstřebán ze střeva do krve a vyloučen ledvinami, nebo se může účastnit enterohepatálního cyklu, konjugovat se v játrech a opět být vyloučen žlučí<sup>14,15</sup>.

Dále byly prokázány schopnosti některých látek ovlivňovat metabolismus 2-NF. Např.  $\beta$ -naftoflavon zvyšuje aktivitu cytochromů P450c a P450d. Ta může být také vyvolána nadprůměrně znečištěným vzduchem či látkami z cigaretového kouře. Může tak vznikat více mutagenních sloučenin, pokud člověk inhaluje 2-NF (cit.<sup>12</sup>). Když byla krysám podána antibiotika, výrazně pokleslo vylučování 2-AF, 2-AAF i 2-FAF a jejich hydroxylovaných derivátů v moči. Naopak se zvýšilo množství vyloučeného OH-2-NF a 2-NF. Z toho vyplývá, že střevní bakterie hrají důležitou roli v reduktivním metabolismu 2-NF (cit.<sup>9</sup>).



Obr. 2. Obecné schéma metabolismu 2-nitrofluorenu po podání orální cestou (cit.<sup>13</sup>)

### 3. Genotoxické účinky 2-nitrofluorenu

2-NF je potenciálním karcinogenem – jeho metabolity indukují tvorbu nádorů v mnoha orgánech, např. v játrech, žaludku, tlustém střevě, ledvinách, plicích, mléčných žlázách, podkoží, hypofýze, ušních kanálech, nadledvinách a slinných žlázách<sup>5,16</sup>. Byly také prokázány nežádoucí účinky 2-NF spojené s jeho orálním podáním ve vysokých dávkách. Podání takovýchto dávek mělo za následek aplastické anémie, pancytopenie, výrazné snížení leukocytů periferní krve a těžký útlum kostní dřeně s téměř úplným zničením pluripotentních hematopoetických kmenových buněk<sup>17</sup>.

Škodlivý účinek 2-NF je spojen s interakcí jeho metabolitů (2-NF je v prostředí střevní mikroflóry redukován na 2-AF a dále transformován acylací na 2-AAF (obr. 2); i když je dominantním místem nitroredukce trávicí soustava, může probíhat i v jiných orgánech, např. v játrech) s DNA a tvorbou odpovídajících kovalentních aduktů. Obecně platí, že se DNA adukty mezi sebou liší svými vlastnostmi, např. obtížností opravy jimi poškozené DNA a jejich chemickou stálostí. Neexistuje jednoduchý vztah mezi odolností DNA aduktů a tvorbou nádorů, které způsobují. Předpokládá se, že odolné DNA adukty představují jakési „spící“ poruchy, které se mohou po svém vzniku (interakce DNA s karcinogenem) dlouhodobě zakonzervovat jako mutace a mohou časem přispívat k maligní transformaci buněk a nekontrolovanému buněčnému dělení<sup>18</sup>.

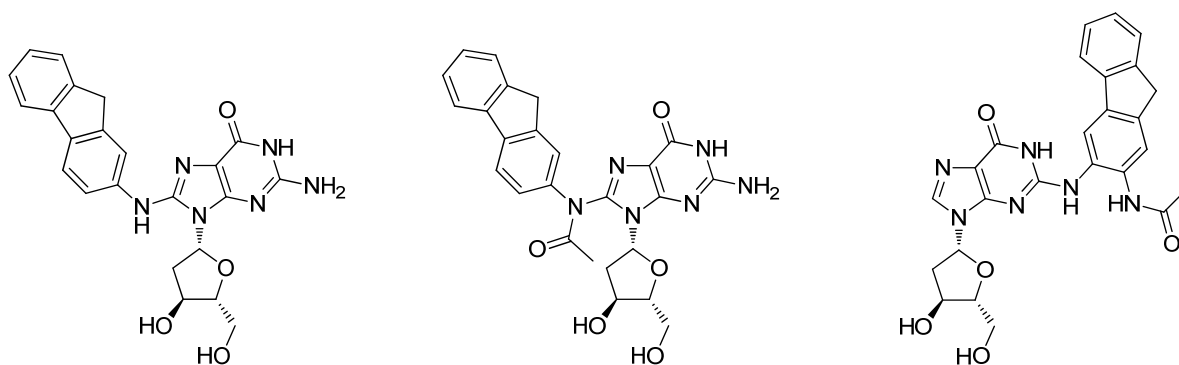
2-NF (resp. jeho primární metabolit 2-AF) i 2-AAF mají stejný reakční cíl ve struktuře DNA, a tím je deoxyguanosin. Po podání 2-AAF se tvoří DNA adukty s větší frekvencí než po dávce 2-NF. Největší množství DNA aduktů bylo nalezeno v játrech, a to jak po podání 2-NF, tak i 2-AAF, ale byly také objeveny v plicích, ledvinách a srdci<sup>19</sup>. Na krysách bylo zjištěno, že 2-NF vyvolává nádory v krátké době po podání dávky nejen v náchylných

orgánech, jako jsou játra, ledviny a přední část žaludku, ale i v těch, ve kterých se nádory u krys tvoří jinak jen vzácně, např. srdce, slezina a žláznatý žaludek<sup>18</sup>.

2-NF způsobuje po své biotransformaci v organismu v největší míře vznik těchto tří DNA aduktů<sup>18,20</sup>: *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluoren, *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren a 3-(deoxyguanosin-*N*2-yl)-2-acetylaminofluoren (obr. 3). Ve srovnání s 2-AAF, který je vážným potenciálním karcinogenem, působí 2-NF jako středně silný iniciátor a slabý promotor při vývoji nádorových onemocnění (vznik DNA aduktů může povzbudit proliferaci buněk s takto pozměněnou DNA). Podáme-li zvířatům 2-NF, vylučují v moči více přímých mutagenů než při podání 2-AAF. Je možné, že silně genotoxický 2-AAF je tak reaktivní, že nikdy neopustí buňku nebo tkáň, aniž by zreagoval s určitou makromolekulární látkou či podlehl detoxikaci. Naproti tomu látky se středně silným genotoxickým potenciálem, jakou je i 2-NF, jsou méně reaktivní, a tudíž mohou být vylučovány i bez předchozí chemické přeměny<sup>15</sup>.

### 4. Elektrochemické DNA biosenzory a jejich využití při studiu interakce 2-nitrofluorenu a jeho metabolitů s DNA

Výzkum vzájemných interakcí malých molekul s nukleovými kyselinami je stále v popředí zájmu celosvětové vědy. Studium těchto supramolekulárních interakcí v módu *in vitro* je zásadní pro jejich detailní pochopení, především pak z hlediska možného poškození struktury DNA způsobeného různými cizorodými látkami<sup>21–24</sup>. Je známo mnoho sloučenin schopných reverzibilní interakce s dvouvláknovou DNA (dsDNA) prostřednictvím následujících tří interakčních módů<sup>21</sup>: 1) sterické interakce molekuly v místě malého či velkého žlábků DNA, 2) interkala-



*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluoren

*N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren

3-(deoxyguanosin-*N*2-yl)-2-acetylaminofluoren

Obr. 3. Struktury DNA aduktů vznikajících při interakci metabolitů 2-NF s DNA (cit.<sup>18</sup>)

ce (vmezezení) molekuly mezi páry bází DNA nebo 3) elektrostatické interakce kladně nabitě části molekuly se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA.

DNA biosenzory jsou integrovaná zařízení tvořená rozhraním bioreceptor|převodník signálu (převodníky pracují většinou na bázi elektrického, teplotního či optického přenosu signálu), ve kterých figuruje DNA jako biomolekulární rozpoznávací prvek pro sledování specifických vazebných procesů vůči DNA<sup>25</sup>. Ve srovnání s ostatními převodníky se ty elektrochemické těší značné oblibě, především díky skutečnosti, že umožňují rychlou detekci a vykazují vysokou citlivost (DNA je elektrochemicky aktivní biopolymer schopný se adsorbovat na rozhraní elektrody a vodného prostředí; je-li vystavena působení genotoxických látek, dochází ke strukturálním změnám a tyto změny mohou být detekovány prostřednictvím elektrochemických signálů<sup>21,24</sup>). Převodníky signálu (pracovní elektrody) používané při konstrukci elektrochemických DNA biosenzorů bývají nejčastěji na bázi uhlíku (různé formy pevných, pastových, kompozitních či filmových elektrod), zlata, platiny, kapalné rtuti či stříbrných amalgamů<sup>21–27</sup>.

Při elektrochemickém studiu interakcí mezi 2-NF (cit.<sup>28–31</sup>) (či jeho metabolity 2-AF (cit.<sup>32,33</sup>) a nebo 2-AAF (cit.<sup>33</sup>)) a DNA (použita byla dsDNA izolovaná z buněk živočichů – telecího brzlíku nebo lososích spermii) byly dosud použity tři typy uhlíkových elektrod (elektroda ze skelného uhlíku (GCE)<sup>29,30,33–35</sup>, síťotisková uhlíková pastová elektroda (SPCE)<sup>28</sup> a velkoplošná uhlíková filmová elektroda (CFE)<sup>32,36</sup>) a dále visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)<sup>31</sup>. Bližší informace o elektrochemických DNA biosenzorech na bázi GCE, SPCE a CFE a jejich využití lze nalézt v našem předchozím přehledovém referátu<sup>22</sup>.

Na uhlíkové elektrody je DNA nejčastěji nanášena nakápnutím jejího vodného roztoku na povrch elektrody. Po odpaření rozpouštědla je DNA na povrchu držena silnou fyzisorpcí<sup>22,24</sup>. Dalším způsobem imobilizace DNA na uhlíkové elektrody je samovolná nebo vloženým napětím stimulovaná (potenciostatická) akumulace<sup>22</sup>. V případě HMDE je nejběžnější využití tzv. adsorpční přenosové rozpouštěcí techniky (AdTS) – díky silné adsorpci DNA na povrchu HMDE je možné přenést elektrodu s akumulovanou DNA z roztoku, ve kterém byla provedena akumulace, do roztoku, ve kterém probíhá elektrochemické měření<sup>24</sup>.

#### 4.1. DNA biosenzory s převodníkem signálu na bázi uhlíku

První práce pojednávající o elektrochemickém výzkumu interakce 2-NF s DNA byla zveřejněna v roce 2010 (cit.<sup>28</sup>). Pro *in vitro* detekci poškození DNA způsobeného 2-NF a 2,7-dinitrofluorenem (2,7-DNF) byl v této studii použit elektrochemický DNA biosenzor na bázi SPCE (DNA/SPCE; na povrch pracovní elektrody tvořené uhlíkovou pastou byla navázána vrstva dsDNA z telecího brzlíku) a byly zkoumány dva druhy možného poškození DNA. První bylo způsobeno přímou interakcí nitrofluore-

nů s dsDNA a druhé radikály s krátkou dobou života, které vznikají při elektrochemické redukci přítomných nitroskupin<sup>37–40</sup>.

Voltametrií s vkládaným pravoúhlým napětím (square-wave voltametrie (SWV)) bylo zjištěno, že obě zkoumané látky (2-NF a 2,7-DNF) interagují s dsDNA, která je navázaná na povrchu SPCE. K elektrochemické oxidaci guaninových zbytků docházelo na tomto DNA biosenzoru (v prostředí 0,25 mol l<sup>-1</sup> acetátový pufr o pH 4,75 (obsahující 10 mmol l<sup>-1</sup> KCl) – methanol (99:1)) přibližně při potenciálu 1000 mV a k elektrochemické oxidaci adeninových zbytků okolo potenciálu 1300 mV (bližší informace o těchto elektrochemických odezvách dsDNA lze nalézt např. v přehledovém referátu<sup>24</sup>). Po interakci studovaných látek s dsDNA se výšky těchto voltametriických píků snížily – docházelo k jejich interkalaci mezi páry bází DNA, což mohlo mít za následek snížení počtu elektrochemicky aktivních míst ve struktuře dsDNA schopných podléhat oxidaci<sup>28</sup>.

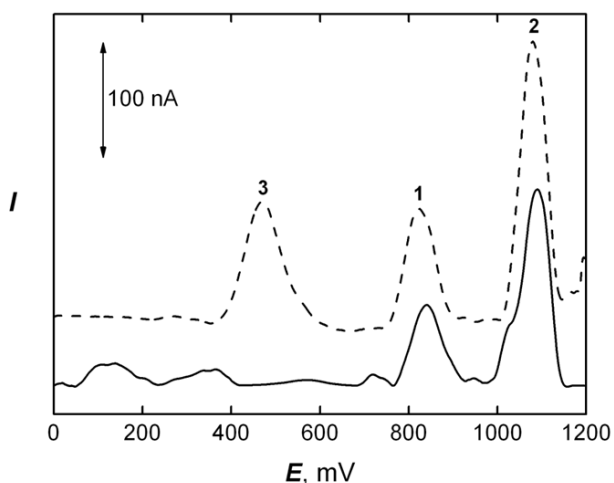
Interkalace byla potvrzena studiem elektrochemického chování známých interkalátorů při kompetici s 2-NF či 2,7-DNF o interakční místa ve struktuře dsDNA (pro toto studium byla použita technika diferenční pulzní voltametrie (DPV)). Jednalo se o redoxní indikátory [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> a [Co(phen)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> (phen reprezentuje 1,10-fenanthrolin)<sup>41,42</sup>. Tyto látky v závislosti na iontové síle interagují prostřednictvím hydrofobních interakcí s vnitřní částí dsDNA (interkalace) nebo prostřednictvím elektrostatických interakcí se záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou dsDNA (elektrostatické vázání) a mohou soutěžit o vazebná místa v dsDNA s nitroderiváty fluorenu. Při koncentraci fosfátového pufru 20 mmol l<sup>-1</sup> (fosfátový pufr o pH 7,0 tvořil hlavní složku použitého základního elektrolytu) bylo pozorováno blokování interkalace redoxních indikátorů do dsDNA vlivem kompetitivní interkalace 2-NF (popř. 2,7-DNF) přítomného ve stejném roztoku. DPV píky indikátorů se snížily, ztatečnější pokles byl pozorován u [Cu(phen)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, který má větší afinitu k DNA. Při koncentraci fosfátového pufru 5 mmol l<sup>-1</sup> (tedy při převažující elektrostatické interakci redoxních indikátorů s dsDNA) ke kompetici s nitrofluoreny prakticky nedocházelo<sup>28</sup>.

Při zkoumání poškození dsDNA radikály s krátkou dobou života, které vznikají při elektrochemické redukci nitroskupin přítomných ve struktuře 2-NF a 2,7-DNF, byla rovněž použita DPV na DNA/SPCE (cit.<sup>28</sup>). Během první fáze elektrochemické redukce 2-NF (popř. 2,7-DNF) se přenášejí čtyři elektrony (v případě 2,7-DNF je to celkem osm elektronů) a nitroskupina se redukuje na hydroxylaminoskupinu<sup>37</sup>. V rámci této reakce vznikají jako meziprodukty reaktivní radikály s krátkou dobou života (Ar–NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, kde Ar reprezentuje aryl) (cit.<sup>37</sup>), které mohou způsobit oxidativní poškození DNA (při kolizi Ar–NO<sub>2</sub><sup>•</sup> se vzdušným kyslíkem jsou generovány reaktivní formy kyslíku (ROS) způsobující oxidaci guaninových zbytků na 8-oxoguaninové zbytky<sup>43</sup>).

Jako optimální elektrochemická technika pro generování Ar–NO<sub>2</sub><sup>•</sup> byla zvolena cyklická voltametrie (CV) s katodicko-anodickým cyklováním (15 cyklů při polari-

zační rychlosti  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) v míchaném temperovaném roztoku  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  2-NF či  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  2,7-DNF (v prostředí  $0,25 \text{ mol l}^{-1}$  acetátový pufr o pH 4,75 (obsahující  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  KCl) – methanol (99:1)) v rozsahu potenciálů 0 až  $-1000 \text{ mV}$ . Teplota  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  byla zvolena v souladu s obecnými pravidly reakční kinetiky (zvýšením teploty dosáhneme větší rychlosti reakce). Po tomto oxidačním poškození dsDNA navázané na povrchu SPCE bylo pozorováno zvýšení DPV píků guaninových (při potenciálu  $800 \text{ mV}$ ) i adeninových (při potenciálu  $1100 \text{ mV}$ ) zbytků (obr. 4). Reaktivní radikály způsobily poškození dsDNA – rozevření dvoušroubovice a větší přístupnost nukleobází pro jejich elektrochemickou oxidaci na povrchu SPCE. Navíc byl nově pozorován další pik při potenciálu  $450 \text{ mV}$ , který byl přiřazen elektrochemické oxidaci 8-oxoguaninových zbytků, které vznikají chemickou oxidací guaninových zbytků prostřednictvím ROS, tzv. oxidačním stresem<sup>28,43</sup>.

V návaznosti na výše uvedenou studii<sup>28</sup> byly elektrochemicky zkoumány interakce 2-NF (cit.<sup>29,30</sup>) a jeho metabolitů 2-AF a 2-AAF (cit.<sup>33</sup>) (a rovněž dalších dvou strukturně příbuzných genotoxických derivátů fluorenu – 2-aminofluoren-9-onu<sup>34</sup> (2-AFN) a 2,7-diaminofluorenu<sup>33</sup> (2,7-DAF)) s dsDNA pomocí DNA biosenzoru (DNA/GCE) na bázi GCE modifikované nízkomolekulární dsDNA z lososích spermií<sup>34,35,44</sup>. Pro všechny uvedené deriváty bylo pomocí SWV na DNA/GCE (obdobný experiment jako ve studii<sup>28</sup>) pozorováno snížení anodických



Obr. 4. DP voltamogramy (po korekci na základní linii) bázi dsDNA zaznamenané na DNA/SPCE (píky poskytované guaninovými (1), adeninovými (2) a 8-oxoguaninovými (3) zbytky) v prostředí  $0,25 \text{ mol l}^{-1}$  acetátový pufr o pH 4,75 (obsahující  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  KCl) – methanol (99:1) před (plná čára) a po elektrochemickém cyklování mezi 0 a  $-1000 \text{ mV}$  (15 cyklů při polarizační rychlosti  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ) v roztoku 2-NF ( $c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) připraveném ve stejném prostředí (čárkovaná čára); experiment byl prováděn v roztocích temperovaných na  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  a každý voltamogram byl zaznamenan na nové DNA/SPCE (cit.<sup>28</sup>)

píků nukleobází dsDNA poté, co byl biosenzor inkubován v roztocích studovaných látek. Pozorované poškození DNA bylo tím větší, čím déle byl biosenzor inkubován a čím větší byla koncentrace analytu v inkubačním roztoku. I zde lze očekávat, že docházelo ke vzniku nekovalentních komplexů studovaných látek s dsDNA (pravděpodobně rovněž interkalačních, jejichž SWV anodické odezvy bylo možné v případě 2-AF, 2-AAF, 2-AFN a 2,7-DAF pozorovat spolu s odezvami nukleobází), což vedlo ke snížení počtu elektrochemicky oxidovatelných míst ve struktuře dsDNA. Vznik nekovalentního komplexu byl rovněž indikován pro 2-AF při použití DNA biosenzoru, jehož převodník signálu byl tvořen filmem kompozitu z mikrokrytalického přírodního grafitu a polystyrenu<sup>32</sup> (DNA/CFE).

Tvorba těchto komplexů byla studována rovněž elektrochemickou impedanční spektroskopií (EIS) a CV (cit.<sup>29,30,32,33</sup>), při jejichž použití byly sledovány odezvy zprostředkované aniontovým redoxním indikátorem  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  přítomným v roztoku (při EIS je to hodnota odporu vůči přenosu náboje ( $R_{ct}$ ) a při CV to jsou výšky anodického ( $I_{p,a}$ ) a katodického ( $I_{p,c}$ ) píku<sup>21</sup>). Povrch elektrody bez a s navázanou dsDNA je možné studovat pomocí záporně nabitých komplexních aniontů, jejichž náboj jim brání v přístupu k modifikované elektrodě, protože jsou odpuzovány rovněž záporně nabitou cukr-fosfátovou kostroou dsDNA. V případě narušení či poškození struktury dsDNA lze na EIS spektrech (tzv. Nyquistových grafech) pozorovat změnu hodnoty  $R_{ct}$  (většinou její pokles) a na cyklických voltamogramech změnu hodnot  $I_{p,a}$  a  $I_{p,c}$  redoxního indikátoru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  (většinou jejich nárůst) ukazující snadnější přenos náboje mezi redoxním indikátorem a modifikovanou elektrodou<sup>21</sup>.

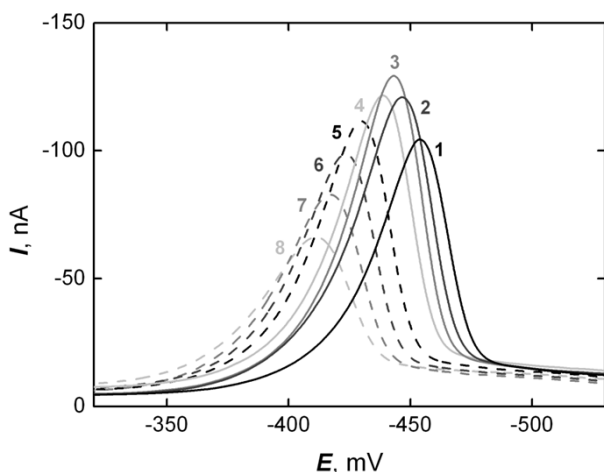
Při studiu tvorby nekovalentního komplexu mezi 2-NF a dsDNA nebyla při EIS a CV pozorována významná změna elektrochemického chování redoxního indikátoru  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  před a po inkubaci DNA/GCE v roztoku s 2-NF (cit.<sup>29,30</sup>). Toto chování naznačuje, že při interakci 2-NF a dsDNA nedochází k významnému narušení či poškození struktury dsDNA, nicméně interkalační komplex vzniká, jak již bylo potvrzeno v dřívější studii<sup>28</sup>. Naopak v případě 2-AF, 2-AAF, 2-AFN a 2,7-DAF bylo při vzniku nekovalentních komplexů pozorováno snížení hodnoty  $R_{ct}$  a zvýšení hodnot  $I_{p,a}$  a  $I_{p,c}$  s rostoucím časem inkubace DNA biosenzoru a s rostoucí koncentrací analytu v inkubačním roztoku (cit.<sup>33</sup>), což naznačuje významnější poškození struktury dsDNA než v případě 2-NF.

#### 4.2. DNA biosenzory s převodníkem signálu na bázi rtuti

Na HMDE modifikované dsDNA z telecího brzlíku (DNA/HMDE) byly zkoumány, stejně jako tomu bylo v případě DNA/SPCE (cit.<sup>28</sup>), dva druhy možného poškození DNA (cit.<sup>31</sup>) – přímou interakcí 2-NF s dsDNA a radikály s krátkou dobou života vznikajícími při elektrochemické redukci přítomné nitroskupiny (bližší informace o elektrochemických DNA biosenzorech na bázi HMDE

a jejich využití lze nalézt např. v cit.<sup>24,45</sup>). DNA/HMDE byla vytvořena technikou AdTS a experimenty byly prováděny v prostředí 0,05 mol l<sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7,0 – ethanol (1:1).

Pomocí CV bylo zkoumáno poškození dsDNA po interakci s 2-NF prostřednictvím sledování výšky voltametrického píku, který odpovídá současně redukci cytosinových a adeninových zbytků (tzv. píku CA)<sup>31</sup>. Po interakci byl zaznamenán pokles píku CA, což lze vysvětlit odlišným elektrochemickým chováním dsDNA poté, co je 2-NF interkalován do její struktury za vzniku nekovalentního komplexu<sup>28</sup>. Vznik interkalačního komplexu byl dále studován pomocí DPV na HMDE (cit.<sup>31</sup>). Do roztoku 10 μmol l<sup>-1</sup> 2-NF v prostředí 0,05 mol l<sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7,0 – ethanol (1:1) byly postupně přidávány přídavky roztoku dsDNA (obr. 5). Po prvních přídavcích nejprve vzrostla výška voltametrického píku 2-NF, jelikož dsDNA v roztoku zvýšila adsorpci 2-NF ve formě interkalačního komplexu na povrch HMDE. Zároveň došlo k posunu potenciálu píku 2-NF ke kladnějším hodnotám, což poukazuje na fakt, že interkalovaný 2-NF je elektrochemicky redukovatelný snadněji než jeho volná forma. Další přídavky dsDNA, při nichž byla většina původního 2-NF již ve formě komplexu s dsDNA, pak měly za následek pokles výšky píku, což lze vysvětlit tím, že dsDNA vyskytující se v roztoku v postupně vyšší koncentraci více konkuruje dsDNA s interkalovaným 2-NF při celkovém transportu hmoty k povrchu elektrody, který je schopen interagovat jen s omezeným množstvím dsDNA. Obdobné výsledky byly získány i v experimentech, při kterých byla na místo HMDE použita stříbrná pevná amalgamová elektroda<sup>46</sup>.



Obr. 5. DP voltamogramy 2-NF ( $c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) zaznamenané na HMDE bez přítomnosti dsDNA (1) a v přítomnosti dsDNA (2–8) ve studovaném roztoku v prostředí 0,05 mol l<sup>-1</sup> fosfátový pufr o pH 7,0 – ethanol (1:1); zobrazené voltamogramy odpovídají hodnotám výsledné koncentrace dsDNA ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve studovaném roztoku: 0 (1), 44 (2), 85 (3), 125 (4), 199 (5), 268 (6), 331 (7) a 391 (8) (cit.<sup>31</sup>)

Technikou CV bylo také sledováno poškození dsDNA způsobené prostřednictvím redukčních produktů elektrochemické přeměny 2-NF – reaktivních radikálů s krátkou dobou života (více v kapitole 4.1). Nejúčinnější generace Ar-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, které zprostředkovane způsobují oxidační poškození DNA, byla pozorována při katodicko-anodickém cyklování v rozmezí potenciálů -300 až -800 mV (20 cyklů při polarizační rychlosti 50 mV s<sup>-1</sup>). I tento druh poškození se projevil poklesem píku CA, nicméně mnohem větším, než tomu bylo při přímé interakci 2-NF s dsDNA. Oxidačním poškozením dsDNA, jehož hlavním důsledkem je oxidace nukleobází, oxidace deoxyribosových jednotek a rozrušení fosfodiesterových vazeb<sup>47</sup>, došlo k celkové degradaci dsDNA (cit.<sup>45</sup>).

## 5. Závěr

V tomto přehledovém referátu jsou shrnuty poznatky o interakcích 2-NF a jeho metabolitů s DNA. Výzkumem poškození DNA *in vivo* se celosvětově zabývá řada vědeckých týmů, z nichž tým profesora L. Möllera (Institut Karolinska, Huddinge, Švédsko) v minulosti zveřejnil poměrně detailní popis nejen metabolických drah 2-NF, ale také působení metabolitů 2-NF na strukturu DNA. Rovněž je v tomto přehledovém referátu ukázáno, že elektrochemické DNA biosenzory představují jednoduše připravitelná, levná, citlivá a selektivní zařízení vhodná pro detekci poškození DNA *in vitro*, a to nejen v případě poškození způsobeným 2-NF a jeho metabolity. Přestože je zřejmé, že výzkum prováděný za takto odlišných experimentálních podmínek (*in vivo* versus *in vitro*) s sebou nese riziko nižší korelace získaných poznatků, je určitě velmi zajímavé poskytnout srovnání výsledků získaných oběma způsoby.

Jelikož byl výzkum poškození DNA po interakci s 2-NF a jeho metabolity prováděn pomocí elektrochemických DNA biosenzorů až v poslední době, týkají se získané poznatky především dvou sloučenin – matečného 2-NF a jeho primárního metabolitu 2-AF. Zde jsou shrnuty poznatky, které jsou *in vivo* a *in vitro* studiím společné:

1. Při biotransformaci (*in vivo*) i elektrochemické přeměně (*in vitro*) 2-NF vzniká jako redukční produkt 2-AF.
2. Redukce 2-NF na 2-AF je ireverzibilní chemický proces.

Pomocí elektrochemických DNA biosenzorů však byly získány i další poznatky, které při *in vivo* studiích nelze získat (nebyly vyvinuty příslušné metody pro takový typ studia) nebo jim nebyla věnována patřičná pozornost. Jedná se především o tato fakta:

1. Při elektrochemické redukci 2-NF dochází v podmínkách srovnatelných s prostředím v buňkách (základní elektrolyty o iontové síle srovnatelné s iontovou silou fyziologického roztoku v rozmezí pH 4,5–7,0) nejprve k tvorbě meziprojektu (2-hydroxylaminofluoren), který je následně redukován na 2-AF.

2. V prvním kroku elektrochemické redukce 2-NF se na povrchu elektrody tvoří radikály s krátkou dobou života, které zprostředkovávají za aerobních podmínek oxidativní poškození DNA (oxidaci nukleobází či vznik zlomů ve vláknech dsDNA), které je známo i z *in vivo* studií (oxidační stres). Je tedy možné, že i v živých organismech existuje při metabolismu 2-NF riziko tohoto typu poškození DNA, které může vést ke vzniku mutací.
3. Přímá interakce 2-NF s dsDNA způsobuje za specifických podmínek (iontová síla prostředí srovnatelná s iontovou silou fyziologického roztoku) jeho interkalaci do struktury dsDNA (jako interkalátory do dsDNA jsou podezřelí i 2-AF a 2-AAF, u nichž však zatím nebyly provedeny důkazové studie stejného druhu jako u 2-NF (cit.<sup>28</sup>); zároveň lze předpokládat, že při přímé interakci 2-AF či 2-AAF s dsDNA nedochází ke vzniku kovalentních aduktů popsaných ve studiích provedených na živých organismech<sup>18,20</sup>). Tento interkalační komplex by mohl při další replikaci DNA vést rovněž ke vzniku degenerované struktury DNA, popř. by mohl zcela zamezit replikaci DNA.

*Tato práce vznikla v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV) a byla finančně podporována MŠMT ČR v rámci programu KONTAKT II (projekt LH13002 – Elektrochemické monitorování biologicky aktivních sloučenin) a Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (K. Stávková a A. Hájková děkují za podporu z projektu GAUK 430214/2014/B-CH/PrF).*

## LITERATURA

1. Wild S. R., Jones K. C.: *Environ. Pollut.* 88, 91 (1995).
2. Marino F., Cecinato A., Siskos P. A.: *Chemosphere* 40, 533 (2000).
3. Wolff R. K., Griffith W. C., Henderson R. F., Hahn F. F., Harkema J. R., Rebar A. H., Eidson A. F., McClellan R. O.: *J. Toxicol. Environ. Health* 27, 123 (1989).
4. Kocourek V.: *Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitro-PAH): environmentální karcinogeny*. Vědecký výbor fytosanitárního a životního prostředí, Praha 2004.
5. Möller L.: *Environ. Health Perspect.* 102, 139 (1994).
6. Törnquist S., Wiklund L., Toftgård R.: *Chem.-Biol. Interact.* 54, 185 (1985).
7. Menzie C. A., Potocki B. B., Santodonato J.: *Environ. Sci. Technol.* 26, 1278 (1992).
8. Foth H., Kahl R., Kahl G. F.: *Food Chem. Toxicol.* 26, 45 (1988).
9. Ueda O., Kitamura S., Kubo R., Yano Y., Kanzaki Y., Fujimoto T., Tatsumi K., Ohta S.: *Xenobiotica* 31, 33 (2001).
10. Ueda O., Kitamura S., Huruse Y., Saito T., Kanzaki Y., Yano Y., Tatsumi K., Ohta S.: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 371 (2001).
11. Möller L., Gustafsson J.-Å.: *Biol. Mass Spectrom.* 13, 681 (1986).
12. Möller L., Rafter J., Gustafsson J.-Å.: *Carcinogenesis* 8, 637 (1987).
13. Ueda O., Kitamura S., Ohta S.: *Xenobiotica* 32, 667 (2002).
14. Möller L., Törnquist S., Beije B., Rafter J., Toftgård R., Gustafsson J.-Å.: *Carcinogenesis* 8, 1847 (1987).
15. Möller L., Torndal U.-B., Eriksson L. C., Gustafsson J.-Å.: *Carcinogenesis* 10, 435 (1989).
16. Möller L., Zeisig M.: *Carcinogenesis* 14, 53 (1993).
17. Anselietter V., Heimpel H.: *Acta Haematol.* 76, 217 (1986).
18. Cui X.-S., Eriksson L. C., Möller L.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 442, 9 (1999).
19. Möller L., Zeisig M., Midtvedt T., Gustafsson J.-Å.: *Carcinogenesis* 15, 857 (1994).
20. Möller L., Cui X.-S., Torndal U.-B., Eriksson L. C.: *Carcinogenesis* 14, 2627 (1993).
21. Fojta M., Daňhel A., Havran L., Vyskočil V.: *Trends Anal. Chem.* 79, 160 (2016).
22. Vyskočil V., Hájková A.: *Chem. Listy* 110, 207 (2016).
23. Paleček E., Bartošík M.: *Chem. Rev.* 112, 3427 (2012).
24. Vacek J., Havran L., Fojta M.: *Chem. Listy* 105, 15 (2011).
25. Labuda J., Oliveira-Brett A. M., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: *Pure Appl. Chem.* 82, 1161 (2010).
26. Teles F. R. R., Fonseca L. P.: *Talanta* 77, 606 (2008).
27. Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M.: *Anal. Chim. Acta* 609, 139 (2008).
28. Vyskočil V., Labuda J., Barek J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 233 (2010).
29. Stávková K., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, S262 (2014).
30. Stávková K.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2014.
31. Krejčová Z.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
32. Vyskočil V., Barek J.: *Procedia Chem.* 6, 52 (2012).
33. Hájková A.: *Disertační práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2016.
34. Hájková A., Barek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 27, 101 (2015).
35. Blašková M., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, S211 (2014).
36. Šmejkalová H., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 108, 264 (2014).
37. Vyskočil V., Barek J.: *Curr. Org. Chem.* 15, 3059 (2011).
38. Vyskočil V., Navrátil T., Polášková P., Barek J.: *Electroanalysis* 22, 2034 (2010).
39. Yosypchuk O., Karásek J., Vyskočil V., Barek J., Pecková K.: *Sci. World J.* 2012, 231986 (2012).
40. Vyskočil V., Navrátil T., Daňhel A., Dědík J., Krejčo-

- vá Z., Škvorová L., Tvrđíková J., Barek J.: *Electroanalysis* 23, 129 (2011).
41. Pang D. W., Abruña H. D.: *Anal. Chem.* 70, 3162 (1998).
  42. Ovádeková R., Jantová S., Letašiová S., Štěpánek I., Labuda J.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 2055 (2006).
  43. Abreu F. C., Goulart M. O. F., Brett A. M. O.: *Biosens. Bioelectron.* 17, 913 (2002).
  44. Blašková M., Hájková A., Vyskočil V.: *Chem. Listy* 109, 235 (2015).
  45. Horakova E., Barek J., Vyskočil V.: *Electroanalysis* 28, 2760 (2016).
  46. Krejčová Z., Barek J., Vyskočil V.: *14<sup>th</sup> International Conference on Electrochemistry (ESEAC 2012), Portorož, 3-7 June 2012*, Book of Abstracts, str. 160, National Institute of Chemistry, Ljubljana 2012.
  47. Xiong H. Y., Wang Y., Zhang X. H., Ye Y., Wang S. F.: *Microchim. Acta* 176, 479 (2012).

**Š. Skalová<sup>a,b</sup>, K. Stávková<sup>a</sup>, A. Hájková<sup>a</sup>, J. Barek<sup>a</sup>, J. Fischer<sup>a</sup>, J. Wang<sup>c</sup>, and V. Vyskočil<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Prague, <sup>b</sup> J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, <sup>c</sup> Department of Nanoengineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA): **Interaction of Genotoxic 2-Nitrofluorene and Its Metabolites with DNA *In Vivo* and Its Monitoring Using Electrochemical DNA Biosensors *In Vitro***

This review is focused on genotoxic 2-nitrofluorene, which is a marker for the presence of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, and summarizes the current knowledge about the negative effects of 2-nitrofluorene and its metabolites on living organisms, especially on their DNA. These findings obtained via *in vivo* investigations are compared with information obtained using electrochemical DNA biosensors, which represent very promising *in vitro* alternative to the study of processes proceeding in living organisms during the interaction of their DNA with various xenobiotic compounds.