

250 Biosenzory v nádorové diagnostice.Kizek R.^{1,*}, Adam V.^{1,2}, Křížková S.¹, Fabrik I.^{1,3}, Šobrová P.¹, Stejskal K.^{1,3}, Masařík M.⁴, Stiborová M.⁵

1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

3) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

4) Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

5) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

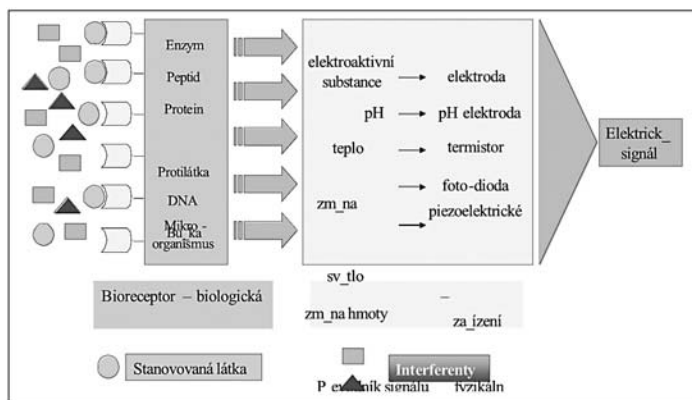
*) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz

*Klíčová slova:**Thiolové sloučeniny – biosenzor – analytické metody – elektrochemické metody – katalytické a oxidační signály***Úvod**

Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupin) chemických látek přítomných ve vzorku. Aplikace biosenzorů zasahuje do oblastí biochemie a biotechnologie, medicíny, analytické a fyzikální chemie, elektroniky, informatiky a nauky o materiálech. Základní schéma biosenzoru je zobrazeno na Obr. 1. Z obrázku vyplývá, že se biosenzor obecně skládá z biologické části (tzv. bioreceptoru či biorekogničního prvku) a fyzikálně chemického převodníku.

Fyzikálně-chemické převodníky

Pro konstrukci biosenzorů se obecně používají čtyři různé druhy fyzikálně-chemických převodníků a to elektrochemické, optické, piezoelektrické, akustické a kalorimetrické. Elektrochemické systémy reprezentují nejrozšířenější typ převodníku používaného pro konstrukci biosenzorů, zejména katalytických. Hlavními výhodami jsou jednoduchá konstrukce měřicího systému, nízké pořizovací náklady a výborná citlivost. Pro sestavení elektrochemického měřicího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody – pracovní (měřicí) a referenční. Podle aplikace a konstrukce biosenzoru může být tento dvouelektrodový systém doplněn o elektrodu pomocnou.



Obr. 1. Princip funkce biosenzoru. Bioreceptor (např. enzym, peptid protilátka) je vhodně navázán na fyzikálně-chemický převodník (elektrody, termistor, piezoelektrické zařízení), který je schopen při navázání stanovované látky na biologickou část biosenzoru detekovat změnu vyjádřenou teplem, světlem, změnou hmoty a dalších.

Bioreceptory

Bioreceptor je velmi kritickou složkou biosenzoru. Na jeho „správné“ funkci záleží úspěch celé analýzy. Podle druhu dělíme bioreceptory na biokatalytické (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus; analyt přeměňují v průběhu chemické reakce) a bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor; analyt váží v afinitním komplexu) [1,3]. Nedávno bylo publikováno využití kovy vázajícího thiolu jako biologické složky biosenzoru pro detekci těžkých kovů [4-6].

Elektrochemických biosenzorů je možné využít nejen pro stanovení toxických látek jako jsou těžké kovy, ale také pesticidní přípravky a některé organické polutanty, např. polychlorované bifenoly, akridinové deriváty a látky fenolické povahy. Nejnovější trendy v navrhování biosenzorů vedou k technikám schopným stanovit specifické sekvence RNA nebo DNA. V těchto případech je využívána DNA-hybridizace případně enzymatické modifikace pevných uhlíkových elektrod [7]. Navíc, DNA imobilizovaná na povrchu indikační elektrody je využitelná pro sledování poškození DNA, což má značný význam pro studium genotoxických vlivů škodlivin na organismy za použití kompaktních a přenosných diagnostických zařízení. Všechny tyto poznatky jsou důležité pro konstrukci selektivních a citlivých elektrochemických zařízení a jejich aplikaci v ochraně životního prostředí a lidského zdraví.

Biosenzory představují budoucnost v rozvoji terénních analýz a plně automatizovaných zařízení pro monitorování nejrůznějších analytů. Nejeftivnější a ekonomicky nejvýhodnější technologií se jeví použití převodníku složeného z galvanostatu či potenciostatu zapojeného s pevnou elektrodou, jako jsou uhlíkové pastové elektrody a nebo elektrody vyrobené z uhlíkového vlákna či pyrolytického grafitu [8]. Na druhou stranu jako biologický prvek biosenzoru je výhodné používat enzymy a některé další proteiny se schopností specifické vazby, nebo v DNA-hybridizační technologii používané, syntetické oligonukleotidy a PNA. Využití biosenzorů je možné i v on-line zapojení s elektroforetickými nebo chromatografickými separačními technikami [9]. Všechny tyto možnosti jsou dnes intenzivně studovány, nicméně použití velmi nadějných technologií DNA-hybridizace pro stanovení chromosomové DNA se prozatím bez složité přípravy vzorku příliš nedaří. V budoucnu by mohl být problém vyřešen použitím automatických mikro-PCR systémů (PCR: polymerázová řetězová reakce). Jednou z nejnovějších technik je např. provedení DNA-hybridizace na velkém pracovním povrchu (povrch H) komerčně vyráběných paramagnetických kuliček a stanovení redoxní a nebo enzymatické značky indukující hybridizaci na malém povrchu indikační elektrody [2,10-13].

Biosenzory a tumor supresorové geny

Kromě mutací v proto-onkogenech mohou vznikat mutační změny v anti-onkogenech (tumor-supresorové geny). Na rozdíl od onkogenů jimi kódované proteiny mají *antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu*. V každé somatické buňce je asi 40 tumor-supresorových genů. Aby se staly tumorogenními, musí být mutovány obě jejich alely – proto název *recesivní onkogeny*. S tím souvisí tzv. *dvouzásahová teorie*, kterou poprvé formuloval Knudson, když vysvětloval vznik vzácného *hereditárního retinoblastomu*. Na rozdíl od mnohem častějšího *sporadického retinoblastomu*, kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna. Příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice. Tomuto procesu se říká *ztráta heterozygosity (LOH=loss of heterozygosity)*. Prvně objevený tumor-supresorový gen byl nazván *retinoblastomový gen = Rb-gen* a jeho produkt RB-protein. Vyskytuje se v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení. *Rb-1* negativně reguluje důležitý transkripční faktor E2F. **Tumor-supresorový gen p53** je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA. Inaktivace *p53* bývá jedním z prvních kroků, který vede k maligní transformaci při vývoji řady nádorových onemocnění. Pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* mají obvykle jednu mutantní alelu v zárodečných buňkách a tím i riziko vzniku sarkomů, leukémie a karcinomu mléčné žlázy. Vzácně pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* nemají v zárodečných buňkách tuto mutaci, ale mutaci genu *CHK 2*, kódující proteinkinasu, která fosforyluje protein *p53*, čímž dochází k jeho aktivaci.

Právě pro studium změny funkce těchto velmi významných proteinů jsou velmi vhodné elektrochemické biosenzory. Umožňují sledování vazby proteinů na cílové molekuly, usnadní rychlé rozpoznání fyziologické či patologické struktury. Navíc umožní výraznou miniaturizaci a komercializaci takových zařízení. Každé takové zařízení může velmi intenzivně pomoci ve včasné diagnostice zhoubných onemocnění a tím umožní vyléčení tohoto závažného onemocnění.

Závěr

Jak je ukázáno, elektrochemické biosenzory jsou nástrojem s perspektivou k budoucím nanotechnologiím v medicíně, farmacii, molekulární biologii a dalších.

Poděkování: Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Skládal P. Biosensory. Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity; 1999.
2. Paleček E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*. 2002;56:809-19.
3. Paleček E. Preface. *Talanta*. 2002;56:807.
4. Wang J, Rivas G, Cai X, Paleček E, Nielsen P, Shiraishi H, et al. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal Chim Acta*. 1997;347:1-8.
5. Adam V, Petrlova J, Potesil D, Zehnalek J, Sures B, Trnkova L, et al. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. *Electroanalysis*. 2005 Sep;17(18):1649-57.
6. Adam V, Zehnalek J, Petrlova J, Potesil D, Sures B, Trnkova L, et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. *Sensors*. 2005 Jan-Feb;5(1-2):70-84.
7. Masarik M, Kizek R, Kramer KJ, Billova S, Brazdova M, Vacek J, et al. Application of avidin-biotin technology and adsorptive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize. *Analytical Chemistry*. 2003 Jun;75(11):2663-9.
8. Gilmartin MAT, Hart JP. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. A review. *Analyst*. 1995;120:1029-45.
9. Bossi A, Piletsky SA, Righetti PG, Turner APF. Capillary electrophoresis coupled to biosensor. *J Chromatogr A*. 2000;892:143-53.

VARIA

10. Paleček E, Billová S, Havran L, Kizek R, Miculkova A, Jelen F. DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection. *Talanta*. 2002;56:919-30.
11. Paleček E, Fojta M, Jelen F, Vetterl V. *Electrochemical analysis of nucleic acids*. New York: Wiley-VCH; 2002.
12. Paleček E, Fojta M, Tomschik M, Wang J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosens Bioelectron*. 1998;13:621-8.
13. Paleček E, Kizek R, Havran L, Billová S, Fojta M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. *Anal Chim Acta*. 2002;469:73-83.