Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Metoda pro studium oxidačního stresu onkologických pacientů pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí

RIGORÓZNÍ PRÁCE

PRAHA 2014 Ondřej Zítka

Název práce: **Metoda pro studium oxidačního stresu onkologických pacientů pomocí průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí**

ABSTRAKT

Oxidační poškození organismu a jeho mechanismy jsou jedním z dlouhodobých cílů studia v oblasti biochemie. Látky způsobující toto poškození, kde jsou nejčastěji skloňovány kyslíkové radikály, působí na molekuly v organismu včetně těch nejdůležitějších biomolekul jako DNA. Díky tomu dochází k přeměnám nukleových bazí v samotném řetězci nukleotidů na jejich analogy a tím může být pozměněna funkčnost genetického kódu, což může vyústit v patologické jevy. Cílem této práce je ukázat vhodnost využití elektrochemických metod pro citlivou detekci produktů oxidace nukleových kyselin jako markeru oxidačního poškození. S využitím metod jako ELISA, průtokový injekční systém a magnetické nanočástice byl navržen senzor pro detekci 8-OHdG jako marker oxidace nukleových kyselin u onkologických pacientů, který byl následně úspěšně aplikován. Pomocí vyvinuté metody byly zanalyzovány vzorky moči u čtrnácti pacientů trpících rakovinou prostaty, kde jsme byli schopni rozdělit pacienty do tří úrovní podle detekované koncentrační hladiny 8-OHdG. Celá metoda je nejen dostatečně citlivá, ale také vhodná pro účely aplikace do mikrofluidního zařízení zvaného „Lab on a chip“. Metoda a její technický základ tak poskytuje do budoucna slibný potenciál pro účely diagnostiky na poli personalizované medicíny.

Thesis: **Method for study of oxidative stress in oncology patients using flow injection analysis with electrochemical detection**

ABSTRACT

An oxidative damage of an organism and its mechanisms belong to the main goals of interest in the area of biochemistry. The substances causing such type of damage, where oxygen radicals are mentioned mostly, affect an organism on the level of the most important biomolecules such as DNA. Due to this fact the transformation of nucleic bases in DNA chain to its analogues occurs and thus the functionality of genetic code may be changed leading to pathological processes. The aim of this thesis is to show the suitability of electrochemical methods for sensitive detection of products of oxidation of nucleic acids as a marker of oxidative damage. Using methods as ELISA, flow injection system and magnetic particles, the sensor for detection of 8-OHdG as a marker of oxidation of nucleic acids at oncological patients was designed and successfully applied. By using of developed method the samples of urine of fourteen patients suffering from prostate cancer were analyzed. We were able to divide the patients into three levels based on determined concentration of 8-OHdG. Whole method is not even sufficiently sensitive but it is suitable for purposes of application into the microfluidic device so-called „Lab on a chip“. The assay and its technical background thus provide promising potential for diagnostics purposes in the field of personalized medicine.

Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně a použil pouze literaturu uvedenou v seznamu.

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěl poděkovat Renému Kizekovi za pevné a vytrvalé vedení, podporu a mnoho připomínek a konzultací, které mi věnoval.

Vojtěchu Adamovi za pomoc při interpretaci výsledků a tvorbě publikací, které byly základem pro tuto práci.

Sylvii Skaličkové za spolupráci při realizaci některých praktických částí této práce.

Děkuji také všem spoluautorům za pomoc při přípravě publikací, které tvoří základ výsledků této práce.

Dále děkuji všem spolupracovníkům pracujícím v Laboratoři metalomiky a nanotechnologií na Mendelově univerzitě v Brně za všestrannou pomoc a vytvoření perfektní pracovní atmosféry.

Za pochopení a spoustu duševní podpory, které se mi od ní dostalo, bych chtěl poděkovat Janě Zítkové.

A nakonec děkuji svým rodičům, za veškerou podporu, a zázemí, bez kterého bych nemohl své práci věnovat tolik potřebného úsilí.

Tato práce vznikla za finančního přispění projektů SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072, NANOSEMED GA AV KAN208130801, IGA MZ NS10200-3 a CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

OBSAH

1. CÍLE RIGORÓZNÍ PRÁCE 7

2. ÚVOD 8

3. Literární přehled 9

3.1 Oxidační stres 9

3.1.1 Reaktivní formy kyslíku 10
3.1.2 Redoxní rovnováha 11
3.1.3 Antioxidační mechanismy pro regulaci hladiny ROS 11
3.2 Role ROS v normální fyziologii 13

3.2.1 Role ROS v normální fyziologii – buněčná smrt 13
3.3 Poškození způsobená ROS na molekulární úrovni 15

3.3.1 Oxidační poškození DNA 16
3.4 Nádorová onemocnění 19

3.4.1 Kancerogeneze a ROS 20
3.4.2 Nádorové onemocnění prostaty 20
3.5 Analýza oxidačního stresu působícího na DNA 21

3.5.1 Elektrochemické metody pro měření oxidačního poškození DNA 23
3.5.2 Mikrofluidní systémy 23
3.6 Odborná publikace I - Přehledový článek 25

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 26

4.1 Odborná publikace II - Experimentální článek 26

4.2 Shrnutí výsledků 26

5. DISKUZE 28

6. ZÁVĚR 33

7. SUMMARY 34

8. SEZNAM LITERATURY 36

9. SOUBOR PUBLIKACÍ 44

Seznam použitých zkratek

8-OHdG - 8-oxo-7,8 -dihydro-2'-deoxyguanosin

AIF - faktor indukující apoptózu

ALP - enzym alkalická fosfatáza

APAF-1 - apoptotické proteázy aktivující faktor 1

Bax - protein X asociovaný s Bcl-2

Bcl-2 - protein (B-cell lymphoma 2)

Bcl-xL - protein (B-cell lymphoma-extra large)

BH3 - Bcl-2 homologní doména 3

DNA - deoxyribonukleová kyselina

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

FIA - průtoková injekční analýza

HDV - hydrodynamický voltamogram

HPLC-ED - vysoko-účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

LSV - voltametrie s lineárním skenem

MAPKs – mitogenem-aktivované-proteinkinázy

MnSOD - mangan superoxid dismutáza

NF-κB - nukleární faktor kappa B

NOXA - immediate early response protein

p53 - protein 53

PEG3 - protein (Paternally-expressed gene 3 protein)

PUMA - modulátor apoptózy regulovaný proteinem p53

ROS - reaktivní sloučeniny kyslíku

RSD - relativní směrodatná odchylka

SFIA - průtoková injekční analýza v zastaveném toku

SIAH 1 - protein (E3 ubiquitin-protein ligase)

SOD - superoxiddismutáza

TNF-α - faktor nádorové nekrózy alfa

1. CÍLE RIGORÓZNÍ PRÁCE

Tato rigorózní práce je zaměřena na problematiku oxidačního poškození organismu kyslíkovými radikály na buněčné a molekulární úrovni a jeho monitoringem, zejména pak v souvislosti s nádorovým onemocněním.
Cílem této práce je ukázat vhodnost využití elektrochemických metod pro citlivou detekci produktů oxidace nukleových kyselin jako markerů oxidačního poškození. S využitím dalších metod jako jsou ELISA, aplikace průtokového systému a využití nanočástic byl navržen senzor pro detekci markeru oxidačního poškození u onkologických vzorků, který byl následně úspěšně aplikován.

Pro tuto práci byly stanoveny následující dílčí cíle:

1. Připravit ucelený literární přehled o oxidačním poškození nukleových kyselin v souvislosti s onkologickým onemocněním a využití elektrochemických metod pro stanovení tohoto poškození.

2. Aplikovat a zoptimalizovat ELISA metodu pro selektivní detekci 8-OHdG s využitím alkalické fosfatázy na paramagnetické částice.

3. Navrhnout a zoptimalizovat zařízení využívající metodu pro mikrofluidní analýzu obsahu naftolu jako produktu alkalické fosfatázy pro hodnocení oxidačního poškození nukleových kyselin.

4. Aplikovat nově vytvořený senzor pro analýzu oxidačního poškození ve vzorcích pacientů s rakovinou prostaty.

2. ÚVOD

Kyslík je po dusíku druhou hlavní složkou zemské atmosféry a díky svým redoxním vlastnostem je pro nás velmi důležitým prvkem, na jehož koloběhu závisí jak naše přežití, tak zachování celé civilizace. Zásoby atmosférického molekulárního kyslíku vznikají během fotosyntézy, kdy je tvořen fotolýzou vody. Na druhé straně jej redukujeme, pomocí redukčních ekvivalentů vzniklých během citrátového cyklu a glykolýzy, během pochodů v dýchacím řetězci opět na vodu. V roce 1775 britský vědec Joseph Priestley publikoval knihu s názvem „Experiments and Observations on Different Kinds of Air“ ve které mimo jiné demonstroval, že svíce hoří rychleji v čistém kyslíku než v obyčejném vzduchu. Nadneseně řečeno stejně tak jako svíci, tak i lidskému organismu může více koncentrovaný kyslík přivodit rychlejší zkázu.

Molekulární kyslík je díky své vysoké elektronegativitě velmi dobrým akceptorem elektronů a vodíkových protonů při kontaktu s vnitřním prostředím lidského těla. Díky tomu vzniká řada sloučenin, které vyvolávají oxidační stres. Tyto jsou pro organismus na jednu stranu nebezpečné, ale na druhou stranu jsou biochemicky odbouratelné a mají svoji důležitou roli v buněčné fyziologii. Při výrazném nadbytku těchto sloučenin v lidském těle však může docházet k patologickým jevům, které mohou vést až ke smrti jedince. Oxidační stres v organismu může být vyvolán řadou faktorů, mezi které patří i medikace agresivními léčebnými přípravky, které jsou používány při léčbě onkologických onemocnění. Díky velkému počtu enzymových reakcí, kterými se organismus snaží snížit akutní oxidační stres a díky nízkému poločasu rozpadu většiny těchto rizikových sloučenin je stanovování úrovně oxidačního stresu u pacientů poměrně náročné.

Vzhledem k uplatnění redoxních mechanismů v této problematice se jako nejlépe využitelné pro studium na molekulární úrovni hodí elektrochemické metody. Další výhodou, těchto metod je jejich snadná miniaturizace, nízké provozní náklady a díky tomu potenciál pro uplatnění v personalizované medicíně.

Tato rigorózní práce se zabývá vývojem elektrochemické metody a její implementace do mikrofluidního systému pro následné rychlé stanovení oxidačního stresu u onkologicky nemocných pacientů.

3. Literární přehled

Pojem oxidační stres je v novodobé historii stále častěji používán nejen odbornou ale také laickou veřejností. Volné radikály jako chemický termín jsou známy od začátku dvacátého století a zahrnují jak organické tak anorganické molekuly. Od poloviny dvacátého století se objevují první práce, které volným radikálům přisuzují některé důležité biologické role, především však škodlivost pro živé buňky [1]. Brzy poté se však začaly objevovat publikace, které naznačovaly, že volné radikály mohou mít i fyziologický význam zejména pro procesy stárnutí [1]. Herman Denham a jeho hypotéza zvaná „Free-radical theory of aging“ od té doby inspirovala velkou řadu vědeckých prací a studií s cílem přispět co nejvíce ke stavu poznání radikálů, kyslíkových radikálů a radikálů kyslíkových sloučenin ale také dalších reaktivních sloučenin, které jsou dnes považovány za velmi důležité pro buněčnou biochemii s výstupy pro klinickou oblast [2,3].

3.1 Oxidační stres

Z chemického hlediska je sloučenina nebo atom, který je schopen přijmout další elektron do svého valenčního elektronového obalu oxidant respektive oxidační činidlo. Na druhou stranu sloučenina nebo atom, který dokáže poskytnout nebo odevzdat elektron ze své valenční vrstvy se nazývá reduktantem neboli redukčním činidlem. Redoxní reakce, kdy dochází právě k předání elektronu, se účastní oba typy těchto sloučenin. Takovéto reakce se odehrávají v biologických procesech, převážně za účasti vodíku jako reduktantu a kyslíku jako oxidantu. Redoxní reakce jsou základem velkého počtu fyziologických dějů živých buněk, jako jsou biosyntézy, energetický metabolismus a regulace. Na druhou stranu některé oxidanty mohou být pro organismus nebezpečné, protože mohou odnímat elektrony i molekulám mimo obvyklé redoxní reakce organismu prospěšné. Tento jev lze souhrnně nazývat jako oxidační stres.

3.1.1 Reaktivní formy kyslíku

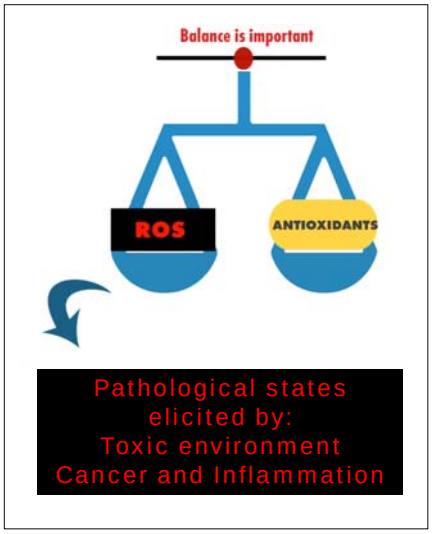
Sloučeniny, způsobující oxidační stres lze rozdělit na dvě základní skupiny. První početnější skupinou jsou reaktivní sloučeniny kyslíku "Reactive Oxygen Species" - ROS ($HO^{\bullet}$, H_2O_2, $^1O_2$, O^{2-}, O_3, $ROO^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$) a druhou, méně početnou skupinou jsou reaktivní sloučeniny dusíku "Reactive Nitrogen Species" – RNS ($NO^{\bullet}$, $NO_2^{\bullet}$) [2]. Dále mohou existovat i thiolové a uhlovodíkové radikály, které jsou také potenciálním původcem oxidačního stresu [4]. Reaktivní formy kyslíku zahrnují skupinu oxidantů, kterou tvoří jednak (volné) radikály a jednak sloučeniny, které mohou volné radikály generovat. Radikály jsou z chemického hlediska molekuly nebo atomy, které obsahují alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem. Radikály vznikají homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, redukcí nebo oxidací. Intracelulárně mohou vznikat pouze superoxidové ionty ($O_2^{\bullet -}$) a dusíkové radikály ($NO^{\bullet}$), avšak pouze 2 % z veškerých reakcí se děje na úrovni fyziologických podmínek jako je mitochondriální dýchání či fagocytóza [5]. ($NO^{\bullet}$) a ($O_2^{\bullet\bullet}$) radikály mohou být přeměněny na hydroxylové radikály ($HO^{\bullet}$), alkoxy radikály ($RO^{\bullet}$), peroxylové radikály ($ROO^{\bullet}$) a singletový kyslík ($^1O_2$). Některé tyto radikály jsou dále převedeny na peroxid vodíku (H_2O_2), peroxynitrity ($ONOO^-$) a kyselinu chlornou (HOCl). Přehled těchto látek je znázorněn v tabulce (Tab. 1).

Reaktivní formy kyslíku				Reaktivní formy dusíku			
radikály		reaktivní látky		radikály		reaktivní látky	
Superoxidový radikál	$O_2^{\bullet -}$	Peroxid vodíku	H_2O_2	Oxid dusnatý	$NO^{\bullet}$	Peroxynitrit	$ONOO^-$
Hydroxylový radikál	$HO^{\bullet}$	Kyselina chlorná	HOCl	Oxid dusičitý	$NO_2^{\bullet}$	Dusitan	NO_2^-
Alkoxylový radikál	$RO^{\bullet}$	Ozon	O_3			Dusičnan	NO_3^-
Peroxylový radikál	$ROO^{\bullet}$	Singletový kyslík	$^1O_2$			Nitrosyl	NO^+

Tab. 1 Tabulkový přehled hlavních reaktivních forem kyslíku a dusíku.

3.1.2 Redoxní rovnováha

Výskyt a přítomnost kyslíkových radikálů v organismu je díky mnoha procesům velmi striktně regulována za pomocí sloučenin, které mají antioxidační účinek a které jsou tak schopny tyto radikály vychytávat, a tím neutralizovat jejich potenciální negativní efekt. Tyto reduktanty se v organismu musí vyskytovat v rovnováze s oxidanty, a pokud je jich nedostatek, pak může častěji docházet k tvorbě oxidačního stresu, který může mít za následek řadu patologických jevů, jenž mohou vyústit až ve smrt organismu (Obr. 1). Na druhou stranu ale také může docházet v opačném případě k redukčnímu stresu. Oxidační stres je asociován s procesy jako stárnutí a kancerogeneze a také řadou onemocnění jako jsou Alzheimerova choroba, atheroskleróza a Parkinsonova choroba [6-9].



Obr. 1 Zjednodušené naznačení rovnováhy mezi oxidačním respektive redukčním stresem způsobeným oxidanty respektive antioxidanty. Převzato z [10].

3.1.3 Antioxidační mechanismy pro regulaci hladiny ROS

Antioxidanty udržují rovnováhu proti tvorbě ROS. Jsou to sloučeniny, které významně přispívají k ochraně proti oxidaci oxidovatelného substrátu. Princip jejich působení spočívá v tom, že mohou poskytnout svůj vlastní elektron ROS a tím je přeměnit na neškodné molekuly [1]. Mnoho studií potvrzuje, že antioxidanty mohou v organismu fungovat na třech odlišných úrovních: jako prevence proti formování ROS, jako činitelé schopní

eliminace ROS, a, jako například glutathion, opravné mechanismy pro opravu poškozených molekul. Antioxidační systémy mohou být klasifikovány do dvou hlavních skupin.

Antioxidační enzymy, mezi které patří cytochrom c, kataláza, glutathionperoxidáza, glutathion reduktáza, superoxiddismutáza (SOD) a ceruloplasmin, se v organismu podílí na ochraně proti působení ROS jejich katalýzou nebo konverzí na méně reaktivní nebo netečné formy [11]. Skupina enzymu SOD zahrnuje MnSOD, která je lokalizována v mitochondriální matrix a Cu, ZnSOD, které jsou lokalizovány v mitochondriálním mezimembránovém prostoru, cytosolu a extracelulárním prostoru. Tyto klíčové enzymy katalyzují dismutaci superoxidového aniontového radikálu na peroxid vodíku a molekulární kyslík [12]. Tím tak chrání buňky před oxidačním poškozením a regulují buněčnou koncentraci O_2^- a jeho reaktivní produkty ve fyziologických i patologických podmínkách. MnSOD je všudypřítomný metaloenzym, který je esenciální pro přežití všech aerobních organismů od bakterií po člověka. Je zodpovědný za udržování buněčné redoxní rovnováhy v celém organismu. Peroxid vodíku, který vzniká působením SOD je následně rozložen pomocí několika izoenzymů glutathionperoxidázy nebo katalázy, které se nachází v cytosolu a mitochondriích většiny tkání. Aktivita katalázy se stává velmi důležitou při vysokých koncentrací peroxidu vodíku, který je schopná velmi účinně rozkládat na molekulární kyslík a vodu. Mikrosomální glutation-S-transferasa je membránově vázaný enzym existující ve formě trimeru, který katalyzuje konjugaci elektrofilních sloučenin s glutathionem a redukci lipidických peroxidů.

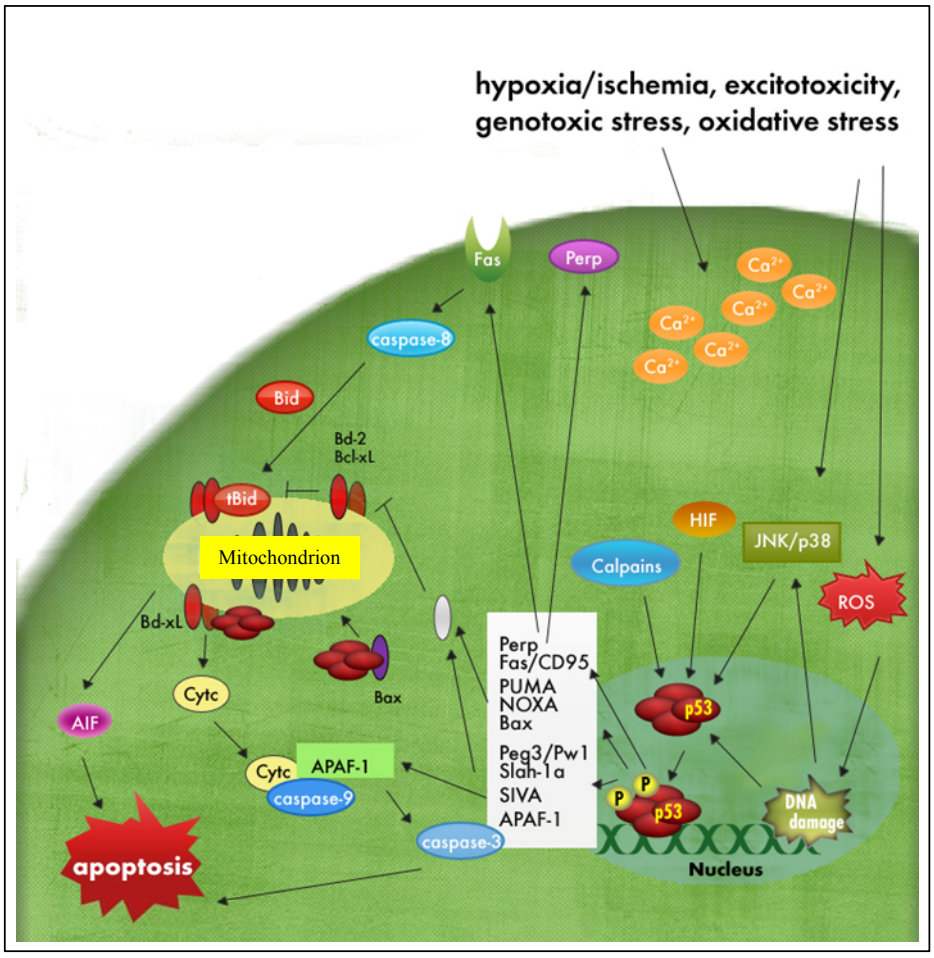
Druhou skupinou antioxidačních systémů jsou některé nízkomolekulární látky, které jsou přítomny v buňkách a vykazují tak sekundární obranu proti ROS. Lze také říci, že jsou to reduktanty nebo volné antioxidanty [13]. Mezi nejvýznamnější antioxidanty lze zařadit glutathion, další sloučeniny obsahující volné sulfhydrylové skupiny (thioly), thioredoxin, vitamín A a provitamín A, vitamín C, vitamín E a vitamín K, koenzym Q10, kyselinu močovou, bilirubin či flavonoidy a další. Tyto látky se na ochraně organismu podílí především díky jejich schopnosti zpomalit nebo zabránit oxidaci jiné molekuly.

3.2 Role ROS v normální fyziologii

Nízké koncentrace ROS jsou esenciální pro fyziologické funkce v organismu, genovou expresi, buněčný růst a ochranu proti infekci. ROS se uplatňují jako simultánní molekuly pro biochemické procesy v buňce [14] nebo aktivátory aktivních míst v transkripčních faktorech jako je nukleární faktor kappa B (NF-κB) či aktivátor proteinů-1, a to prostřednictvím reverzibilní oxidace v závislosti na genové expresi a buněčném růstu. ROS také mohou nepřímo působit na transkripční faktory aktivací signálních transdukčních cest proteinkináz aktivovaných mitogenem (MAPKs) [15]. ROS se také účastní biosyntézy látek podobných hormonům (thyroxiny nebo prostaglandiny), a tím mohou urychlovat vývojový proces organismu. Bylo prokázáno, že ROS jsou využívány imunitním systémem jako spouštěč proliferace T-buněk prostřednictvím aktivace NF-κB. Makrofágy a neutrofilní buňky vytváří ROS pro usmrcení bakterií, které následně fagocytují. Díky tvorbě ROS také přenáší faktor nádorové nekrózy (TNF-α) cytotoxicitu na rakovinné nebo buňky napadené viry, a tak indukuje apoptózu těchto buněk [14].

3.2.1 Role ROS v normální fyziologii – buněčná smrt

Zvýšená koncentrace ROS může přímo ovlivnit DNA v buněčném jádře a touto cestou vyvolat kaskádu reakcí, které vedou k buněčné smrti. Jedním z dobře popsaných příkladů takového procesu je znázorněn na schématu (Obr. 2).



Obr. 2 Schéma vývoje buněčné smrti neuronu, indukované přes protein p53, který je ovlivněn metabolickým signálem nebo oxidačním stresem (Převzato z [10]). Schéma ukazuje vztah mezi proteinem p53 a jeho zvýšenou expresí v případě zvýšeného oxidativního poškození anebo ve spojení s indukcí dalších signálních molekul. Zvýšení exprese proteinu p53 dále ovlivňuje expresi genů Bax, BH3-only proteinu PUMA a Noxa. Dále jsou tímto proteinem také ovlivněny proteiny Fas a APAF-1.

V závislosti na počátečním aktivačním stimulu může být aktivace p53 uskutečněna různými cestami včetně těch, které obecně působí proti aktivaci p53. P53 svoji aktivitu vyvolávající buněčnou smrt vynakládá na zvýšenou expresi pro-apoptotických genů jako Bax a proteinů PUMA a NOXA, které se následně přemisťují do mitochondrií. Zde tyto proteiny způsobují narušení membránového potenciálu a uvolnění pro-apoptotických faktorů včetně cytochromu c a proteinu AIF. Mnoho transkripčních genů jako Peg3/Pw1, Siah-1 a SIVA působí podobně díky možnosti interakce s pro-apoptotickými členy rodiny

proteinů Bcl-2 na úrovni mitochondrií. Dále může p53 vyvolat buněčnou smrt transaktivací receptoru Fas anebo „nadregulací“ APAF-1, který podporuje kaspázovou dependentní apoptózu po formaci apoptosomu s cytochromem c a kaspázou-9 . V neposlední řadě může p53 přímo spouštět apoptózu po přesunu do mitochondrií (u nervových synapsí, synaptická apoptóza), kde mohou být zahrnuty i interakce s Bax nebo Bcl-xL. Vznik mutací, chyb při translaci a následná inhibice proteosyntézy jsou výsledkem těchto poškození.

3.3 Poškození způsobená ROS na molekulární úrovni

ROS reagují s mnoha buněčnými makromolekulami včetně proteinů, lipidů a DNA.

Proteiny zastávají v buňkách mnoho významných funkcí, primárně se uplatňují jako enzymy, které katalyzují biochemické procesy v organismu. Proteiny obecně jsou složeny z 21 aminokyselin, které však díky odlišnosti ve své chemické struktuře, vykazují odlišnou afinitu k ROS, a tudíž i náchylnost k poškození. Aminokyseliny jako cystein, methionin a histidin jsou mimořádně citlivé na oxidační poškození vzniklé z hydroxylových radikálů. Pokud jsou lokalizovány v aktivních místech enzymů, dochází při ataku ROS k inaktivaci celého enzymu. Je také důležité zmínit, že míra oxidace proteinu závisí na jeho struktuře, 3D-konformaci, fragmentaci, agregaci nebo případné interakci. Oxidace proteinů často vede k jejich degradaci buněčnými systémy zodpovědnými za eliminaci poškozených proteinů z buněk [16].

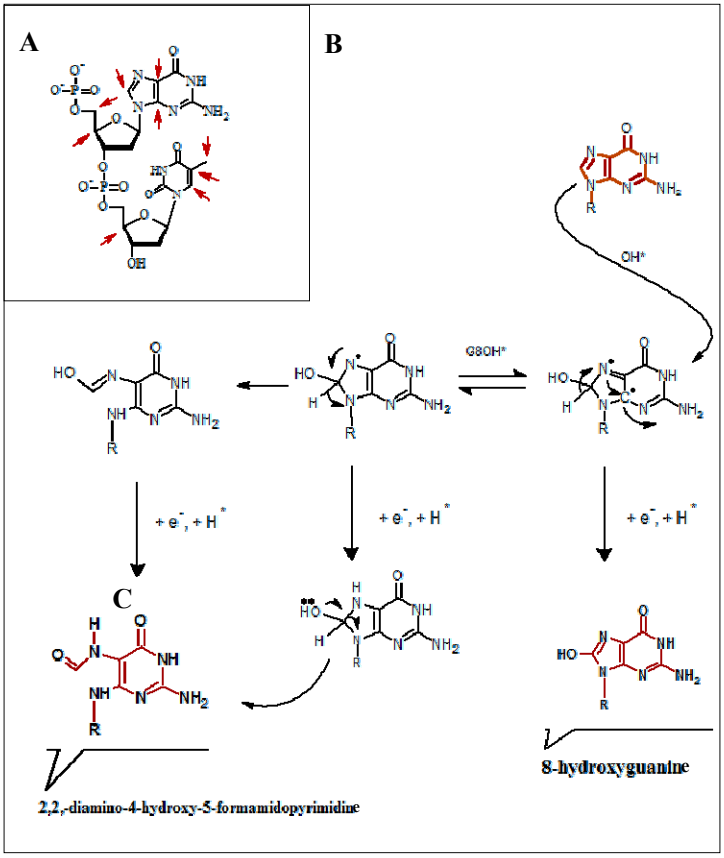
Lipidy jsou esenciální součástí membrán, které obklopují buňky nebo některé z buněčných organel, jako je jádro či mitochondrie. Jejich kompletní degradace je typickým projevem oxidačního poškození. Polynenasycené mastné kyseliny jsou díky dvojným vazbám v uhlíkovém řetězci senzitivní zejména k atakům hydroxylovými radikály, ale i ostatními ROS. Lipidová peroxidace buněčných membrán tak často vede k formaci sekundárních reaktivních produktů [16].

3.3.1 Oxidační poškození DNA

Přestože studium oxidačního poškození DNA je jednou velmi intenzivně studovaných oblastí, jsou stále hledány nové více či méně spolehlivé markery tohoto poškození. Oxidační poškození DNA je indukováno ROS, které mohou reagovat s DNA, avšak ne všechny reaktivní formy kyslíku poškozují DNA přímo. Peroxid vodíku a $O_2^{\bullet -}$ poškozují DNA interakcí s přechodnými kovy za tvorby chelátů nebo v Haber-Weissově reakci katalyzované kovy, kde je produkován ($HO^{\bullet}$)[17]. Dále i Fentonova reakce, která se uplatňuje při oxidaci Fe a Cu je jedním z hlavních zdrojů ($HO^{\bullet}$) radikálů [18].

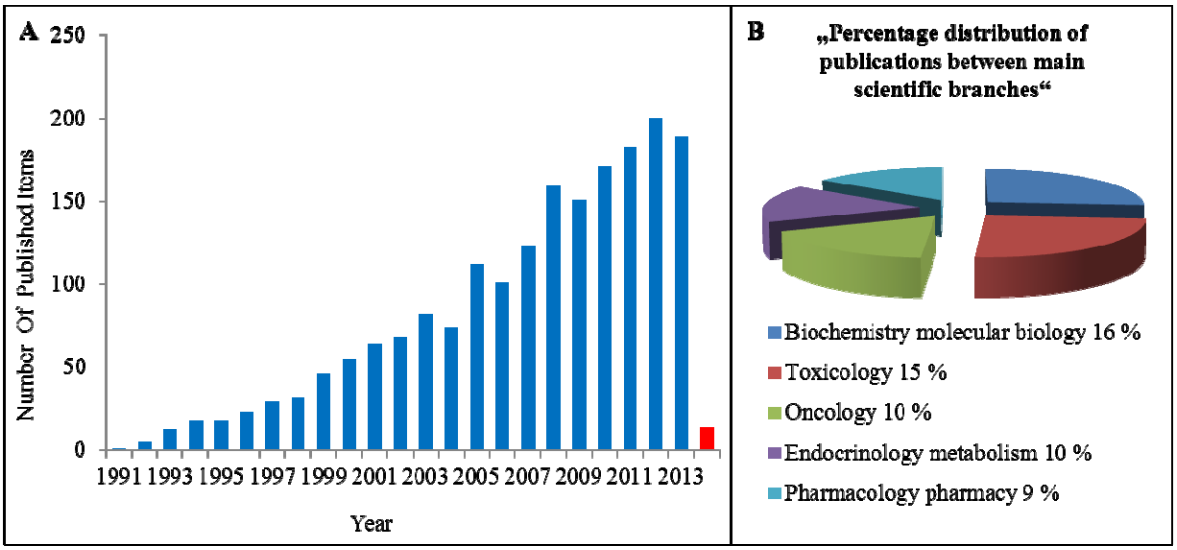
V předchozím studiích bylo popsáno více než 20 různých mechanismů vedoucích k oxidačnímu poškození DNA a díky tomu formování těchto derivátů guaninu (8-hydroxyguanin, 8,5'-cyklo-2'-deoxyguanosin, 7,8-dihydro-8-oxoguanin, xanthin, hypoxanthin), adeninu (7,8-dihydro-8-oxoadenin, 8,5´-cyklo-2´-deoxyadenosin, 2-hydroxyadenin,4,6-diamino-5-formamidopyrimidin), dále oxidačních produktů cytosinu (5-hydroxycytosin, 5,6-dihydoxycytosin), produktů odvozených od thyminu a uracilu (5-hydroxyuracil, isodivalurová kyselina) a také alloxanu (thymin glykol, 5-hydroxymethyluracil, 5-formyluracil, 5- hydroxy-5-methylhydantoin a močovina) [10].

Během reakce s purinovými bázemi je hydroxylový radikál adován na pozice 4, 5, nebo 8 (Obr. 3A). Adice na pozici C8 guaninu vede k formování 8-hydroxyguaninového radikálu, který může být následně oxidován za formování 8-hydroxyguaninu. Tento produkt může být redukován za současného otevření purinového kruhu a vzniku 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formaminopyrimidinu (Obr. 3B). Struktura adeninu může být modifikována stejným mechanismem.



Obr. 3 (A) Znázornění míst pro atak nukleofilu (červené šipky) v rámci jednovláknové DNA. (B) Schéma formování dvou typů oxidačních produktů guaninu jako je 8-hydroxyguanin a 2,2,-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, u kterého dochází k otevření purinového kruhu. Převzato z [10].

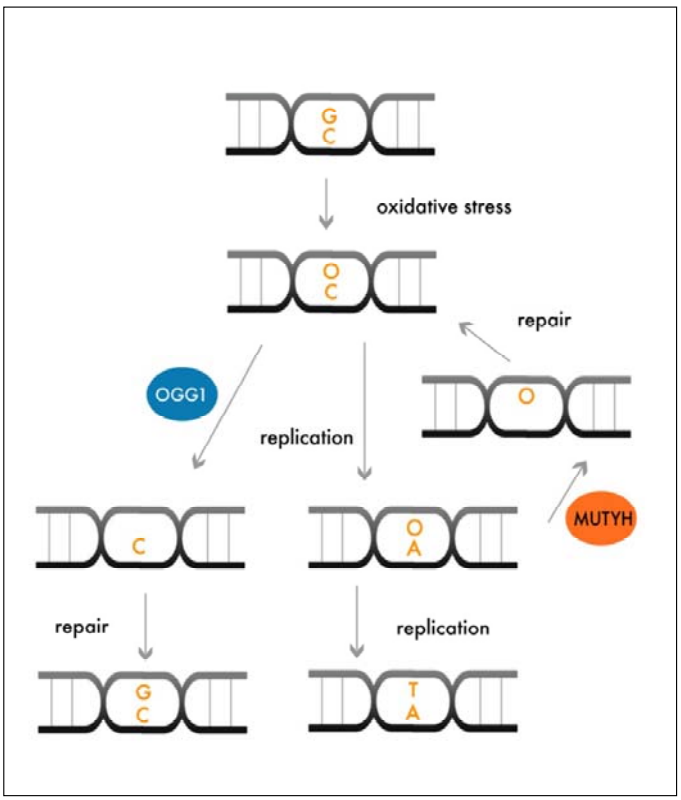
Ze všech zde zmíněných oxidačních produktů, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin patří k těm nejvíce slibným ve smyslu indikace oxidačního stresu. Časový vývoj v počtu vědeckých prací obsahujících "8-oxo-7,8 -dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)" ve svém abstraktu, názvu či klíčových slovech hledaných v databázi Web of Science od 1991 do 2014 je téměř exponenciální (Obr. 4A). V roce 2014, je k zde k datu 12. února elektronicky publikováno již dalších 13 impaktovaných prací. Z hlediska využití 8-OHdG v oblastech výzkumu je zde velmi vyrovnané zastoupení mezi pěti hlavními výzkumnými oblastmi (Obr. 4B).



Obr. 4 (A) Schéma vývoje počtu publikací cílených na 8-OHdG v čase dle WOS. (B) Procentuální zastoupení jednotlivých vědeckých oblastí věnující se výzkumu 8-OHdG. Převzato z [10] a aktualizováno k datu 12.2.2014.

Jedno-vláknové zlomy v DNA jsou často výsledkem přímého působení radikálů spolu s chemickou modifikací purinových a pyrimidinových bází nebo cukr-fosfátové kostry. Příkladem nepřímého působení je aktivace Ca^{2+}- dependentních endonukleáz v jádře, která vede k fragmentaci DNA a celkově k vyvolání procesů buněčné smrti (apoptózy). Dále může být kromě DNA poškozena řada jaderných proteinů, které mají důležitou strukturní a regulační roli spojenou například s transkripcí. Vzniklé proteinové radikály mohou následně reagovat s bázemi za vzniku DNA-protein „křížových“ produktů. Jako výsledek tohoto poškození dochází k formování mutací jako GC↔ AT tranzice a GC ↔ TA transverze. Tyto mají dále za následek chyby v translaci při biosyntéze proteinů, které mohou vést až k celkové inhibici proteosyntézy. Vznik 8-oxoG (O) v DNA řetězci může zapříčinit GC ↔ T(A) transverzi jak je ukázáno na obrázku (Obr. 5). Formování DNA-proteinových produktů také zabraňuje „rozbalování“ chromatinu, jeho následné replikaci a transkripci. Působení hydroxylových radikálů na deoxyribózu vede k odštěpení vodíkového atomu za vzniku uhlovodíkových radikálů. V přítomnosti O_2^- radikálů jsou formovány peroxylové radikály, které pokračují do dalších reakcí jako disproporcionace, eliminace vody, štěpení vazeb uhlík-uhlík a podobně. V případě nízké koncentrace O_2^- se začne vyskytovat intramolekulární cyklizace, jejímž finálním produktem je 8,5'-

cyklopurin-2'-deoxynukleotid. $^1O_2$ reaguje zejména s guaninem, za vzniku nestabilního endoperoxidu, který je dále příčinou vzniku množství rozkladných produktů.



Obr. 5 Schéma opravy poškozeného řetězce DNA pomocí excize bází za účasti BER glykosylázy MutM (OGG1) a DNA glykosylázy MUTYH. Převzato z [10]. Přítomnost 8-oxoG (O) v DNA způsobuje transverse z G-na-T, jak je schematicky ukázáno na cestě uprostřed. Lidská DNA glykozyláza OGG1 a MUTYH jsou zapojeny do excize bazí z DNA. OGG1 odstraňuje 8-oxoG z párů 8-oxoG·C, a MUTYH odstraňuje A z párů 8-oxoG·A, a obojí generují AP místa na DNA. Krokově značená ' oprava ' zahrnuje účinky Apurinové/apyrimidinové AP endonukleázy, deoxyribofosfát lyázy, DNA polymerázy a DNA ligázy. OGG1 má také AP lyázovou aktivitu.

3.4 Nádorová onemocnění

Jako nádorové onemocnění se označuje skupina onemocnění, které souvisí s enormním a nekontrolovatelným dělením buněk. To může být způsobeno důsledkem několika faktorů, jako jsou biologické, chemické, fyzikální, hormonální nebo jejich synergií. Svoji roli ale také hrají vlivy jako dědičnost, věk, prostředí a životní styl. Nekontrolované dělení je

zpravidla způsobeno mutacemi genetického kódu na úrovni DNA, které mají za následek vyřazení nebo narušení mechanismu apoptózy. Obecně nejvíce náchylné k těmto mutacím jsou buňky tkání s vysokou frekvencí dělení (dýchací a trávící soustava) a vysokou hladinou hormonální stimulace (prostata, vaječníky, varlata, prsa).

3.4.1 Kancerogeneze a ROS

Působení oxidačních mechanismů bylo prokázáno jako potencionální činitel při iniciaci, promoci a maligního zvratu kancerogeneze. Vzhledem ke kumulativnímu charakteru rizik, je s vyšším věkem pacienta spojeno vyšší oxidační poškození DNA, a proto je oxidační poškození DNA považováno za ukazatele některých onemocnění. Jako jeden z markerů je sledován 8-OHdG, jehož přítomnost je spojena s potencionální mutací DNA v savčích buňkách. Podporou pro toto tvrzení je, že transverze CG->TA je potencionálně odvozená z 8-OHdG, jak bylo prokázáno *in vivo*, v RAS onkogenu a tumorovém supresorovém genu *p53* v rakovinné tkáni plic a jater. Samozřejmě tato transverze není jediná a může také vznikat CC->TT substituce při absenci UV světla. Ve vnitřních částech tumoru byly tyto substituce identifikovány jako charakteristické pro mutaci způsobené ROS [19]. Mnoho studií naznačuje, že některé nádorové buněčné linie mohou produkovat významné množství H_2O_2 bez exogenní stimulace, což se projevuje zvýšeným oxidačním poškozením DNA. Gackowski a kol. ukazují, že přítomnost volného množství nízkomolekulárního železa (LIP) v buňkách s H_2O_2 rozhoduje o produkci ROS [20]. Avšak mnoho poznatků, naznačujících vztah mezi ROS a nádorovým bujením, bylo odvozeno nepřímo. Je také možné, že působením ROS se nejen zvyšuje poškození DNA, ale také se snižuje exprese a aktivita enzymů, které působí v prevenci tohoto poškození [21]. Mnohé studie potvrzují roli oxidačního stresu v progresi kancerogeneze, avšak dosud není přesně definováno v jakém rozsahu.

3.4.2 Nádorové onemocnění prostaty

Z hlediska dělení nádorových onemocnění podle tkáně, ze které vychází primární ložisko postižených buněk, patří rakovina prostaty do skupiny karcinomů. Přesný mechanismus vzniku a progrese karcinomu prostaty není dosud objasněn [22], nicméně byla identifikována řada rizikových faktorů, které výrazně zvyšují vznik tohoto onemocnění.

Mezi tyto faktory patří věk, genetické predispozice, etnický původ a životní styl [23]. Dalšími zmíněnými rizikovými faktory, které pravděpodobně přispívají ke vzniku nádorových onemocnění prostaty, jsou genetické dispozice [24,25], kde riziko výskytu karcinomu prostaty je asi trojnásobné pokud rodinná anamnéza obsahuje rakovinu prsu a karcinom prostaty [26]. Důležitou roli při vzniku a rozvoji tohoto onemocnění hrají hormonální látky androgeny. Z tohoto pohledu lze rozdělit karcinomy prostaty na „androgen-dependentní“ a „androgen non-dependentní“ [27,28].

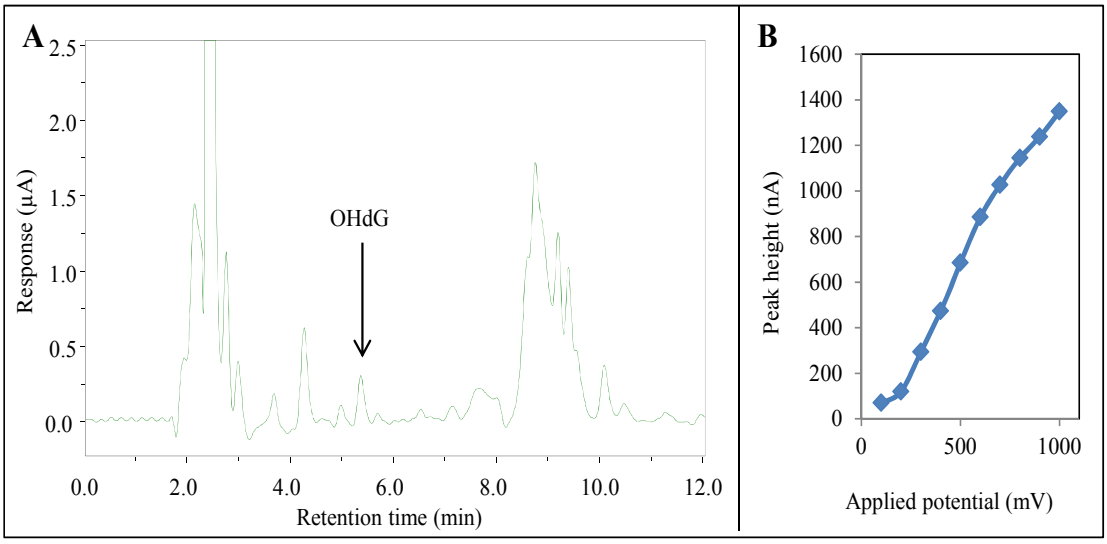
Vývoj nádoru prostaty je velmi pozvolný, přičemž agresivní forma se objevuje bez zjevných stimulů [29]. Nezhoubný typ nádoru pacienta omezuje minimálně a po léta se příliš nemění [30], a proto se může stát, že pacienti s benigním typem nádoru podstupují chirurgické zákroky a radioterapie zbytečně. Rozlišení obou variant je totiž velmi obtížné [31]. Pro tyto účely je k dispozici soubor vyšetření, která lze rozdělit na ta, která i) označí podezření na karcinom prostaty - vyšetření *per rectum* a hladiny prostatického specifického antigenu [32], ii) na základě histologického vyšetření potvrdí toto onemocnění - transrektální sonografie s biopsií prostaty [33], iii) a ostatní vyšetření, která slouží k určení pokročilosti onemocnění - magnetická rezonance [34], CT [35] nebo pozitronová emisní tomografie [36].

Klíčovým faktorem pro léčbu nádorových onemocnění prostaty zůstává stále včasná diagnostika a určení stádia nemoci, na kterých pak závisí celková onkologická léčba. Onkologičtí pacienti jsou vystaveni oxidačnímu stresu ať už vlivem onemocnění anebo vlivem léčby [37-41]. Sledování změn úrovně oxidačního stresu za použití jednodušších a plně automatizovaných přístupů může mimo jiné přinést možnosti okamžité změny léčebného protokolu a přispět tak k posunu do oblasti personalizované medicíny.

3.5 Analýza oxidačního stresu působícího na DNA

Díky tomu, že je oxidační stres působící na DNA spojen s nádorovým onemocněním, je v posledních letech intenzivně studován. Antioxidační systém člověka ROS rychle rozkládá na sekundární produkty a tak je jejich stanovení značně ztíženo. Proto je vhodné se zaměřit na detekci těch sloučenin, které vznikají v důsledku poškození proteinů, lipidů a DNA, jako jsou malondialdehyd [42,43], skupina izoprostanů [44], poměr hladiny redukovaného glutathionu (GSH) a jeho oxidované formy disulfidu glutathionu (GSSG) [45], akrolein [46], 3-nitrotyrosin [47] a dalších. Jedním z nejsledovanějších markerů

oxidačního poškození je 8-oxo-7,8-dihydro-2´-deoxyguanosin (8-OHdG). Tato látka není přijímána potravou, její hladina není ovlivněna dietou a je dobře stanovitelná. Proto je hladina 8-OHdG ve vybraných biologických materiálech, hlavně v moči, pokládána za validní marker oxidačního poškození DNA a v obecnějším smyslu též jako marker oxidačního stresu [48-50]. Vhodnými metodami pro stanovení 8-OHdG jsou v současné době vysoko-účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED) [51,52] díky které lze sledovat obsah tohoto analytu při optimálně nastaveném elektrochemickém detektoru (Obr. 6A). Toto nastavení je určeno vloženým aplikovaným potenciálem na průtokové elektrody. Pro optimalizaci vhodného potenciálu je sestaven takzvaný hydrodynamický voltamogram, který znázorňuje v tomto případě maximální oxidační proudovou odezvu v závislosti na vloženém konstantním potenciálu (Obr. 6B).



Obr. 6 (A) Chromatogram reálného vzorku moče s viditelným píkem 8-OHdG (Retenční čas 5,4 min). Chromatogram byl získán s využitím přístroje HPLC-ED CoulArray. (B) Součtové hydrodynamické voltamogramy (HDV) pro stanovení optimálního aplikovaného potenciálu (800 mV) na detektoru CoulArray. Převzato z [10].

Více rozšířenými jsou však imunochemické metody [53-55] a hmotnostní detekce v kombinaci s plynovou chromatografií (GC-MS) [56], hmotnostní detekce s ionizací za pomocí elektrospreje (ESI-MS) [57], hmotnostní detekce v tandemu s kapalinovou chromatografií (LC-MS) [58] a kapilární elektroforéza [59-61]. Výčet těchto metod ukazuje značné rozšíření analýzy tohoto analytu na úrovni specializovaných a klinických laboratoří. Oproti tomu v oblasti personalizované medicíny není reálná možnost uplatnění takto instrumentálně náročných metod. Proto se výzkum v této oblasti ubírá také cestou

využití jednodušších metod s jistou možností snadné miniaturizace a rapidní redukce výrobních nákladů.

3.5.1 Elektrochemické metody pro měření oxidačního poškození DNA

Elektrochemické metody vynikají svojí senzitivitou a selektivitou pro stanovení produktů oxidačního poškození DNA. Elektroaktivita nukleových kyselin je známá již mnoho let [62]. Rtuťové elektrody jsou vhodné pro studium molekul, které jsou produkty oxidačního poškození DNA. Rtuťové elektrody jsou uzpůsobeny zejména ke studiu redukčních procesů, které probíhají na nukleových kyselinách [62-65], zatímco ke sledování oxidačních dějů, které jsou principem poškození nukleových kyselin se používají pevné elektrody, a to především elektrody uhlíkové [66-68]. Ke studiu oxidace adeninu (A), guaninu (G), thyminu (T) a cytosinu (C) byla použita metoda diferenční pulzní voltametrie na skelné uhlíkové elektrodě (GCE), kde bylo dosaženo limitu detekce jednotlivých nukleotidů nižší než 1 μM [69]. Obdobný limit detekce byl i při použití voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV) na uhlíkové pastové elektrodě (CPE). Při neutrálním pH, s použitím Ag/AgCl/3 M KCl referenční elektrody, byly pozorovány píky při 1.00, 1.28, 1.47 a 1.53 V pro G, A, T a C [70]. Pro stanovení 8-OHdG lze také využít skleněnou uhlíkovou elektrodu. Limity detekce jsou 5 ng/ml s použitím SPE extrakce [71]. Výhodou skelné uhlíkové elektrody je možnost její modifikace a tím dosažení lepších limitů detekce a zvýšení selektivity, což usnadňuje přípravu vzorků. Všechny výše uvedené metody však většinou využívají takzvaných stacionárních systémů, které jsou díky své všestrannosti velmi vhodné pro provádění charakterizace elektrod, studium elektrodových procesů a optimalizací a vývoj nových metod pro stanovení analytů. Pro konkrétní aplikace s vyššími nároky na robustnost, opakovatelnost a miniaturizaci se daleko více hodí sofistikované průtokové systémy, které využívají převážně pevných elektrod.

3.5.2 Mikrofluidní systémy

Průtokové systémy lze díky dnešním znalostem fyzikálních parametrů kapalin a díky pokrokům v oblastech materiálového výzkumu snadno miniaturizovat a dosáhnout tak výkonu srovnatelného s konvenčními přístroji a metodami. K rozvoji miniaturizace

analytických zařízení v této oblasti přispívají práce jako použití elektrody z uhlíkového vlákna pro detekci 8-OHdG v reálném čase na povrchu epiteliální buňky [72]. Tyto elektrody mohou být implementovány do mikrofluidních systémů, které vynikají jednoduchostí, citlivostí a specifitou stejně tak jako automatizací a potenciální miniaturizací detekčních zařízení [73]. Využitím elektrochemického detektoru pro analýzu 8-OHdG vzniká mnoho instrumentálních variací. V uspořádání FIA (průtoková injekční analýza) s amperometrickým detektorem a modifikovanou elektrodou, byl 8-OHdG stanoven ze vzorku DNA se stejnou senzitivitou, kterou poskytuje vysoko-účinná kapalinová chromatografie. Limit detekce byl 26.6 fg/ml [74]. V jednom z experimentů bylo prokázáno, že opakovatelnost stanovení 8-OHdG pomocí FIA-ED s elektrodou ze skelného uhlíku modifikovanou poly (3-methylthiofenem), je velmi dobré (RSD 0.77%) [75]. Velkým pokrokem bylo spojení miniaturizovaných detektorů se separační technikou [76]. Paramagnetické nebo superparamagnetické částice (MPs) jsou slibným nástrojem pro takovéto systémové uspořádání [77-79]. MPs, jejichž velikost je v rozmezí nm až mm, reagují na vnější magnetické pole a usnadňují navázání bioaktivních molekul díky jejich afinitě k modifikovanému povrchu MPs [80-83]. 8-OHdG tedy nemusí být nutně detekován elektrochemickým detektorem přímo, ale byla úspěšně provedena i nepřímá detekce pomocí 1-naftolu vznikajícího po imunoseparaci 8-OHdG za pomoci paramagnetických částic z biologického vzorku [55]. Samotná elektrochemická detekce vzniklého 1-naftolu následně probíhala pomocí mikrofluidního SFIA systému. Výhodou tohoto uspořádání je nízká spotřeba vzorku (10 μl) a velmi nízký limit detekce [55].

3.6 Odborná publikace I - Přehledový článek

Příloha A

Zitka O., Krizkova S., Skalickova S., Kopel P., Babula P., Adam V., Kizek R.:

Electrochemical Study of DNA Damaged by Oxidation Stress.

Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 16: 130-141, 2013

Podíl autora Zítka O.: 50 % textové části práce.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část předkládané rigorózní práce je přiložena ve formě odborné publikace.

4.1 Odborná publikace II - Experimentální článek

Příloha B

Zítka O., Křížková S., Krejčová L., Hynek D., Gumulec J., Masařík M., Sochor J., Adam V., Hubálek J., Trnková L., Kizek R.:

Microfluidic tool based on the antibody modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2´-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients.

Electrophoresis 32(22): 3207-3220, 2011

Podíl autora Zítka O.: 50 % textové části práce a 60% experimentální práce

4.2 Shrnutí výsledků

Příloha B

Tato publikace je komplexní metodickou prací, která popisuje vývoj metody pro stanovení oxidačního stresu v reálném vzorku. Jako příklad využití byla tato metoda demonstrována pro analýzu moči onkologických pacientů trpících rakovinou prostaty. K tomuto účelu byla jako produkt oxidačního poškození nukleových kyselin organismu zvolena molekula 8-OHdG, který je běžně v moči stanovován.

V této práci byla optimalizována a testována izolace 8-OHdG z biologického materiálu za využití paramagnetických částic s protilátkami modifikovaným povrchem. 8-OHdG byl stanovován přes 1-naftol, který byl generován jako produkt reakce alkalické fosfatázy (ALP), jež byla konjugována na sekundární protilátku. Ta se vázala na primární protilátku proti pokrývací protilátce s již imobilizovaným 8-OHdG na magnetické částici.

Celý komplex byl díky působení magnetického pole přečištěn a po přidání substrátu (1-naftyl fosfátu) pro ALP proběhla v alkalickém prostředí reakce za vzniku 1-naphtholu, který byl dále elektrochemicky stanoven. Pro toto stanovení byla vyvinuta metoda průtokové injekční analýzy v zastaveném toku (SFIA) s elektrochemickou detekcí využívající elektrodu ze skelného uhlíku a elektrochemickou metodu voltametrie s lineárním skenem (LSV). Tento speciální modulární elektrochemický SFIA systém, kterému pro analýzu stačí pouhých 5-10 µl vzorku včetně pracovního pufru byl kompletně navržen a úspěšně odzkoušen. Navržená metoda může být snadno modifikována a převedena do mikrofluidního "lab on valve" systému. Celá tato navržená metoda vykazovala dostatečnou citlivost a selektivitu, a proto mohla být použita pro stanovení 8-OHdG v lidské moči. Díky tomu se podařilo stanovit úroveň oxidačního poškození DNA jako důsledku oxidačního stresu u pacientů s onemocněním rakoviny prostaty.

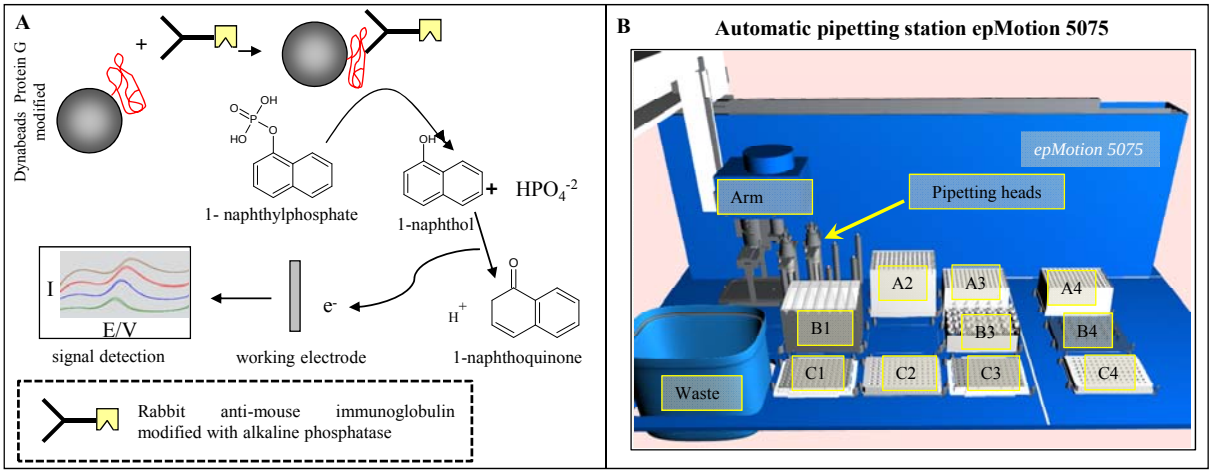
5. DISKUZE

Není překvapující, že 8-OHdG je považován za biomarker oxidačního stresu způsobeného jak exogenními tak endogenními vlivy [84-88]. Navíc je zde jasné spojení mezi ionty těžkých kovů (jako arsenu a kadmia), které vyvolávají vznik ROS nebo RNS produkující rozpad DNA doprovázený výskytem 8-OHdG, který vede k rozvoji onkologických onemocnění [3,49,89-94]. V roce 2008 byla publikována práce, která poukázala na spojení zvýšené hladiny niklu v moči u akutní leukémie u čínských dětí se zvýšenou hladinou 8-OHdG v moči [95].

8-OHdG je tak díky svému klinickému významu cílem mnoha bioanalytických, biochemických a biologických nástrojů a postupů. Řada postupů využívá vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) s hmotnostní detekcí (MS) jako zlatý standard [96], nicméně takovéto metody jsou pracné vzhledem k vysokým nárokům na přípravu vzorku [97]. Na druhou stranu HPLC ve spojení s elektrochemickým detektorem (ED) se zdá být velmi vhodným nástrojem pro stanovení 8-OHdG díky univerzálnosti elektrochemického detektoru, který je k této molekule ultra senzitivní a navíc méně senzitivní k běžným ostatním balastním látkám [48,98-100].

Jako jednoduchou alternativu k této robustní metodě jsme vyvinuli metodu s využitím magnetických nanočástic, které začínají být v této oblasti velmi slibným nástrojem [77-79]. Nanočástice mají mnoho fyzikálně-chemických výhod [101,102]. Jejich velikost může být přizpůsobena v závislosti na potřebě a druhu biologického vzorku, který má být zdrojem cílové biomolekuly (jako proteiny 5–50 nm, viry 20–450 nm, buňky 10–100 μm) [103-107]. Jejich povrch může být také modifikován množstvím cílových (specifických) molekul včetně protilátek.

Naším cílem bylo navrhnout mikrofluidní zařízení pro stanovení 8-OHdG využívající „sendvičovou ELISA“ metodu na magnetických částicích doprovázenou elektrochemickou detekcí produktu imunoanalýzy 1-naftolu. Nejprve byly provedeny zkoušky pro ověření funkčnosti alkalické fosfatázy (ALP), magnetických částic a elektrochemické detekce produktu (Obr. 7 A). Bylo tak ověřeno základní experimentální schéma.

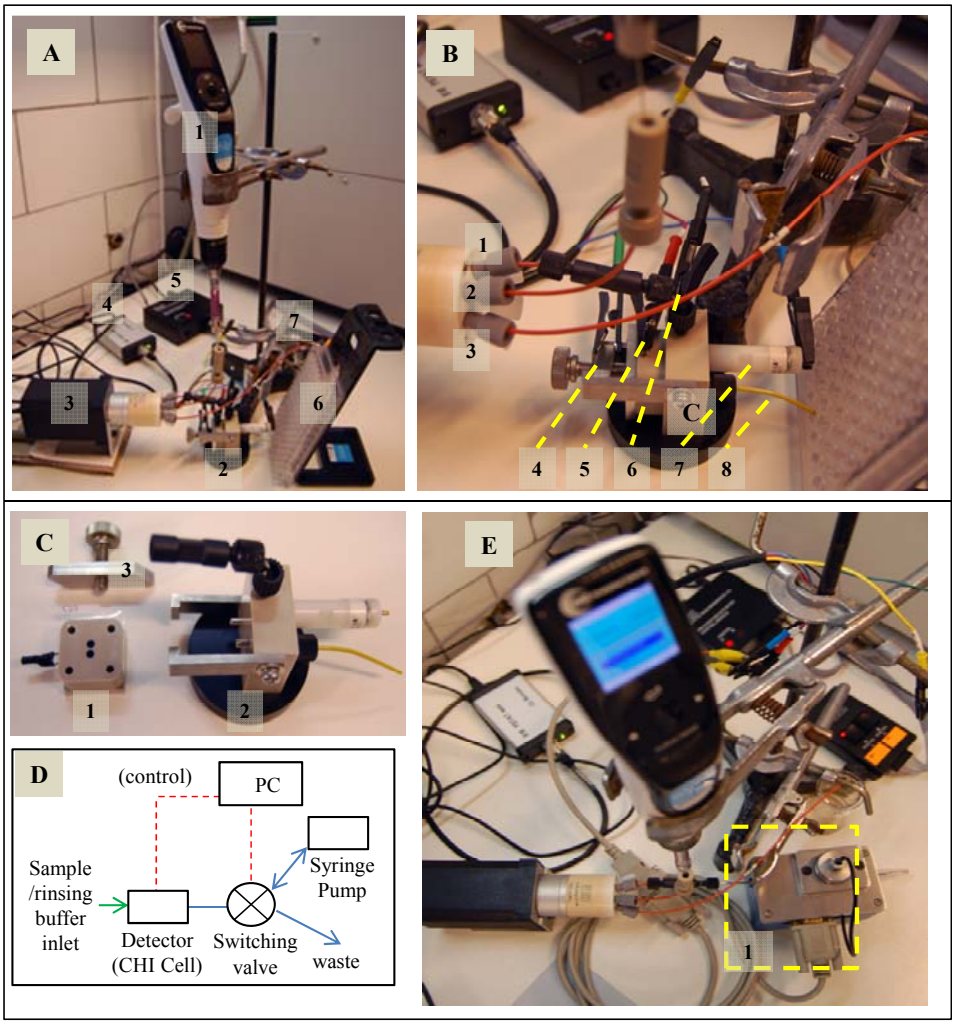


Obr. 7 (A) ALP konjugovaná králičí (proti-myší) protilátkou IgG byla spojena s G proteinem kovalentně navázaným na povrchu magnetické částice. ALP štěpí 1-naftyl-fosfát za vzniku 1-naftolu a hydrogenfosfátu. 1- naftol je pak následně detekován voltametrií s lineárním skenem (LSV). (B) Schéma automatické pipetovací stanice epMotion 5075: A2, A3, A4 pozice pro špičky, B1 nádržky s promývacími roztoky a odpadem, B3 nádržky pro protilátky a substrát, B4 magnetický držák, C1 termostatovaná pozice (4 °C), C2 a C4 manipulační pozice, C3 termostatovaná pozice (37 °C). Převzato z [10].

Komplexnost biologické matrice pro stanovení 8-OHdG vyžaduje několikakrokovou přípravu vzorku [108-110]. S využitím paramagnetických částic, imunoextrakce a imunodetekce jsou rapidně snižovány nároky na zpracování vzorku a také minimalizováno riziko výskytu artefaktů. Primárně byla testována funkce protilátek pomocí ELISA metody podle dříve publikovaných prací [111,112]. Následně byla verifikována stanovení 8-OHdG na různě poškozené DNA [6,110]. Po těchto základních testech jsme byly připraveni k optimalizaci paramagnetických částic pro imunoseparaci. Všechny kroky této optimalizace byly provedeny pomocí automatické pipetovací stanice (Obr. 7B), která byla zvlášť programována pro každou testovací sekvenci potřebných kroků. V rámci optimalizace izolační metody ELISA byla tak testována řada parametrů jako vliv ředění pokrývací protilátky (polyklonální kozí proti-8OHdG) a doba inkubace. Všechny takto připravené vzorky byly následně na výstupu ihned analyzovány pomocí naší vyvinuté elektrochemické metody.

Pro elektrochemickou detekci bylo navrženo a sestaveno zařízení pro průtokovou injekční analýzu v zastaveném toku („stopped flow injection analysis with electrochemical

detection“, SFIA-ED) s elektrochemickou detekcí využívající jako pracovní pevnou elektrodu ze skelného uhlíku a metodu voltametrie s lineárním „skenem“ (LSV) (Obr. 8). Systém byl navržen s cílem získat kompaktní zařízení malých rozměrů pro opakovatelnou mikrofluidní analýzu. Pro optimální výkon zařízení byly testovány parametry pro detekci 1-naftolu jako objem pH detekčního pufru, rychlost (0.15 V/s) a rozsah elektrochemického skenu (-0.5 V až 1.5V), doba prekondiciace elektrody (10s) před zahájením „skenu“ a objem dávkovaného vzorku (10 µl), který se ukázal jako horní limitní rozsah využitelný pro maximální opakovatelnost analýz. Při nástřiku 5 µl byla opakovatelnost RSD 5.9 % (n = 10). Minimální objem vzorku potřebného pro nasátí do systému a následné úspěšné detekce bylo 3-4 µl.



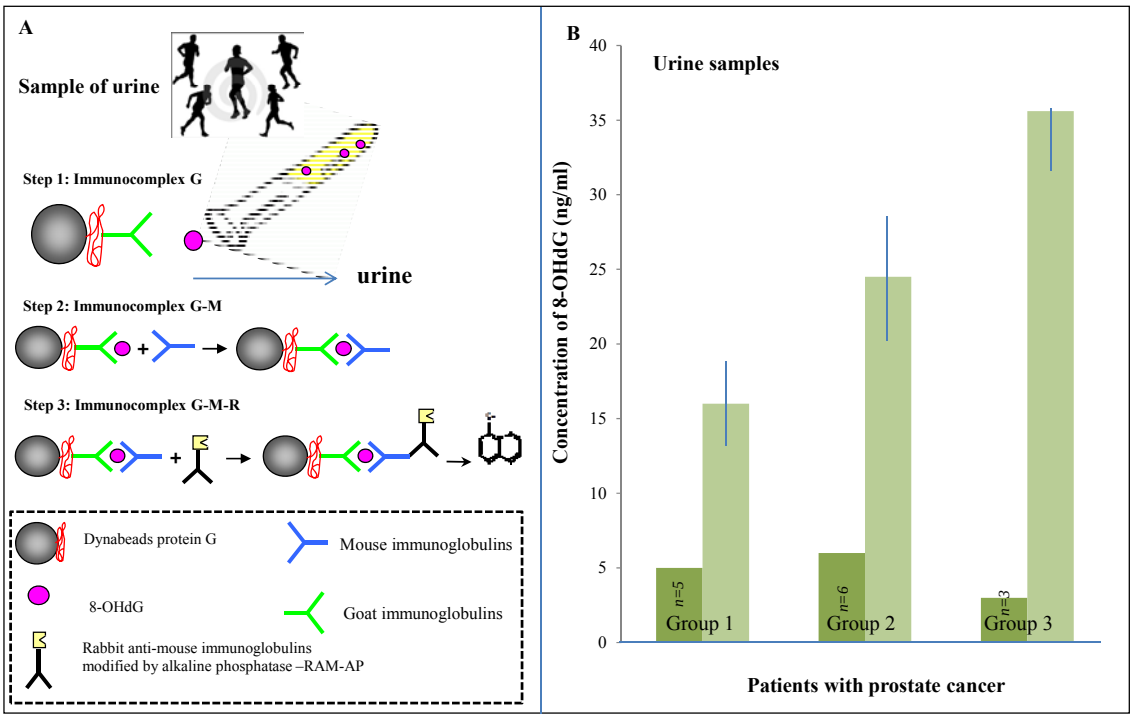
Obr. 8 (A) Fotografie zařízení SFIA-ED (1-syringe pumpa, 2-průtoková cela, 3-přepínací dvoupoziční ventil, 4-potenciostat, 5-ovládání ventilu, 6-microtitrační destička, 7-odpad. (B) Detail – přepínací ventil, průtoková cela a vstup vzorku (1-připojení průtokové cely, 2-připojení syringe, 3-odpad, 4-uzemnění, 5-pracovní elektroda, 6-

pomocná elektroda, 7-referenční elektroda, 8-kapilára pro dávkování vzorku). (C) Demontovaná průtoková cela (1-pracovní elektroda, 2-tělo průtokové cely, 3-šroubení upevňující pracovní elektrodu). (D) Schéma SFIA-ED zařízení. (E) SFIA zařízení ve spojení s HPLC analytickou celou (1 - cela 5040 (ESA, Inc.)). Převzato z [10].

Po dokončení veškerých optimalizací všech dílčích kroků celé metody byla sestavena kalibrační křivka v rozsahu aplikované koncentrace 8-OHdG od 0,25 do 200 ng/ml. Byla získána lineární závislost podle rovnice y = 5,03x – 16,96 s parametry R^2 = 0,9901 (RSD = 8,9 %, n = 3). Limit detekce (3 S/N) byl 5 pg/ml.

Následně byla metoda použita pro analýzu reálných vzorků. Proces finální přípravy vzorku, kde byla využita celá optimalizovaná „sendvičová ELISA“ metoda se třemi typy protilátek a finální elektrochemickou SFIA-ED detekcí 1-naftolu je znázorněn na obrázku (Obr. 9A).

Podle stanoveného obsahu 8-OHdG v moči jsme sérii vzorků pro tuto studii rozdělili do tří skupin. Skupina 1 měla stanovenou koncentraci 8-OHdG v rámci intervalu od 13 do 20 ng/ml s průměrnou hodnotou 16 ± 2 ng/ml; skupina 2 v rámci intervalu od 21 do 30 ng/ml s průměrnou hodnotou 25 ± 3 ng/ml; a skupina 3 s vyšší koncentrací 8-OHdG než 31 ng/ml s průměrnou hodnotou 36 ± 1 ng/ml jak je ukázáno na obrázku (Obr. 9B). Zjistili jsme, že nejvíce zastoupenou byla skupina 2 (n = 6). Tyto výsledky budou dále začleněny do detailnější klinické studie, do které plánujeme zahrnout více ostatních klinických markerů a která bude publikována v rámci delšího časového výhledu.



Obr. 9 (A) Zjednodušené schéma separace 8-OHdG ze vzorku moči. Krok 1: Připravený imunokomplex G je inkubován se vzorkem a probíhá vazba 8-OHdG. Krok 2: Formuje se imunokomplex G-M. Krok 3: Formování imunokomplexu G-M-R s následnou detekcí 1-naftolu. (B) Analýza koncentrace 8-OHdG ve vzorcích moči pacientů s rakovinou prostaty (n=14). Tmavý sloupeček: počet vzorků, světlý sloupeček: průměrné koncentrace 8-OHdG v rámci skupin 1, 2 a 3. Převzato z [10].

6. ZÁVĚR

Předkládaná rigorózní práce se v teoretické části zabývá jednak definicí a zařazením fenoménu oxidačního stresu a vysvětlením důležitosti jeho pochopení v biologickém kontextu s následným zaměřením na problematiku studia v konkrétní oblasti onkologie. Zde je práce blíže zaměřena už jen pouze na studium oxidačního poškození DNA a identifikaci vhodného markeru pro tyto účely. V praktické části pak byla vyvinuta komplexní metoda využívající imunoseparaci a imunoanalýzu sloučeniny 8-OHdG, která pak byla úspěšně verifikována a aplikována na reálné vzorky onkologických pacientů.
Výsledky práce lze tak shrnout do několika hlavních bodů.

- Byl připraven a publikován literární přehled zaměřený na oxidační poškození nukleových kyselin v souvislosti s onkologickým onemocněním a využití elektrochemických metod pro stanovení tohoto poškození.

- Byla optimalizována „sendvičová ELISA“ metoda pro selektivní izolaci 8-OHdG a následnou detekci s využitím alkalické fosfatázy na paramagnetických částicích.

- Bylo navrženo, optimalizováno a verifikováno zařízení, využívající metodu SFIA s elektrochemickou detekcí pro analýzu obsahu naftolu jako produktu AP pro hodnocení oxidačního poškození nukleových kyselin.

- Celý postup využívající izolaci a detekci 8-OHdG byl využit jako senzor pro analýzu oxidačního poškození u vzorků moči patřící pacientům s rakovinou prostaty.

7. SUMMARY

The oxygen as a specie is crucial not even for human beings on the planet. Its importance is well known and there is no doubt that without its unique chemical properties the life on the earth would not be possible. Contrary to this, even negative effects of this specie on the organism have been studied more than hundredths of years.

This work is one of the many which is trying to contribute to the problematic of oxidative damaging of the organism. The work is aimed at first point on the bringing of short overview about the study of oxidative stress caused by namely oxygen radicals and its effect on the cellular level. In detail the work is than focused on the oxidative stress in the cancer and particularly on the electrochemistry as the perspective method for its detection.

Aim of the second part of this work is to show the suitability of electrochemical method, for sensitive detection of oxidative products of nucleic acids as a marker of oxidative damage. By optimization and subsequently usage of ELISA method and application of flow injection method, the sensor system for detection of 8-OHDG as a marker of oxidative damage in urine of patients with prostate carcinoma has been proposed and applied.

The practical part of this work is based on the results obtained during preparing of complex methodical work which describes a stepwise development of method for determination of oxidative stress in the real sample. For that purpose as product of oxidative damage the molecule of 8-OHdG which is commonly studied was selected. The isolation of 8-OHdG from urine using paramagnetic particles with by antibody modified surfaces was used. 8-OHdG was determined via 1-naphtol, which was generated by enzyme of alkaline phosphatase (ALP), which was conjugated to secondary antibody. The secondary antibody was bound on to primary antibody which binds to the complex of coating antibody, attached on the particles, with in that time immobilized 8-OHdG. Due to magnetic field whole complex was purified from matrix of real sample. After addition of substrate (1-naphtyl phosphate) for ALP the enzymatic reaction in alkaline pH resulting in 1-naphthol production, which was subsequently electrochemically determined, was started. For 1-naphthol determination method of flow injection analysis in stopped flow (SFIA) with electrochemical detection using glassy carbon electrode and method of linear scan

voltammetry (LSV) was designed. This specially designed modular system was successfully tailored and tested resulting in excellent sample consumption which was only 5-10 µl. It proves the proposed method could be thus easily modified into the microfluidic "lab on valve" device.

The whole method in final design showed sufficient sensitivity and selectivity to be useful for determination of 8-OHdG as marker of oxidative stress in urine. Thanks to this the three levels of oxidative damage in urine of patients based on the concentration of 8-OHdG detected were justified by tested group within the average range from 16 to 36 ng/ml. The results obtained will be incorporated in more rigorous clinical study which is planned to be carried out in near future with covering of other clinical markers.

It clearly follows from the results obtained and as well supported by the attached publications that 8-OHdG is valuable marker of oxidative stress and can be used as a target compound for novel approaches using hyphenated methods such as ELISA and electrochemical detection herein presented. Moreover the work also shows that electrochemistry still has a bright future in the area of miniaturization of detection devices which could be useful for medical aid or personalized medicine purposes.

8. SEZNAM LITERATURY

[1] A. Nyska and R. Kohen, "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification", *Toxicologic Pathology*, 2002, pp. 620-650.

[2] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, pp. 44-84.

[3] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chemico-Biological Interactions*, 2006, pp. 1-40.

[4] B. Halliwell, "The wanderings of a free radical", *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, pp. 531-542.

[5] C.C. Winterbourn, "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species", *Nature Chemical Biology*, 2008, pp. 278-286.

[6] P. Dandona, K. Thusu, S. Cook, B. Snyder, J. Makowski, D. Armstrong and T. Nicotera, "Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus", *Lancet*, 1996, pp. 444-445.

[7] A. Kikuchi, A. Takeda, H. Onodera, T. Kimpara, K. Hisanaga, N. Sato, A. Nunomura, R.J. Castellani, G. Perry, M.A. Smith and Y. Itoyama, "Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy", *Neurobiol. Dis.*, 2002, pp. 244-248.

[8] W.R. Markesbery and J.M. Carney, "Oxidative alterations in Alzheimer's disease", *Brain Pathol.*, 1999, pp. 133-146.

[9] L.L. Wu, C.C. Chiou, P.Y. Chang and J.T. Wu, "Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics", *Clin. Chim. Acta*, 2004, pp. 1-9.

[10] O. Zitka, S. Krizkova, S. Skalickova, P. Kopel, P. Babula, V. Adam and R. Kizek, "Electrochemical Study of DNA Damaged by Oxidation Stress", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2013, pp. 130-141.

[11] J.M. Mates, "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology", *Toxicology*, 2000, pp. 83-104.

[12] H.J. Forman, M. Maiorino and F. Ursini, "Signaling Functions of Reactive Oxygen Species", *Biochemistry*, 2010, pp. 835-842.

[13] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, pp. 44-84.

[14] W. Droge, "Free radicals in the physiological control of cell function", *Physiological Reviews*, 2002, pp. 47-95.

[15] G. Gloire, S. Legrand-Poels and J. Piette, "NF-kappa B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later", *Biochemical Pharmacology*, 2006, pp. 1493-1505.

[16] O. Blokhina, E. Virolainen and K.V. Fagerstedt, "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review", *Annals of Botany*, 2003, pp. 179-194.

[17] M.S. Cooke, R. Olinski and M.D. Evans, "Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance?", *Clinica Chimica Acta*, 2006, pp. 30-49.

[18] D.J. Dwyer, M.A. Kohanski, B. Hayete and J.J. Collins, "Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli", *Mol. Syst. Biol.*, 2007, pp.

[19] T.M. Reid and L.A. Loeb, "TANDEM DOUBLE CC- TT MUTATIONS ARE PRODUCED BY REACTIVE OXYGEN SPECIES", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, pp. 3904-3907.

[20] D. Gackowski, M. Kruszewski, T. Bartlomiejczyk, A. Jawien, M. Ciecierski and R. Olinski, "The level of 8-oxo-7,8-dihydro-2 '-deoxyguanosine is positively correlated with the size of the labile iron pool in human lymphocytes", *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2002, pp. 548-550.

[21] H. Wikman, A. Risch, F. Klimek, P. Schmezer, B. Spiegelhalder, H. Dienemann, K. Kayser, V. Schulz, P. Drings and H. Bartsch, "hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): Significance for lung cancer susceptibility in a Caucasian population", *International Journal of Cancer*, 2000, pp. 932-937.

[22] H. Shimojo, M. Kobayashi, T. Kamigaito, Y. Shimojo, M. Fukuda and J. Nakayama, "Reduced Glycosylation of alpha-Dystroglycans on Carcinoma Cells Contributes to Formation of Highly Infiltrative Histological Patterns in Prostate Cancer", *Prostate*, 2011, pp. 1151-1157.

[23] H.H. Chang, B.Y. Chen, C.Y. Wu, Z.J. Tsao, Y.Y. Chen, C.P. Chang, C.R. Yang and D.P.C. Lin, "Hedgehog overexpression leads to the formation of prostate cancer stem cells with metastatic property irrespective of androgen receptor expression in the mouse model", *J. Biomed. Sci.*, 2011, pp. 1-6.

[24] C.N. Huang, S.P. Huang, J.B. Pao, T.Y. Chang, Y.H. Lan, T.L. Lu, H.Z. Lee, S.H. Juang, P.P. Wu, Y.S. Pu, C.J. Hsieh and B.Y. Bao, "Genetic polymorphisms in androgen receptor-binding sites predict survival in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy", *Ann. Oncol.*, 2012, pp. 707-713.

[25] A. Bjartell, "Genetic Markers and the Risk of Developing Prostate Cancer", *Eur. Urol.*, 2011, pp. 29-31.

[26] S. Lindstrom, F.R. Schumacher, D. Cox, R.C. Travis, D. Albanes, N.E. Allen, G. Andriole, S.I. Berndt, H. Boeing, H.B. Bueno-de-Mesquita, E.D. Crawford, W.R. Diver, J.M. Gaziano, G.G. Giles, E. Giovannucci, C.A. Gonzalez, B. Henderson, D.J. Hunter, M. Johansson, L.N. Kolonel, J. Ma, L. Le Marchand, V. Pala, M. Stampfer, D.O. Stram, M.J. Thun, A. Tjonneland, D. Trichopoulos, J. Virtamo, S.J. Weinstein, W.C. Willett, M. Yeager, R.B. Hayes, G. Severi, C.A. Haiman, S.J. Chanock and K. Peter, "Common Genetic Variants in Prostate Cancer Risk Prediction-Results from the NCI Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3)", *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2012, pp. 437-444.

[27] D. Vindrieux, M. Reveiller, J. Chantepie, S. Yakoub, C. Deschildre, A. Ruffion, M. Devonec, M. Benahmed and R. Grataroli, "Down-regulation of DcR2 sensitizes androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells to TRAIL-induced apoptosis", *Cancer Cell Int.*, 2012, pp. 1-14.

[28] S. Paquet, L. Fazli, L. Grosse, M. Verreault, B. Tetu, P.S. Rennie, A. Belanger and O. Barbier, "Differential Expression of the Androgen-Conjugating UGT2B15 and UGT2B17 Enzymes in Prostate Tumor Cells during Cancer Progression", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2012, pp. E428-E432.

[29] Y. Tang, Y.K. Chen, H.M. Jiang and D.T. Nie, "Promotion of tumor development in prostate cancer by progerin", *Cancer Cell Int.*, 2010, pp. 1-10.

[30] G. Dhom, "Pathology of benign and malignant prostate tumors", *Urol.-Ausg. A*, 1992, pp. W47-W55.

[31] W.J. Catalona, J.P. Richie, F.R. Ahmann, M.A. Hudson, P.T. Scardino, R.C. Flanigan, J.B. Dekernion, T.L. Ratliff, L.R. Kavoussi, B.L. Dalkin, W.B. Waters, M.T. Macfarlane and P.C. Southwick, "Comparison of digital rectal examination and serum prostate-specific antigen in the early detection of prostate-cancer - results of a multicancer clinical - trial of 6,630 ", *Journal of Urology*, 1994, pp. 1283-1290.

[32] J.R. Prensner, M.A. Rubin, J.T. Wei and A.M. Chinnaiyan, "Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers", *Sci. Transl. Med.*, 2012, pp.

[33] H.A. van Vugt, M.J. Roobol, M. Busstra, P. Kil, E.H. Oomens, I.J. de Jong, C.H. Bangma, E.W. Steyerberg and I. Korfage, "Compliance with biopsy recommendations of a prostate cancer risk calculator", *BJU Int.*, 2012, pp. 1480-1488.

[34] J. Borin, B. Zhang, K. Siddiqui, J. Papadimitriou, H. Yfantis, D. Holanda, S. Roys, M. Naslund, M. Phelan, A. Kramer and R. Gullapalli, "Improved detection of prostate cancer using multi-parametric magnetic resonance imaging (MRI): Correlation of in vivo and ex vivo scans with whole mount histological sections", *J. Endourol.*, 2007, pp. A29-A29.

[35] J. Lattanzi, S. McNeely, A. Hanlon, I. Das, T.E. Schultheiss and G.E. Hanks, "Daily CT localization for correcting portal errors in the treatment of prostate cancer", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998, pp. 1079-1086.

[36] H. Schoder and S.M. Larson, "Positron emission tomography for prostate, bladder, and renal cancer", *Semin. Nucl. Med.*, 2004, pp. 274-292.

[37] K.S. Engstrom, M. Vahter, G. Johansson, C.H. Lindh, F. Teichert, R. Singh, M. Kippler, B. Nermell, R. Raqib, U. Stromberg and K. Broberg, "Chronic exposure to cadmium and arsenic strongly influences concentrations of 8-oxo-7,8-dihydro-2 '-deoxyguanosine in urine", *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, pp. 1211-1217.

[38] P. Karihtala, S. Kauppila, U. Puistola and A. Jukkola-Vuorinen, "Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis", *Histopathology*, 2011, pp. 854-862.

[39] M. Pylvas, U. Puistola, S. Kauppila, Y. Soini and P. Karihtala, "Oxidative stress-induced antioxidant enzyme expression is an early phenomenon in ovarian carcinogenesis", *Eur. J. Cancer*, 2010, pp. 1661-1667.

[40] M. Pylvas, U. Puistola, L. Laatio, S. Kauppila and P. Karihtala, "Elevated Serum 8-OHdG Is Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer", *Anticancer Res.*, 2011, pp. 1411-1415.

[41] K.F. Whelan, J.P. Lu, E. Fridman, A. Wolf, A. Honig, G. Paulin, L. Klotz and J.H. Pinthus, "What Can Surrogate Tissues Tell Us about the Oxidative Stress Status of the Prostate? A Hypothesis-Generating In-Vivo Study", *Plos One*, 2010, pp.

[42] D.H. Mouhamed, A. Ezzaher, F. Neffati, W. Douki, L. Gaha and M.F. Najjar, "Study of a marker of oxidative stress in smokers: The malondialdehyde", *Immuno-Analyse & Biologie Specialisee*, 2012, pp. 153-158.

[43] V. Peddireddy, S.P. Badabagni, S.D. Gundimeda, P.R. Penagaluru and H.P. Mundluru, "Assessment of 8-oxo-7, 8-dihydro-2 '-deoxyguanosine and malondialdehyde levels as oxidative stress markers and antioxidant status in non-small cell lung cancer", *Biomarkers*, 2012, pp. 261-268.

[44] T. Dorjgochoo, Y.T. Gao, W.H. Chow, X.O. Shu, G. Yang, Q.Y. Cai, N. Rothman, H. Cai, H.L. Li, X.Y. Deng, A. Franke, L.J. Roberts, G. Milne, W. Zheng and Q. Dai, "Major metabolite of F-2-isoprostane in urine may be a more sensitive

biomarker of oxidative stress than isoprostane itself", *American Journal of Clinical Nutrition*, 2012, pp. 405-414.

[45] O. Zitka, S. Skalickova, J. Gumulec, M. Masarik, V. Adam, J. Hubalek, L. Trnkova, J. Kruseova, T. Eckschlager and R. Kizek, "Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients", *Oncology Letters*, 2012, pp. 1247-1253.

[46] A. Gugliucci, M. Tsuji, E. Kinugasa, H. Ogata, H. Ikeda, Y. Shikama and S. Kimura, "High free serum acrolein levels in bacterial infection and other disease states associated with oxidative stress: a potential biomarker?", *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2007, pp. 1559-1560.

[47] R.S. Darwish, N. Amiridze and B. Aarabi, "Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: Evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury", *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, 2007, pp. 439-442.

[48] A. Pilger and H.W. Rudiger, "8-Hydroxy-2 '-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures", *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2006, pp. 1-15.

[49] A. Valavanidis, T. Vlachogianni and C. Fiotakis, "8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis", *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 2009, pp. 120-139.

[50] S. Lagorio, C. Tagesson, F. Forastiere, I. Iavarone, O. Axelson and A. Carere, "EXPOSURE TO BENZENE AND URINARY CONCENTRATIONS OF 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE, A BIOLOGICAL MARKER OF OXIDATIVE DAMAGE TO DNA", *Occupational and Environmental Medicine*, 1994, pp. 739-743.

[51] D. Kato, M. Komoriya, K. Nakamoto, R. Kurita, S. Hirono and O. Niwa, "Electrochemical Determination of Oxidative Damaged DNA with High Sensitivity and Stability Using a Nanocarbon Film", *Analytical Sciences*, 2011, pp. 703-707.

[52] A. Gutierrez, S. Osegueda, S. Gutierrez-Granados, A. Alatorre, M.G. Garcia and L.A. Godinez, "Amperometric Detection and Quantification of 8-Hydroxy-2 '-deoxyguanosine (8-OHdG) Using Dendrimer Modified Electrodes", *Electroanalysis*, 2008, pp. 2294-2300.

[53] C.C. Chiou, P.Y. Chang, E.C. Chan, T.L. Wu, K.C. Tsao and J.T. Wu, "Urinary 8-hydroxydeoxyguano sine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers", *Clinica Chimica Acta*, 2003, pp. 87-94.

[54] B.Y. Yin, R.M. Whyatt, F.P. Perera, M.C. Randall, T.B. Cooper and R.M. Santella, "DETERMINATION OF 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE BY AN IMMUNOAFFINITY CHROMATOGRAPHY-MONOCLONAL ANTIBODY-BASED ELISA", *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, pp. 1023-1032.

[55] O. Zitka, S. Krizkova, L. Krejcova, D. Hynek, J. Gumulec, M. Masarik, J. Sochor, V. Adam, J. Hubalek, L. Trnkova and R. Kizek, "Microfluidic tool based on the antibody-modified paramagnetic particles for detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine of prostate cancer patients", *Electrophoresis*, 2011, pp. 3207-3220.

[56] M. Harri, H. Kasai, T. Mori, J. Tornaeus, K. Savela and K. Peltonen, "Analysis of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine in urine using high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2007, pp. 242-246.

[57] J.J. Hu, W.B. Zhang, H.M. Ma, Y.M. Cai, G.Y. Sheng and J.M. Fu, "Simultaneous determination of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine and 5-methyl-2 '-deoxycytidine in DNA sample by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, pp. 2765-2769.

[58] C.J. Wang, N.H. Yang, C.C. Chang, S.H. Liou and H.L. Lee, "Rapid and simple one-step membrane extraction for the determination of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine in human plasma by a combination of on-line solid phase extraction and LC-MS/MS", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, pp. 3538-3543.

[59] M.J. Li, J.B. Zhang, W.L. Li, Q.C. Chu and J.N. Ye, "Capillary electrophoretic determination of DNA damage markers: Content of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine and 8-nitroguanine in urine", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, pp. 3818-3822.

[60] S.D. Arnett, D.M. Osbourn, K.D. Moore, S.S. Vandaveer and C.E. Lunte, "Determination of 8-oxoguanine and 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine in the rat cerebral cortex using microdialysis sampling and capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005, pp. 16-25.

[61] E. Samcova, P. Marhol, F. Opekar and J. Langmaier, "Determination of urinary 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine in obese patients by HPLC with electrochemical detection", *Analytica Chimica Acta*, 2004, pp. 107-110.

[62] E. Palecek, "Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid", *Nature*, 1960, pp. 656-657.

[63] E. Palecek, "Oszillographische Polarographie der Nucleinsauren und Ihrer Bestandteile", *Naturwissenschaften*, 1958, pp. 186-187.

[64] E. Palecek and B.D. Frary, "A highly sensitive pulse-polarographic estimation of denatured deoxyribonucleic acid in native deoxyribonucleic acid samples", *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, pp. 431-+.

[65] E. Palecek and B.D. Frary, "A highly sensitive pulse-polarographic estimation of denatured deoxyribonucleic acid in native deoxyribonucleic acid samples", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1966, pp. 431-+.

[66] G. Dryhurst and P.J. Elving, "Electrochemical oxidation of adenine reaction products and mechanisms", *Journal of the Electrochemical Society*, 1968, pp. 1014-&.

[67] G. Dryhurst and G.F. Pace, "Electrochemical oxidation of guanine at pyrolytic graphite electrode", *Journal of the Electrochemical Society*, 1970, pp. 1259-&.

[68] V. Brabec and G. Dryhurst, "Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at pyrolytic-graphite electrode A new probe for studies of polynucleotide structure and reactions", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 1978, pp. 161-173.

[69] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva and V.C. Diculescu, "Voltammetric determination of all DNA nucleotides", *Analytical Biochemistry*, 2004, pp. 321-329.

[70] I. Stempkowska, M. Liga, J. Jasnowska, J. Langer and M. Filipiak, "Electrochemical response of oligonucleotides on carbon paste electrode", *Bioelectrochemistry*, 2007, pp. 488-494.

[71] C. Matayatsuk and P. Wilairat, "Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress in thalassemic patients using

HPLC with an electrochemical detector", *Journal of Analytical Chemistry*, 2008, pp. 52-56.

[72] S. Prabhulkar and C.Z. Li, "Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker", *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, pp. 1743-1749.

[73] C.C. Lin, J.H. Wang, H.W. Wu and G.B. Lee, "Microfluidic Immunoassays", *Jala*, 2010, pp. 253-274.

[74] T. Paixao, C.C.M. Garcia, M.H.G. Medeiros and M. Bertotti, "Flow injection amperometric detection of 2 '-deoxyguanosine at a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified electrode", *Analytical Chemistry*, 2007, pp. 5392-5398.

[75] T.H. Li, W.L. Jia, H.S. Wang and R.M. Liu, "Electrochemical performance of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine and its detection at poly(3-methylthiophene) modified glassy carbon electrode", *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, pp. 1245-1250.

[76] M. Pumera, A. Merkoci and S. Alegret, "New materials for electrochemical sensing VII. Microfluidic chip platforms", *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2006, pp. 219-235.

[77] C. Becker, M. Hodenius, G. Blendinger, A. Sechi, T. Hieronymus, D. Muller-Schulte, T. Schmitz-Rode and M. Zenke, "Uptake of magnetic nanoparticles into cells for cell tracking", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, pp. 234-237.

[78] Z.J. Cao, Z.X. Li, Y.J. Zhao, Y.M. Song and J.Z. Lu, "Magnetic bead-based chemiluminescence detection of sequence-specific DNA by using catalytic nucleic acid labels", *Anal. Chim. Acta*, 2006, pp. 152-158.

[79] C.H. Chiou, Y.Y. Huang, M.H. Chiang, H.H. Lee and G.B. Lee, "New magnetic tweezers for investigation of the mechanical properties of single DNA molecules", *Nanotechnology*, 2006, pp. 1217-1224.

[80] N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, Y. Chevolot and J.P. Cloarec, "Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads", *Sensors*, 2007, pp. 589-614.

[81] D.K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K.V. Rao and M. Muhammed, "Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2001, pp. 30-36.

[82] T. Kinoshita, S. Seino, Y. Mizukoshi, T. Nakagawa and T.A. Yamamoto, "Functionalization of magnetic gold/iron-oxide composite nanoparticles with oligonucleotides and magnetic separation of specific target", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, pp. 255-258.

[83] E. Palecek and M. Fojta, "Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing", *Talanta*, 2007, pp. 276-290.

[84] L.L. Wu, C.-C. Chiou, P.-Y. Chang and J.T. Wu, "Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics", *Clin. Chim. Acta*, 2004, pp. 1-9.

[85] K.B. Beckman and B.N. Ames, "Oxidative decay of DNA", *J. Biol. Chem.*, 1997, pp. 19633-19636.

[86] M.S. Cooke, M.D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec, "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease", *Faseb J.*, 2003, pp. 1195-1214.

[87] R. Edge, P. Gaikwad, S. Navaratnam, B.S.M. Rao and T.G. Truscott, "Reduction of oxidized guanosine by dietary carotenoids: A pulse radiolysis study", *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, pp. 100-103.

[88] A. Joergensen, K. Broedbaek, A. Weimann, R.D. Semba, L. Ferrucci, M.B. Joergensen and H.E. Poulsen, "Association between Urinary Excretion of Cortisol

and Markers of Oxidatively Damaged DNA and RNA in Humans", *Plos One*, 2011, pp.

[89] M. Wei, H. Wanibuchi, K. Morimura, S. Iwai, K. Yoshida, G. Endo, D. Nakae and S. Fukushima, "Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors", *Carcinogenesis*, 2002, pp. 1387-1397.

[90] R. Yoshida, Y. Ogawa, I. Mori, A. Nakata, R.S. Wang, S. Ueno, I. Shioji and N. Hisanaga, "Associations between oxidative stress levels and total duration of engagement in jobs with exposure to fly ash among workers at municipal solid waste incinerators", *Mutagenesis*, 2003, pp. 533-537.

[91] M. Stiborova, J. Patocka, E. Frei and H.H. Schmeiser, "Biochemistry and toxicological aspects of etiology of balkan endemic nephropathy", *Chemicke Listy*, 2005, pp. 782-788.

[92] A. Szymanska-Chabowska, A. Beck, R. Poreba, R. Andrzejak and J. Antonowicz-Juchniewicz, "Evaluation of DNA Damage in People Occupationally Exposed to Arsenic and Some Heavy Metals", *Polish Journal of Environmental Studies*, 2009, pp. 1131-1139.

[93] H.M. Wang, S.H. Lv, F.S. Li, Q.A. Liu and S. Ke, "Study on the changes of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels and burden of heavy metal around e-waste dismantling site", *Science of the Total Environment*, 2010, pp. 6092-6099.

[94] M. Valko, H. Morris and M.T.D. Cronin, "Metals, toxicity and oxidative stress", *Current Medicinal Chemistry*, 2005, pp. 1161-1208.

[95] Y. Yang, X.M. Jin, C.H. Yan, Y. Tian, J.Y. Tang and X.M. Shen, "Urinary level of nickel and acute leukaemia in Chinese children", *Toxicology and Industrial Health*, 2008, pp. 603-610.

[96] H.I. Chen, S.H. Liou, S.F. Ho, K.Y. Wu, C.W. Sun, M.F. Chen, L.C. Cheng, T.S. Shih and C.H. Loh, "Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): Influence of 4,4 '-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking", *J. Occup. Health*, 2007, pp. 389-398.

[97] R.N. Goyal, M. Oyama and A. Tyagi, "Simultaneous determination of guanosine and guanosine-5'-triphosphate in biological sample using gold nanoparticles modified indium tin oxide electrode", *Anal. Chim. Acta*, 2007, pp. 32-36.

[98] S. Koide, Y. Kinoshita, N. Ito, J. Kimura, K. Yokoyama and I. Karube, "Determination of human serum 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine (8-OHdG) by HPLC-ECD combined with solid phase extraction (SPE)", *J. Chromatogr. B*, 2010, pp. 2163-2167.

[99] Y. Matsumoto, Y. Ogawa, R. Yoshida, A. Shimamori, H. Kasai and H. Ohta, "The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature", *J. Occup. Health*, 2008, pp. 366-372.

[100] H. Kasai, P. Svoboda, S. Yamasaki and K. Kawai, "Simultaneous determination of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative stress, and creatinine, a standardization compound, in urine", *Ind. Health*, 2005, pp. 333-336.

[101] T. Lund-Olesen, M. Dufva and M.F. Hansen, "Capture of DNA in microfluidic channel using magnetic beads: Increasing capture efficiency with integrated microfluidic mixer", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, pp. 396-400.

[102] O. Lunov, S. Bespalova and V. Zablotskii, "A model for magnetic bead microrheometry", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007, pp. 162-165.

[103] I.M. Hsing, Y. Xu and W.T. Zhao, "Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing", *Electroanalysis*, 2007, pp. 755-768.

[104] C.J. Xu and S.H. Sun, "Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications", *Polym. Int.*, 2007, pp. 821-826.
[105] C.H. Yu, C.C.H. Lo, K. Tam and S.C. Tsang, "Monodisperse binary nanocomposite in silica with enhanced magnetization for magnetic separation", *J. Phys. Chem. C*, 2007, pp. 7879-7882.
[106] D. Huska, V. Adam, L. Trnkova and R. Kizek, "The dependence of adenine isolation efficiency on the chain length evidenced using paramagnetic particles and voltammetry measurements", *J. Magn. Magn. Mater.*, 2009, pp. 1474-1477.
[107] D. Huska, J. Hubalek, V. Adam, D. Vajtr, A. Horna, L. Trnkova, L. Havel and R. Kizek, "Automated nucleic acids isolation using paramagnetic microparticles coupled with electrochemical detection", *Talanta*, 2009, pp. 402-411.
[108] D.J. Weiss and C.E. Lunte, "Detection of a urinary biomaker for oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Electrophoresis*, 2000, pp. 2080-2085.
[109] S.R. Mei, C.H. Yao, L.S. Cai, J. Xing, G.W. Xu and C.Y. Wu, "Capillary electrophoresis with end-column amperometric detection of urinary 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine", *Electrophoresis*, 2003, pp. 1411-1415.
[110] M. Wirtz, C.A. Schumann, M. Schellentrager, S. Gab, J. vom Brocke, M.A.L. Podeschwa, H.J. Altenbach, D. Oscier and O.J. Schmitz, "Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence analysis of endogenous damage in mitochondrial and genomic DNA", *Electrophoresis*, 2005, pp. 2599-2607.
[111] S. Saito, H. Yamauchi, Y. Hasui, J. Kurashige, H. Ochi and K. Yoshida, "Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) by using ELISA", *Res. Commun. Mol. Pat. Pharm.*, 2000, pp. 39-44.
[112] K. Shimoi, H. Kasai, N. Yokota, S. Toyokuni and N. Kinae, "Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked Immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2 '-deoxyguanosine in human urine", *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002, pp. 767-770.

9. SOUBOR PUBLIKACÍ