

ELEKTROANALÝZA INSULINU NA NANOKOMPOZITNÍCH ELEKTRODÁCH

Tento článek je součástí seriálu *Ženy v české chemii**

LIBUŠE TRNKOVÁ a IVETA TRÍSKOVÁ

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika
175126@mail.muni.cz

Došlo 17.3.23, přijato 14.7.203.

Článek si všímá posledních prezentovaných prací s problematikou elektrochemické detekce insulinu a předkládá kritický pohled na výzkum a vývoj jeho elektrochemických neenzymových senzorů. Monitoruje vliv experimentálních podmínek na insulinový oxidační signál a zamýšlí se nad katalytickými efekty nanočástic či nanokompozitů deponovaných na površích elektrochemického snímače.

Klíčová slova: insulin, tyrosin, elektrochemie, senzor, nanočástice, nanokompozit, modifikované povrchy



Prof. RNDr. Libuše Trnková, CSc. (*25. 9. 1947) působí na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity (MU) více jak 50 let. V letech 1965–1970 studovala na MU (tehdy ještě UJEP) chemii a fyziku se zaměřením na výuku, a když se v roce 1972 uvolnilo místo asistenta na Katedře teoretické a fyzikální chemie (KTFCH), neváhala a konkurz vyhrála. Během prvních dvou let obhájila rigorózní práci (RNDr.), za dalších 11 let kandidátskou práci (CSc.) a v roce 2000 habilitační práci (doc.). Jmenovaná profesorkou byla v roce 2017, a to v oboru fyzikální chemie. Náplní její vědecko-výzkumné práce je (a) studium elektrodových procesů biologicky významných látek (nukleové kyseliny, oligonukleotidy, proteiny a jejich složky) na rtuťových a grafitových elektrodách, (b) rozvoj a aplikace moderní elektrochemické metody – eliminační voltametrie (EVLS – Elimination Voltammetry with Linear Scan) a (c) charakterizace i tvorba nových modelových systémů pro popis polarizovaného mezifázi elektroda/elektrolyt a dějů, které se na tomto rozhraní odehrávají. Je autorkou více jak 250 publikací v renomovaných mezinárodních časopisech s h indexem 44. **Za celoživotní přínos k rozvoji elektroanalytické chemie jí byla v roce 2018 udělena Cena firmy Metrohm.**

Dlouhodobé působení na KTFCH a od roku 2007 na Ústavu chemie v sobě odráží bohatou pedagogickou činnost Libuše Trnkové, počínaje laboratorními cvičeními a semináři z fyzikální chemie až po přednášky z biofyzikální chemie, elektroanalýzy, elektrodové kinetiky a metod chemického výzkumu. V Laboratořích biofyzikální chemie a elektrochemie (LABIFEL) probíhají nejen laboratorní cvičení z pokročilých analytických metod, ale i výzkum v rámci bakalářských, diplomových a disertačních prací.

Z mimouniverzitních aktivit Libuše Trnkové lze zmínit její dlouhodobé působení v Brněnském filharmonickém sboru Beseda brněnská (BFS BB), kde zastává funkci místopředsedkyně sboru; stará se nejen o propagaci sboru, ale i o organizaci jeho koncertů doma a v zahraničí. Kromě hudby a zpěvu se zajímá o historii a ráda cestuje.

* Tento příspěvek je součástí seriálu *Ženy v české chemii*, jenž představuje ku příležitosti každoročních významných celosvětových svátků – Mezinárodního dne žen a dívek ve vědě (11. únor) a Mezinárodního dne žen (8. březen) – úspěšné ženy působících v české chemii. Článek vznikl na pozvání redakčního kruhu a jeho výjimečně větší stránkový rozsah byl na přání autorek, vzhledem k jedinečnosti představeného tématu a jeho podrobného zpracování, umožněn.



RNDr. Mgr. Iveta Třísková, Ph.D. (*7. 6. 1986) absolvovala v roce 2010 magisterské studium v oboru Analytická biochemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Ve své diplomové práci, kterou vypracovala pod vedením Dr. Marty Farkové, navázala na bakalářskou práci a věnovala se potenciometrickému studiu protonačně-deprotonačních rovnováh purinových derivátů, zejména benzylaminopurinu. Výsledky diplomové práce následně rozšířené o voltametrickou studii byly v roce 2012 publikovány a staly se tak podkladem pro rigorózní práci, která byla v roce 2012 úspěšně obhájena. V roce 2014 ukončila doktorské studium v oboru Fyzikální chemie na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně. Ve své disertační práci, kterou vypracovala pod vedením prof. Libuše Trnkové, se věnovala elektrochemickému studiu krátkých oligonukleotidů nejen na rtuťové kapkové elektrodě, ale i na pevných elektrodách, a to především na polymerní pentelkové elektrodě. Ve své práci využila klasickou voltametrickou metodu cyklickou voltametrii nebo voltametrii s lineární polarizací elektrody, doplněnou o eliminační voltametrii s lineárním scanem (EVLS). Základy této metody na MU položila a o její další vývoj se zasloužila právě její školitelka prof. Libuše Trnková. **Dosažené výsledky v rámci jejího doktorského studia byly v letech 2011 a 2012 oceněny Cenou ředitele Ústavu a v roce 2014 obdržela Cenu děkana. V roce 2015 obdržela Cenu Metrohm za nejlepší publikaci mladého elektroanalytického chemika do 35 let.** Elektrochemickému výzkumu na pevných grafitových elektrodách, stejně tak jako dalšímu rozvoji eliminační voltametrie se věnuje dodnes. V poslední době se její výzkum zaměřil i na elektrochemickou studii aminokyselin a proteinů, a to zejména insulinu. Je školitelkou a konzultantkou bakalářských a diplomových prací s elektrochemickou tematikou. Je autorkou/spoluautorkou 27 publikací v mezinárodních impaktovaných odborných časopisech. Ve svém volném čase se věnuje především rodině.

Obě autorky (IT a LT) se podílely na akreditaci nového studijního oboru – Biofyzikální chemie – a její výuce se jak v základních, tak i v pokročilých kurzech intenzivně věnují. Autorky také každoročně organizují konferenci (Workshop of Biophysical Chemists and Electrochemists), které se zúčastňuje velký počet studentů s možností soutěžit o tři ceny firmy Metrohm ČR v oblasti biofyzikální chemie a elektrochemie a také o Cenu Emila Palečka za nejlepší práci v oblasti bioelektrochemie. Loni se uskutečnil již 22. ročník a od letošního roku se bude tato akce konat střídavě v Brně na MU a na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského.

Obsah

1. Úvod
2. Insulin a diabetes mellitus
3. Současný stav analýzy insulinu
4. Elektrochemický proces insulinu a tyrosinu
5. Neenzymové elektrochemické senzory pro stanovení insulinu
6. Poznatky našich experimentů
 - 6.1. Vliv modifikovaných elektrodových povrchů
 - 6.2. Vliv chloridů
 - 6.3. Vliv pH, iontové síly a koncentrace insulinu
 - 6.4. Nativní a denaturovaný stav insulinu v elektrochemické detekci
 - 6.4.1. Tepelná denaturace insulinu
 - 6.4.2. Chemická denaturace insulinu
7. Závěr

1. Úvod

Cílem článku je představit zapojení elektrochemie do výzkumu významného proteinu, jako je insulin. Jedná se o relativně malý hormonální protein tvořený jednapadesáti aminokyselinami, který ve výzkumu proteinů často zastupuje modelový systém. Na základě jeho struktury se odvíjí i jeho elektrochemická aktivita. Základní elektrochemický protokol obecně staví na elektroaktivitě zkoumané látky

a v případě proteinů, pokud se nejedná o metaloproteiny, je tento protokol závislý především na redoxní aktivitě jednotlivých aminokyselin. Tuto aktivitu lze předpokládat u pěti aminokyselin, z nichž dvě obsahují atomy síry, L-cystein nebo jeho dimer L-cystin (Cys) a L-metionin (Met), a tři z nich jsou sice bez atomu síry, ale nesou ve své molekule postranní aromatický řetězec: L-tyrosin (Tyr), L-tryptofan (Trp), L-histidin (His)¹. Dalo by se očekávat, že všechny tyto aminokyseliny jsou v insulinu přítomné, ale není tomu tak. Insulin překvapivě neobsahuje Met a Trp a z elektrochemických studií vyplývá, že za oxidační odezvy insulinu jsou zodpovědné především Tyr. Protože molekula insulinu obsahuje celkem čtyři tyrosiny, otázkou zůstává, které jsou z nich oxidovány. Při hledání odpovědi na tuto otázku se však musíme podívat na vyšší strukturu insulinu, protože elektroda se chová jako elektrochemická čočka a tyrosin by měla vidět. Je také možné, že si elektroda svým nábojem a chemickým složením insulinu k oxidačnímu procesu připraví, třeba změněným nábojem, denaturací nebo vazbou na danou látku v chemicky modifikovaném povrchu elektrody. Proto rozšířený elektrochemický protokol může stavět i na elektrochemické aktivitě látek, které umožní zprostředkovaně získat citlivý a selektivní senzor prostřednictvím vazebné interakce s protilátkou, aptamerem, specifickým ligandem (biosenzor) nebo prostřednictvím katalyzátoru, jako je např. nanočástice nebo nanokompozit.

2. Insulin a diabetes mellitus

Po mnoho let hraje insulin klíčovou roli v rozvoji chemie peptidů, farmakologie, buněčného signalizování a strukturální biologie². Tento polypeptidický hormon, produkovaný β -buňkami lokalizovanými v malých kulovitých strukturách nazývaných Langerhansovy ostrůvky slinivky břišní^{3,4}, reguluje hladinu glukosy v krvi a zajišťuje její hladinu v normálních mezích (3–8 mmol l⁻¹)⁵. Normální hladina insulinu v krvi nalačno je nižší než 25 mIU l⁻¹ (0,86 ng l⁻¹; 0,15 nmol l⁻¹)⁵. Dysfunkce produkce insulinu způsobuje různé formy syndromu diabetu (diabetes mellitus, DM), celosvětově nejběžnějšího a nejnákladnějšího metabolického onemocnění⁶. Lékařské údaje poukazují na to, že v roce 2030 bude na světě diabetem postiženo více než 422 milionů lidí a stane se tak sedmou nejčastější příčinou úmrtí. Podle statistik Světové zdravotnické organizace nyní trpí cukrovkou v České republice více než jeden milion obyvatel a např. v USA je diabetických pacientů na počet obyvatel více jak deset procent. Nedávno, v souvislosti s pandemií Covid-19, byl DM uznán jako závažný rizikový faktor nepříznivého průběhu a smrtelných následků tohoto virového onemocnění. Enzymové senzory pro glukosu, komerčně využívané k diagnostice diabetu, vykazují určité nevýhody vyplývající ze závislosti enzymové aktivity použitého enzymu na teplotě, vlhkosti a pH (cit.⁷). Navíc je třeba poznamenat, že tak jako hladina insulinu, tak i hladina glukosy v krvi může kolísat v závislosti na životním stylu.

3. Současný stav analýzy insulinu

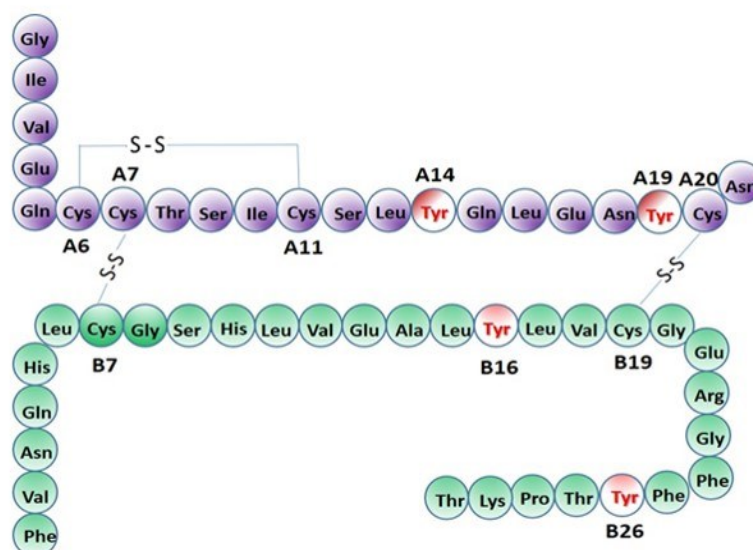
Vzhledem k závažnosti tohoto velice rozšířeného onemocnění je stanovení insulinu v diagnostice diabetu velmi důležité⁸. Zpočátku navržené postupy pro sledování koncentrací insulinu byly však málo citlivé, navíc i velmi náročné na realizaci⁹, a proto bylo nezbytné zaměřit se na vývoj levného, citlivého a selektivního insulinového senzoru¹⁰. V současné době využívané analytické postupy zahrnují metody bioanalýzy, především imunoanalýzy (EIA, RIA, LIA)^{11–13}. Jejich nevýhodou je však dlouhotrvající analýza a často nedostatečná citlivost¹⁴, kterou lze však zvýšit derivatizací insulinu pomocí izotopů a florigenních značek⁵. Další využívané metody, založené na chromatografii (HPLC)^{15,16}, kapilární elektroforéze (CE)¹⁷, jsou náročné nejen na instrumentaci, ale i na dlouhotrvající předpřípravu¹⁸. V poslední době je detekce insulinu diskutována v souvislosti s průtokovou injekční analýzou¹⁹ a s elektrochemickými metodami²⁰. Elektrochemické metody jsou považovány za jedny ze slibných metod pro stanovení insulinu, díky nenáročnosti na instrumentaci a čas, a díky poskytnutému nízkému limitu detekce. Toto tvrzení zaznává v mnoha publikacích, ale velmi často je to přání otcem myšlenky (*Libenter homines id, quod volunt, credunt*), protože jedním z největších problémů elektro-detekce je interference a znečištění povrchu senzoru složkami analyzovaného reálného vzorku. Na druhé straně je třeba poznamenat, že elektrochemické metody, které položily základ pro kon-

strukci biosenzorů, mohou být hlavními ukazateli DM, ať už se jedná o enzymové, neenzymové, elektrochemické, optické, neinvazivní biosenzory anebo biosenzory s nepřetržitým monitorováním⁹. Jsou využívány při stanovení glukosy, kde se však detekční limity pohybují řádově téměř v milionkrát vyšších hodnotách než v případě insulinu.

V posledních letech byl zaznamenán také pokrok ve vývoji nanobiosenzorů využívajících různé nanomateriály (např. nanočástice kovů, magnetické nanočástice, nanovlákná, nanodrátky, nanokompozity, kvantové tečky, uhlíkové nanotrubičky, grafen)⁹. Specifita katalytického nebo afinitního biosenzoru závisí na vazebné reakci. Zatímco pomocí katalytického biosenzoru lze stanovit změnu koncentrace analytu, pomocí afinitního biosenzoru je sledována jeho vazebná aktivita²¹. Biosenzor je považován za analytické zařízení slibující lepší komunikaci našeho těla s prostředím a reakci na něj, což vede ke zlepšení péče o pacienty díky včasné diagnostice a léčbě onemocnění²². Biosenzor je definovaný jako samostatné integrované zařízení poskytující přesná kvantitativní nebo semi-quantitativní analytická data s využitím biorekogniční složky²³. Pro jeho realizaci je vyvíjeno velké množství technik a spojení biosenzoru s vysoce afinitními biomolekulami vede ke stanovení významných látek, jako je glukosa a insulin⁹. Navzdory pokroku a neustálému výzkumu a vývoji ve výrobě biosenzorů pro glukosu^{24–31}, vývoj biosenzorů pro insulin je však stále pozadu⁹ a to platí především v případě elektrochemických senzorů, kterým je na rozdíl od biosenzorů v tomto článku věnována pozornost.

4. Elektrochemický proces insulinu a tyrosinu

Jak již bylo naznačeno, elektrochemický výzkum proteinů se zabývá pěti redoxně aktivními aminokyselinami (AMK) (tryptofan, tyrosin, histidin, methionin a cystein), které mohou poskytnout kvalitativní a kvantitativní informace o studovaném proteinu s ohledem na jeho změny ve struktuře, tvorbu a degradaci dimerních a multimerních struktur. Insulin je složen ze dvou peptidových řetězců, řetězce A (21 AMK) a řetězce B (30 AMK), které jsou spolu spojeny dvěma disulfidovými vazbami (obr. 1)^{2,4}. Jedna disulfidická vazba je umístěna v řetězci A na pozicích 6–11. Řetězec A lze oddělit od řetězce B redukčními činidly při takových experimentálních podmínkách, aby došlo k přerušení disulfidických vazeb mezi A7–B7 a A20–B19 (denaturace). Biochemický a lékařský výzkum ukazuje, že tři kratší oblasti řetězce A (1–3; 12–17; 19) a jedna delší oblast s aminokyselinovou sekvencí od pozice 8 do 25 v řetězci B jsou nezbytné pro správnou funkci insulinu. Z hlediska elektroaktivity jsou důležité nejen disulfidové vazby, které lze redukovat a insulin se následně ocitne v denaturované formě, ale také dva histidiny a čtyři tyrosiny. Ne každá publikace má správně uvedenou primární strukturu insulinu a v mnoha publikacích na tuto nesrovnalost neupozornili ani jejich oponenti. Bohužel se velmi často stává, že následující autor opíše nesprávnou insulinovou strukturu a chyba se stále opakuje.

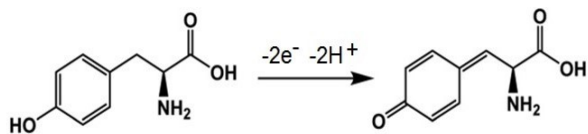


Obr. 1. Primární struktura lidského insulinu (tyrosiny jsou vyznačeny červeně). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

Přímá a účinná elektrochemická oxidace insulinu je pro vývoj rychlého a citlivého insulinového elektrochemického senzoru velmi důležitá³². Je obecně známo, že nejpoužívanějším elektrodovým materiálem je uhlík³², ať už se jedná o elektrody ze skelného uhlíku (glassy carbon electrodes, GCE)³³, tištěné uhlíkové elektrody (screen printed carbon electrodes, SPCE)³⁴, pentelkové grafitové elektrody (PeGE)³⁵, nebo uhlíkové pastové elektrody³⁶. Pentelkové grafitové elektrody mají ve srovnání s ostatními uhlíkovými elektrodami řadu výhod, a to nízkou pořizovací cenu, tedy širokou dostupnost, snadnou možnost modifikace³⁷ a dobře definovanou plochu elektrody¹³. Co se týká chemických a elektrochemických vlastností, pentelkový uhlík má vysokou chemickou a tepelnou odolnost, překvapivě nízký kapacitní proud a velmi rychlý přenos náboje^{38–40}. I když je uhlík považován za jeden z nevhodnějších materiálů, studie ukázaly, že přímá oxidace insulinu na nemodifikovaných elektrodách je limitována především dvěma nedostatky: pomalá kinetika jeho oxidačního procesu a povrchové znečištění elektrody, což způsobuje nižší citlivost, horší reprodukovatelnost a stabilitu senzoru v lineárním rozsahu insulinových koncentrací^{32,41}. Z tohoto důvodu byly vítány povrchové modifikace elektrod, a to především prostřednictvím nanočástic a nanokompozitů, umožňujících stanovení insulinu ve stopových i v ultrastopových koncentracích^{32,33,41–47}. Návrh insulinového neenzymového senzoru často čerpá z výhod zesílených elektrostatických interakcí (kladně nabitý polymer nebo membrána vůči záporně nabitému insulinu), zvětšeného povrchu senzoru (nanočástice nebo uhlíkové nanotrubic, CNT) a efektivní katalýzy (nanočástice kovů nebo kovových oxidů, Me_xO_y).

První průzkumy redoxního chování insulinu byly realizovány na povrchově upravených elektrodách ze skel-

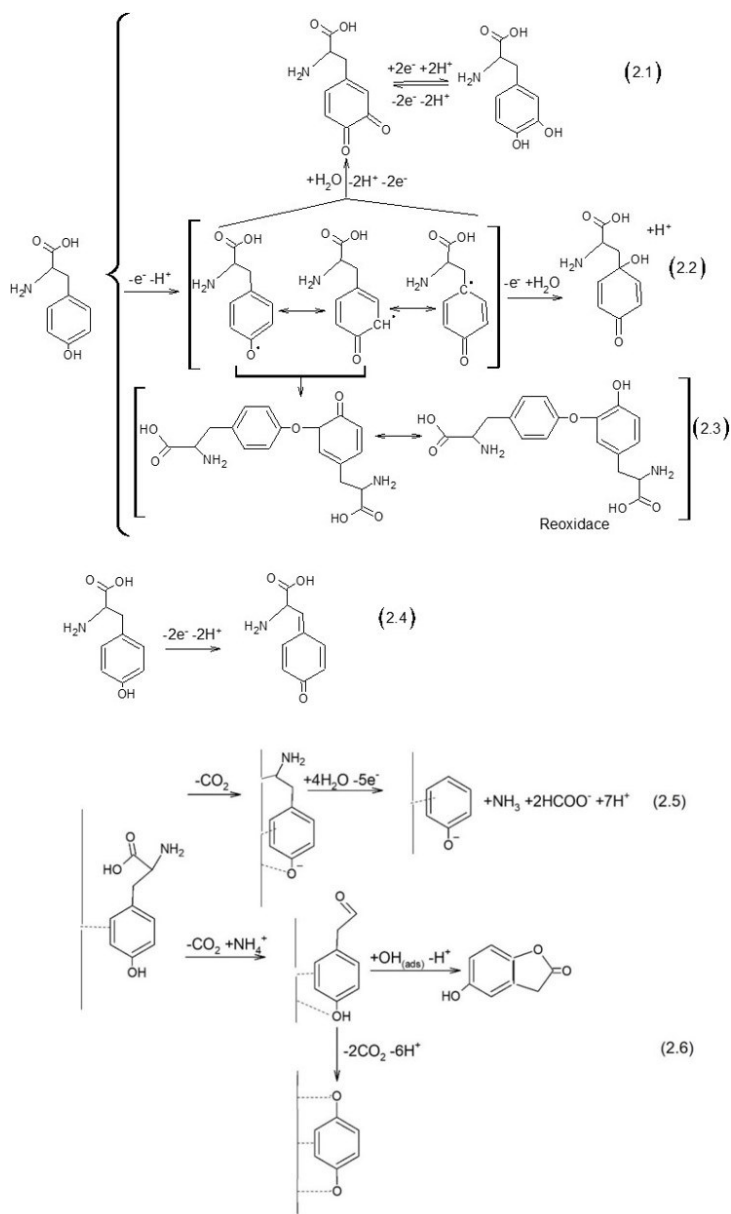
ného uhlíku pokrytých chitosanovým filmem (CHIT) a mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubicami (MWCNT), jež oproti nemodifikovaným elektrodám poskytovaly stabilní insulinové signály. GCE/CHIT/MWCNT elektrody tak byly použity pro zkoumání elektrooxidačních procesů insulinu a také k amperometrickému stanovení insulinu. Pro charakterizaci anodického procesu byly provedeny pH studie elektrochemické oxidace insulinu na MWCNT elektrodách a ukázalo se, že zvyšující se pH roztoku oxidaci insulinu usnadňuje. Závislost potenciálu oxidace insulinu na pH vykazovala směrnici rovnou -61 mV, což nepřímo vyjadřovalo elektrodový proces s poměrem počtu H^+ iontů k počtu elektronů rovným 1. Toto chování lze vysvětlit předpokladem, že oxidační proces zahrnuje redoxně aktivní tyrosinové zbytky přítomné v molekule insulinu. Pokud se podíváme na elektro-oxidaci volné aminokyseliny tyrosinu, pak zjistíme, že změna nastává na hydroxyly dle rovnice $-\text{C}-\text{OH} \rightarrow -\text{C}=\text{O} + \text{H}^+ + \text{e}^-$. Výsledky voltametrické studie insulinu a volného tyrosinu na GCE/CHIT/MWCNT ukázaly na podobnost polohy anodického signálu insulinu a volného tyrosinu na potenciálové ose (kolem $0,7$ V)⁴⁸, což podpořilo tvrzení, že oxidační proces insulinu na GCE/CHIT/MWCNT zahrnuje tyrosinové zbytky přítomné ve struktuře insulinu. Produkt elektrolýzy insulinu byl také testován, a to pomocí hmotnostní spektrometrie, elektronové paramagnetické rezonance a separačních metod (gelová elektroforéza, HPLC). Bylo navrženo, že ztráta čtyř hmotnostních jednotek po oxidaci insulinu na GCE/CHIT/MWCNT by mohla být způsobena tvorbou dvou intramolekulárních dityrosinových můstků^{32,41}. Pro bližší pochopení oxidačního procesu insulinu je nutné seznámit se s oxidačním mechanismem volného tyrosinu, který do dnešní doby není úplně vyjasněn. Před zhruba 30 lety bylo navrženo schéma oxidace tyrosinu



Obr. 2. Schéma elektro-oxidace tyrosinu

a v literatuře je stále uváděn zjednodušený oxidační mechanismus Tyr (obr. 2)^{1,49}.

Na základě literárních podkladů Dourado a spol.⁵⁰ navrhuje podrobnější oxidační mechanismus L-Tyr

Obr. 3. Možná schematická reprezentace tyrosinové oxidace (upraveno podle⁵⁰)

(obr. 3). Mnoho autorů se shodlo na tom, že bez ohledu na elektrodový materiál dochází nejdříve k oxidaci fenolické skupiny v molekule L-Tyr (cit. 51–55), avšak přesný mechanismus oxidace a konečný produkt měnící se v závislosti na experimentálních podmínkách je sporný. Některé publikace využívající spektroskopické techniky jako např. FTIR na kovových elektrodách^{56,57} se přiklání k variantě, že nejdříve dochází k dekarboxylaci molekuly a následně k oxidaci aminoskupiny. Jiní autoři předpokládají, že procesy oxidace aminoskupiny a dekarboxylace molekuly proběhnou zároveň⁵⁷ (reakce 2.6). Většina prací, která předpokládá prvotní oxidaci fenolické skupiny, navrhuje její oxidaci na keton v jediném kroku^{52–55} (reakce 2.1, 2.2 a 2.4), někteří však považují za konkurenční krok polymere-

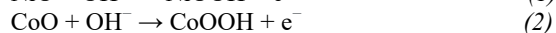
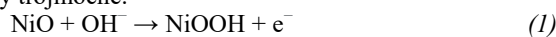
rizaci⁵² (reakce 2.3). Na základě jistých experimentů se též předpokládá, že oxidace fenolické skupiny bude probíhat ve dvou $1e^-$ krocích s aromatickým radikálovým meziproduktem. Tato částice může být díky hybridizaci oxidována na jiném uhlíku za vzniku molekuly se dvěma ketoskupinami⁵¹ (reakce 2.1). Publikace využívající spektroskopické techniky ukázaly, že velmi důležitým faktorem pro proces oxidace je adsorpce, a to bez ohledu na kyselý (reakce 2.6)⁵⁷ či alkalický prostředí (reakce 2.5)⁵⁶. V kyselých prostředích byla důležitá role adsorpce pozorována díky rozdílným voltamogramům zaznamenaným na polykrystalické a monokrystalické platinové elektrodě. Intenzita proudu v oblasti vylučování vodíku se mění, což naznačuje, že místa pro adsorpci jsou obsazena jinými částicemi, a dochází tak k posunu v oblasti tvorby oxidu Pt (cit.⁵⁷). „Geometrie“ této adsorpce může také objasnit, proč by mohla být usnadněna oxidace karboxylové skupiny; možná díky tomu, že by molekula měla být orientována $-COOH$ skupinou k povrchu elektrody, stejně tak jako celý fenolický kruh. Po těchto oxidačních krocích, se však mezi autory objevují opět neshody. Ogura a spol. předpokládali, že konečným produktem bude fenol⁵⁶, zatímco Zinola a spol. navrhuje více komplexní cestu, kde C_{α} je oxidován na keton a jeho pozdější oxidace generuje chinon, který se následně re-oxiduje na *para*-derivát. Podle našich zkušeností se proces oxidace tyrosinu může značně lišit v závislosti na elektrodozem materiálu. Je však důležité mít na paměti, že v každém případě má tento proces mnoho podobností⁵². Rozdíl mezi elektrodami by měl být vztažen ke zvýšení či snížení pravděpodobnosti dekarboxylace aminokyseliny⁵⁰.

Variabilita v tyrosinové oxidaci je tedy bohatá a jistě bude záviset nejen na povrchové chemii a morfologii elektrody, ale i na pH, iontové síle, rozpouštědle a na složení základního elektrolytu. Navíc je třeba si uvědomit, že zde prozatím hovoříme o volném tyrosinu a ne tyrosinu vázaném v molekule proteinu. Nejvhodnější chemie a morfologie povrchů elektrod pro citlivou a selektivní detekci insulinu se stále hledá a pro mnoho prací se stala základem elektroda ze skelného uhlíku pokrytá chitosanem (elektrostatická interakce) s uhlíkovými nanotrubičkami (zvětšení povrchu a podle nás i možné hydrofobní interakce). GCE/CHIT/MWCNT elektrody vykazují při potenciálu 0,7 V a fyziologickém pH detekční limit kolem 30 nmol l^{-1} , relativně vysokou citlivost ($135 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), lineární dynamický rozsah v rozmezí od 100 nmol l^{-1} do $3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a vysokou provozní a dlouhodobou stabilitu. I když se tyto upravené elektrody staly prvními slibnými elektrochemickými senzory pro insulin³², tak výzkum oxidačního chování insulinu na různě modifikovaných uhlíkových elektrodách se neustále vyvíjí.

5. Neenzymové elektrochemické senzory pro stanovení insulinu

Jak už bylo uvedeno, insulin je jedním z obtížněji stanovitelných analytů (pomalá elektro-oxidace) a vyžaduje katalýzu, často realizovanou pomocí nanočástic kovů

nebo kovových oxidů. Arvinte A. a spol. v roce 2010 představili elektrochemický senzor pro detekci insulinu využívající CNT-NiCoO/Nafion modifikované uhlíkové tištěné elektrody (SPGE), umožňující oxidativní detekci insulinu ve vodných roztocích s fyziologickým pH s dobrou citlivostí ($22,57 \text{ } \mu\text{A mg}^{-1} \text{ ml}^{-1}$)⁴⁷. Tento nanokompozit byl připraven spojením komerčně dostupného nanoprášku (označeného NiCoO_2) v roztoku Nafionu (jako kotevní pojivo) s CNT (zvýšení povrchu) velikosti v různých hmotnostních poměrech. Jelikož materiály založené na oxidu kovu, využívané jako heterogenní katalyzátory, vykazují chemickou stabilitu a elektrokatalytickou aktivitu pouze v alkalickém prostředí, byla pro zvýšení odezvy zmíněného senzoru ve fyziologickém prostředí nezbytná předpříprava (pretreatment) takto modifikované SPGE v alkalickém prostředí (cyklování v prostředí 1 M NaOH v rozmezí potenciálů od $-0,2 \text{ V}$ do $+1,1 \text{ V}$). Elektrokatalytický efekt nanočástic byl popsán rovnicemi (1) a (2), které poukazují na oxidaci dvojmocných kovů na kovy trojmocné:



V zájmu zhodnocení možné interference některých běžných analytů vyskytujících se v tělních tekutinách (např. askorbová a močová kyselina) autoři sledovali amperometrické odezvy senzoru s přídavnou vrstvou Nafionu bez katalyzátoru s předpokladem repulzního efektu záporně nabitého Nafionu vůči aniontovým substancím, který zabraňuje vstupu interferující molekuly do nanokompozitu⁴⁷. Je však třeba poznamenat, že repulzní efekt nafionové membrány není stoprocentně účinný, zejména v případě askorbové kyseliny. O vlivu dalších interferentů proti znečištění (antifouling) senzoru práce nepodává žádné informace.

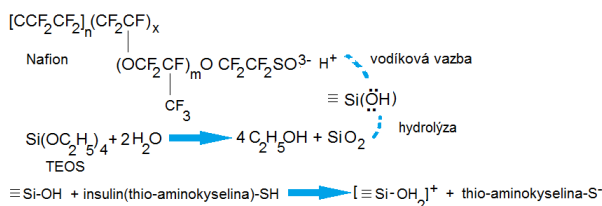
Zajímavá je práce autorů skupiny Salimiho, která pro elektrodovou modifikaci elektrody ze skelného uhlíku poprvé použila nanočástice karbidu křemíku (SiC) s výsledkem nízkého detekčního limitu insulinu ($3,3 \text{ pmol l}^{-1}$) díky amperometrické průtokové injekční analýze. Největší pozornost zasluhuje rychlá příprava senzoru bez použití mediátorů přenosu elektronů či specifických činidel a také antiadsorpční vlastnosti jeho povrchu⁵⁸. I když zmiňovaný senzor má téměř excelentní vlastnosti, tak zde není zmínka o jeho aplikaci při stanovení insulinu v reálných vzorcích; byl řešen jen efekt interference přídavnou vrstvou Nafionu, podobně jako to učinil Arvinte. Je třeba poznamenat, že autoři neřeší problém elektrostatické interakce insulinu s Nafionem z hlediska jejich nábojů, neboť se dá předpokládat, že při fyziologickém pH má insulin záporný náboj⁵⁹. Podle našeho názoru je také možné, že elektrostatická repulzní interakce záporně nabitých malých molekul se záporně nabitými membránovými póry Nafionu bude mnohem větší než v případě velkých molekul, jako je insulin.

Ke slovu se dostala i uhlíková pastová elektroda (CPE), kterou použil Jaafariasl M. se svými spolupracovníky v roce 2011 a modifikoval ji silikagelem (Si-CPE). Adsorpce insulinu na povrchu takto modifikované elektro-

dy poskytovala vysokou citlivost pomocí adsorptivní rozpuštěcí (stripping) analýzy v diferenčním pulzním nebo hydrodynamickém amperometrickém režimu. Zejména hydrodynamická amperometrie ukázala větší citlivost než diferenční pulzní analýza. Klíčovou výhodou takto navrženého elektrochemického senzoru je jeho vysoká selektivita vůči insulinu i v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru (cystin, cystein a glutathion)¹⁴. Voltametrické experimenty potvrdily akumulaci insulinu na povrchu Si-CPE a byl navržen oxidační mechanismus, který byl popsán rovnicemi bez podrobnějšího rozboru: prekoncentrace ($\equiv\text{SiOH}_{(\text{CPE})} + \text{insulin}_{(\text{roztok})} \leftrightarrow \equiv\text{SiOH-insulin}_{(\text{CPE})}$) a anodické rozpouštění (od +0,4 V do 1,2 V, $\equiv\text{SiOH-insulin}_{(\text{CPE})} \leftrightarrow \equiv\text{SiOH}_{(\text{CPE})} + \text{insulin-Ox}_{(\text{roztok})} + \text{ne}^-$).

Autoři se zabývají odpovědí na otázku, které aminokyseliny jsou zodpovědné za oxidaci insulinu. Za tímto účelem provedli elektrochemickou analýzu volných aminokyselin, které mohou být elektrochemicky aktivní (tyrosin, cystin, histidin a cystein). I když cystein a cystin oxidační odezvu neposkytovaly, což je z našeho pohledu zajímavé, oxidační signál tyrosinu a histidinu byl zaznamenán, a to při potenciálu 900 mV a 950 mV. Tímto experimentem je dokladováno, že cystin ani cystein se na oxidaci insulinu podílet nebudou a za oxidační odezvu bude zodpovědný tyrosin nebo histidin. I když navržený mechanismus zvýšené reaktivity silikagele vůči insulinu není zatím úplně vyjasněn, tak nepřítomnost odezvy cysteinu a cystinu podmiňuje již zmíněnou vysokou selektivitu senzoru vůči insulinu v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru. Interakce insulinu se silikagelem není v práci zcela vyjasněna. Užitečnost navrženého senzoru byla testována i z hlediska jeho využití pro stanovení insulinu v injekcích.

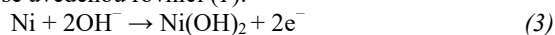
Konstrukce senzorů s využitím jejich povrchové modifikace pomocí kompozitu křemíku se stala velmi populární a také tým Aminioho v roce 2014 této popularity využil pro konstrukci elektrochemického insulinového senzoru nanočástice oxidu křemíku (SiO_2NP). Nanokompozit $\text{SiO}_2\text{NP}/\text{Nafion}$ imobilizovali na povrchu elektrody ze skelného uhlíku. Podobně jak uvádí i předchozí práce^{47,58} (Arvinte, Salimi), Nafion zde hraje roli kotevního pojiva a zabraňuje smývání vytvořeného filmu z povrchu elektrody v průběhu elektrochemického procesu. Elektrokatalytické chování takto vyrobeného senzoru bylo sledováno pomocí cyklické (CV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) a výsledky ukázaly, že nano- SiO_2 vykazuje výraznou elektrokatalytickou aktivitu v oxidaci insulinu, a to na základě navrženého reakčního mechanismu (upraveno a opraveno nejen z publikace⁶⁰, ale i z publikace⁶¹):



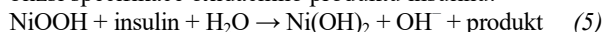
Předností navrženého senzoru je skutečnost, že byl aplikován pro stanovení insulinu nejen v injekčních vzorcích, ale i v reálných vzorcích kožního potu, což je méně obvyklé; ostatní prezentované senzory tuto aplikaci vůbec neuvádí. Autoři věnují pozornost i rušivým účinkům interferujících látek (glukosa, glycin, fenylalanin, histidin, cystin a tryptofan) a pouze v případě vysoké koncentrace tryptofanu byla zaznamenána viditelná interference. Vzhledem ke stabilitě a antipasivačním vlastnostem je nově zkonstruovaný senzor $\text{SiO}_2\text{NP}/\text{Nafion}/\text{GCE}$ považován za vysoce účinný amperometrický insulinový detektor v nanomolárním měřítku⁶⁰.

Jinou modifikací uhlíkové elektrody, spočívající v elektrodepozici nanokompozitu RuOx/CNT na povrch uhlíkové elektrody a umožňující stabilní a citlivou voltametrickou a amperometrickou detekci insulinu představil v roce 2007 J. Wang se svým týmem. Jeho studie ukázala, že pokrytí elektrody pomocí nanokompozitu RuOx/CNT nabízí výrazné zrychlení oxidace insulinu ve srovnání s elektrodami pokrytými buď jen RuOx , nebo jen CNT , což je pravděpodobně důsledkem synergického zesílení účinnosti elektrodového povrchu. Překvapivý účinek modifikace pomocí nanokompozitu RuOx/CNT na oxidaci insulinu však není zatím úplně vyjasněn. I přes tento možný nedostatek práce naznačuje velký příslib pro konstrukci miniaturizovaných senzorů a detektorů pro monitorování insulinu⁴².

V roce 2016 byl Yu Y. a spol. vyroben elektrochemický insulinový senzor, využívající levné a ekologicky šetrné nanočástice niklu (NiNP)⁶². Pro modifikaci povrchu elektrody vyrobené z cínem dopovaného oxidu inditého – Indium Tin Oxide – byla využita technika iontové implantace, která spočívá v tom, že povrch materiálu se bombarduje určitými ionty ve vakuové komoře ($< 10^{-4}$ mbar, tj. 0,01 Pa) pomocí energie o rozsahu 50 až 200 keV. Ionty násilně pronikají povrchem materiálu a při četných kolizích s atomy se zastaví a ztratí svoji energii. O podmínkách tohoto procesu autoři nepiší. ITO elektroda byla vybrána jako vhodný elektrodový substrát díky širokému potenciálovému oknu a stabilním elektrochemickým vlastnostem. Výkonnost senzoru byla testována pomocí cyklické voltametrie, elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) a chronoamperometrie (CA) a takto připravená NiNP/ITO elektroda vykazovala v prostředí 0,1 M NaOH dobré detekční limity (viz tab. I). Elektrokatalytický efekt niklových nanočástic byl opět podmíněn alkalickým prostředím (cyklování v 0,1 M NaOH v rozmezí potenciálu od -1 V do $+1$ V; 30 cyklů) a popsán rovnicemi, které mají podobnost s výše uvedenou rovnicí (1):



Katalytický efekt redoxního páru $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ na oxidační proces insulinu je vyjádřen jednoduchou rovnicí bez bližší specifikace oxidačního produktu insulinu:



Autoři věnovali pozornost interferencím vyskytujících se v tělních tekutinách běžně společně s insulinem (askorbová kyselina, močová kyselina, glukosa).

V případě, že byla studie možných interferentů provedena na úrovni pikomolární koncentrace, v souladu s požadavkem na analýzu pikomolárních koncentrací insulínu v lidské krvi, nebyly interference na NiNP/ITO elektrodě pozorovány. Jiná situace však nastala, pokud byla koncentrace interferentů oproti koncentraci insulínu $50\times - 100\times$ zvýšena; pak byla na elektrodě pozorována silná odezva interferujících substancí. Jedná se o častý problém senzorů založených na elektrokatalytickém stanovení insulínu a vyvíjí se studie vedoucí ke zmírnění možných interferencí. Autoři jako jednu z možností navrhuji využití průtokového systému⁶².

Je třeba poznamenat, že elektrokatalytický efekt nanočástic oxidu niklu pro oxidační signál insulínu poprvé zkoumal Rafiee B., který v roce 2013 vyvinul senzor využívající nanokompozit NiONP/Nafion-MWCNT (multi walled carbon nanotubes)⁶³. NiONP byly deponovány na povrch tištěné uhlíkové elektrody (SPE) dekorované uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT), kdy karboxylové skupiny na povrchu MWCNT mohou stimulovat depozici NiONP. Elektrochemické chování kompozitu NiONP/Nafion-MWCNT ve vodných alkalických roztocích insulínu bylo zkoumáno pomocí CV, CA a EIS. Rafiee vysvětluje elektrokatalytický efekt nanočástic oxidu niklu, spočívající v konverzi Ni^{II}/Ni^{III} v alkalickém prostředí (0,1 M NaOH) dle rovnice $Ni(OH)_2 \leftrightarrow NiOOH + e^- + H^+$. V přítomnosti insulínu NiONP/Nafion-MWCNT/SPE senzor reflektuje oxidační procesy probíhající ve dvou potenciálových oblastech. V první oblasti anodických potenciálů se nejdříve začínají produkovat Ni^{III} nanočástice, což je vyjádřené rovnicí: $Ni(OH)_2 \leftrightarrow NiOOH + e^- + H^+$. Následně, při vyšších potenciálech, dochází k elektrokatalytické oxidaci insulínu, dle schématu: $NiOOH + \text{insulin} \rightarrow Ni(OH)_2 + \text{produkt}$ (kolem +0,7 V) a současně k redukci Ni^{III} na Ni^{II} . Podle autorů je posledně jmenovaný proces dokladován snížením katodického signálu redukce Ni^{III} na Ni^{II} při zpětné polarizaci senzoru. Tato skutečnost by měla jasně dokazovat, že použitý modifikátor v podobě NiONP se přímo účastní elektrokatalytické oxidace insulínu, ovšem podle CV záznamů toto tvrzení není zřetelně podloženo. Předpokládá se adsorpce insulínu na tvořící se Ni^{III} (kolem +0,7 V). Adsorbovaný insulin je oxidován v chemické reakci s pomalou kinetikou a produkuje částice Ni^{II} , což se projevuje poklesem katodického signálu; částice Ni^{II} pak mohou být zpětně oxidovány na Ni^{III} . Voltametrické studie ukázaly, že SPE modifikovaná filmem NiONP/Nafion-MWCNT snižuje přepětí insulínu a usnadňuje jeho oxidaci ve srovnání s nemodifikovanými SPE. Pro zhodnocení výkonnosti této modifikované elektrody byla využita také amperometrická metoda⁶³.

Na tuto práci navázala Šišoláková I. a spol.⁷ v roce 2019 a pro substrát si místo SPE zvolila pentelkovou grafitovou elektrodu (PeGE) modifikovanou nejen kompozitem NiONP/chitosan-MWCNT, ale i kompozitem NiNP/chitosan-MWCNT. Nanočástice Ni nebo NiO byly deponovány na povrch chitosan-MWCNT/PeGE pomocí pulzní voltmetrie a elektrochemické vlastnosti obou připravených senzorů byly zkoumány pomocí CV, CA a EIS

v prostředí fosfátového pufru (PBS) o fyziologickém pH simulujícím prostředí lidského organismu. Elektroda NiONP/chitosan-MWCNT/PeGE vykazovala lepší elektroanalytickou charakteristiku ve srovnání s NiNP/chitosan-MWCNT/PeGE a autoři došli k závěru, že pro elektroanalýzu insulínu vhodnějším kandidátem je pentelková tuha modifikovaná oxidem kovu než samotným kovem⁷. Nicméně detekční limity pro insulin nezasahovaly ani v případě NiONP/chitosan-MWCNT/PeGE do pikomolárních koncentrací insulínu. Překvapivé ale je, že oxidační signál insulínu je v případě modifikace NiONP zapsán až kolem 1,45 V, a v případě modifikace NiNP kolem 1,1 V, tedy v obou případech v daleko pozitivnějších potenciálech než 0,7 V, který uvádí Rafiee⁶³.

Důležitost vlivu chitosanové membrány při elektrochemické detekci insulínu na NiONP a MWCNT modifikované tištěné uhlíkové elektrodě (SPCE) je pak dále ukázána na porovnání dvou elektrochemických senzorů NiONP/MWCNT/SPCE a NiONP/chitosan-MWCNT/SPCE, kdy elektrody modifikované chitosanem vykazují širší lineární rozsah koncentrací ($0,25 \mu\text{mol l}^{-1} - 5 \mu\text{mol l}^{-1}$), nižší limit detekce, 94 nmol l^{-1} , vyšší citlivost ($0,021 \mu\text{A l} \mu\text{mol}^{-1}$) a také lepší stabilitu oproti elektrodám bez chitosanové membrány⁶⁴. Z důvodu simulace koncentrace chloridů v lidské krvi byla detekce insulínu provedena v prostředí PBS a nežádoucí vliv chloridů na elektrochemickou detekci insulínu byl pak eliminován pomocí chitosanové membrány, která má stabilizující efekt pro nanočástice, ale pravděpodobně i odpuzující efekt pro ionty Cl^- .

Jak se tedy ukázalo a stále ukazuje, nanočástice přechodných kovů, zejména jejich oxidů, lze považovat za slibný a levný materiál pro katalýzu oxidačního procesu insulínu. Navíc kombinace nanočástic přechodných kovů s uhlíkovými nanotrubičkami, které zvětšují aktivní povrch elektrody, může zlepšit analytické vlastnosti elektrodového povrchu. Byly připraveny další dva typy elektrochemických senzorů založených na tištěných uhlíkových elektrodách modifikovaných kombinací CoNP nebo CuNP s chitosanem a MWCNT. Výsledky porovnání stability, analytické charakteristiky a selektivity obou senzorů prokázaly lepší stabilitu a analytické vlastnosti bez výrazného vlivu interferencí na stanovení insulínu v případě senzoru CoNP/chitosan-MWCNT/SPCE (cit.⁶⁵). Podobně jako CoNP a CuNP, tak i nanočástice zinku (ZnNP) vykazují elektrokatalytickou aktivitu ve stanovení insulínu. I když ZnNP/chitosan-MWCNT/SPCE má o něco lepší mez detekce (LOD, tab. I) než předchozí uvedené nanokompozitní SPCE, tak ostatní analytické parametry (tab. I) jsou podobné⁶⁶. Podle našich úvah do elektrokatalytického procesu v alkalickém prostředí vstupují nanočástice ne v podobě čistého kovu, ale v podobě jeho příslušného oxidu.

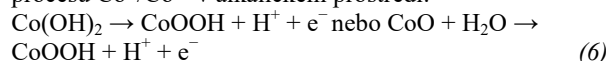
V. Singh v roce 2019 navrhnul senzorové pole, založené na SPE dekorované uhlíkovými nanotrubičkami s modifikací kvantových teček (CdSe/ZnS QD), za účelem přímé detekce pikomolárních koncentrací insulínu v jedné kapce (obr. 4). Ve fyziologickém prostředí takto vytvořené senzorové pole vykazuje limit detekce 100 pmol l^{-1}

a lineární rozsah pro pikomolární koncentrace insulinu ($100 \text{ pmol l}^{-1} - 5000 \text{ pmol l}^{-1}$)⁶⁷.

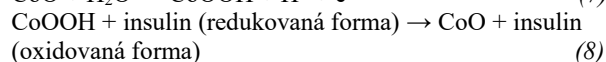
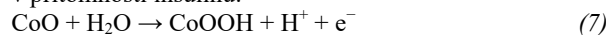
Z našeho pohledu synergický efekt konjugátu multi-stěnných nanotrubiček a kvantových teček typu c/s (core/shell) usnadňuje u oxidovatelných tyrosinových reziduí přenos elektronů. Vzniká otázka, proč je pro usnadnění přenosu elektronu výhodné používat kombinace QD a MWCNT? Dalo by se předpokládat, že oxidace kvantových teček CdSe/ZnS bude probíhat za odejmutí elektronů z valenčního pásu ZnS (shell) a ty by mohly být přijaty uhlíkovými nanotrubičkami, protože jejich Fermiho hladina leží mezi HOMO-LUMO energií (gap) kvantových teček. V tom případě by elektrony z MWCNT mohly usnadnit elektronový transfer insulinu.

Razmi H. a spol.⁶⁸ v roce 2019 představili levný a stabilní elektrochemický senzor založený na pentelkové grafitové elektrodě modifikované nanokompozitem tvořeným oxidem grafenu (GO) a nanočásticemi oxidu kobaltu (CoONP). Při přípravě senzoru byly nejdříve syntetizovány nanovrstvy oxidu grafenu (GO), a to přímo na povrchu pentelkové elektrody jako zdroji uhlíku za pomoci potenciostatické metody v prostředí kyseliny sírové, a následně byly na povrch GO modifikované PeGE deponovány nanočástice oxidu kobaltu (CoONP) za pomoci voltametrie.

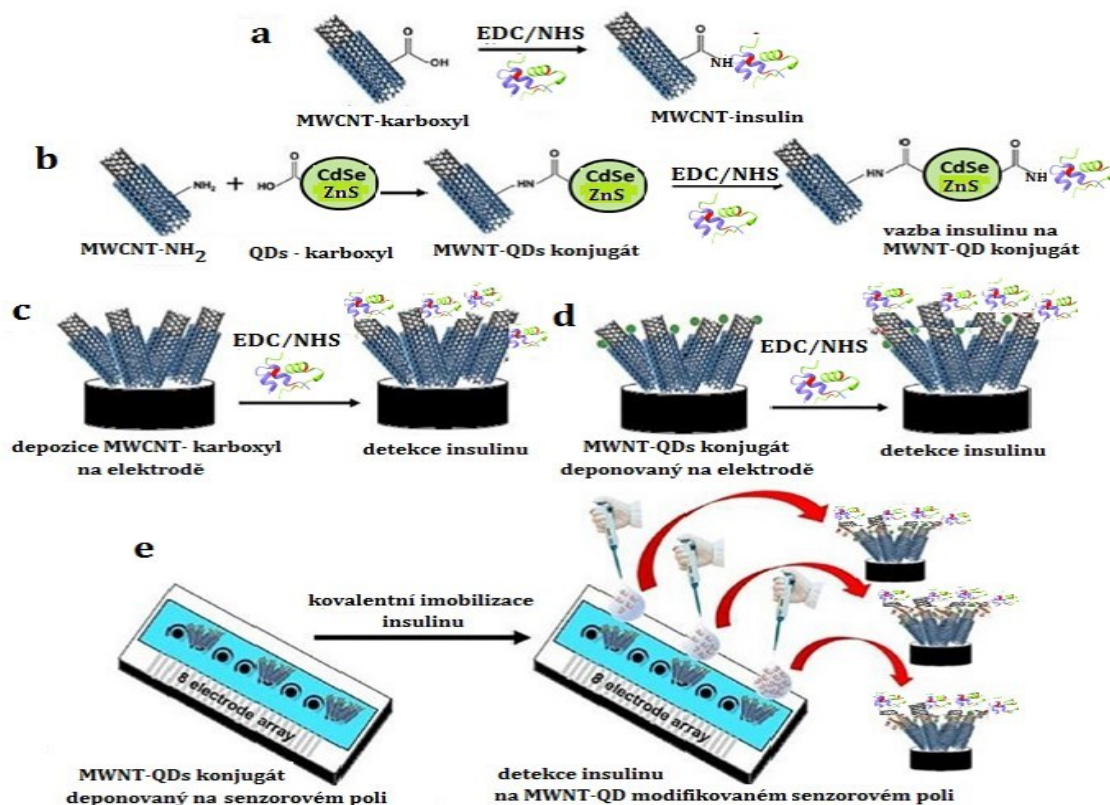
Katalytické vlastnosti CoONP/GO/PGE pomohly snížit detekční limit na subnanomolární koncentrace (LOD $0,12 \text{ nmol l}^{-1}$), zvýšit jak citlivost ($0,687 \mu\text{A l nmol}^{-1}$), tak i lineární koncentrační rozsah ($0,46 \text{ nmol l}^{-1} - 100 \text{ nmol l}^{-1}$). Odezva senzoru nebyla ovlivněna přítomností běžných biologických interferentů, jako jsou kyseliny askorbová, močová, citronová a také glukosa. Byly analyzovány tři synteticky připravené farmaceutické vzorky insulinu tří různých značek (Regular, Isophane a Lansolin) a procento výtěžnosti ($97,55-101,48 \%$) naznačuje, že navrhovaný senzor může být použit pro rutinní analýzu insulinu ve farmaceutických vzorcích⁶⁸. Díky tomu, že CoONP jsou stabilní a elektroaktivní pouze v alkalickém prostředí, byla popsána elektrokatalytická reakce odpovídající redoxnímu procesu $\text{Co}^{\text{II}}/\text{Co}^{\text{III}}$ v alkalickém prostředí:



Stejně tak byl navržen i mechanismus elektrokatalýzy v přítomnosti insulinu:



Nedávno autoři⁶⁹ vyvinuli robustní a citlivý elektrochemický insulinový senzor založený na elektroaktivních



Obr. 4. Schéma detekce insulinu pouze pomocí MWCNT (a, c) a navázání MWCNT na povrch SPE modifikované pomocí QDs (b, d). Návrh MWCNT – QD modifikovaného elektrodového pole pro detekci insulinu v jedné kapce (e), upraveno podle⁶⁷. EDC je 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid; NHS je *N*-hydroxysukcinimid

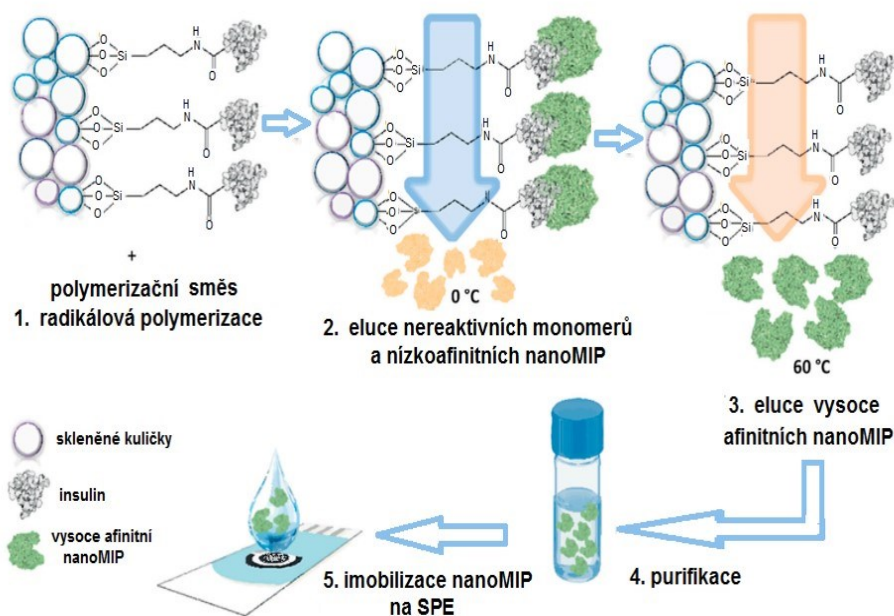
molekulárně vtištěných (imprintovaných) polymerních částicích (nanoMIP), které v polymerní matici zanechávají dutiny s afinitou pro vybranou „templátovou“ molekulu, v tomto případě insulin. NanoMIP senzor označený redoxní sondou kombinuje rozpoznávací a informační schopnosti a v podstatě nahrazuje páry seskupení enzym-mediátor využívané v klasických biosenzorech. Lze předpokládat, že nanoMIP senzor oproti biosenzoru může poskytovat vyšší stabilitu a lepší výkon v komplexních biologických vzorcích. Zajímavostí v této práci je, že nanoMIP částice byly výpočetně navrženy pomocí *in silico* mapování insulinového epitopu (antigenní determinant – konkrétní oblast antigenu, na kterou se vážou protilátky) a syntetizovány polymerací na pevné fázi (skleněné kuličky) (obr. 5). Oxidační odezva insulinu byla sledována pomocí diferenční pulzní voltametrie v klinicky relevantním rozsahu koncentrací 50 pmol l^{-1} – 2000 pmol l^{-1} . Podle autorů nanoMIP senzor díky velkému počtu rozpoznávacích míst a uzpůsobené geometrii pro insulin nabízí řadu výhod, a to především vysokou citlivost a selektivitu vůči insulinu s limitem detekce 26 fmol l^{-1} a 81 fmol l^{-1} v pufru a v lidské plazmě, potvrzující praktickou aplikaci u lůžka pacienta (point of care analysis). NanoMIP senzor vykazuje také velkou stabilitu po 168 dní, což by potvrzovalo robustnost daného senzoru⁶⁹.

Molekulárně imprintovaný polymer (MIP), který zanechává dutiny v polymerní matici s afinitou pro vybranou „templátovou“ molekulu a který mimikuje interakci zámku a klíče (lock and key) podle nás sice slibuje vysokou citlivost senzoru, ale proces imprintu je často nároč-

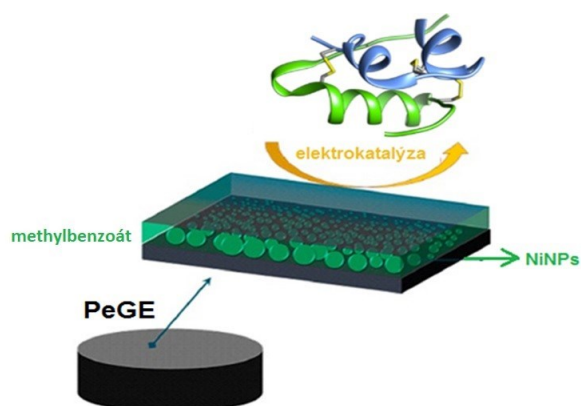
ný na reprodukovatelnost: 1) těžko kontrolovatelný proces radikálové polymerace vede ke značným odchylkám mezi jednotlivými šaržemi senzorů; 2) regenerace senzorů s MIP je často neúplná (vědecké publikace málokdy zařazují měření slepých vzorků a měří jen kalibrace od nízkých koncentrací k vysokým koncentracím a tak se může zdát, že senzor díky jisté hysterezi z předchozích měření funguje lépe, než by tomu odpovídala realita); 3) selektivita senzoru a jeho afinita k analytu bývá prakticky výrazně horší než u protilátky, výhodou může být ale aplikace MIP senzorů na analyty, pro které je produkce protilátek obtížná, např. nízkomolekulární látky.

Nedávno autoři⁷⁰ představili elektrochemický senzor pro kvantifikaci insulinu založený na modifikaci pentelkové grafitové elektrody nanočásticemi Ni (NiNP) a methylbenzoátem a testovaný pomocí cyklické a diferenční pulzní voltametrie (obr. 6). Pro nás byla překvapivá malá závislost oxidačního signálu insulinu na pH a podle našich zkušeností je třeba hodnotit nejen výšku, ale i polohu signálu. Úloha benzoátu není přesně definována, stejně jako elektrokatalytická aktivita niklových nanočástic. Krevní vzorky (lidské sérum) byly před vlastní insulinovou detekcí podrobeny precipitačnímu protokolu s ethanolom, přičemž do takto upraveného krevního séra byl následně insulin o známé koncentraci přidán. V tomto případě nelze tvrdit, že NiNP/MB/PeGE je slibným nástrojem pro detekci insulinu v biologických vzorcích, poskytující relevantní signály bez vedlejších interferencí⁷⁰.

Kamyabi M. a spol. v roce 2021 navrhli citlivý, rychlý a neenzymový elektrochemiluminiscenční (ECL) sen-



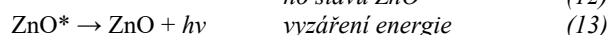
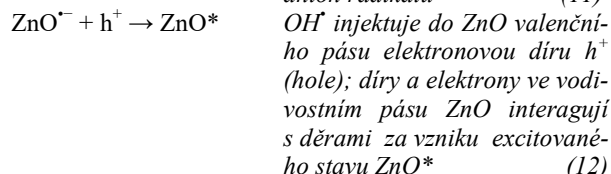
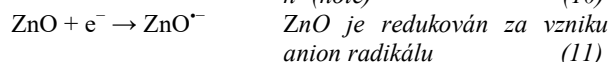
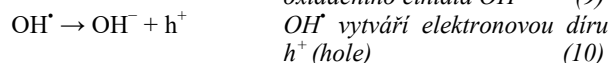
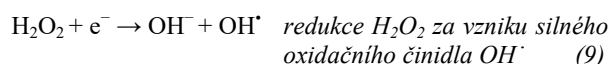
Obr. 5. Syntéza a eluce molekulárně imprintovaných nanočástic termo-elučním procesem a jejich zavedení na povrch tištěné platinové elektrody (upraveno podle⁶⁹)



Obr. 6. Schéma výroby senzoru NiNPs/(MB)/PeGE (upraveno podle⁷⁰)

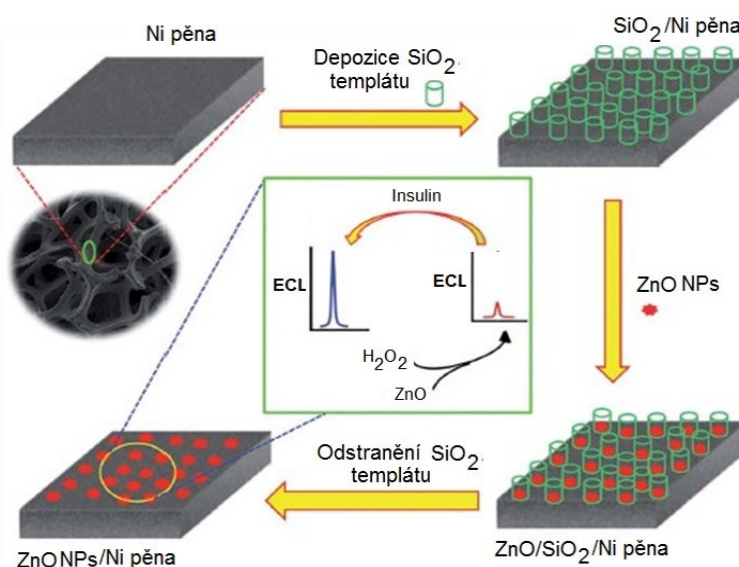
zor, založený na dekoraci niklové pěny ZnO nanočásticemi. Pro úpravu velikosti nanočástic ZnO byl použit templát oxidu křemičitého. Příprava ZnONP/Ni pěnové elektrody zde byla podrobně popsána a morfologie takto připraveného senzoru ZnONP/Ni-pěna byla charakterizována pomocí FESEM (field emission scanning electron microscopy), EDX (energy dispersive X-ray), XRD (X-ray diffraction) a EIS (electrochemical impedance spectroscopy). Elektrochemiluminiscence (ECL) senzoru ZnONP/Ni-pěna byla zkoumána v přirozeném médiu v přítomnosti H_2O_2 jako účinného ko-reaktantu. Se zvyšující se koncentrací insulinu bylo pozorováno výrazné zlepšení signálu ECL, což prokázalo zesilující účinek insulinu na ECL emisi (obr. 7).

Byl předložen pravděpodobný ECL reakční mechanismus mezi ZnONP a H_2O_2 :



V prostředí fosfátového pufru tento senzor vykazoval excelentní výkonnost při detekci insulinu v lineárním rozsahu koncentrací $3,57 \cdot 10^{-15} \text{ mol l}^{-1}$ až $2,94 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$ a velmi nízký detekční limit $1 \cdot 10^{-16} \text{ mol l}^{-1}$. Navržený ECL senzor s výbornou reprodukovatelností, teplotní stabilitou a vysokou citlivostí byl využit pro stanovení insulinu v reálných vzorcích krevního séra s velmi přijatelnými výsledky⁷¹. K přesvědčivé hodnověrnosti senzoru by přispěla srovnávací studie s jiným proteinem než s insulinem.

Pro potřeby klinické diagnostiky a účinné léčby s ohledem na ekonomickou a praktickou potřebnost je nevhodnějším řešením vícesložková analýza. Zde se nabízí simultánní analýza insulinu a glukosy. Problém je však nejen v překryvu oxidačních signálů obou analytů a ve vzájemném zapojení se do reakčních procesů, ale i ve velmi rozdílných koncentračních hladinách. A proto Zhao Y. a spol. v roce 2021 uvedli studii, v níž jsou představeny algoritmy umělé inteligence (AI), které pomáhají elektrochemickým metodám k překonání tohoto problému. Nejdříve se změní pomocí cyklické voltametrie proudové



Obr. 7. Modifikační proces výroby niklové pěnové elektrody se ZnO nanočásticemi pro ECL detekci insulinu (upraveno podle cit.⁷¹)

Tabulka I
Elektrochemické senzory insulinu a jejich stručná charakterizace

Senzor	Metoda	LOD	Linearita	Poznámka	Lit.
ZnONP/Ni pěnová elektroda	ECL	1 fM	3,57 fM – 2,94 nM	výborná reprodukovatelnost, teplotní stabilita a vysoká citlivost; využití pro stanovení insulinu v reálných vzorcích krevního séra	71
NanoMIP /SPPE	DPV	26 fM (pufr) 81 fM (lidská plazma)	50 pM – 2000 pM	vysoká citlivost a selektivita vůči insulinu, praktická aplikaci u lůžka pacienta	69
SiC/GCE	CV DPV amperometrie v průtoku (FIA)	3,3 pM (FIA) 20 nM (DPV)	100 pM – 600 pM (FIA) 200 pM – 600 nM (DPV)	rychlá příprava bez použití mediátorů, vysoká citlivost, výborná katalytická aktivita, stabilita	58
elektrochemie a AI (umělá inteligence) vičesložková analýza insulinu a glukosy	CV machine learning	pM (insulin) a mM (glukosa)	není uvedeno	přijatelný detekční limit a přesnost, nízká cena a vysoká účinnost, s potenciálem pro využití v klinické diagnostice	72
NiNP/ITO	CV, EIS, chrono- amperometrie	10 pM	100 pM – 2400 pM a 1 nM – 125 nM	potenciální biosenzor pro insulin	62
Si-CPE (silica gel modified carbon paste electrode)	DPAdSV a hydro- dynamická amperometrie	36 pM (hydrodynamická amperometrie) 4,8 nM (DPAdSV; pH 2) 6,7 nM (DPAdSV; pH 7,4)	90 pM – 1400 pM (hydrodynamická amperometrie) 10 nM – 560 nM (DPAdSV; pH 2) 30 nM – 360 nM (DPAdSV; pH 7,4)	snadná příprava, vysoká reprodukovatelnost, dobrá chemická a mechanická odolnost a snadná obnovitelnost povrchu, vysoká selektivita vůči insulinu v přítomnosti aminokyselin obsahujících síru	14
MWCNT – QD/SPE elektrodové pole (CdSe/ZnS QD)	CV	100 pM	100 pM – 5000 pM	přímá detekce pikomolárních koncentrací insulinu v kapce, ve fyziol. prostředí	67
CoONP/GO/PGE	CV	0,12 nM	0,46 nM – 100 nM	rutinní analýza insulinu ve farmaceutických vzorcích	68

Tabulka I
Pokračování

Senzor	Metoda	LOD	Linearita	Poznámka	Lit.
RuOx/CNT/GCE	CV amperometrie	1 nM	10 nM – 800 nM	zlepšení citlivosti a stability senzoru v důsledku elektrokatalytické aktivity	42
Au-AgNP/GQD/GCE	CV, DPV	1,1 nM	10 μ M – 120 μ M	spolehlivý a přesný senzor pro insulin v biologických a klinických vzorcích	73
SiNP/Nafion/GCE	DPV CV	3,1 nM	10 nM – 50 nM	nano-SiO ₂ vykazuje výraznou elektrokatalytickou aktivitu k oxidaci insulinu	60
NiONP/Nafion-MWCNT/SPE	CV, chrono- amperometrie EIS	6,1 nM	20,0 nM – 260 nM	dobrá reprodukovatelnost a stabilita	63
NiNP/MB(methylbenzoát)/PGE	CV	8,30 nM	25 nM – 450 nM	spolehlivost detekce insulinu v biologických vzorcích není průkazná	70
CoNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	25 nM	0,05 μ M – 5 μ M	vhodný elektrochemický senzor pro detekci insulinu	65
NiONP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV, chrono- amperometrie EIS	94 nM	0,25 μ M – 5 μ M	vhodný elektrochemický senzor pro detekci insulinu	64
NiONP/chitosan-MWCNT/PGE	CV, chrono- amperometrie EIS	260 nM	0,05 μ M – 5 μ M	vhodný kandidát na elektrochemický senzor pro insulin	7
CNT-NiCoO ₂ /Nafion/SPE	CV amperometrie	0,22 μ g ml ⁻¹	0,1 μ g ml ⁻¹ – 31,5 μ g ml ⁻¹	citlivá a stabilní odezva pro insulin	47
ZnNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	0,23 μ M	0,5 μ M – 5 μ M	rychlý, levný a efektivní senzor	66
CuNP/chitosan-MWCNT/SPCE	CV	1,11 μ M	0,1 μ M – 4 μ M		65
NiNP/chitosan-MWCNT/PGE	CV, chrono- amperometrie EIS	4,34 μ M	1 μ M – 5 μ M		7
CNF/SPCE	CV, DPV	1,7 μ M	1 μ M – 10 μ M		74
Bi ₂ O ₃ /SPCE	CV, DPV	1,8 μ M	1 μ M – 10 μ M		

křivky insulinu, glukosy a jejich směsi, následně je extrahováno sedm typických znaků voltametrické křivky jako charakteristických hodnot pro detekci koncentrací insulinu a glukosy. Nakonec, po naučení s využitím algoritmu (strojové učení – machine learning), jsou koncentrace insulinu a glukosy odděleny (obr. 8). Celý proces tak trvá asi tři minuty. S využitím tohoto přístupu lze detekovat insulin na pikomolární úrovni a glukosu na milimolární úrovni, což splňuje klinické požadavky. K ověření výkonnosti a účinnosti navržené metody byla tato metoda využita ke stanovení insulinu a glukosy ve fetálním hovězím séru a reálných klinických vzorcích krevního séra. Výsledky jsou uspokojivé, ukazující, že tato metoda může splňovat základní klinické potřeby. Tento vícesložkový testovací systém poskytuje přijatelný detekční limit a přesnost; má přednosti v nízké ceně a vysoké účinnosti, s potenciálem pro využití v klinické diagnostice⁷².

V témže roce Wang J. představil citlivý elektrochemický senzor pro stanovení insulinu v předepsaných léčích u pacientů s diabetem 2. typu. Senzor využívá Au-Ag nanočástice a kvantové tečky grafenu (Au-Ag NP/GQD). Pro přípravu Au-Ag NP/GQD modifikované GCE elektrody (Au-Ag NP/GQD/GCE) byly syntetizovány GQD hydrotermální metodou přímo na povrch GCE a následně byly na tento povrch elektrochemicky deponovány Au-AgNP. Stanovení insulinu pomocí CV a DPV ukázalo, že lineární rozsah koncentrací, limit detekce a citlivost odpovídaly hodnotám v rozsahu $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ – $120 \mu\text{mol l}^{-1}$; $1,1 \text{ nmol l}^{-1}$ a $0,242 \mu\text{A l} \mu\text{mol}^{-1}$. Selektivita navrženého insulinového senzoru byla zkoumána ve vzorku lidského séra, a to v přítomnosti biologických látek, jako jsou thiomocovina, glukosa, methionin, cystein,

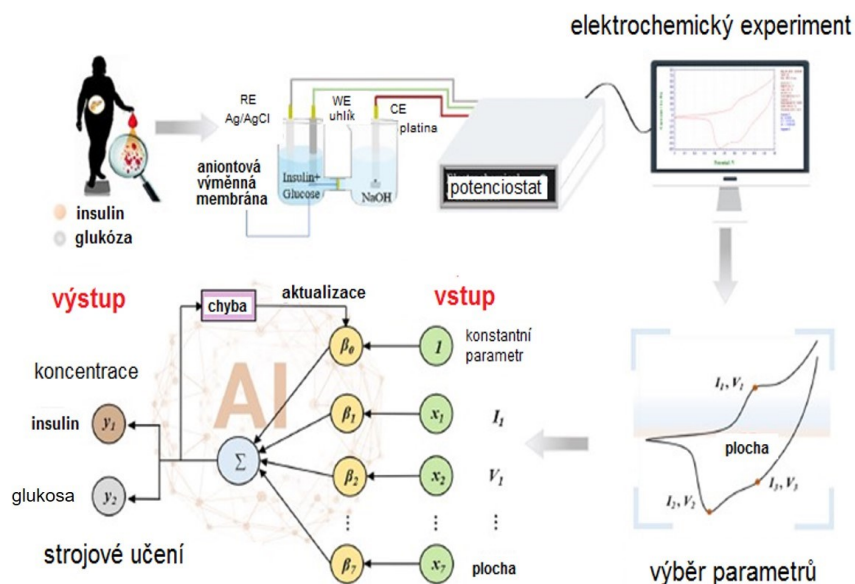
askorbová kyselina, močová kyselina a glutathion, a výsledky ukázaly, že přítomnost těchto látek stanovení insulinu neovlivňuje. Bylo by velmi užitečné rozšířit toto zjištění o podrobnější studii, proč je nanokompozit nevlivný k výše vyjmenovaným interferentům. Aplikovatelnost navrženého senzoru byla studována v injekcích insulinu glarginu a výsledky ukázaly přijatelné hodnoty regenerace a relativní směrodatné odchylky⁷³.

Kromě všech výše zmíněných elektrochemických senzorů se pro detekci insulinu velmi často používají i komerčně dostupné tištěné elektrody (SPCE) modifikované nanočásticemi. Naše prozatímní výsledky ukázaly, že insulin lze v jednotkách mikromolárních až stovkách nanomolárních koncentrací spolehlivě stanovit na SPCE modifikovaných uhlíkovými nanovláknky (carbon nanofibres, CNF) a nanočásticemi oxidu bismutu Bi_2O_3 . O využití těchto modifikovaných tištěných elektrod bude blíže pojednáno v následující kapitole.

6. Poznatky našich experimentů

6.1. Vliv modifikovaných elektrodoých povrchů

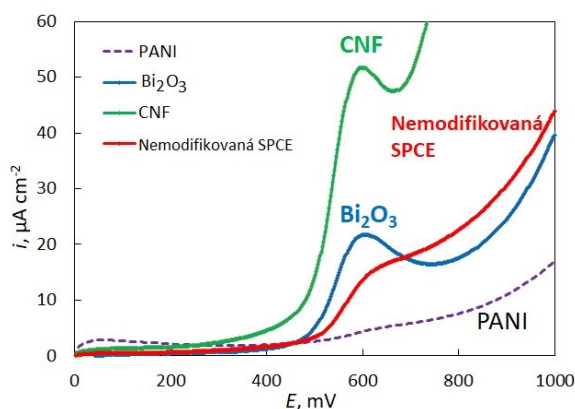
Na základě získaného vhledu do elektrochemického chování insulinu na různých typech chemicky modifikovaných senzorů, kdy citlivá detekce insulinu je většinou podmíněna katalytickým efektem nanočástic či nanokompozitů, jsme se na jedné straně dozvěděli mnoho zajímavých informací, ale na druhé straně jsme v článcích nenacházeli dostatečné vysvětlení jevů při zprostředkované elektrochemické detekci insulinu. Problém dostatečné



Obr. 8. Elektrochemická a AI (Artificial Intelligence) experimentální struktura (upraveno podle⁷²)

citlivosti a selektivity elektrochemického senzoru, různě modifikovaného nanomateriálem, lze vidět především v matici fyziologických vzorků, která obsahuje plno interferujících, často povrchově silně kontaminujících složek. Z hlediska aplikace potenciálních senzorů v klinickém výzkumu je nezbytné dozvědět se více o tom, jak se insulin v roztoku i na povrchu elektrody chová. Za tímto účelem jsme si položili několik otázek, na něž jsme se snažili najít odpověď. První otázka byla, jak je detekce insulinu podmíněna modifikovaným povrchem komerční SPCE ve fyziologickém prostředí. Na čtyřech tištěných elektrodách jsme pomocí voltametrie s lineární polarizací elektrody (linear sweep voltammetry – LSV) sledovali oxidační signál rekombinantního lidského insulinu v prostředí PBS a abychom sofistikovaně mohli komparaci signálů provést, byly proudy (I) převedeny podle plochy elektrody S na proudové hustoty ($i=I/S$). Výsledné LSV křivky jsou prezentovány na obr. 9. Voltametrie byla realizována pomocí μ Autolabu firmy Metrohm^{74–76}.

Jak je vidět z obrázku, nejnižší, skoro přehlédnutelný oxidační signál insulinu je zaznamenán na tištěné elektrodě modifikované polyanilinem (PANI); polymerní anilin v tomto fyziologickém prostředí oxidaci insulinu nepodporuje. Vzájemné porovnání intenzity oxidačních signálů pro insulin o stejné koncentraci získaných na nedomifikované elektrodě SPCE a Bi_2O_3 a CNF modifikovaných SPCE ukázalo, že správně zvolená povrchová modifikace může zněkolikanásobit citlivost detekce. I když na nedomifikované elektrodě oxidační signál insulinu je patrný, tak modifikace SPCE přispěla ke zvýšení citlivosti se stejnou energetickou synergií (potenciály jsou kolem 600 mV). Na první pohled vyšší oxidační signály na uhlíkových nanovláčkách (CNF – carbon nanofibers) než na nanočásticích Bi_2O_3 jsou ovlivněny vyšší proudovou odezvou základního elektrolytu – PBS pufru. Podobná situace se objevila



Obr. 9. LSV signály pro rekombinantní lidský insulin o koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ na nedomifikované a různě modifikované tištěné elektrodě SPCE (oxid bismutitý, uhlíková vlákna, polyanilin) v prostředí PBS pufru (pH 7,4). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

i při použití SPCE modifikovaných grafenem (není ukázáno). Pokud by byla aplikována korekce na základní linii (base line correction), pak by byly oxidační piky insulinu na obou posledně jmenovaných elektrodách velmi podobné. Na nedomifikované SPCE je mechanismus oxidace insulinu následován dalšími reakcemi a je možné, že CNF na svém povrchu vlastní další oxidovatelné skupiny nebo ke zvýšenému proudovému pozadí přispívají přítomné chloridy. Je také možné, že v případě PANI chloridy interagují s povrchem a brání insulinu v procesu přenosu elektronů.

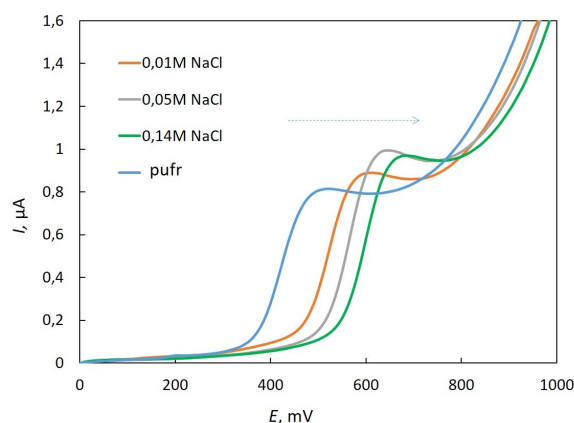
6.2. Vliv chloridů

Na základě poslední úvahy o vlivu chloridů jsme provedli experiment, který je zobrazen na obr. 10. Vliv chloridů se projevuje posunem oxidačního potenciálu insulinu do pozitivnějších hodnot oproti prostředí fosfátovému pufru, který chloridy neobsahoval.

Vliv iontů Cl^- podle našich úvah může posunout hodnotu oxidačního potenciálu insulinu prostřednictvím elektrostatické interakce, neboť insulin v prostředí pH 7,4 je záporně nabitý.

6.3. Vliv pH, iontové síly a koncentrace insulinu

Oxidační chování insulinu bylo sledováno na obou typech modifikovaných elektrod (CNF/SPCE , $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) nejen s ohledem na koncentraci insulinu ($1\text{--}20 \mu\text{mol l}^{-1}$), ale i v kontextu podmínek okolního prostředí, jako je pH ($1,8\text{--}11,0$), iontová síla a složení pufru (PBS – phosphate buffer saline, FA – fosfát-acetát, fosfát). Vůdčí myšlenkou provedené koncentrační závislosti byla práce⁷⁷ (Pocker měřil v rozsahu pH $1,1\text{--}11,2$ a efekt pH zkoumal při koncentraci insulinu $100 \mu\text{mol l}^{-1}$), zabývající se strukturními přechody monomer/dimer, přičemž se předpoklá-



Obr. 10. LSV oxidační signály insulinu ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) ve fosfátovém pufru (pH 7,4) s přidavkem různé koncentrace chloridových iontů (šipka naznačuje posun potenciálu se zvyšující se koncentrací chloridů). (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

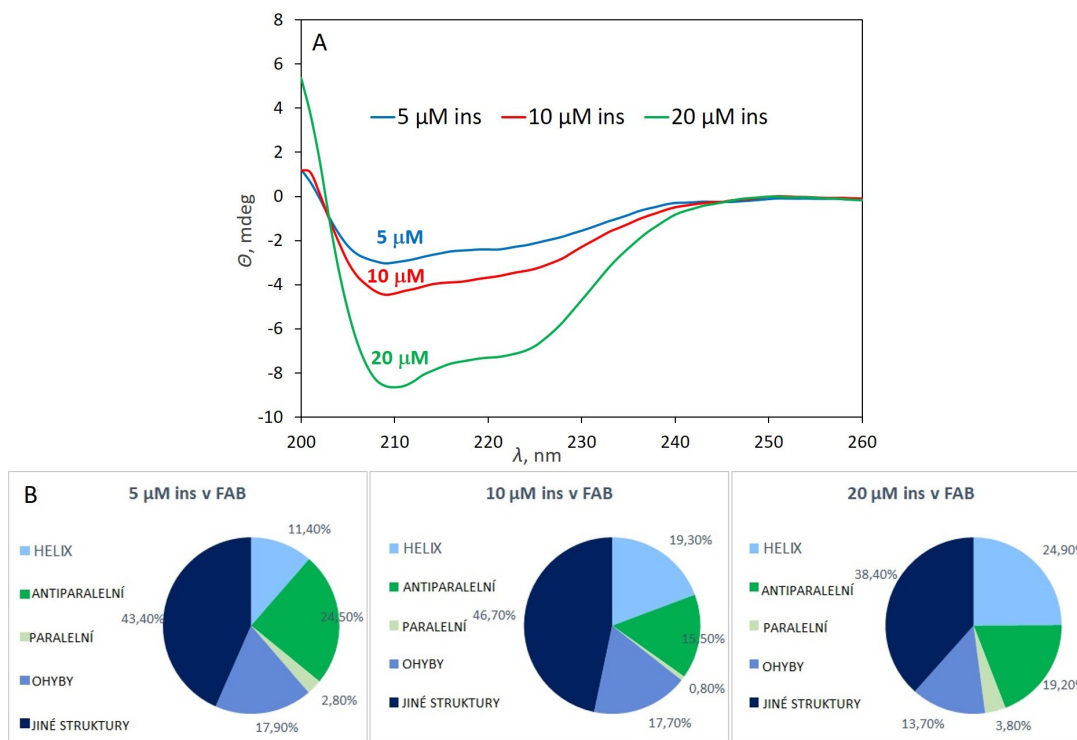
dalo, že monomerní insulin existuje při velmi nízkých koncentracích (maximálně do $2 \mu\text{mol l}^{-1}$); při vyšších koncentracích se tvoří především dimer. Jelikož tato práce hodnotí strukturální změnu nativního insulinu v závislosti na koncentraci z hlediska změny ve spektru cirkulárního dichroismu (CD), chtěly jsme se podívat, zda i elektrochemie bude schopná reflektovat strukturální přechod z monomeru na dimer v podobě viditelné změny v charakteru oxidačních signálů insulinu v důsledku měnící se koncentrace. Předpokládaná strukturální změna monomer/dimer však nebyla zatím elektrochemicky prokázána, což může být způsobeno fyziologickou hodnotou pH předpokládající přechod na monomerní strukturu bez ohledu na koncentraci insulinu⁷⁷. Na základě provedené koncentrační závislosti insulinu byla stanovena i hodnota LOD pro použité elektrodové modifikace (CNF/SPCE a $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) ve všech pufovaných prostředích a ukázalo se, že nejnižší hodnotu LOD poskytuje CNF/SPCE ($1,20\text{--}1,76 \mu\text{mol l}^{-1}$), oproti $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ ($1,67\text{--}1,86 \mu\text{mol l}^{-1}$)^{74–76}.

Vliv koncentrace na chování insulinu byl monitorován i z hlediska charakteru CD spekter, kdy s rostoucí koncentrací insulinu dochází ke zvýšení intenzity v CD spektru, a to ve všech pufovaných prostředích (obr. 11A). Sekundární struktura pak byla posouzena pomocí algorit-

mu BeStSel, což je webový server poskytující pro analýzu CD spekter metodu výběru beta struktury (Beta Structure Selection). Na server lze jednoduše přímo nahrát naměřená CD data (elipticita vs. vlnová délka). Originalita BeStSel spočívá v tom, že provádí podrobnou analýzu sekundární struktury, poskytující informace o osmi komponentách sekundární struktury, včetně paralelní β -struktury a antiparalelních β -listů se třemi různými skupinami stočení v prostoru^{78,79}. Z tohoto posouzení je zřejmé, že s rostoucí koncentrací dochází k poklesu zastoupení neuspořádaných struktur, zvyšuje se procentuální zastoupení β -listů, což lze právě vysvětlit posunem rovnováhy směrem ke struktuře dimeru (obr. 11B)⁷⁵.

Oxidační chování insulinu bylo sledováno i z hlediska vlivu iontové síly prostředí na obou typech modifikovaných elektrod (CNF/SPCE a $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$) v prostředí FA pufru o iontové síle $I = 0,2 \text{ mol l}^{-1}$ a $I = 0,55 \text{ mol l}^{-1}$. Vyšší iontová síla sice zvyšuje intenzitu oxidačních signálů insulinu, avšak naproti tomu samotný oxidační proces insulinu znesnadňuje (posun oxidačního signálu do pozitivnějších potenciálů), a to na obou typech modifikovaných elektrod^{74–76}.

Jelikož již dříve publikované CD spektrální studie prokázaly strukturální přechod monomer/dimer nejen vlivem koncentrace, ale i vlivem pH (cit.⁷⁷), bylo opět naším



Obr. 11. A) Vliv koncentrace insulinu (ins) v roztoku FA pufru (pH 7,4) na tvar CD spekter. B) Diagram zastoupení strukturálních uspořádání v molekule insulinu získaný z programu BeStSel. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

cílem zjistit, zda i elektrochemie bude schopna s ohledem na měnící se pH prostředí odrážet případné strukturální změny v molekule insulinu. Jinými slovy, zda bude docházet ke změně charakteru oxidačních signálů insulinu a prokáže se tak přechod z dimerní formy na formu monomerní či naopak. Bohužel ani v tomto případě existence rozlišené monomerní a dimerní struktury insulinu elektrochemicky prokázána nebyla.

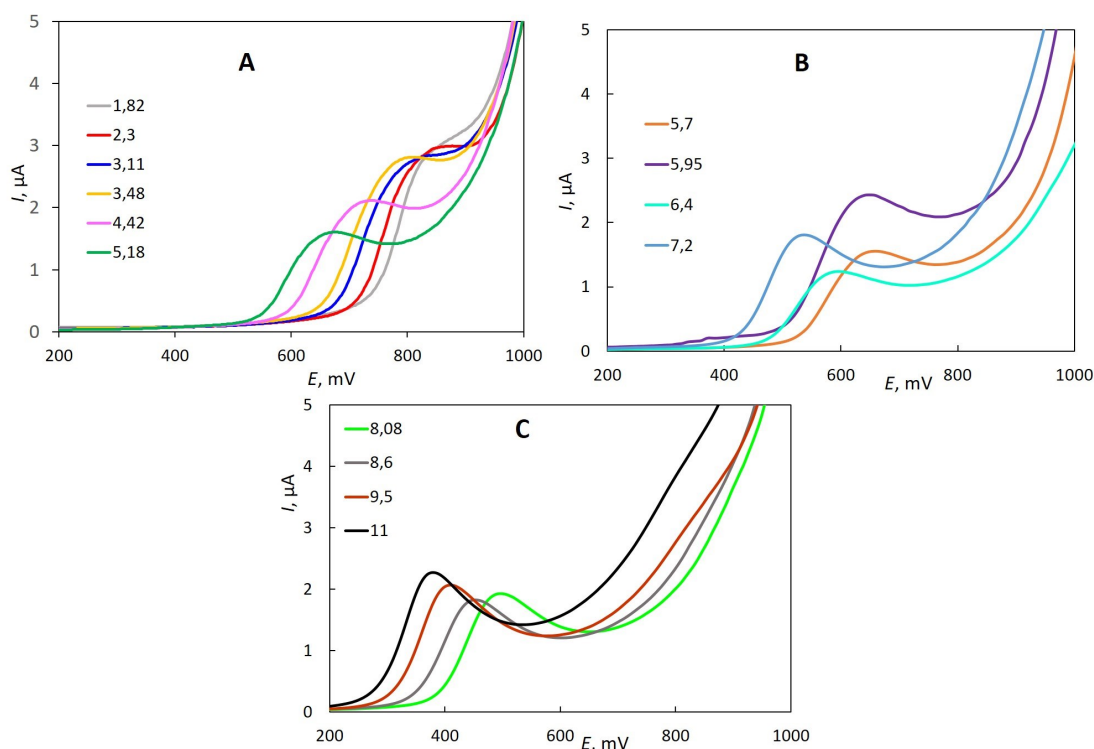
Insulin poskytoval charakteristické oxidační signály v celé škále pH (1,8–11,0) pufovaného prostředí na obou typech modifikovaných elektrod. $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ poskytuje podobný charakter oxidačních signálů jako CNF/SPCE. Zároveň i tato provedená pH závislost potvrdila, že na CNF/SPCE probíhá méně energeticky náročný oxidační proces insulinu ve srovnání s $\text{Bi}_2\text{O}_3/\text{SPCE}$ a navíc modifikace CNF poskytla oxidační signály insulinu s vyšší intenzitou. Zajímavostí zůstává, že na rozdíl od tyrosinu, který v závislosti E_p na pH vykazuje zlomy (v souladu pak s hodnotami jeho $\text{p}K_{a1} = 2,2$; $\text{p}K_{a2} = 9,2$; $\text{p}K_{a3} = 10,46$), u insulinu žádné zlomy pozorovány nebyly a v celkové škále pH hodnot směrnice dE_p/pH odpovídala hodnotě -52 mV na jednotku pH. Tyrosin v oblasti fyziologického pH poskytoval hodnotu -57 mV na jednotku pH (cit.^{74,80}).

Pokud se pozorně podíváme na obrázky pH závislosti, tak voltametrické píky mají v kyselých a alkalických oblastech (obr. 12A a 12C) kromě postupného sledu potenciálů píků

(E_p) i postupný mírně klesající a mírně stoupající trend i ve výškách píků (I_p). Jinak se chová insulin v oblasti od jeho izoelektrického bodu ($\sim 5,7$) až do $\text{pH} \sim 7,5$ (obr. 12B), kde posloupnost v I_p je narušena. I když nebyly voltamogramy snímány na stejné elektrodě, popsany trend se opakoval a podněcoval myšlenku, že struktura insulinu může být podle jeho náboje ovlivňována nábojem i morfologií povrchu elektrody⁷⁴.

6.4. Nativní a denaturovaný stav insulinu v elektrochemické detekci

Je obecně známo, že za stabilitu nativní struktury proteinů jsou zodpovědné nejen hydrofobní interakce, ale i disulfidické můstky. Vlivem faktorů prostředí, jako je pH, teplota, ale i vlivem chemických činidel je možné tyto disulfidické můstky rozrušit, a pak hovoříme o denaturaci proteinů. Naše experimenty byly vedeny snahou odpovědět opět na zajímavé otázky. Jaká bude role disulfidických můstků a s tím související denaturační změny ve struktuře insulinu a zda bude zaznamenán redoxní proces cystein-cystin? Tepelná denaturace či chemická denaturace je známá z výsledků studií pomocí CD spekter, avšak neexistují studie, které by se na denaturační proces podívaly pod drobnohledem elektrochemie. Vzhledem k tomu, že insulin je malá molekula, tak se může velmi krátce po

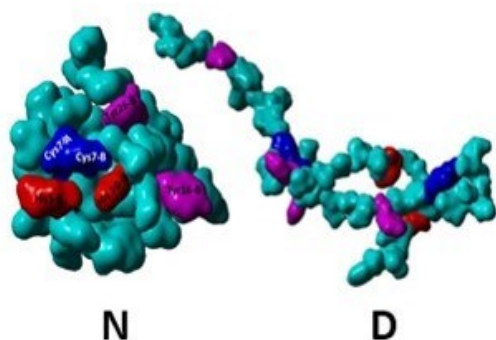


Obr. 12. LSV oxidační signály insulinu ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) v oblasti kyselého (A), neutrálního (B) a alkalického pH (C) fosfátového-acetátového pufru (FA pufr; pH 1,82–10,99) na CNF/SPCE. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy; pro nebarevnou tištěnou verzi obrázku je třeba poznamenat, že zvyšující se hodnota pH posouvá oxidační signály insulinu k negativnějším potenciálům).

denaturaci opět svinout do určité náhodné konformace, která však nemusí být totožná s nativní strukturou (nepublikované výsledky).

6.4.1. Tepelná denaturace insulínu

Vlivem teploty dochází k rozrušení terciární a sekundární struktury proteinů, tedy i k rozštěpení disulfidických vazeb. Přesto, že tepelná denaturace insulínu byla podrobně studována již dříve, tak se jednalo především o CD spektrální studie či diferenční skenovací kalorimetrické (DSC) a izotermální titrační kalorimetrické (ITC) studie, umožňující navíc i vyhodnocení teploty tání insulínu (melting point, T_m) odpovídající hodnotě 68 °C (cit.⁸¹). Naproti tomu nejsou známy literární zdroje, které by tepelnou denaturaci insulínu posuzovaly z hlediska elektrochemie. Naše experimenty prokázaly, že i elektrochemické metody jsou schopny detekovat rozdíl mezi nativní a denaturovanou formou insulínu, a to na základě rozdílné intenzity oxidačního signálu insulínu. Předpokládali jsme, že intenzita (tedy výška) oxidačních signálů insulínu nám může zodpovědět otázku, kolik molekul tyrosinu se bude na oxidačním procesu podílet a zda v průběhu denaturace došlo k úplnému rozvinutí struktury insulínu se všemi čtyřmi molekulami tyrosinu přístupnými elektrodě. Důležitým předpokladem pro úplné rozvinutí řetězce do lineární podoby je existence nativního insulínu v monomerní formě. Právě v tomto případě je zde zajištěn jasný přechod nativní (N)/denaturovaná forma (D), jak naznačuje i simulovaný YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application; dostupné z <http://www.yasara.org/>) model (obr. 13). Studie provedené pomocí molekulové dynamiky ukázaly, že v nativní struktuře insulínu jsou dvě molekuly tyrosinu lokalizovány uvnitř struktury a dvě jsou exponované na povrchu, a tudíž se mohou významně podílet na oxidačním signálu insulínu. V případě denaturace insulínu a rozpletení řetězce do lineární formy lze očekávat dvojnásobný nárůst oxidačního signálu, z důvodu zpřístupnění všech čtyř molekul tyrosinu.



Obr. 13. YASARA model pro nativní a denaturovanou formu insulínu. Tyrosiny jsou v barvě fialové, cystein-cystin v barvě modré a histidin v barvě červené. (Barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chem. Listy).

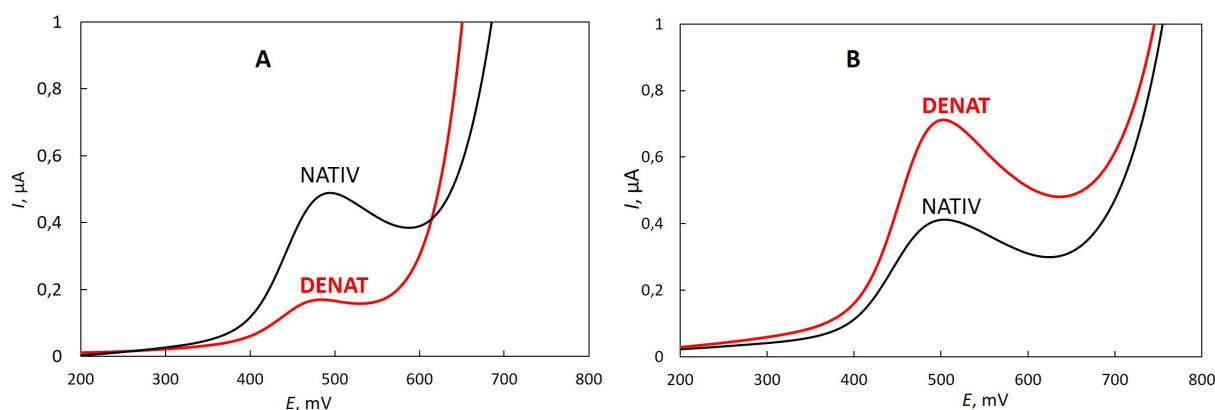
Tepelný denaturační proces byl posuzován z několika hledisek, a to z hlediska a) vlivu struktury insulínu, b) času denaturace a c) vlivu prostředí, v němž denaturační proces probíhá. Ideou provedených experimentů byla nejen zvědavost, jak se budou lišit oxidační signály denaturovaného insulínu, jehož původní nativní struktura byla monomerní ($c = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$) a jehož původní nativní struktura byla dimerní ($c = 10 \mu\text{mol l}^{-1}$). Jinými slovy, zda charakter získaných oxidačních signálů potvrdí, že denaturace monomerní struktury povede přímo k úplnému rozvinutí struktury do podoby D (obr. 13), což se může projevit dvojnásobnou intenzitou oxidačních signálů nebo denaturační proces z dimerní struktury bude více komplexnější a proběhne tak ve více po sobě jdoucích krocích. Ukázalo se, že k úplnému rozvinutí nativní monomerní struktury došlo již po 30 minutách, kdy bylo zaznamenáno téměř dvojnásobné zvýšení oxidačních signálů, avšak úplná denaturace dimerní struktury byla časově náročnější a pravděpodobně se jednalo o dvoukrokovou denaturaci. Svou roli během denaturačního procesu sehrálo i pufované prostředí, v němž denaturace probíhala, a potvrdilo se, že nativní struktura insulínu je obecně stabilnější v prostředí FA pufru oproti PBS pufru a potřebuje tak delší čas pro úplnou denaturaci⁷⁶.

Tepelná denaturace byla sledována i prostřednictvím CD spekter. V této studii se vycházelo z publikace⁸¹ uvádějící, že dimerní struktura insulínu se rozbaluje při teplotě ~ 70 °C a dva získané monomerní mutanty se rozplétají při vyšších teplotách. CD termálně denaturační experiment byl realizován pro insulín o koncentraci $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ v PBS pufru (pH 7,4) v rozsahu teplot 15–95 °C. Z provedené teplotní závislosti bylo možné usoudit, že se jedná o dvoufázový proces, což koreluje i se získanými elektrochemickými výsledky pro koncentraci insulínu $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ v prostředí PBS (cit.⁷⁵).

6.4.2. Chemická denaturace insulínu

Pro chemickou denaturaci insulínu sledovanou pomocí elektrochemie byla jako běžně využívaná denaturační činidla vybrána močovina a guanidin hydrochlorid. Výběr těchto denaturačních činidel byl učiněn z důvodu pouhé ztráty nativního stavu insulínu (rozvolnění struktury) aniž by docházelo k rozštěpení disulfidických vazeb. Tudíž nedochází k oddělení insulínových řetězců A a B jako v případě denaturačního činidla 1,4-dithiothreitolu (DTT). Navíc DTT je elektrochemicky aktivní, proto je nutné po skončení denaturace provést odsolení (Amicon 3K dialyzační kolonka; „cut off“ 3 kDa), což se pro nás stalo komplikací (viz další text). Molekulová hmotnost insulínu činí 5,8 kDa, po denaturaci pomocí DTT se oddělí řetězec A a B s tím, že jeden z řetězců bude menší než 3 kDa, a tudíž se nezachytí na dialyzační membráně, ale projde přes membránu. Denaturaci pomocí DTT proto bylo možné zkoumat pouze spektrálně.

Vysoká koncentrace močoviny (8 mol l^{-1} v prostředí 30 mM MOPS – 3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina; pH 7,0) a guanidin hydrochloridu (5 mol l^{-1} v prostředí 0,1 M TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan; pH 7,4)



Obr. 14. Diferenční pulzní voltamogramy nativního (NATIV) a denaturovaného (DENAT) insulinu v 30 mM MOPS pufru: 3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina, pH 7,0. Chemická denaturace byla provedena pomocí 8 M močoviny s následným odsolením na dialyzační kolonce (A) bez odsolení (B)

byla vybrána z důvodu, že použitá takto vysoká koncentrace denaturačního činidla by měla zajistit úplnou denaturaci insulinu v rozpletení řetězců. Toto tvrzení lze podložit i faktem z publikace⁸² uvádějící, že při použití močoviny jako denaturačního činidla o koncentraci 0–3 mol l⁻¹ je možno očekávat přítomnost i nativního proteinu, při koncentraci 3–6 mol l⁻¹ dochází k přechodu mezi nativní a denaturovanou formou a při koncentraci močoviny vyšší než 6 mol l⁻¹ bude zajištěna úplná denaturace proteinu. Postupy chemické denaturace močovinou i guanidin hydrochloridem byly prováděny dle publikací^{83,84}.

Je známo, že močovina jako denaturační činidlo vytváří vodíkové vazby s –NH i –CO skupinami exponovaných peptidových vazeb a oslabuje tak hydrofobní efekt, jež je hlavním příspěvkem ke stabilitě nativní struktury proteinu. Důsledkem tohoto chování je pak rozvolnění nativní struktury proteinu. Denaturační proces byl nejdříve prováděn na základě literatury tak, že byl insulin denaturován v prostředí 30 mM MOPS pufru obsahujícím 8 M močovinu a po 15 minutách denaturace byl odsolen na dialyzační kolonce. Výsledek však nebyl uspokojivý, protože oxidační signál denaturovaného insulinu je značně nižší než oxidační signál nativního insulinu. Tento jev může být důsledkem odsolení na kolonce, což dokládá i publikace⁸⁵, která tvrdí, že jakmile je močovina odstraněna po denaturaci dialýzou, dochází působením vzdušného kyslíku k opětovné renaturaci proteinu a spontánně se vytváří sekundární a terciární struktura. Insulin, vzhledem ke své velikosti, se ihned po denaturaci sbalí, avšak tato nově vytvořená struktura nemusí odpovídat struktuře nativního insulinu. Může se vytvořit jakákoliv náhodná energeticky málo výhodná struktura, způsobující značné snížení oxidačního signálu denaturovaného insulinu. Proto byl pro další zkoumání, po předchozím ověření, že močovina není elektroaktivní na elektrodě, využit postup bez odsolení a insulin byl podroben denaturačnímu procesu přes noc. A ukázalo se, že oxidační signál denaturovaného insulinu byl dle očekávání cca 2× vyšší ve srovnání s oxidačním

signálem nativního insulinu, což by dokazovalo, že dojde k úplnému rozvinutí řetězce do lineární podoby a elektrodě tak budou přístupné všechny čtyři molekuly tyrosinu (obr. 14)⁷⁶.

Guanidin hydrochlorid jako denaturační činidlo působí podobně jako močovina, tedy taktéž oslabuje hydrofobní efekt zajišťující stabilitu nativní struktury proteinů. V tomto případě byl využit denaturační postup dle publikace^{83,84} (5 M guanidin hydrochlorid v 0,1 M TRIS; pH 7,4) s následným odsolením denaturačního činidla po 6 hodinách na Amicon kolonce a stejně tak, jako v případě močoviny, byl zaznamenán stejný charakter oxidačního chování denaturovaného insulinu. Proto byla i v tomto případě, po ověření elektrochemické neaktivity guanidin hydrochloridu, provedena následná elektrochemická analýza denaturovaného insulinu bez předchozího odsolení.

Chemická denaturace insulinu byla zkoumána také pomocí spekter cirkulárního dichroismu. V tomto případě byl jako denaturační činidlo využit 1,4-dithiothreitol. DTT, známý jako Clelandovo činidlo, se využívá pro redukci disulfidických můstků v proteinech. Samotný DTT je také elektroaktivní, jeho redoxní potenciál je –0,33 V při pH 7. S rostoucím pH nad hodnotu 7 je jeho redukční schopnost omezená až se úplně vytrácí. Dobře se rozpouští ve vodných roztocích, ale i v některých organických rozpouštědlech a má malou schopnost podléhat oxidaci vzdušným kyslíkem. Chemická denaturace insulinu ($c = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$) v PBS (pH 7,4) probíhala pomocí přídatku 10 mM DTT. Jelikož DTT sám o sobě absorbuje v oblasti vlnových délek 200–208 nm a může tak měnit tvar CD spektra insulinu, byl denaturační proces sledován pouze v rozmezí vlnových délek 208–250 nm, a tudíž nebylo možné využít algoritmu BeStSel pro analýzu sekundární struktury. V průběhu chemické denaturace dochází k postupnému nasycení a na základě výpočtu kinetiky reakce se ukázalo, že se jedná o kinetiku 1. řádu. Po 30 minutách denaturace však dochází ke zlomu a kinetika procesu se mění⁷⁵. Popsané denaturační studie jasně indi-

kuji neustálý dialog mezi experimentem, dosavadním poznatkem a vlastní invencí.

7. Závěr

Největším přáním a přímo touhou analytického elektrochemika je získat pro daný analyt levný, přenosný, lehce obslužný, citlivý a selektivní senzor. Aby všechny tyto atributy byly splněny také v případě insulinu, jsou poslední dva jmenované atributy velkou výzvou, protože: 1) detekční limit pro insulin je velmi nízký a odpovídá jednotkám pikomolárních koncentrací a 2) selektivita v reálném vzorku, kde je mnoho interferujících látek, včetně konkurujících proteinů, je ohrožena. Často, a to nejen v případě insulinu, se objeví rozličné strategie, jak čelit nízké citlivosti a nízké selektivitě senzoru. Důraz je kladen na ty parametry, z nichž jsou užitečné informace o příčině odezvy senzoru. Tyto informace mohou vývoj robustního elektrochemického senzoru značně podpořit. I když denně vychází nespočet článků o nových citlivých senzorech s příslibem jejich perspektivní aplikace, jen málokterý se skutečně využije. Větší měrou se tato skutečnost objevuje v oblasti biosenzorů, kde je propast mezi navrženými a skutečně používanými senzory ještě markantnější.

Náš článek si všímá elektrochemických senzorů, které pro stanovení insulinu využívají různých nanokompozitních povrchových modifikací. Na návrhy senzorů se díváme více kriticky, ovšem bez zpochybňování výsledků, které mohou vést k další zajímavé studii, k dalším inovacím a k vysvětlením jevů, jež dosud vysvětleny nebyly. Je jasné, že insulin pro svou oxidační přeměnu potřebuje podporu, to znamená být aktivován k přenosu elektronů a protonů, s největší pravděpodobností prostřednictvím svého tyrosinu.

Za zamyšlení stojí několik faktů, které by stály za objasnění, tj.: (a) různé citlivý oxidační signál insulinu v závislosti na povrchové modifikaci elektrody (morfologie, chemismus); (b) oxidační potenciál volného a vázaného tyrosinu nemusí být zcela identický; (c) vedle tyrosinu mohou být v insulinu oxidovány cysteiny a třeba i histidiny; (d) katalýza oxidace insulinu nanočásticemi a nanokompozity v závislosti na jejich složení a různých poměrech složek; (e) existence povrchové denaturace insulinu; (f) odlišná konformace insulinu po chemické denaturaci v důsledku odstranění denaturačního činidla pomocí dialýzy.

Závěrem lze konstatovat, že cesta úspěšné aplikace nově navrženého insulinového senzoru do klinické praxe není snadná. Každá analýza reálného vzorku vydává elektrodu (senzor) na milost složkám matrice a tento klíčový moment je nutné u každého navrženého senzoru individuálně řešit. Z hlediska insulinu, jehož koncentrace se v reálném vzorku pohybuje v řádu pikomolárních koncentrací, je toto řešení obzvláště náročné.

Seznam zkratk a symbolů

BeStSel	software (Beta Structure Selection)
CD	cirkulární dichroismus
CHIT	chitosan
CNT	uhlíková nanotrubička (carbon nanotube)
CNF	uhlíkové nanovláknko (carbon nanofiber)
DM	diabetes mellitus
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie (differential scan calorimetry)
DTT	1,4-dithiothreitol
ECL	elektrochemiluminiscence (electrochemiluminescence)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
GCE	elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
ITC	izotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
MIP	molekulárně vtištěný polymer (molecular imprinted polymer)
MOPS	3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
MWCNT	vicestěnná uhlíková nanotrubička (multi wall-ed carbon nanotube)
NP	nanočástice (nanoparticle)
PBS	roztok fosfátového pufru (phosphate buffer saline)
PeGE	pentelková grafitová elektroda (pencil graphite electrode)
QDs	kvantové tečky (quantum dots)
Tyr	tyrosin
YASARA	molekulová dynamika (Yet Another Scientific Artificial Reality Application)

LITERATURA

1. Palecek E., Tkac J., Bartosik M., Bertok T., Ostatna V., Palecek J.: *Chem. Rev.* 115, 2045 (2015).
2. Mayer J. P., Zhang F., DiMarchi R. D.: *Biopolymers* 88, 687 (2007).
3. Cabrera O., Berman D. M., Kenyon N. S., Ricordi C., Berggren P. O., Caicedo A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2334 (2006).
4. Fu J. Q., Cui Q., Yang B., Hou Y. Y., Wang H. H., Xu Y. Y., Wang D. F., Zhang Q., Pi J. B.: *Food Chem. Toxicol.* 100, 161 (2017).
5. Hovancova J., Sisolakova I., Orinakova R., Orinak A.: *J. Solid State Electrochem.* 21, 2147 (2017).
6. Buchanan T. A., Xiang A. H.: *J. Clin. Invest.* 115, 485 (2005).
7. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Garcia D. R., Shylenko O., Radonak J.: *Electroanalysis* 31, 103 (2019).
8. Maghsoudi A. S., Hassani S., Akmal M. R., Ganjali M. R., Mirnia K., Norouzi P., Abdollahi M.: *Int. J. Nanomed.* 15, 2219 (2020).

9. Sabu C., Henna T. K., Raphey V. R., Nivitha K. P., Pramod K.: *Biosens. Bioelectron.* 141, 111201 (2019).
10. Wang J., Musameh M.: *Anal. Chim. Acta* 511, 33 (2004).
11. Frasconi M., Tortolini C., Botre F., Mazzei F.: *Anal. Chem.* 82, 7335 (2010).
12. Burgi W., Briner M., Franken N., Kessler A. C.: *Clin. Biochem.* 21, 311 (1988).
13. Tanaka T., Matsunaga T.: *Anal. Chem.* 72, 3518 (2000).
14. Jaafariasl M., Shams E., Amini M. K.: *Electrochim. Acta* 56, 4390 (2011).
15. Luo Y., Huang K. X., Xu H. B.: *Anal. Chim. Acta* 553, 64 (2005).
16. Hvass A., Skelbaek-Pedersen B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 551 (2005).
17. Ortner K., Buchberger W., Himmelsbach M.: *J. Chromatogr. A* 1216, 2953 (2009).
18. Visser N. F. C., van Harmelen M., Lingeman H., Irth H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 451 (2003).
19. Taghdisi S. M., Danesh N. M., Lavaee P., Emrani A. S., Ramezani M., Abnous K.: *Anal. Lett.* 48, 672 (2015).
20. Wang Y., Li J. H.: *Anal. Chim. Acta* 650, 49 (2009).
21. Turner A. P. F., Chen B. N., Piletsky S. A.: *Clin. Chem.* 45, 1596 (1999).
22. Sanghera N., Anderson A., Nuar N., Xie C., Mitchel D., Klein-Seetharaman J.: *Int. J. Parallel Emergent Distrib. Syst.* 32, 119 (2016).
23. Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosens. Bioelectron.* 16, 121 (2001).
24. Taguchi M., Ptitsyn A., McLamore E. S., Claussen J. C.: *J. Diabetes Sci. Technol.* 8, 403 (2014).
25. Yoo E. H., Lee S. Y.: *Sensors* 10, 4558 (2010).
26. Pisoschi A. M.: *Biochem. Anal. Biochem.* 1, 1000e119 (2012).
27. Updike S. J., Hicks G. P.: *Nature* 214, 986 (1967).
28. Mosbach K., Danielsson B.: *Biochim. Biophys. Acta* 364, 140 (1974).
29. Mehrotra P.: *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* 6, 153 (2016).
30. Hovorka R., Nodale M., Haidar A., Wilinska M. E.: *Diabetes Technol. Ther.* 15, 4 (2013).
31. Thabit H., Hovorka R.: *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 41, 105 (2012).
32. Zhang M. G., Mullens C., Gorski W.: *Anal. Chem.* 77, 6396 (2005).
33. Cheng L., Pacey G. E., Cox J. A.: *Anal. Chem.* 73, 5607 (2001).
34. Hart J. P., Crew A., Crouch E., Honeychurch K. C., Pemberton R. M.: *Anal. Lett.* 37, 789 (2004).
35. Poorahong S., Thammakhet C., Thavarungkul P., Limbut W., Numnuam A., Kanatharana P.: *Microchim. Acta* 176, 91 (2012).
36. Wang J., Rivas G., Cai X. H., Chicharro M., Farias P. A. M., Palecek E.: *Electroanalysis* 8, 902 (1996).
37. Akanda M. R., Sohail M., Aziz M. A., Kawde A. N.: *Electroanalysis* 28, 408 (2016).
38. Navratil R., Kotzianova A., Halouzka V., Opletal T., Triskova I., Trnkova L., Hrbac J.: *J. Electroanal. Chem.* 783, 152 (2016).
39. Li X. C., Triskova I., Trnkova L.: *Electrochim. Acta* 442, 141921 (2023).
40. Trnkova L., Triskova I., Cechal J., Farka Z.: *Electrochem. Commun.* 126, 107018 (2021).
41. Salimi A., Noorbakhash A., Sharifi E., Semnani A.: *Biosens. Bioelectron.* 24, 792 (2008).
42. Wang J., Tangkuaram T., Loyprasert S., Vazquez-Alvarez T., Veerasai W., Kanatharana P., Thavarungkul P.: *Anal. Chim. Acta* 581, 1 (2007).
43. Salimi A., Roushani M., Soltanian S., Hallaj R.: *Anal. Chem.* 79, 7431 (2007).
44. Cox J. A., Gray T. J.: *Anal. Chem.* 61, 2462 (1989).
45. Gorski W., Aspinwall C. A., Lakey J. R. T., Kennedy R. T.: *J. Electroanal. Chem.* 425, 191 (1997).
46. Pikulski M., Gorski W.: *Anal. Chem.* 72, 2696 (2000).
47. Arvinte A., Westermann A. C., Sesay A. M., Virtanen V.: *Sens. Actuators, B* 150, 756 (2010).
48. Brabec V.: *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 116, 69 (1980).
49. Ozcan A., Sahin Y.: *Biosens. Bioelectron.* 31, 26 (2012).
50. Dourado A. H. B., Pastrian F. C., De Torresi S. L. C.: *An. Acad. Bras. Cienc.* 90, 607 (2018).
51. Enache T. A., Oliveira-Brett A. M.: *J. Electroanal. Chem.* 655, 9 (2011).
52. Malfoy B., Reynaud J. A.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 213 (1980).
53. Suprun E. V., Zharkova M. S., Morozovich G. E., Veselovsky A. V., Shumyantseva V. V., Archakov A. I.: *Electroanalysis* 25, 2109 (2013).
54. Cai X. H., Rivas G., Farias P. A. M., Shiraishi H., Wang J., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 332, 49 (1996).
55. Zhu S. Y., Zhang J., Zhao X. E., Wang H., Xu G. B., You J. M.: *Microchim. Acta* 181, 445 (2014).
56. Ogura K., Kobayashi M., Nakayama M., Miho Y.: *J. Electroanal. Chem.* 463, 218 (1999).
57. Zinola C. F., Rodriguez J. L., Arevalo M. C., Pastor E.: *J. Electroanal. Chem.* 585, 230 (2005).
58. Salimi A., Mohamadi L., Hallaj R., Soltanian S.: *Electrochem. Commun.* 11, 1116 (2009).
59. Kivlehan F., Lanyon Y. H., Arrigan D. W. M.: *Langmuir* 24, 9876 (2008).
60. Amini N., Gholivand M. B., Shamsipur M.: *J. Electroanal. Chem.* 714, 70 (2014).
61. Mahreni A., Mohamad A. B., Kadhum A. A. H., Daud W. R. W., Iyuke S. E.: *J. Membr. Sci.* 327, 32 (2009).
62. Yu Y. N., Guo M. S., Yuan M. W., Liu W. T., Hu J. B.: *Biosens. Bioelectron.* 77, 215 (2016).
63. Rafiee B., Fakhari A. R.: *Biosens. Bioelectron.* 46, 130 (2013).
64. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Trnkova L., Garcia D. R., Radonak J.: *Bioelectro-*

- chemistry 130, 107326 (2019).
65. Sisolakova I., Hovancova J., Orinakova R., Orinak A., Trnkova L., Triskova I., Farka Z., Pastucha M., Radonak J.: *J. Electroanal. Chem.* 860, 113881 (2020).
 66. Sisolakova I., Hovancova J., Chovancova F., Orinakova R., Maskalova I., Orinak A., Radonak J.: *Electroanalysis* 33, 627 (2021).
 67. Singh V.: *Mater. Lett.* 254, 415 (2019).
 68. Razmi H., Ezzati L., Khorablou Z.: *J. Electrochem. Soc.* 166, B961 (2019).
 69. Cruz A. G., Haq I., Cowen T., Di Masi S., Trivedi S., Alanazi K., Piletska E., Mujahid A., Piletsky S. A.: *Biosens. Bioelectron.* 169, 112536 (2020).
 70. Kouchakinejad S., Babae S., Roshani F., Kouchakinejad R., Shirmohammadi N., Kaki S.: *Chem. Phys. Lett.* 759, 137987 (2020).
 71. Kamyabi M. A., Alipour Z., Moharramnezhad M.: *Anal. Methods* 13, 1003 (2021).
 72. Zhao Y. L., Zhang H. Y., Li Y., Yu X. D., Cai Y., Sha X. P., Wang S. Y., Zhan Z. K., Xu J. H., Liu L. Q.: *Biosens. Bioelectron.* 186, 113291 (2021).
 73. Wang J., Liu C. Y., Hua J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* 16, 211016 (2021).
 74. Seveldová P.: *Redoxní procesy insulinu na uhlíkových tištěných elektrodách. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 75. Nosková N.: *Denaturační a agregační stavy insulinu v jeho redukované a oxidované formě. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 76. Velecká M.: *Elektrochemická analýza insulinu. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 77. Pocker Y., Biswas S. B.: *Biochemistry* 19, 5043 (1980).
 78. Micsonai A., Wien F., Bulyaki E., Kun J., Moussong E., Lee Y. H., Goto Y., Refregiers M., Kardos J.: *Nucleic Acids Res.* 46, W315 (2018).
 79. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y. H., Goto Y., Refregiers M., Kardos J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E3095 (2015).
 80. Brezanová A.: *Redoxní procesy elektroaktivních aminokyselin. Bakalářská práce.* Masarykova univerzita, Brno 2022.
 81. Huus K., Havelund S., Olsen H. B., van de Weert M., Frokjaer S.: *Biochemistry* 44, 11171 (2005).
 82. Wingfield P. T.: *Curr. Protoc. Protein Sci.* (2001).
 83. Pace N. C., Grimsley G. R., Scholtz M. J.: *Denaturation of Proteins by Urea and Guanidine Hydrochloride.* Wiley-VCH, Weinheim 2005.
 84. Jiang C. T., Chang J. Y.: *FEBS Lett.* 579, 3927 (2005).
 85. Koolman J., Roehm K. H.: *Barevný atlas biochemie.* Grada, Praha 2012.

L. Trnková and I. Trísková (*Department of Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice, Brno, Czech Republic*): **Electroanalysis of Insulin on Nanocomposite Electrodes**

The article notes the latest presented work on the electrochemical detection of insulin and presents a critical view of the research and development of its electrochemical non-enzymatic sensors. It monitors the effect of experimental conditions on the insulin oxidation signal and considers the catalytic effects of nanoparticles or nanocomposites deposited on the surfaces of the electrochemical sensor.

Keywords: insulin, tyrosine, electrochemistry, sensor, nanoparticles, nanocomposite, modified surfaces