

**ELEKTROCHEMICZNE I BIOLOGICZNE BADANIA DNA:
PLAZMIDY I CHROMOSOMALNE DNA**

KRÓTKA HISTORIA BADAŃ DNA
W PRACOWNI ELEKTROANALIZY CHEMICZNEJ

ELECTROCHEMICAL AND BIOLOGICAL
INVESTIGATIONS OF DNA:
PLASMIDS AND CHROMOSOMAL DNA

SHORT HISTORY OF DNA INVESTIGATIONS
AT CHEMICAL ANALYSIS LABORATORY

Hanna Elżanowska^{1,*}, Blanka Kępska-Tatar²

¹*Pracownia Elektroanalizy Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet
Warszawski, Pasteura 1, 02093 Warszawa Poland*

²*Wydział Chemii UW*

*e-mail: helzan@chem.uw.edu.pl

Dedykowane Profesorowi Zbigniewowi Galusowi
z okazji 90 urodzin

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Organizacja badań DNA w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii UW.
 - 1.1. Współpraca z innymi ośrodkami.
 - 1.2. Współpraca między Pracowniami.
 - 1.3. Badania DNA w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej.
2. Plazmidy: Struktura i zastosowanie w biologii molekularnej.
3. Zastosowanie plazmidów w elektrochemii.
4. Elektrochemiczne badania plazmidów w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii UW.
 - 4.1. Tworzenie stabilnych, odtwarzalnych cienkich warstw DNA, szczególnie plazmidów.
 - 4.2. Stosowane metody elektroanalityczne (SWV, DPV, ACV 0⁰ i ACV 90⁰)
 - 4.3. Różnice w akumulacji superhelikalnych i liniowych plazmidów, oraz chromosomalnego DNA, na elektrodzie GC.
 - 4.4. Oddziaływanie DNA z błękitem metylenowym (BM).
 - 4.5. Oddziaływanie plazmidów z nowosyntetyzowanymi potencjalnymi związkami przeciwnowotworowymi IPBD i CI-IPBD.

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr Hanna Majewska-Elżanowska uzyskała tytuł magistra chemii w 1972r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i w 1976r. tytuł doktora chemii w Instytucie Chemii fizycznej PAN, a następnie była zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego do roku 1981. Następnie, po dłuższej pracy na uniwersytetach w Kanadzie (Calgary) i w U.S.A (Portland, Oregon), od 1996r. do chwili obecnej jest zatrudniona na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W tym czasie kierowała pracami magisterskimi i pracą doktorską na tematy związane z opracowaniem biosensora glukozowego i oddziaływaniem DNA z różnego typu związkami.



<https://orcid.org/0009-0007-3316-8095>

Dr Blanka Kępska-Tatar studiowała chemię na Uniwersytecie Warszawskim, gdzie w 2008r. uzyskała tytuł magistra. W 2019 r. obroniła pracę doktorską na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Jest autorem i współautorem wielu publikacji naukowych oraz zgłoszeń patentowych i patentów. Aktualnie jest Badaczem Afiliowanym przy Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.



<https://orcid.org/0009-0008-6237-8996>

ABSTRACT

For a number of years, the DNA interactions with various compounds have been a subject of research at the Laboratory of Electroanalytical Chemistry. Plasmids and chromosomal DNAs have been used to investigate and distinguish between the DNA interactions with intercalators, newly synthesized potential anticancer drugs and antioxidants. So far, plasmids have been rarely used in electrochemical experiments and therefore their use can be considered a novelty in our investigations, realized in collaboration with the Molecular Biology Laboratory at the Faculty of Biology of the University of Warsaw. New potential anticancer drugs have been synthesized at the Institute of Organic Industrial Chemistry and tested on cancer cell lines at the Pharmacy Department of the Warsaw Medical University. The methodology of DNA-drugs investigations has been tested with the use of a typical DNA intercalator, Methylene Blue, and resulted in the sequential use of four electrochemical methods, i.e. SW, DP, AC 0⁰ i AC 90⁰ to assess redox properties and capacity/resistance changes of the electrode layers formed. Such complex electroanalytical methodology allowed for distinguishing between the anticancer properties of two seemingly similar compounds, IPBD and Cl-IPBD, which differed only by one substituent. The comparison of these electrochemical results with biological testing (on cancer cell lines) these prospective anticancer drugs, showed good correlation of the two different methods used, in prediction of anticancer properties of new drugs. Thus, it has been shown that the combination of electroanalytical methods can be successfully used for preliminary testing of anticancer drugs, before further confirming their use by complex and time consuming biological methods. It should be noted that the interactions of plasmids with the antioxidants such as: riboflavin (Rb, Wit.B2), Witamin C and Rutin (RU), used in this work and tested by electroanalytical methods, showed contrasting results to the ones obtained for anticancer drugs.

Keywords: DNA, plasmids, Methylene Blue, anticancer compounds, antioxidants

Słowa kluczowe: DNA, plazmidy, błękit metylenowy, związki przeciwnowotworowe, antyoksydanty

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
BM	– błękit metylenowy
Rb	– ryboflawina, witamina B2
RU	– rutyna
SWV	– woltametria fali prostokątnej (ang. <i>Square Wave Voltammetry</i>)
DPV	– woltametria pulsowa różnicowa (ang. <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
ACV	– woltametria zmiennoprądowa (ang. <i>Alternating Current Voltammetry</i>)

WPROWADZENIE

Już od lat 60-tych XX wieku znane są elektrochemiczne pomiary reakcji redoks zasad kwasów nukleinowych, zapoczątkowane i kontynuowane w pracowni prof. Palečka [1-4], oraz w pracowni prof. Oliviera-Brett, na elektrodach rtęciowych [5], a później węglowych [6] i złotych, w pracowni prof. Ferapontovej [7-9]. Okazało się, że kwasy nukleinowe są elektroaktywne, ale reakcje redoks zasad nukleinowych są skomplikowane, wieloetapowe, wolne [10,11], a zatem w sensie elektrochemicznym nieodwracalne, czyli można obserwować albo redukcję na elektrodach rtęciowych, albo utlenienie na elektrodach stałych - węglowych lub złotych. Zatem kwasy nukleinowe, choć elektroaktywne, są trudne do identyfikacji elektrochemicznej. Jednakże utlenianie zasad kwasów nukleinowych dopiero przy wysokich, dodatnich potencjałach elektrodowych ma też swoje dobre strony, a mianowicie ułatwia monitorowanie oddziaływania kwasów nukleinowych, DNA, a w szczególności plazmidów, z innymi elektroaktywnymi substancjami, jak na przykład ze związkami przeciwnowotworowymi, czy antyoksydantami.

W Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, a szczególnie w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej, efektywność badań na stałych elektrodach węglowych zawdzięczamy Profesorowi Zbigniewowi Galusowi nie tylko jako studentowi, doktorantowi i pracownikowi biegłemu w metodach elektroanalitycznych stosowanych w kinetyce elektrodowej, ale także dzięki pionierskiej pracy Pana Profesora na początku lat 80. XX wieku [12] na temat zastosowania elektrod grafitowych z pasty węglowej do badań elektrochemicznych.

1. ORGANIZACJA BADAŃ DNA W ZAKŁADZIE CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ WYDZIAŁU CHEMII UW

1.1. WSPÓPRACA Z INNYMI OŚRODKAMI

Elektrochemiczne badania plazmidowego i chromosomalnego DNA przedstawione w tej pracy prowadzone były w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii UW we współpracy z Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UW (otrzymywanie plazmidów) oraz Instytutem Przemysłu Organicznego w Warszawie i Uniwersytetem Przyrodniczym w Lublinie (projektowanie i synteza nowych potencjalnych związków przeciwnowotworowych) oraz Wydziałem Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (badania efektywności działania związków przeciwnowotworowych na rakowych liniach komórkowych). Tak rozległa,

wieloletnia współpraca między kilkoma uczelniami począwszy od roku 2006 była możliwa dzięki poparciu i przy czynnym udziale profesorów kierujących poszczególnymi Zakładami.

Pan Profesor Zbigniew Galus przez wiele lat kierował Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii UW, w tym Pracownią Elektroanalizy Chemicznej, ucząc nas podstaw metod elektroanalitycznych i kinetyki elektrodowej. Później funkcję tę przejął Profesor Paweł Kulesza, który aktywnie uczestniczył w naszych badaniach, a nawet prezentował na konferencjach wyniki badań autorów tego tekstu. Zrozumienie biologii plazmidów zawdzięczamy Profesorowi Zbigniewowi Staroniowi, który kierował Zakładem Biologii Molekularnej Wydziału Biologii UW, oraz współpracującej z nami dr Agnieszce Girstun, która nawet obecnie czynnie uczestniczy w naszych badaniach nad plazmidami. Natomiast bliski kontakt z Profesorem Andrzejem Niewiadomym i dr Moniką Karpińską zaowocował trafnym wyborem do badań elektrochemicznych kilku potencjalnych związków przeciwnowotworowych przez nich zaprojektowanych i zsyntetyzowanych. Współpraca ta jest nadal kontynuowana. Natomiast ścisła współpraca z dr Anitą Kośmider (Wydział Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, WUM) pozwoliła na zaprojektowanie badań na rakowych liniach komórkowych w celu określenia oddziaływań nowych, potencjalnych związków przeciwnowotworowych w sposób, który był skorelowany z warunkami badań elektrochemicznych.

1.2. WSPÓLPRACA MIĘDZY PRACOWNIAMI

W Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej kierowanej przez Profesora Zbigniewa Galusa, badania DNA zostały zapoczątkowane w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej przez Profesor Magdalenę Maj-Żurawską już od ok. 2001 roku we współpracy ze znanym badaczem DNA prof. Mascini [13]. Znaczący wkład do badań nad utlenianiem DNA i oddziaływań z lekami przeciwnowotworowymi zawdzięczamy doktorantce (obecnie dr) Iwonie Szpakowskiej, która oprócz badań elektrochemicznych pod kierunkiem prof. Maj-Żurawskiej zajmowała się syntezą nowych związków przeciwnowotworowych pod kierunkiem prof. Maciejewskiej na Wydziale Farmacji Akademii Medycznej w Warszawie. Badania DNA i krótkich fragmentów oligonukleotydów prowadzone były głównie na elektrodach sitodrukowanych (z pasty węglowej), stosowanych przez prof. Maj-Żurawską [14] i są obecne nadal kontynuowane przez dr Hannę Elżanowską z zastosowaniem elektrod węglowych z węgla szklanego (ang. *Glassy carbon*, *GC*) i plazmidowego, oraz chromosomalnego DNA, w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej, przez wiele lat kiero-

waną przez Profesora Zbigniewa Galusa, a obecnie przez Profesora Pawła Kuleszę pod nazwą Pracownia Elektroanalizy i Elektrokatalizy Chemicznej.

1.3. BADANIA DNA W PRACOWNI ELEKROANALIZY I ELEKTROKATALIZY CHEMICZNEJ

Dr Hanna Elżanowska, mając już doświadczenie w pracach nad oligonukleotydami (krótkimi fragmentami DNA o znanej sekwencji zasad nukleinowych, poly[d(G-C)] i poly[d(G-m⁵C)] w obecności jonów metali przejściowych Ni(II) i Mn(II) [15,16], w pracach nad biosensorem glukozowym [17], elektroredukcją flawin [18] i przeciwbakteryjnym działaniem H₂O₂ i jonów Cu [19], od 2006 roku prowadziła badania w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej nad opracowaniem sensora DNA. Początkowo testowane było tworzenie cienkich warstw elektrodowych (plazmidów i chromosomalnego DNA) poprzez oddziaływanie z Błękitem Metylenowym (BM, znanym interkalatorem DNA), dodatkowo badając możliwości wprowadzenia metalicznego Pd do DNA. Istotne dalsze badania prowadzone były z nowosyntetyzowanymi, potencjalnymi związkami przeciwnowotworowymi i antyoksydantami, a także wstępne badania oddziaływania plazmidów ze związkami przeciwbakteryjnymi i przeciwwirusowymi.

Prace eksperymentalne od 2006r. wykonywane były przez magistrantki: Blanę Kępską [20] - tworzenie cienkich plazmidowych warstw elektrodowych, oraz Agnieszkę Gniazdowską [21], Ewelinę Krawczyk [22] i Agnieszkę Ogórek [23] - porównanie warstw utworzonych z plazmidami superhelikalnymi i liniowymi, oraz oddziaływania z błękitem metylenowym (BM, interkalatorem DNA), rutyną (antyoksydantem) i ryboflawiną (witaminą B2).

Następnie badania były kontynuowane przez magistrantki: Annę Banasiak [24] i Dominikę Janiszek [25] - oddziaływania ze związkami przeciwnowotworowymi, oraz Katarzynę Michalską [26] - tworzenie Z-DNA. Dominika Janiszek, już jako doktorantka [27] dalej kontynuowała prace rozpoczęte w pracy magisterskiej nad oddziaływaniem DNA ze związkami przeciwnowotworowymi i antyoksydantami (witaminą C), a także wykonała pionierskie badania oddziaływań DNA ze związkami antybakteryjnymi i antywirusowymi. Ponadto wykonała też badania spektroskopowe, w tym dichroizmu kołowego, w celu określenia zmian skręcalności plazmidów na skutek oddziaływań ze związkami przeciwnowotworowymi i pentamidyną, oraz czynnie uczestniczyła w monitorowaniu badań efektów przeciwnowotworowych na komórkach rakowych. Prowadziła także wstępne badania oddziaływania plazmidów ze związkami przeciwbakteryjnymi i przeciwwirusowymi.

Ważnym nowym elementem prac dr Elżanowskiej i współpracowników, począwszy od 2006r., było zastosowanie plazmidowego DNA (plazmidów), za namową

Blanki Kępskiej, zafascynowaną tworzeniem i stosowaniem plazmidów w trakcie swojej praktyki zawodowej w 2005r. na Wydziale Biologii UW, w Zakładzie Biologii Molekularnej, kierowanej przez prof. Zbigniewa Staronia, a pod opieką dr Agnieszki Girstun, z którą, razem z obecnie już dr Blanką Kępską-Tatar, jesteśmy nadal w kontakcie i planujemy dalsze wspólne badania. Dr Kępska-Tatar ma obecnie status Badacza Afiliowanego przy Wydziale Chemii UW.

Plazmidy były sukcesywnie otrzymywane przez kolejne studentki na Wydziale Biologii pod kierunkiem dr Agnieszki Girstun. Efektem tych prac jest 16 zgłoszeń na konferencje, w tym dwanaście posterów [28-32, 34, 37-39, 43,44], cztery prezentacje [33, 35, 36, 40] i pięć publikacji [14, 42, 45, 46, 47], a dalsze są w przygotowaniu.

2. PLAZMIDY: STRUKTURA I ZASTOSOWANIE W BIOLOGII MOLEKULARNEJ

W odróżnieniu od chromosomalnego DNA, powszechnie znanej dwuniciowej spiralnej struktury DNA, plazmidy [27, 48, 49] występują jako struktury koliste, również tzw. superhelikalne (koliste, dodatkowo skręcone), a po przecięciu podwójnej nici, jako dwuniciowe liniowe.

W komórkach bakteryjnych, oraz u niektórych eukariotów, plazmidy znajdują się głównie jako koliste struktury DNA zdolne do replikacji niezależnej od chromosomalnego DNA gospodarza [27]. Chociaż najczęściej występują w postaci cząsteczek superhelikalnych, możliwe jest izolowanie plazmidów o strukturze zrelaksowanej (kolistej lub liniowej), poprzez odpowiednią manipulację enzymatyczną przy użyciu odpowiednich stężeń enzymów restrykcyjnych (Podrozdział 4.1).

Plazmidowy DNA można wyhodować z hodowli bakteryjnych, (tak, jak to zostało opisane w Podrozdziale 4.1). Dzięki obecności genów kodujących odpowiednie białka, plazmidy zmieniają odpowiedź komórki. Plazmidy decydują również o odporności na dany związek, co jest użyteczne między innymi w badaniach eksperymentalnych nad procesami bakteryjnymi. Plazmidy mogą zawierać geny warunkujące odporność na antybiotyki, tolerancję na metale toksyczne, produkcję toksyn oraz syntezę enzymów [27].

Komórki bakteryjne mogą nadal funkcjonować poprawnie nawet bez plazmidów, ponieważ geny kluczowe dla podstawowych funkcji życiowych bakterii znajdują się w DNA chromosomalnym [27, 48, 49]. Plazmidy stanowią dodatkowe źródło informacji genetycznej dla komórki bakteryjnej. Mimo że, plazmidy przecho-

wują informację genetyczną, nie są one integralną częścią genetycznej struktury komórki, ani nie są niezbędne do jej wzrostu i podziału w standardowych warunkach. Plazmidy zazwyczaj zawierają od 5 do 100 genów, które w standardowych warunkach środowiskowych nie mają kluczowego znaczenia dla przetrwania bakterii. Niemniej jednak, w określonych warunkach, te cząsteczki DNA mogą przynosić korzyści, wspierając przetrwanie i wzrost komórek.

Plazmidowe DNA używane jest w biologii molekularnej w różnorodnych aplikacjach ze względu na swoje unikalne właściwości i łatwość manipulacji [27, 48, 49]. Służy ono jako wektor do klonowania genów, umożliwia ekspresję genów, produkcję białek rekombinowanych, tworzenie mutantów genetycznych oraz sekwencjonowanie DNA. Jest również używane do badania struktury i regulacji genów. Te zastosowania plazmidowego DNA w biologii molekularnej stanowią kluczową część narzędzi i technik używanych do badania struktury, funkcji i regulacji genów oraz manipulacji nimi w różnych organizmach.

W pracach laboratoryjnych często stosowane są plazmidy pUC19 i pGEX-4T-2 w dwóch formach: superhelikalnej (sc) i liniowej (lin). Litery w nazwach plazmidów informują np. o odkrywcach tych plazmidów, albo o instytucjach, w których były przygotowane, a numery oznaczają poszczególne typy plazmidów w ramach tej samej grupy.

3. ZASTOSOWANIE PLAZMIDÓW W ELEKTROCHEMII

Na temat właściwości elektrochemicznych plazmidowego DNA wiadomo niewiele w porównaniu z opisem właściwości elektrochemicznych chromosomalnego DNA [4]. Jednak już w końcu lat 50. i na początku 60. w laboratorium prof. Palećka [50-52], zauważono, że superhelikalne, koliste i liniowe formy plazmidów można rozróżnić badając zmiany pojemności elektrody rtęciowej na skutek adsorpcji plazmidów i monitorując redukcję zasad nukleinowych.

Dopiero zastosowanie elektrod stałych, z pasty węglowej lub pirolitycznego grafitu, pozwoliło na detekcję utleniania zasad nukleinowych, guaniny (G) i adeniny (A) [53]. W ten sposób otwarta została droga do zastosowania badań plazmidów w elektrochemii, zarówno jako zmian pojemności elektrody, jak i utleniania zasad nukleinowych. Ciągłe jednak pozostał problem elektrochemicznej detekcji zasad nukleinowych, szczególnie w superhelikalnych formach plazmidów, ze względu na utrudniony dostęp elektronów do zasad nukleinowych w tych skomplikowanych strukturach.

Jednym z powodów stosunkowo małego zainteresowania plazmidami w badaniach elektrochemicznych, a szczególnie w badaniach utleniania zasad nukleinowych: guaniny (G), adeniny (A), cytozyny (C) i tyminy (T) jest fakt, że utlenianie tych zasad w plazmidach w porównaniu z chromosomalnym DNA przebiega przy tak wysokich dodatnich potencjałach, że trudno je odróżnić od prądów związanych z rozkładem elektrolitu. W tego typu pomiarach pomocne są elektrody sitodrukowane i zastosowanie korekcji prądów w porównaniu z pomiarem w roztworze bez dodatku DNA, stosowane przez prof. Maj-Żurawską i współpracowników [13, 14].

Utlenianie zasad nukleinowych jest najłatwiejsze, tzn. procesy utlenienia zasad nukleinowych przebiegają przy najmniej dodatnich potencjałach, dla samych zasad, następnie dla nukleozydów i nukleotydów [5,6] i dalej dla krótkich fragmentów podwójnej nici DNA, ale już trudniejsze, choć ciągle zauważalne dla podwójnej nici chromosomalnego DNA [3].

Terminy „łatwiejsze, trudniejsze utlenianie” są potocznie używane jako uproszczenie w przypadku kwasów nukleinowych i ich składowych. Jak to zostało wyjaśnione w początkowej części tej pracy (we WPROWADZENIU), te sygnały redoks odzwierciedlają redukcję lub utlenienie zasad nukleinowych. Reakcje są nieodwracalne w sensie kinetyki elektrodowej, czyli w przypadku opisywanych procesów adsorpcyjnych, potencjały redukcji i utlenienia zasad nukleinowych nie są zbliżone, lecz różnią się znacznie między sobą. Skrajnym przykładem nieodwracalnych procesów adsorpcyjnych są reakcje redoks zasad nukleinowych obserwowane tylko jako redukcja (na elektrodach ręciovych) albo utlenienie (na elektrodach stałych).

Potencjały utlenienia zasad nukleinowych na elektrodzie z pasty węglowej [24] różnią się znacznie dla zasad i monofosforanów nukleotydów w buforze octanowym o pH 4.7. Dla zasad - guaniny (G) i adeniny (A) wynoszą odpowiednio ok. 0.6 V i 0.9 V vs. AgCl, a dla monofosforanów mononukleotydów GMP i AMP odpowiednio ok. 0.9 V i 1.2 V vs. AgCl. Sygnały te zostały zarejestrowane przy użyciu woltometrii fali prostokątnej (ang. *Square Wave Voltammetry*, SWV) i używając dodatkowo korekty pozwalającej na odejmowaniu prądów elektrolitu podstawowego, znacznych przy potencjałach powyżej 1.0 V. Ponadto konieczne było zastosowanie mikromolowych stężeń (μM) zasad i fosforanów mononukleotydów. W chromosomalnym (helikalnym) DNA utlenianie guaniny

i adeniny jest obserwowane przy jeszcze bardziej dodatnich potencjałach: guaniny przy ok. 1.1 V i adeniny przy ok. 1.3 V [20].

Te różnice w potencjałach utleniania guaniny i adeniny w zależności od umiejscowienia zasady w kolejnych złożonych strukturach sugerują, że w strukturach plazmidów - liniowych, a tym bardziej superhelikalnych - utlenianie zasad nukleinowych może być jeszcze bardziej utrudnione. Prawdopodobnie jest to ważny powód niewielkiego zastosowania plazmidów w badaniach elektrochemicznych.

Tymczasem można sobie wyobrazić, że właśnie ten fakt może być użyteczny przy tworzeniu plazmidowych warstw elektrodowych i rozróżnieniu między plazmidami liniowymi i superhelikalnymi. Utrudniona detekcja sygnałów utlenienia zasad nukleinowych w plazmidach może być także użyteczna przy badaniu oddziaływań plazmidowego DNA z różnymi typami elektroaktywnych związków i to w dwojaki sposób. Sygnały redoks tych związków niezaburzone utlenianiem zasad nukleinowych będą łatwo zauważalne. Ponadto pojawienie się sygnałów zasad nukleinowych na skutek oddziaływań z pewnymi związkami będzie świadczyło o zaburzeniu struktury plazmidowego DNA i będzie łatwiej zauważalne niż w przypadku chromosomalnego DNA. Poza tym, nie tylko utlenianie zasad nukleinowych, ale detekcja zmian pojemności i oporu warstwy DNA może być monitorowana przy zastosowaniu woltametrii zmiennoprądowej (ang. *Alternating Current Voltammetry*, ACV), szczególnie w przypadku plazmidów superhelikalnych.

Takie idee przyświecały naszym badaniom z udziałem plazmidów i związków interkalujących w DNA, jak np. błękit metylenowy (BM), oraz związków przeciwnowotworowych czy antyoksydantów o nieznanym sposobie łączenia się z DNA.

4. ELEKTROCHEMICZNE BADANIA PLAZMIDÓW W PRACOWNI ELEKTROANALIZY CHEMICZNEJ ZAKŁADU CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ WYDZIAŁU CHEMII UW

W tym krótkim artykule przedstawiamy najważniejsze wyniki doświadczeń elektrochemicznych prowadzonych w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej nad oddziaływaniem DNA, głównie plazmidów, ale też, dla porównania chromosomalnego DNA, z różnego typu związkami: błękitem metylenowym (BM), znanym interkalatorem DNA, użytym do testowania układu plazmidowego, nowosyntetyzowanymi potencjalnymi związkami przeciwnowotworowymi i ich współdziałania z antyoksydantami, a także wstępne wyniki dla związków przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych. Przykładowe wyniki badań zostały

wybrane z prac magisterskich [20-26] i pracy doktorskiej [27], wykonanych w Pracowni, prezentowanych na konferencjach [28-40, 43,44] i opublikowanych [14, 42, 45-47].

4.1. TWORZENIE STABILNYCH, ODTWARZALNYCH CIENKICH WARSTW DNA, SZCZEGÓLNIIE PLAZMIDÓW

Pierwszym etapem elektrochemicznych badań DNA było opracowanie odpowiednich warunków eksperymentalnych. Szczególnie w przypadku plazmidów, okazało się to trudne i czasochłonne. Stosowane często w pomiarach adsorpcyjnych nakrapianie substancji bezpośrednio na elektrodę, okazało się nieefektywne, ponieważ, jak można było zauważyć w pionierskich pomiarach AFM Blanki Kępskiej [20], pokrycie elektrod było nierównomierne i zbyt duże, choć wyraźnie widać było koliste plazmidy zaadsorbowane np. na elektrodzie złotej. Ponadto, już w trakcie początkowych pomiarów magistrantki Blanki Kępskiej, okazało się, że plazmidy wyjątkowo silnie adsorbują się nie tylko na elektrodach pracujących, ale też na elektrodzie odniesienia i pomocniczej, a także na ściankach naczynka. Nawet typowe, wielogodzinne oczyszczanie w stężonych kwasach okazało się niewystarczające i konieczne okazało się dodatkowe, czasem wielokrotne czyszczenie całego układu w płuczce ultradźwiękowej, aż do zaniku sygnału DNA. Procedura ta była stosowana przed każdym pomiarem z udziałem DNA, zarówno plazmidowego, jak i chromosomalnego.

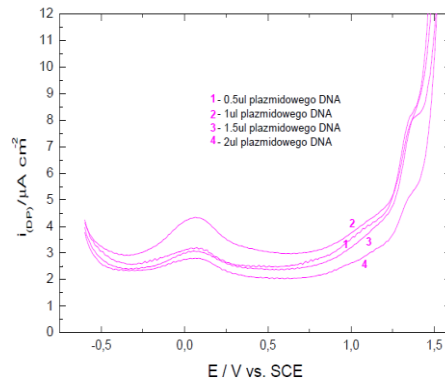
W dalszych pomiarach opisanych w pracy magisterskiej dr. Blanki Kępskiej [20] okazało się, że w podobny sposób można tworzyć stabilne warstwy elektrodowe na elektrodach z węgla szklanego (ang. *Glassy Carbon, GC*), choć dodatkową trudność sprawiało czasochłonne czyszczenie samej elektrody przez szlifowanie, przed oczyszczaniem w płuczce ultradźwiękowej. Późniejsze precyzyjne pomiary AFM wykonane przez prof. Sławomira Sęka na Wydziale Chemii UW i zamieszczone w pracy doktorskiej dr Dominiki Janiszek [27], a także w publikacjach [14, 42, 45-47] i zgłoszeniach na konferencje [28-40, 43, 44] pokazały regularne ułożenie plazmidów na elektrodzie z węgla szklanego (ang. *Glassy Carbon, GC*). Można było także rozróżnić formę kolistą superhelikalną (sc) i formę liniową (lin), określaną także jako forma zrelaksowana albo strawiona plazmidów pUC19 i pGEX-4T-2.

Te formy plazmidów były przygotowywane na Wydziale Biologii UW (pod kierunkiem dr Agnieszki Girstun) przez kolejne studentki Wydziału Chemii UW w ilościach wymaganych do pomiarów elektrochemicznych. Używane były standardowe metody przygotowania i oczyszczania plazmidów. Plazmidy superheli-

kalne scpUC19 i scpGEX-4T-2 były namnażane, izolowane i oczyszczane przy użyciu bakterii *Escherichia coli* (XII Blue MRF*) i GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit from Eurs, Poland. Formy liniowe plazmidów (lin) otrzymywane były z form superhelikalnych przy użyciu enzymu restrykcyjnego w temp 37 °C, i w buforze producenta (Fermentas). Następnie mieszaninę reakcyjną rozdzielano przy użyciu 1 % żelu agarazowego, traktowanego bromkiem etydyny. Liniowy fragment plazmidu był izolowany i dalej oczyszczany przy użyciu GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (Eurs, Poland)

Aby otrzymać powtarzalne wyniki doświadczeń, konieczne było też obniżenie stosowanych stężeń plazmidów i chromosomalnego DNA w naczynku pomiarowym przynajmniej do wartości rzędu pg/ml lub niższych, w odróżnieniu od zwykle stosowanych ilości µg/ml. Ten sposób tworzenia plazmidowej warstwy elektrodowej wymagał zatem kilku godzin powolnej adsorpcji z roztworu, aż do stabilizacji układu. Dopiero wtedy można było dodawać do roztworu niewielkie ilości substancji oddziałującej z plazmidowym DNA rzędu µg/ml.

Blanka Kępska, w początkowej fazie swojej pracy magisterskiej [20] stosowała elektrody złote (elektrody szklane z napylnym złotem), ale dopiero pomiary wykonane z użyciem elektrody z węgla szklanego (GC) [20] dobrze rokowały jako elektrody pracujące.



Rys.1 z [20].

Krzywe zarejestrowane dla pulsowej woltametrii różnicowej (DPV) w zależności od ilości plazmidowego DNA zaadsorbowanego na elektrodzie węglowej (Glassy Carbon, GC) o powierzchni 0,07cm², w buforze octanowym (stężenie 0,25M, pH=4,7-4,8), krzywe: 1) 1,3 pg plazmidowego DNA, 2) 2,7 pg plazmidowego DNA, 3) 4 pg plazmidowego DNA, 4) 5,4 plazmidowego DNA (superhelikalnego pUC19) nakropłonego bezpośrednio na elektrodę (0,5µl=1,3 pg, 1µl=2,7 pg, 1,5µl=4, 2µl=5,4 pg).

Fig. 1 from [20]. Pulse voltammetric curves (DPV) for plasmid DNA adsorbed on carbon electrode (Glassy Carbon, GC), 0.07 cm^2 area, in acetate buffer (concentration 0.25 M, pH 4.7-4.8), curves: 1) 1,3 pg plasmid DNA, curve 2) 2,7 pg plasmid DNA, curve 3) 4 pg plasmid DNA, curve 4) 5,4 pg plasmid DNA (superhelical pUC19) placed on the electrode ($0,5 \mu\text{l}=1,3 \text{ pg}$, $1 \mu\text{l}=2,7 \text{ pg}$, $1,5 \mu\text{l}=4$, $2 \mu\text{l}=5,4 \text{ pg}$).

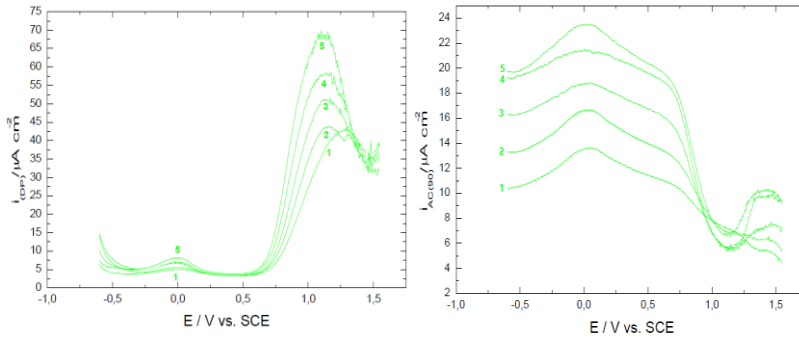
Krzywe 1-4 na Rys. 1, nie były jednak proporcjonalne do ilości DNA nakroplonych na elektrodę GC. Wobec tego w dalszych pomiarach stosowane było osadzanie plazmidów na elektrodzie GC (0.7 cm^2) poprzez długotrwałą akumulację z roztworu zawierającego 20 pg/ml (pikogramów/ml). Dopiero wtedy można było otrzymywać powtarzalne wyniki pomiarów.

4.2. STOSOWANE METODY ELEKTROANALITYCZNE

(SWV, DPV, ACV 0^0 i ACV 90^0)

Detekcja tworzenia cienkiej, ale stabilnej warstwy elektrodowej DNA jest utrudniona w przypadku plazmidów, ponieważ, w porównaniu z chromosomalnym DNA, sygnały utlenienia zasad nukleinowych plazmidów na elektrodzie z węgla szklanego (GC) są jeszcze mniej zauważalne niż dla chromosomalnego DNA, nawet przy zastosowaniu tak czułych metod elektroanalitycznych jak woltammetria fali prostokątnej SWV (ang. *Square Wave Voltammetry*) czy woltammetria pulsowa różnicowa DPV (ang. *Differential Pulse Voltammetry*). Dlatego przydatne są również inne metody, np. metody zmiennoprądowe ACV (ang. *Alternating Current Voltammetry*), które pozwalają na detekcję zmian pojemności i oporu warstwy elektrodowej. W badaniach DNA, zarówno przy akumulacji DNA na elektrodzie GC, jak i w badaniach oddziaływania różnego typu związków z DNA (tych elektroaktywnych, jak i nieaktywnych), we wszystkich pomiarach stosowane były cztery wymienione metody: SWV, DPV i ACV 0^0 oraz ACV 90^0 . Pomiary były wykonywane zawsze w tej samej kolejności i w odstępach 20 minutowych.

Rysunek 2 przedstawia pomiary wykonane przez pierwszą z magistrantek zajmujących się elektrochemią plazmidów, Blankę Kępską, stosując elektrodę z węgla szklanego (GC), po jej uprzednim długotrwałym oczyszczeniu z DNA, oraz stosując długotrwałą akumulację z roztworów o niskim stężeniu plazmidów, rzędu pg/ml. Taki układ pomiarowy, stosowany następnie przez kolejne studentki, pozwolił na otrzymywanie powtarzalnych wyników pomiarów.



Rys. 2 z [20]. Krzywe DPV (lewa strona) i ACV 90° (prawa strona) zarejestrowane w 0.25 M buforze octanowym, pH 4,7, zawierającym liniowe plazmidowe DNA (linpUC19) osadzone na elektrodzie GC ($0,7 \text{ cm}^2$). Krzywe 1-5 zostały zarejestrowane po czasie: 1) 1 min, 2) 20 min, 3) 40 min, 4) 60 min, 5) 80 min.

Fig. 2 from [20]. Curves: DPV (left) and ACV 90° (right), registered in 0.25 M acetate buffer, pH 4.7, containing linear plasmid DNA (linpUC19) adsorbed on the GC electrode (0.7 cm^2). Curves 1-5 registered after: 1) 1 min., 2) 20 min., 3) 40 min., 4) 60 min., 5) 80 min.

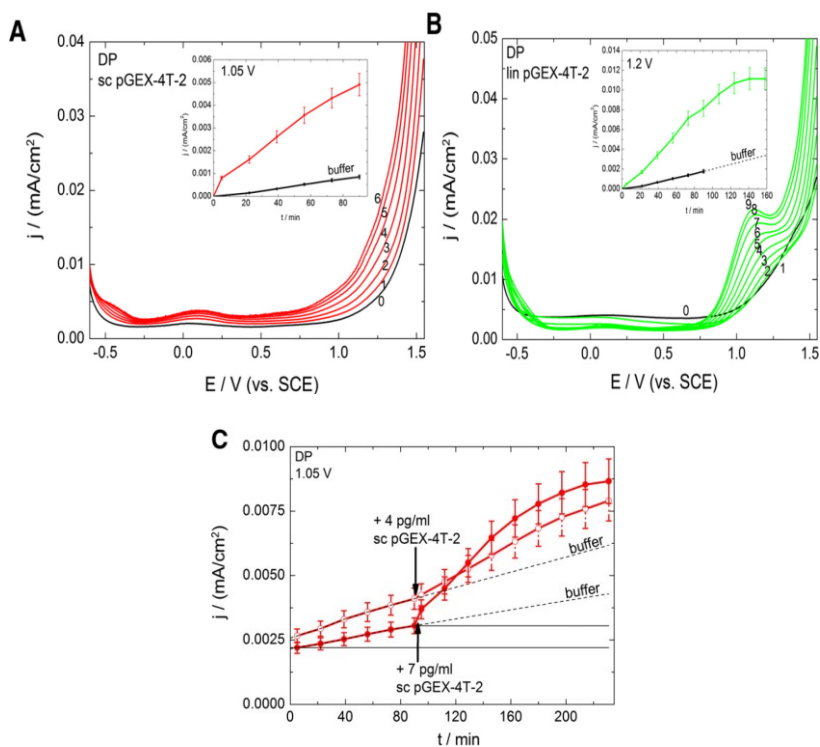
Podwyższenie krzywych DPV i ACV 90° wraz z czasem pomiarów świadczy o zwiększających się ilościach linpUC19 zakumulowanych na elektrodzie GC i widocznych jako utlenianie zasad nukleinowych przy potencjałach ok. 1.1 V vs. SCE w metodzie DPV, oraz jako wzrost pojemności i oporu (C/R) warstwy elektrodowej w metodzie ACV 90° . W obydwu metodach krzywe akumulacyjne są różne, ale proporcjonalne do ilości zakumulowanego plazmidu. Ponadto utlenianie zasad nukleinowych jest również obserwowane w metodzie ACV 90° jako minimum obserwowane przy potencjale ok. 1,0 V na krzywych akumulacyjnych.

W trakcie tworzenia stabilnej warstwy elektrodowej, seria czterech pomiarów była powtarzana, aż do uzyskania maksymalnego pokrycia elektrody DNA. Przy stężeniach DNA w roztworze rzędu piko gramów na ml (pg/ml), utworzenie stabilnej, praktycznie już niezmiennej warstwy, zabierało kilka godzin. Dopiero wtedy do roztworu dodawane były kolejne porcje badanej substancji akumulującej się w plazmidach. Po każdym dodaniu badanej substancji, ponownie wykonywane były cztery pomiary metodami SWV, DPV i ACV 0° oraz ACV 90° , zaczynając od minimalnych stężeń, tak, aby te początkowe zmiany były ledwie zauważalne i dalej, aż do nasycenia warstwy DNA, czyli aż do uzyskania zbliżonych lub identycznych wyników pomiarowych.

Te czasochłonne pomiary okazały się jednak celowe, pozwalając na wykreślenie i porównanie wielu krzywych tworzenia warstwy i akumulacji związków, w zależności od stosowanego plazmidu lub chromosomalnego DNA i rodzaju akumulowanego związku.

4.3. RÓŻNICE W AKUMULACJI PLAZMIDÓW SUPERHELICALNYCH I LINIOWYCH ORAZ CHROMOSOMALNEGO DNA NA ELEKTRODZIE GC

Przykładowe różnice w krzywych akumulacyjnych plazmidów pGEX-4T-2 i pUC19 w formie superhelikalnej (sc) i liniowej (lin) zaobserwowane w pomiarach magistrantek Agnieszki Gniazdowskiej [21] i Eweliny Krawczyk [22] zostały przedstawione w publikacji ‘*Supercoiled and linear plasmid DNAs interactions with methylene blue*’ [42]. Akumulacja superhelikalnego sc pGEX-4T-2 i liniowego lin pGEX-4T-2, przedstawiona na Rys. 3A-3C poniżej, prowadzona była z roztworów zawierających odpowiednio 7 pg/ml i 4 pg/ml plazmidu, a obserwowana przez 230 min.



Rys. 3A-3C z [42]. A — B. Woltamogramy DP pokazujące akumulację: A — superhelikalnego (sc) i B — liniowego (lin) plazmidu pGEX-4T-2 w 0.25 M buforze octanowym z dodatkiem 18 mM MgCl₂ (pH 4.7). Stężenie plazmidów: A — (0), tzn. w buforze, (1)–(6) 7 pg/ml scpGEX-4T-2 i B — (0) 0, tzn. w buforze, (1)–(9) 4 pg/ml linpGEX-4T-2. Czasy akumulacji: (0) 0, (1) 5 min, (2) 22 min, (3) 39 min, (4) 56 min, (5) 73 min, (6) 90 min, (7) 107 min, (8) 124 min, (9) 141 min. W ramkach na rysunkach 3A i 3B pokazane są zależności gęstości prądów wzgl. czasu akumulacji plazmidów. Prądy mierzone były wzgl. SCE przy potencjale 1,05 V dla plazmidu sc i przy 1,2 V dla plazmidu lin. Te potencjały, elektroda GC i bufor były te same we wszystkich doświadczeniach prezentowanych w tej pracy. C — Gęstości prądów wzgl. czasu (*j* vs. *t*) dla pomiarów woltametrycznych DP przy 1,05 V w buforze bez scpGEX-4T-2 (pierwsze 90 min.) i po dodaniu plazmidu (następne 140 min.) Stężenie plazmidu: (otwarte kółka) +4 pg/ml, (zamknięte kółka) +7 pg/ml. Przerwane linie pokazują ekstrapolowane, liniowe zależności *j* vs. *t* dla buforu. Ciągłą linią przy *t* = 0 zaznaczono gęstości prądów na początku doświadczenia (*t* = 0) i przed dodaniem plazmidu (*t* = 90 min).

Fig. 3A-3C from [42]. A — B. DP voltammograms showing the accumulation of: A — supercoiled circular (sc) and B — linear (lin) pGEX-4T-2 plasmid in 0.25 M acetate buffer, 18 mM MgCl₂ (pH 4.7). Plasmid concentration: A — (0) 0, i.e. buffer solution, (1)–(6) 7 pg/mL scpGEX-4T-2 and B — (0) 0, i.e. buffer solution, (1)–(9) 4 pg/mL linpGEX-4T-2. Accumulation times: (0) 0, (1) 5 min., (2) 22 min, (3) 39 min, (4) 56 min, (5) 73 min, (6) 90 min, (7) 107 min, (8) 124 min, (9) 141 min. The insets show the dependence of the DP current densities on the plasmid accumulation time. The DP voltammetric currents were measured vs. SCE at 1.05 V for sc plasmid and at 1.2 V for lin plasmid. These potentials, the GC electrode and the buffer solution used were the same in all experiments presented in this work. C — Current density vs. time (*j* vs. *t*) plots taken from DP voltammetric curves at 1.05 V in buffer solution without scpGEX-4T-2 plasmid presence (first 90 min) and after the plasmid addition (next 140 min). Plasmid concentrations: (open circles) +4 pg/mL, (closed circles) +7 pg/mL. Dotted lines show the extrapolated, linear *j* vs. *t* dependencies for the buffer solution. The solid line at *t* = 0 marks the current density value for the baseline at the beginning of the experiment (*t* = 0) and before the addition of the plasmid (*t* = 90 min).

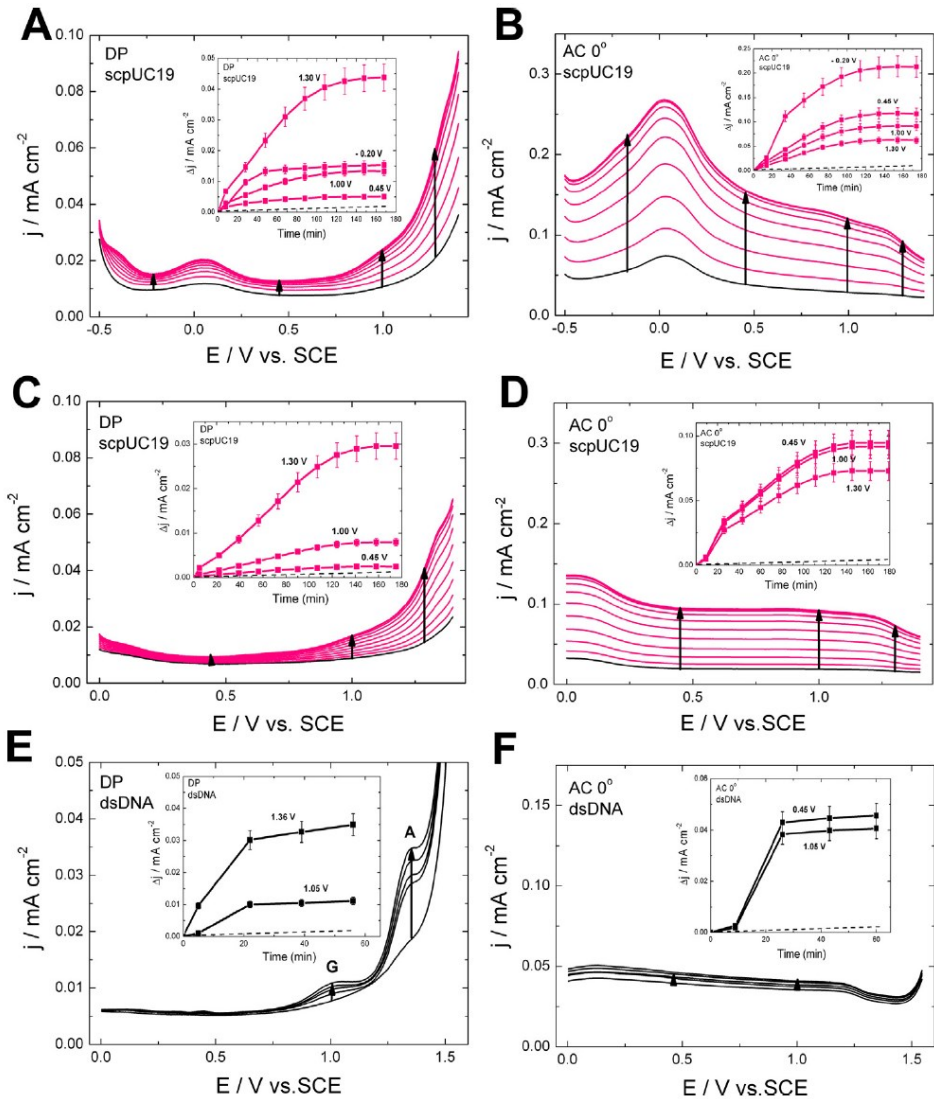
Dla superhelikalnego plazmidu nie obserwowano pików utleniania zasad nukleinowych, a jedynie wzrost sygnału DPV przy potencjałach elektrodowych powyżej 1.0 V. Natomiast dla liniowego plazmidu wyraźnie zauważalny był pik utlenienia z maksimum przy ok. 1.0 V vs. SCE. Tymczasem tworzenie warstwy plazmidu pUC19 następowało znacznie szybciej, w czasie 100 minut, dla stężenia 8 pg/ml scpUC19, a poza tym prądy akumulacyjne były cztery razy wyższe. Ponadto, dla liniowego plazmidu linpUC19 trzy razy wyższe prądy w porównaniu z linpGEX-

4T-2 obserwowane były już przy stężeniu 0.3 pg/ml. Zatem różnice w akumulacji poszczególnych plazmidów były łatwo zauważalne (Fig. 3A-3C z [42]).

Jak przedstawiono na Rys. 4A-4F, podobne zależności utleniania zasad nukleinowych jak w przypadku akumulacji plazmidu pGEX-4T-2 (Rys. 3A-3B) zostały zaobserwowane w plazmidzie pUC19: liniowym (Fig. 4A) i superhelikalnym (Fig. 4C), przy zastosowaniu metody DPV. Utlenianie plazmidów jest zauważalne tylko jako wzrost prądów utlenienia w zakresie potencjałów od ok. 0,8 V do ok. 1,4 V (Rys. 4A i 4C). Natomiast w przypadku chromosomalnego DNA, w pomiarach wykonanych tą samą metodą DPV (Rys. 4E) można zauważyć dwa piki utleniania, przypisywane zwykle utlenieniu guaniny (G), przy potencjale 1.05 V, i adeniny (A) przy potencjale 1.36 V. W ramce na rysunku 4E pokazane są zależności gęstości prądów utleniania G i A wzgl. czasu akumulacji chromosomalnego DNA.

Różnice między akumulacją plazmidów i chromosomalnego DNA są widoczne nie tylko przy porównaniu prądów utleniania, ale także czasów akumulacji wyznaczonych metodą DPV i przedstawionych w ramach rysunków 4A, 4C i 4E. Formacja stabilnej warstwy plazmidu wymaga ok.120 min., a chromosomalnego DNA tylko ok. 20 minut.

Pomiary wykonane metodą woltometrii zmiennoprądowej ACV 0^0 (Rys. 4B, 4D i 4F) również wskazują na różnice w akumulacji plazmidów i chromosomalnego DNA, ale jako zmiany pojemności i oporu warstwy elektrodowej.

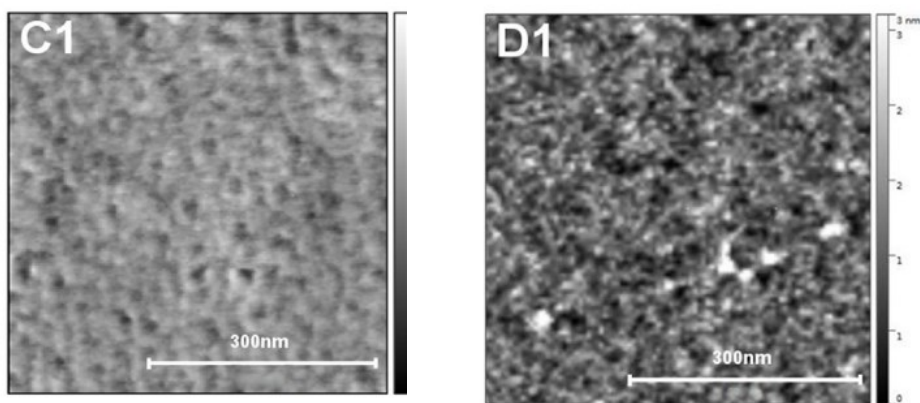


Rys. 4A-4F z [46]. Woltamogramy DPV (1A, 1C, 1E) i ACV 0^0 (1B, 1D, 1F) obrazujące akumulację DNA na elektrodzie GC dla: plazmidu scpUC19 w zakresie potencjałów od 0.5 V do 1.4 V (1A, 1B), oraz w zakresie potencjałów od 0 V do 1.4 V (1C, 1D) i dla dsDNA ze spermy łososia w zakresie potencjałów od 0 V do 1.55 V (1E, 1F). Stężenia DNA: (linie różowe) scpUC19, 8.07 $\mu\text{g/mL}$ i (linie czarne) dsDNA ze spermy łososia 4 $\mu\text{g/mL}$. Bufor octanowy: 0.25 M z dodatkiem 18 mM MgCl_2 (pH 4.7): (linie czarne). Czasy akumulacji: (1A) 0, 8, 28, i dalej co 20 min aż do 168 min., (1B) 0, 14, i dalej co 20 min aż do 174 min, (1C) 0, 5, i dalej co 17 min aż do 175 min, (1D) 0, 5, i dalej co 17 min aż do 179 min, (1E) 0, 5, i dalej co 17 aż do 56 min, (1F) 0, 9, i dalej co 17 aż do 60 min. Na rysunkach 4A-4F w ramkach pokazane są zależności gęstości prądów DPV

i ACV 0^0 wzgl. czasu akumulacji plazmidów. Prądy mierzone były przy potencjałach: 0.20 V, 0.45V, 1.00 V i 1.3 V (1A, 1B), 0.45 V, 1.00 V i 1.3 V (1C,1B), 1.05V, i 1.36 V (1E), 0.45 V, i 1.05V (1F) vs. SCE. Linie przerywane pokazują nieznaczne podwyższenie prądów w buforze, tzn. bez dodatku plazmidu lub chromosomalnego DNA.

Fig. 4A-4F from [46]. DP (1A, 1C, 1E) and AC (0) (1B, 1D, 1F) voltammograms of DNA accumulation on a GC electrode for: sc pUC19 plasmid in the potential range from 0.5 V to 1.4 V (1A, 1B), from 0 V to 1.4 V (1C, 1D) and for salmon sperm dsDNA in the potential range from 0 V to 1.55V (1E, 1F). DNA concentrations: (pink lines) scpUC19, 8.07 pg/mL and (black lines) salmon sperm dsDNA 4 pg/mL. Buffer solution: 0.25 M acetate, 18 mM MgCl₂ (pH 4.7): (black lines). Accumulation times increase in the order: (1A) 0, 8, 28, and then every 20 min up to 168 min., (1B) 0, 14, and then every 20 min up to 174 min, (1C) 0, 5, and then every 17 min up to 175 min, (1D) 0, 5, and then every 17 min up to 179 min, (1E) 0, 5, and then every 17 min up to 56 min, (1F) 0, 9, and then every 17 min up to 60 min. The insets show the dependence of the DP and AC(0) current densities on the plasmid accumulation time. The voltammetric currents were measured at 0.20 V, 0.45V, 1.00 V, and 1.3 V (1A, 1B), 0.45 V, 1.00 V, and 1.3 V (1C,1B), 1.05V, and 1.36 V (1E), 0.45 V, and 1.05V (1F) vs. SCE. Dotted lines in the accumulation plots (insets) show a small baselines increase for the buffer solution.

Jak wynika z pomiarów obrazowania powierzchni elektrod wykonaną metodą AFM, przedstawionych na Rys. 5A–5B, przy akumulacji superhelikalnego plazmidu sc pUC19 (E1) widoczna jest superhelikalna struktura, inna od liniowej (F1). Ciekawe jest jednak, że struktury superhelikalne są także częściowo obserwowane przy akumulacji liniowego plazmidu.



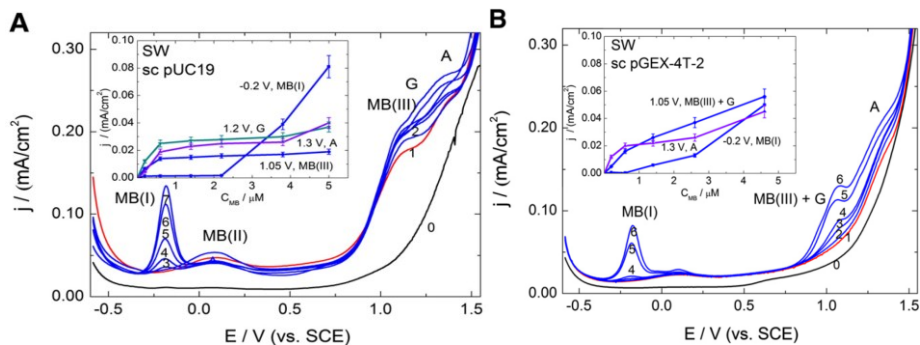
Rys. 5A-5B z [46]. Rysunki C1 i D1 pokazują zdjęcia AFM płytki w węgla szklonego (GC) o wymiarach 10 mm x 10 mm pokrytej pUC19: (C1) plazmid scpUC19 nakropiony na płytkę z roztworu 8 pg/ml, RMS 0,628 nm, (D1) plazmid linpUC19 nakropiony na płytkę GC z roztworu 80 pg/ml, RMS 0,936 nm.

Fig. 5A-5B from [46]. E1 i F1 show the AFM images of the glassy carbon (GC) plate (10 mm x 10 mm) with pUC19 deposits: (C1) scpUC19 plasmid, drop cast on a GC plate from 8 pg/mL solution, RMS 0,628 nm., (D1) linUC19 plasmid, drop cast on a GC plate from 8 pg/mL solution, RMS 0,936 nm.

4.4. ODDZIAŁYWANIE DNA Z BŁĘKITEM METYLENOWYM (BM)

Błękit metylenowy (BM) jest znaną substancją ulegającą akumulacji w DNA, głównie poprzez interkalację, czyli umiejscowienie związku wewnątrz heliksu DNA i dlatego może być używany do rozróżnienia struktur DNA, sekwencji zasad, długości łańcucha i helikalności [54-57]. W naszej publikacji [42] BM został użyty do potwierdzenia stabilności warstwy i możliwości rozróżnienia struktur superhelikalnych i liniowych plazmidów pUC19 i pGEX-4T-2. W tych publikacjach wykorzystane zostały pomiary magistrantek Blanki Kępskiej [20], Agnieszki Gniazdowskiej [21], Eweliny Krawczyk [22] i Agnieszki Ogórek [23], która dodatkowo osadzała Pd w warstwach plazmidów z zakumulowanym błękitem metylenowym [26]. Badania zostały przedstawione na konferencjach [28, 29].

Zastosowanie w naszych badaniach elektrody GC pozwoliło na monitorowanie i porównywanie kilku sygnałów utlenienia MB, np. MB(I) przy -0.2 V i MB(III) przy 1.05 V [42]. Jeśli MB zostało zakumulowane na czystej elektrodzie GC, to, jak można się spodziewać, stosunek tych sygnałów, MB(III)/MB(I) był prawie niezmienny, bliski 1, w zakresie stężeń od 1 μ M do 5 μ M w roztworze ([42]. Jeśli natomiast akumulacja MB zachodziła w warstwie plazmidowej, np. w plazmidach superhelikalnych, to ten stosunek był dużo większy, bliski 10 dla warstwy scpUC19, a nawet 40-50 dla warstwy scpGEX-4T-2 w pewnych zakresach stężeń (Rys. 6A-6B).



Rys. 6A-6B z [42]. Woltamogramy SW pokazują akumulację błękitu metylenowego (MB) na czystej (krzywe 0) i pokrytej superhelikalnym plazmidem elektrodzie GC (krzywe 1-7): scpUC19 (4pg/ml, 6A) i scpGEX-4T-2 (7pg/ml, 6B). Stężenie MB: 6A — (0) 0, (1) 0, (2) 0.2, (3) 0.6, (4) 1.4, (5) 2.2, (6) 3.8, (7) 5.0 μM , 6B — (0) 0, (1) 0, (2) 0.2, (3) 0.6, (4) 1.4, (5) 2.6, (6) 4.6 μM . W ramkach na rysunkach 6A i 6B pokazane są zależności gęstości prądów wzgl. czasu akumulacji plazmidów przy -0.2 V dla MB(I), 1.05 V dla MB(III), 1.2 dla G i 1.3 V dla A w zależności od stężenia MB.

Fig. 6A-6B from [42]. SW voltammograms showing the accumulation of methylene blue (MB) on bare (curves 0) and supercoiled circular plasmid covered GC electrode (curves 1–7): scpUC19 (4 pg/mL, 6A) and scpGEX-4T-2 (7 pg/mL, 4B). MB concentration: 6A — (0) 0, (1) 0, (2) 0.2, (3) 0.6, (4) 1.4, (5) 2.2, (6) 3.8, (7) 5.0 μM , 6B — (0) 0, (1) 0, (2) 0.2, (3) 0.6, (4) 1.4, (5) 2.6, (6) 4.6 μM . The insets show the dependence of the currents at: -0.2 V for MB(I), 1.05 V for MB(III), 1.2 for G and 1.3 V for A on the MB concentration.

Jeśli natomiast akumulacja BM zachodzi w liniowych plazmidach [42], to wzmożenie sygnału MB(III)/MB(II) jest znacznie mniejsze, ale także różne dla tych dwóch typów plazmidów. Dodatkowo, innym sposobem monitorowania oddziaływań MB z plazmidami jest wykreślenie zależności potencjału redoks MB(I) od stężenia MB w roztworze. Zależności te są całkowicie odmienne dla plazmidów superhelikalnych i liniowych i korelują się ze zmianami sygnałów prądowych [28, 29, 42].

Badania oddziaływania plazmidów z BM, czyli ze znanym interkalatorem DNA, zostały zaprojektowane jako badania sprawdzające powtarzalność i poprawność pomiarów z udziałem plazmidów, tych rzadko stosowanych w elektrochemicznych eksperymentach rodzajów DNA. Celem było też sprawdzenie czy (jak można było się spodziewać) utrudnione utlenianie zasad nukleinowych w plazmidach, szczególnie superhelikalnych, nie tylko ułatwia obserwację utleniania innych związków zakumulowanych w plazmidach, ale również powoduje łatwiejsze

utlenianie zasad nukleinowych. I rzeczywiście okazało się, że np. w przypadku supehelikalnego pUC19, obecność MB w warstwie plazmidu powoduje znaczny wzrost sygnałów utleniania guaniny i adeniny (Rys. 6 A), czyli BM działa jako mediator utleniania zasad nukleinowych. Badania oddziaływania plazmidów z MB można zatem potraktować jako badania modelowe z udziałem związków o nieznanym typie oddziaływań z DNA, np. związków przeciwnowotworowych.

4.5. ODDZIAŁYWANIE PLAZMIDÓW Z NOWOZSYNTEZYZOWANYMI POTENCJALNYMI ZWIĄZKAMI PRZECIWNOWOTWOROWYMI IPBD I CI-IPBD

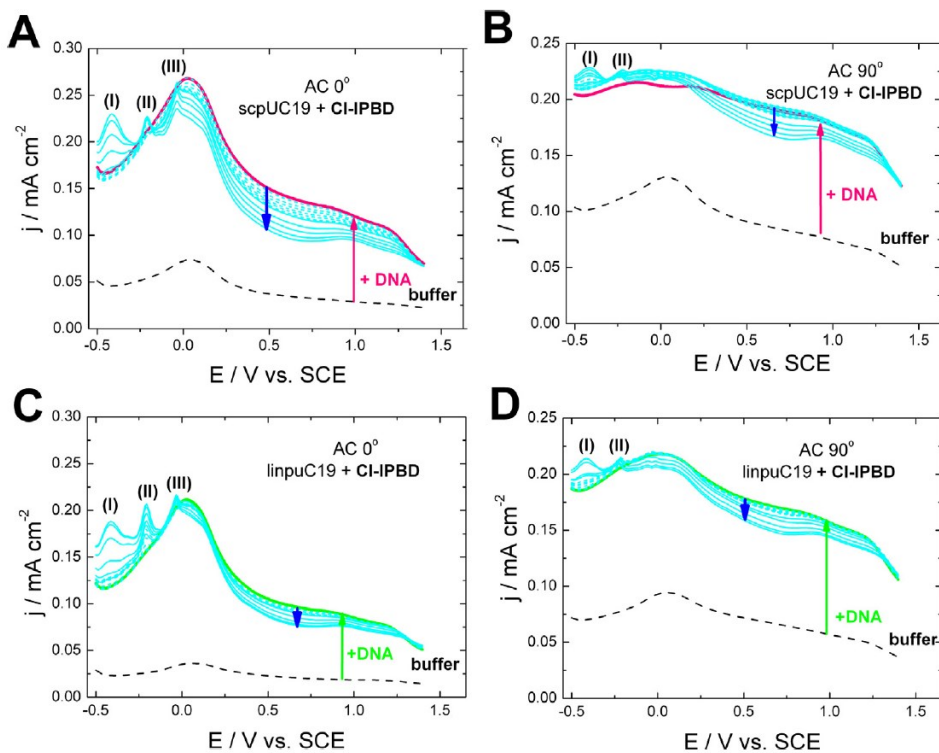
Akumulacja nowych, potencjalnych związków przeciwnowotworowych w plazmidach, również przy akumulacji antyoksydantów, była przedmiotem badań magistrantek Anny Banasiak [24] i Dominiki Janiszek [25], która dalej kontynuowała te badania w swojej pracy doktorskiej badając również oddziaływanie z pentamidyną i witaminą C i uszkodzenia DNA w reakcji Fentona [27]. Wyniki tych badań zostały przedstawione na konferencjach [36, 39, 41] i w publikacjach [31, 42, 45, 46, 47]

Już w początkowych pomiarach [27, 36, 39] można było zauważyć, że akumulacja potencjalnego związku przeciwnowotworowego CI-IPBD przypomina akumulację błękitu metylenowego (BM). Piki utleniania CI-IPBD widoczne były w podobnym zakresie ujemnych potencjałów elektrodowych jak BM (nawet trzy, a nie dwa piki, jak w BM) i czwarty pik utleniania przy potencjale bliskim utleniania zasad nukleinowych, ok. 0.8 V vs. NEK. Ponadto, zauważalne było pięciokrotne wzmocnienie sygnału IV względem sygnału II przy akumulacji tego związku w linpGX-4T-2.

W następnej publikacji [46] *Phase Transition Detection in Accumulation of a Potential Anticancer Drug CI-IPBD with DNA: Supercoiled and Linear pUC19*, zawierającej wyniki doświadczalne doktorantki Dominiki Janiszek [27] porównana została akumulacja CI-IPBD w supehelikalnym i liniowym plazmidzie pUC19, potwierdzając poprzednie wyniki dla linpGX-4T-2. Nowum była natomiast detekcja dwóch, a nie jednej orientacji związku CI-IPBD w zależności od ilości zakumulowanej substancji, łatwo zauważalna jako sygnały redoks w metodach SW i DP. To przejście fazowe, czyli zmiana orientacji cząsteczki CI-IPBD była obserwowana zarówno w superhelikalnym, jak i liniowym plazmidzie pUC19. Następnym ważnym wnioskiem była obserwacja, przy użyciu metody ACV, znacznych zmian pojemności i oporu (C/R) w warstwie plazmidowej wraz ze wzra-

stającym stężeniem IPBD w warstwie. Takie zmiany są zwykle korelowane z kondensacją warstwy elektrodowej, a kondensacja związków przeciwnowotworowych jest czasem sugerowana, jako przyczyna ich oddziaływania na komórki rakowe.

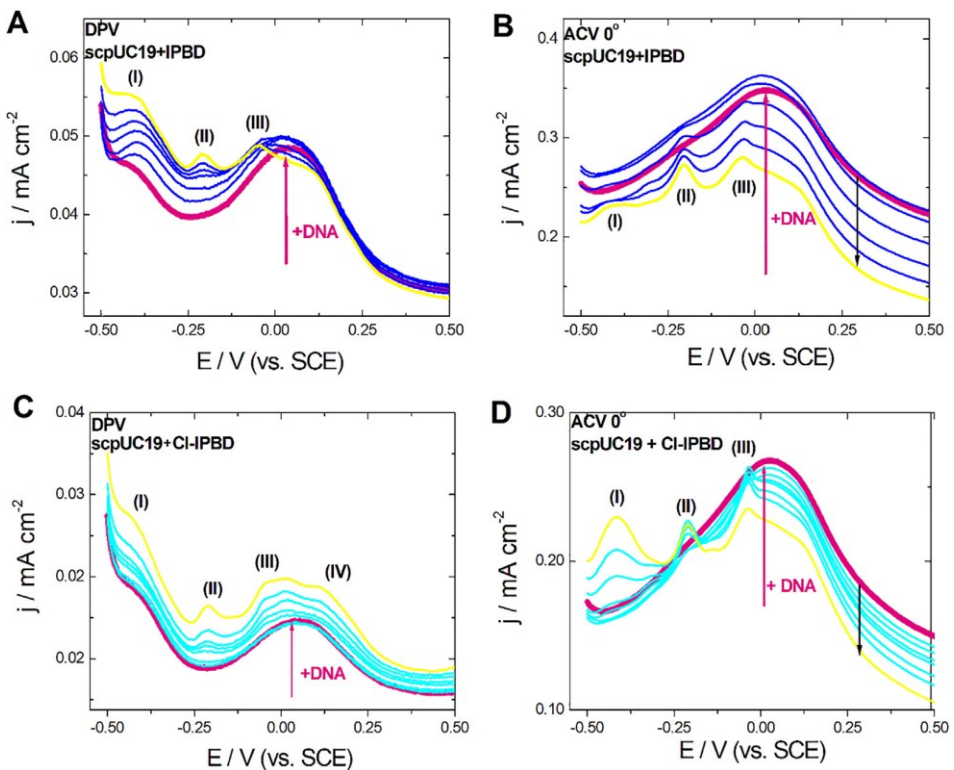
W tej publikacji [46], na podstawie pomiarów metodą ACV 0° zestawiono na jednym rysunku wzrost prądów utlenienia związków przeciwnowotworowych i obniżenie krzywych obrazujących zmiany pojemności i oporu (C/R) w warstwie plazmidowej. Zależności te były symetryczne. Natomiast takie zależności wykreślone na podstawie pomiarów antyoksydantów ryboflawiny (RF, wit. B2 i rutyny, RU) były niesymetryczne, ponieważ zmiany pojemności i oporu (C/R) były w tym przypadku minimalne. Ten eksperyment potwierdził jednocześnie zasadność pomiarów, jak i różnice w tworzeniu warstwy elektrodowej plazmidów w przypadku nowosyntetyzowanego związku przeciwnowotworowego IPBD i antyoksydantów.



Rys. 7A-7B z [46]. Woltamogramy ACV 0° (7A, 7C) i AC 90° (7B, 7D) pokazują akumulację związku CI-IPBD na elektrodzie GC pokrytej scpUC19 (8.07 pg/mL) — (7A, 7B) and linpuC19 (8.39 pg/mL) — (7C, 7D). Stężenie związku: (czarne przerywane linie) 0, bufor, (niebieskie przerywane linie, Orientacja I) 0,8, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10mM (niebieskie ciągłe linie, Orientation II) 20, 30, 40 and 50mM.

Fig. 7A-7B from [47]. AC 0^0 (7A, 7C) and AC 90^0 (7B, 7D) voltammograms showing accumulation of compound Cl-IPBD on GC covered with scpUC19 (8.07 pg/mL) — (7A, 7B) and linpUC19 (8.39 pg/mL) — (7C, 7D). Compound concentration increases in the order: (black dashed lines) 0, i.e. buffer solution, (blue dashed lines, Orientation I) 0.8, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10mM (blue solid lines, Orientation II) 20, 30, 40 and 50mM

W kolejnej publikacji [47] ‘Differences in electrochemical response of prospective anticancer drugs IPBD and Cl-IPBD, doxorubicin and Vitamin C at plasmid modified glassy carbon’) porównane zostały nie tylko własności elektrochemiczne dwóch potencjalnych związków przeciwnowotworowych, różniących się tylko jednym podstawnikiem, ale przedstawione zostały także wyniki badań przeciwnowotworowej efektywności tych związków na liniach komórkowych. Większą efektywność w testach MTT w badaniach na komórkach raka płuc (A259) Cl-IPBD vs. IPBD można było skorelować z potencjałami utleniania tych związków. W przypadku chlorkowej pochodnej obserwowany był dodatkowy pik utleniania (I) przy potencjale ok. -0.4 V, prawie niezauważalny dla IPBD. Te efekty były najlepiej widoczne w metodzie ACV 0^0 .



Rys. 8 A – 8 D z [47]. Adsorpcja IPBD (linie niebieskie) w warstwie plazmidu (scpUC19) (linia różowa), DPV (8A) i ACV 0^0 (8B) dla wybranych krzywych przy: 0.8 mM, 3 mM, 7 mM, 15 mM, 30 mM, 50 mM). Adsorpcja Cl-IPBD (linie niebieskie) w warstwie plazmidu (linia różowa), DPV (8C) i ACV 0^0 (8D), (dla wybranych krzywych: 0.8 mM, 3 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM). Żółte linie pokazują krzywe voltametryczne zarejestrowane przy 50 mM, najwyższym stosowanym stężeniu IPBD (8A and 8B) i Cl-IPBD (8C and 8D). Plazmid (scpUC19) był akumulowany z roztworu 8 pg/mL związku w 0.25 M buforze octanowym z dodatkiem 18 mM MgCl₂, pH 4.7. Symbole I, II, III i IV odpowiadają sygnałom redoks IPBD (8A and 8B) and Cl-IPBD (8C and 8D).

Fig. 8A-8B from [47]. Adsorption of IPBD (blue lines) within plasmid (scpUC19) layer (pink lines), DPV (8A) and ACV 0^0 (8B) for the selected runs at: 0.8 mM, 3 mM, 7 mM, 15 mM, 30 mM, 50 mM). Adsorption of Cl-IPBD (cyan lines) within DNA layer (pink lines), DPV (8C) and ACV 0^0 (8D), for the selected runs at: 0.8 mM, 3 mM, 7 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM). Yellow lines show the voltammetric response at the highest IPBD (8A and 8B) and Cl-IPBD (8C and 8D) concentration of 50 mM. Plasmid (scpUC19) was accumulated from 8 pg/mL solution in 0.25 M acetate buffer with 18 mM MgCl₂, pH 4.7. Symbols I, III and IV represent redox signals of IPBD (8A and 8B) and Cl-IPBD (8C and 8D).

UWAGI KOŃCOWE

Dr Janiszek w swojej pracy doktorskiej wykonała również interesujące pomiary dichroizmu kołowego wskazujące na korelację między badaniami elektrodowymi i spektroskopowymi na przykładzie oddziaływań plazmidów z pentamidyną oraz z mieszaniną pentamidyny ze związkami przeciwnowotworowymi. Ponadto dr Janiszek badała też własności redoks związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, które, jak się okazało, wykazują zupełnie inne właściwości elektrodowe. Interesujące byłoby kontynuowanie tych badań.

PODZIĘKOWANIE

Autorki tego opracowania oraz studentki uczestniczące w naszych badaniach nad DNA prowadzonych w Pracowni Elektroanalizy Chemicznej chciałyby przyłączyć się do życzeń całej pracowni, najserdeczniejszych życzeń zdrowia i wszelkiej pomyślności z okazji 90-tych urodzin Pana Profesora Galusa. Pragniemy również podziękować Panu Profesorowi za stworzenie wspaniałego środowiska naukowego. Pana wizja badań naukowych i zaangażowanie w naukę nie tylko umożliwiły nam rozwój zawodowy, ale także inspirowały nas do ciągłego poszukiwania nowych

rozwiązań i szukania odpowiedzi na najtrudniejsze naukowe pytania. Niezwykle cenna dla nas była Pana otwartość na nowe idee i gotowość dzielenia się swoją wiedzą. Z trudnymi problemami zawsze zwracaliśmy się do Pana Profesora, wiedząc, że od razu znajdzie Pan właściwe rozwiązanie, albo zada Pan odpowiednie pytanie, zwracając uwagę na istotę problemu. Tak się dzieje do dzisiaj, kiedy Pan Profesor Galus uczestniczy w naszych zakładowych seminariach naukowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Paleček, *Crit., Rev., Biochem.*, 1991, **26**, 151.
- [2] E. Paleček, *Electroanalysis*, 2009, **21**, 239.
- [3] E. Paleček, M. Bartošik, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 3427.
- [4] C. Teireiro, K. Nejedly, E. Paleček, *J. Biomol. Structure and Dynamics*, 1993, **2**, 313.
- [5] C.M.A. Oliveira, A.M. Oliveira-Brett, S.H.P. Serano, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, **366**, 225.
- [6] A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu, *Biochem.* 2004, **332**, 321.
- [7] E.E. Ferapontova, *Electrochim. Acta*, 2004, **49**, 1751.
- [8] E. Farjami, L. Clima, K.V. Gothelf, E.E. Ferapontova, *MB Analyst* 2010, **135**, 1443.
- [9] E. Ferapontova, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2018, **11**, 197.
- [10] G. Dryhurst, G. Pace, *J. Electroanal. Chem.* 1979, **101**, 19.
- [11] Q. Li, C. Batchelor-McAuley, R.G. Compton, *mechanism J. Phys. Chem.* 2010, **B114**, 7423.
- [12] Margaret E. Rice, Zbigniew Galus, Ralph N. Adams, *J. Electroanal. Chem.* 1983, **143**, 89.
- [13] D. Maciejewska, I. Szpakowska, I. Wolska, M. Niemyjska, M. Mascini, M. Maj-Zurawska, *Bioelectrochemistry*, 2006, **69**, 1.
- [14] A. Palińska, A. Grodzka, H. Elżanowska, B. Kępska, E. Zwierkowska, S. Achmatowicz, M. Maj-Zurawska, *Electroanalysis* 2010, **22**, 1306.
- [15] Hanna Elżanowska, Johan H van de Sande, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1988, **253(3)**, 425.
- [16] Hanna Elżanowska, Johan H van de Sande, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1988, **19(3)**, 441.
- [17] H. Elżanowska, E. Abu-Irhayem, B. Skrzynecka, V.I. Birss, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 478.
- [18] M.M. Kamal, H. Elżanowska, M. Gaur, D. Kim, and V.I. Birss, *J. Electroanal. Chem.*, 1991, **318**, 349.
- [19] H. Elżanowska, R.G. Wolcott, D.M. Hannum, and J.K. Hurst, *Free radical Biology & Medicine*, 1995, **18**, 437.
- [20] Blanka Kępska, Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2008.
- [21] Agnieszka Gniazdowska, Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2010.
- [22] Ewelina Krawczyk Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2010.
- [23] Agnieszka Ogórek Praca magisterska, Wydział Chemii UW 2010
- [24] Anna Banasiak, Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2013.
- [25] Dominika Janiszek Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2013.
- [26] Katarzyna Michalska Praca magisterska, Wydział Chemii UW, 2016.
- [27] Dominika Janiszek Praca doktorska Wydział chemii UW, 2021.

- [28] H. Elzanowska, B. Kępska, A. Palińska, K. Staroń, M. Maj-Zurawska, „Electrochemical Detection of Plasmid DNA”, 7th Spring Meeting of the International Society of Electrochemistry, Szczyrk 2009, poster.
- [29] Hanna Elzanowska, Agnieszka Ogórek, Paweł J. Kulesza, „Enhanced DNA Detection with Palladium and Methylene Blue”, 61th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE) Nice 2010, September 26-October 1, poster.
- [30] Dominika Janiszek, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Oddziaływanie rutyny i ryboflawiny z DNA w obecności reaktywnych form tlenu, XII konferencja „Elektroanaliza w teorii i praktyce”, 6-7 czerwca 2013, Kraków. poster.
- [31] Anna Banaszek, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Monika Karpińska, Andrzej Niewiadomy, Oddziaływanie plazmidowego DNA z substancjami przeciwnowotworowymi, XII konferencja „Elektroanaliza w teorii i praktyce”, 6-7 czerwca 2013, Kraków. poster.
- [32] D. Janiszek, H. Elzanowska, P. J. Kulesza „Elektrochemiczna detekcja rozplatania podwójnej nici DNA w liniowych i superhelikalnych plazmidach” XIII konferencja „Elektroanaliza w teorii i praktyce”, 5-6 czerwca 2014, Kraków, poster.
- [33] D. Janiszek, H. Elzanowska, A. Girstun, P.J. Kulesza, “Utlenianie zasad nukleinowych jako metoda detekcji struktur DNA”; 57 Zjazd PTChem i SITPChem, Częstochowa; 14-18 września 2014, prezentacja.
- [34] D. Janiszek, A. Banasiak, M. Maj-Żurawska, H. Elzanowska, A. Girstun, P. J. Kulesza, “Label-free electrochemical detection of plasmids: Supercoiled vs. linear forms” International Conference on Electrochemical Sensors, Matrafured, Hungary, June 15 – 20, 2014, poster.
- [35] D. Janiszek, A. Banasiak, H. Elzanowska, A. Girstun, P. J. Kulesza, “Electrochemical detection of DNA damage in Fenton reaction”, 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE), Lausanne, Switzerland, 31 August-5 September 2014, presentation.
- [36] Dominika Janiszek, Monika Karpinska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Zurawska and Paweł Kulesza, „Nucleic Acid-Drug Interactions: An Electrochemical Approach”, 3rd International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering; Granada, Spain, April 15-17, 2015, prezentacja.
- [37] Hanna Elzanowska, Dominika Janiszek, Monika M. Karpińska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Magdalena Maj-Zurawska, Paweł J. Kulesza, “Thin Redox Layers Use in DNA sensors: Interactions with Drugs” The 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, The Hague, The Netherlands, 21-26 August, 2016, poster.
- [38] Dominika Janiszek, Monika M. Karpińska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Żurawska, Paweł J. Kulesza, “Does Pentamidine Interact with Plasmid DNA Similarly to Some Anticancer Drugs?”, The 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, The Hague, The Netherlands, 21-26 August, 2016, poster
- [39] Dominika Janiszek, Monika M. Karpińska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Żurawska, Paweł J. Kulesza, „Oddziaływanie potencjalnego związku przeciwnowotworowego z plazmidowym DNA”, XIII Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików - ChemSession'16, Warszawa, 10 czerwca 2016, poster.
- [40] Hanna Elzanowska, Dominika Janiszek, Monika M. Karpińska, Andrzej Niewiadomy, Magdalena Maj-Zurawska, Paweł J. Kulesza, The 23rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Vilnius, Lithuania, 8-11 May, 2018, presentation.
- [41] Dominika Janiszek, Monika M. Karpinska, Andrzej Niewiadomy, Magdalena Maj-Zurawska, Hanna Elzanowska, Paweł J. Kulesza, Simultaneous Interactions of Pentamidine and a New Potential Anticancer Drug CI-IPBD with Plasmid DNA, 6th LIA Workshop report and Evolution of the Polish-French cooperation in Biotechnologies, Warsaw, 4-5 June, 2019, poster.

- [42] Agnieszka Gniazdowska, Adriana Palinska-Saadi, Ewelina Krawczyk, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Zurawska, *Bioelectrochemistry* 2013, **92**, 32.
- [43] Banasiak, H. Elżanowska, A. Girstun, D. Janiszek, M. M. Karpińska, M. Maj-Żurawska, A. Niewiadomy, A. Palińska-Saadi, S. Strzałkowska; „Utlenianie zasad kwasów nukleinowych i ligandu jako metoda badania oddziaływań DNA - interkalator”; „Problemy współczesnej elektrochemii”, Wydawnictwo Naukowe Akapit, Kraków, 2014, 217 – 244.
- [44] Banasiak, H. Elżanowska, A. Girstun, D. Janiszek, M. M. Karpińska, M. Maj-Żurawska, A. Niewiadomy, A. Palińska-Saadi, S. Strzałkowska; „Utlenianie zasad kwasów nukleinowych i ligandu jako metoda badania oddziaływań DNA - interkalator”; „Problemy współczesnej elektrochemii”, Wydawnictwo Naukowe Akapit, Kraków, 2014, 217 – 244.
- [45] Dominika Janiszek, Monika Karpinska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Zurawska and Pawel Kulesza, „Nucleic Acid-Drug Interactions: An Electrochemical Approach”, Extended Abstracts, International Work-Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering; Granada, Spain, April, 15-17, 2015, 77-82.
- [46] Dominika Janiszek, Monika M.Karpinska, Andrzej Niewiadomy, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Magdalena Maj-Zurawska, Pawel J. Kulesza, Phase Transition Detection in Accumulation of a Potential Anticancer Drug Cl-IPBD with DNA: Supercoiled and Linear pUC19 Plasmids, *Electrochimica Acta*, 2016, **210**, 42.
- [47] Dominika Janiszek, Monika M. Karpinska, Andrzej Niewiadomy, Anita Kośmider, Agnieszka Girstun, Hanna Elzanowska, Pawel J. Kulesza, *Bioelectrochemistry* 2021, **137**, 107682.
- [48] M. Włodarczyk, *Kosmos*, 51 (2002), **51**, 231.
- [49] J. Hinnebusch, K. Tiiiy, *Molecular Microbiology*, 1993, **10**, 917.
- [50] E. Paleček, *Nature*, 1958, **45**, 186.
- [51] E. Paleček, *Nature*, 1960, **188**, 658.
- [52] E. Paleček, *Talanta* 2002, **56**, 809.
- [53] E. Paleček, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1988, **20**, 179.
- [54] W. Yang, M. Ozsoz, D.B. Hibbert, J.J. Gooding, *Electroanalysis* 2002, **14**, 1299.
- [55] T. Leszczyński, H. Duński, *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 2006, **70**, 65.
- [56] E. Farjami, L. Clima, K.V. Gothelf, E.E. Ferapontova, *Analyst* 2010, **135** 1443.
- [57] C.G. Pheaney, J. K. Barton, *Langmuir* 2012, **28**, 7063.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 maja 2024 r.