

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Lenka Storoženková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Aptasenzory pro detekci diagnosticky významných látek
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka Storoženková
Osobní číslo: C19296
Studijní program: B3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Zdravotní laborant
Téma práce: Aptasenzory pro detekci diagnosticky významných látek
Téma práce anglicky: Aptasensors For The Detection Of Clinically Important Substances
Zadávající katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování

Z dostupných literárních zdrojů vypracujte rešerši o možnostech využití aptasenzorů, se zaměřením na detekci klinicky významných proteinů spojených s diagnostikou některých onemocnění.
V první části definujte, co to jsou aptasenzory, jaké jsou jejich složky, uspořádání, a jaký je jejich princip.
V další části uveďte využívané metody elektrochemické detekce při vývoji aptasenzorů.
V závěru práce uveďte konkrétní příklady takových aptasenzorů.

Rozsah pracovní zprávy: 25 s.
Rozsah grafických prací: dle potřeby
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

Pro vypracování rešerše využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *SciencēDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: 18. prosince 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 1. července 2022

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

LS.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Aptasenzory pro detekci diagnosticky významných látek jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2022

Lenka Storoženková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala paní doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. jako vedoucí mé práce za velmi cenné rady, čas, trpělivost, motivaci, konstruktivní kritiku a obrovskou vůli být nápomocna při vypracování této bakalářské práce. Dále bych zde ráda poděkovala své rodině za jejich podporu, jak psychickou, tak finanční. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala všem svým přátelům, kteří při mně stáli a pomohli kdykoliv bylo potřeba. Speciální poděkování patří mému příteli Janu Hubařovi za trpělivost a Bc. Janě Marečkové, Bc. Martinu Zelinkovi a Pavlu Sillingerovi, za jejich pomoc.

ANOTACE

Tato práce shrnuje informace o pokroku ve vývoji biosenzorů založených na aptamerech, neboli aptasenzorů. Dále se zaměřuje na využití aptasenzorů pro detekci klinicky významných biomarkerů v diagnostice. Primárně se zabývá biomarkery z oblasti nádorových, kardiovaskulárních a neurologických onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aptasenzor, biosenzor, DNA, proteinový biomarker, receptor, RNA

TITLE

Aptasensors for the detection of clinically important substances

ANNOTATION

This work summarizes information on progress in the development of aptamer-based biosensors, or aptasensors. It also focuses on the use of aptasensors for the detection of clinically significant biomarkers in diagnostics. It is primarily focused on biomarkers associated with cancer, cardiovascular and neurological diseases.

KEYWORDS

Aptasensor, biosenzor, DNA, protein biomarker, receptor, RNA

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	10
ÚVOD.....	12
1. BIOSENZORY	13
1.1 BIORECEPTORY.....	13
1.1.1 PROTILÁTKY/ANTIGENY.....	13
1.1.2 ENZYMY	14
1.1.3 NUKLEOVÉ KYSELINY.....	14
1.1.4 BUNĚČNÉ STRUKTURY.....	15
1.1.5 BIOMIMETICKÉ RECEPTORY.....	15
1.2 PŘEVODNÍKY	15
1.2.1 OPTICKÉ PŘEVODNÍKY.....	15
1.2.2 ELEKTROCHEMICKÉ PŘEVODNÍKY	15
1.2.3 HMOTNOSTNÍ PŘEVODNÍKY	16
2 APTAMERY	16
2.1 USPOŘÁDÁNÍ TESTŮ VYUŽÍVAJÍCÍCH APTAMERY	18
2.2 METODY DETEKCE VYUŽÍVANÉ V APTASENZORECH.....	19
2.2.1 ELEKTROCHEMICKÉ APTASENZORY	19
2.2.2 OPTICKÉ METODY DETEKCE APTAMERŮ	21
2.2.3 HMOTNOSTNÍ DETEKCE.....	24
3 APTASENZORY V DIAGNOSTICE.....	26
3.1 APTASENZORY V DIAGNOSTICE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	26
3.1.1 ELEKTROCHEMICKÉ APTASENZORY	27
3.1.2 OPTICKÉ APTASENZORY.....	28
3.2 APTASENZORY V DIAGNOSTICE KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	29
3.3 APTASENZORY V DIAGNOSTICE NEUROLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ.....	30
ZÁVĚR	33
POUŽITÁ LITERATURA	34

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 Schéma dvou typů bioreceptorů	13
Obrázek 2 Schematické znázornění procesu pro systematický vývoj aptamerů exponenciálním obohacováním (SELEX).....	17
Obrázek 3 Formáty testů na bázi aptamerů.....	18
Obrázek 4 Schémata pro elektrochemické senzory „signal-off“ a „signal-on“	19
Obrázek 5 Molekulární maják na bázi aptameru	22
Obrázek 6 Schéma aptasenzoru založeném na kolorimetrické změně AuNPs na základě jejich agregačního stavu.....	23
Obrázek 7 „Sendvičový“ typ kolorimetrie na bázi aptamerů s amplifikací zlatem a stříbrem	24
Obrázek 8 Hmotnostně citlivé aptasenzory	25
Tabulka 1 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů	27
Tabulka 2 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů	28
Tabulka 3 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů souvisejících s AMI.	30
Tabulka 4 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů ND.....	33
Tabulka 5 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů ND.....	33

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMI	akutní infarkt myokardu (z angl. acute myocardial infarction)
Apt	aptamer
BNNS	bor nitridové nanovrstvy (z angl. boron nitride nanosheets)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
CFP	papír z uhlíkových vláken (z angl. carbon fiber paper)
CNT	tranzistor s uhlíkovými nanotrubicemi (z angl. carbon nanotube field-effect transistors)
CRP	C-reaktivní protein
cTn	kardiotroponin
cTnI	kardiotroponin I
cTnT	kardiotroponin T
CV	cyklická voltametrie (z angl. cyclic voltammetry)
CVD	kardiovaskulární onemocnění (z angl. cardiovascular disease)
DPV	diferenčně pulzní voltametrie (z angl. differential pulse voltammetry)
EKG	elektrokardiografie (z angl. electrocardiography)
ELISA	enzymová analýza na pevné fázi (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay)
ERGO	elektrochemicky redukovaný oxid grafenu (z angl. electrochemically reduced graphene oxide)
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (z angl. fluorescence resonance energy transfer)
GCD	skleněná uhlíková elektroda (z angl. glassy carbon electrode)
GNP-STP	sondy pro přenos signálu značené zlatými nanočásticemi (z angl. gold nanoparticle-tagged signal transduction probes)
GO	oxid grafenu (z angl. graphene oxide)
HRP	křenová peroxidáza (z angl. horseradish peroxidase)
ITO	cínem dopovaný oxid india (tin-doped indium oxide)
LOD	limit detekce
Mb	myoglobin
MCH	6-merkpto-1-hexanol
MM	methylenová modř

MOF	kovovo-organické konstrukce (z angl. metal-organic frameworks)
MPAuN	makroporézní zlatá nanostruktura (z angl. macroporous gold nanostructure)
ND	neurologické onemocnění (z angl. neurological disease)
NiO	oxid nikelnatý
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
NP	nanočástice (z angl. nanoparticle)
PDANS	polydopaminové nanokuličky (z angl. polydopamine nanospheres)
PDGF	růstový faktor odvozený z krevních destiček (z angl. Platelet-derived growth factor)
PEI	polyethylenimin
PPy-COOH	polymerovaná pyrrol-2-karboxylová kyselina (z angl. polymerized pyrrole-2-carboxylic acid)
pRhNP	porézní nanočástice rhodia (z angl. porous rhodium nanoparticle)
QCM	křemenné mikrováčky (z angl. quartz crystal microbalance)
QD	kvantové tečky (z angl. quantum dots)
rGO	redukováná forma oxidu grafenu (z angl. reduced graphene oxide)
SAW	povrchová akustická vlna (z angl. surface acoustic wave)
SPCE	tištěná uhlíková elektroda (z angl. screen printed carbon electrode)
SPR	povrchová plasmonová rezonance (z angl. surface-plasmon resonance)
SPRI	zobrazení povrchovou plasmonovou rezonancí (z angl. surface-plasmon resonance imaging)
strep-MB	magnetické částice potažené streptavidinem (z angl. streptavidin-coated magnetic beads)
strep-HRP	streptavidin konjugovaný s křenuvou peroxidázou (z angl. HRP-conjugated streptavidin)
SWV	square-wave voltametrie (z angl. square-wave voltammetry)
TA	kyselina trithiokyanurová (z angl. trithiocyanuric acid)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. vascular endothelial growth factor)
ZnS	sulfid zinečnatý

ÚVOD

V posledních letech se velmi zintenzivnil vývoj nových diagnostických technologií. S tím přišlo i zvýšení nároků na limit detekce a zvýšení citlivosti a selektivity diagnostických metod. Tyto metody jsou využívány jak v běžně rutinních stanoveních, tak i v oblasti výzkumu, se snahou o následné využití v rutinní diagnostice. Jednou z oblastí vývoje diagnostických reagensů je využití aptamerů. Jedná se o krátké sekvence DNA (jednovláčkové, či dvouvláčkové) nebo RNA, jejichž specifická vazebnost konkrétních sekvencí zajišťuje vysokou specifitu. Pokud je zároveň zvolena vhodně citlivá značka, je možné díky jejímu spojení s aptamerem dosáhnout vysoké citlivosti. Aptamery mohou být použity k identifikaci molekulárních markerů onemocnění nebo mohou fungovat jako léky, systémy dodávání léků a systémy řízeného uvolňování léčiva. Využití nacházejí i v jiných úlohách molekulárního inženýrství. Vývoj aptasenzorů jako takových započal kolem roku 1996, kdy výzkumné týmy začaly propojovat aptamery s nanočásticemi (NPs) a možnostmi citlivější detekce.

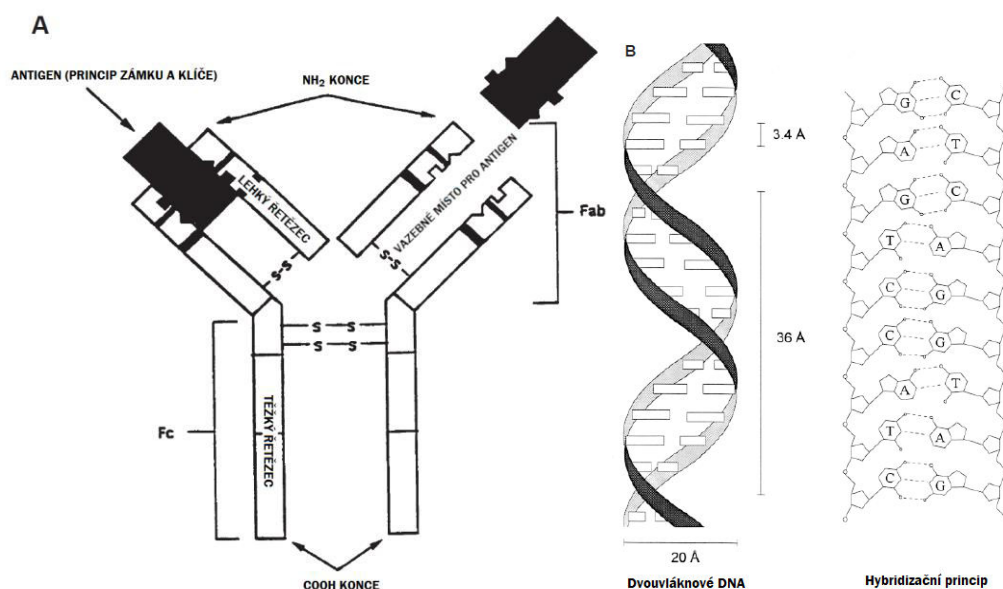
Právě toto propojení aptamer-NPs se ukázalo jako velmi vhodné pro klinickou diagnostiku. Rozpoznávací složka senzoru tvořená aptamerem se dokáže dokonale navázat na specifický analyt, zatímco NP část zajišťuje vysokou citlivost techniky. Tato vlastnost aptasenzorů je vysoce žádoucí např. v diagnostice onemocnění, která mohou zásadním způsobem ovlivnit život pacienta. Jedná se primárně o nádorová onemocnění a onemocnění kardiovaskulárního a neurologického systému.

1. BIOSENZORY

Biosenzor je analytické zařízení, které se používá pro detekci chemické látky kombinující biologickou složku s fyzikálně-chemickým převodníkem [1]. Biologickým prvkem, vykazujícím vysokou citlivost, je materiál neboli biomimetická složka, která rozpoznává nebo interaguje se zkoumaným analytem. Převodník neboli prvek detektoru, který transformuje signál biologického prvku naměřitelný, pracuje na fyzikálně-chemickém principu: optickém, piezoelektrickém, elektrochemickém, elektrochemiluminiscenčním atd. Je podmíněn interakcí analytu s biologickým prvkem. Dále se biosenzor propojuje s přidruženou elektronikou, která je primárně zodpovědná za zobrazení výsledků [2].

1.1 BIORECEPTORY

Bioreceptory jsou zodpovědné za specifitu biosenzoru. Zodpovídají za navázání analytu k senzoru. Bioreceptory mohou mít více podob. Obecně lze bioreceptory rozdělit do pěti hlavních kategorií: protilátky/antigeny (Obrázek 1A), enzymy, nukleové kyseliny/DNA (Obrázek 1B), buněčné struktury/buňky a biomimetika [3].



Obrázek 1 Schéma dvou typů bioreceptorů (A) protilátka IgG; (B) hybridizační princip DNA. Převzato a upraveno z [3]

1.1.1 PROTILÁTKY/ANTIGENY

Protilátky jsou biologické molekuly vykazující velmi specifické vazebné schopnosti pro specifické struktury. Molekuly protilátek jsou tvořené ze stovek aminokyselin uspořádaných do tvaru organizované sekvence. Způsob interakce specifické protilátky a antigenu, vůči kterému působí, lze analogicky chápat jako kompatibilitu zámku a klíče: specifická geometrická konfigurace jedinečného klíče umožňuje otevřít zámek. Tato jedinečná vlastnost

antigenně specifických protilátek je klíčová pro jejich využití v imunosenzorech [3]. Biosenzory využívající protilátky jako rozpoznávací element, označujeme jako imunosenzory.

Prvním dálkovým vláknovým imunosenzorem pro detekci *in situ* byl detekován karcinogenní benzo[a]pyren [4]. Od tohoto vývoje se protilátky staly běžnými bioreceptory a dnes se využívají v biosenzorech [5–7]. Podle formy prováděného testu je možné rozdělit biomolekulární interakce do dvou kategorií: přímé a nepřímé. V případě přímých interakcí interaguje imobilizovaná cílová molekula s molekulou ligandu nebo imobilizovaný ligand přímo s cílovou molekulou. U imunosenzorů je nejjednodušší situace interakce *in situ* s následným přímým měřením [4]. U systémů s nefluorescenčním analytem následuje inkubace *in situ* s vyvoláním značení druhé protilátky enzymem, radioizotopem, ale i chemickou látkou. Výsledný signál je přímo úměrný množství navázaného antigenu. Nepřímá forma zahrnuje kompetici mezi značenými a neznačenými antigeny. V tomto případě neznačený analyt soutěží s analytem značeným o omezený počet vazebných míst na protilátce [7].

1.1.2 ENZYMY

Enzymy jsou často vybírány jako bioreceptory s ohledem na jejich specifické vazebné schopnosti a také jejich katalytickou aktivitu. S výjimkou malé skupiny katalytických molekul ribonukleové kyseliny jsou všechny enzymy bílkoviny. Některé enzymy nevyžadují pro svou aktivitu žádné jiné chemické skupiny než zbytky aminokyselin. Jiné vyžadují další chemickou složku, která se nazývá kofaktor a která může být jeden nebo více anorganických iontů, například Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} nebo Zn^{2+} , nebo složitější organický nebo metalorganický iont [8].

1.1.3 NUKLEOVÉ KYSELINY

Další mechanismus biologického rozpoznávání zahrnuje hybridizaci deoxyribonukleové kyseliny (DNA) nebo ribonukleové kyseliny (RNA). V posledních desetiletích se nukleové kyseliny těší stále většímu zájmu jako bioreceptory pro biosenzory a biočipové technologie. Komplementarita adenin : thymin (A : T) a cytosin : guanin (C : G) v DNA tvoří základ pro specifičnost biorozpoznávání v DNA biosenzorech, často označovaných jako genosenzory nebo aptasenzory. Pokud je sekvence bází tvořící určitou část molekuly DNA známa, poté může být komplementární sekvence, která se často označuje jako sonda, syntetizována a označena opticky detekovatelnou sondou (např. fluorescenční značkou). Rozvinutím

dvouvláknové DNA na jedno vlákno, přidáním sondy se označená sonda hybridizuje se svou komplementární sekvencí na cílové molekule [9–12].

1.1.4 BUNĚČNÉ STRUKTURY

Buněčné struktury tvoří další kategorii bioreceptorů, které jsou využívány při vývoji biosenzorů a biočipů. Tyto bioreceptory jsou založeny na biorozpoznávání celou buňkou/mikroorganismem nebo na specifickou buněčnou složkou. Jedním z hlavních přínosů spojených s používáním této třídy bioreceptorů je, že často mohou být detekční limity velmi nízké díky zesílení signálu. Mnoho biosenzorů vyvinutých s těmito typy bioreceptorů spoléhá na jejich katalytické nebo pseudokatalytické vlastnosti [13–17].

1.1.5 BIOMIMETICKÉ RECEPTORY

Receptor, který je vyroben a navržen tak, aby napodoboval bioreceptor se často označuje jako biomimetický receptor. V průběhu několika let byly vyvinuty různé metody konstrukce biomimetických receptorů. Tyto metody zahrnují: geneticky upravené molekuly, uměle vyrobené membrány a molekulární imprinting. Technika molekulárního imprintingu je založena na tvorbě molekulárních děr, nebo vazebných míst, která jsou komplementární k danému analytu [18–20].

1.2 PŘEVODNÍKY

Druhou nezbytnou částí biosenzoru jsou již zmíněné převodníky. Ty je možné klasifikovat podle způsobu přenosu, který používají. Transdukce může být zjištěna pomocí nejrůznějších metod. Většinu forem transdukce lze zařadit do jedné ze tří hlavních tříd. Těmito třídami jsou: 1) optické metody detekce, 2) elektrochemické metody detekce a 3) metody hmotnostní detekce. Neustále však vznikají nové typy převodníků pro použití v biosenzorech. [3]

1.2.1 OPTICKÉ PŘEVODNÍKY

Optické převodníky nabízí největší počet možných podkategorií. Je to dáno tím, že optické biosensory jsou založeny na různých typech spektroskopických detekčních technik (např. absorpční, fluorescenční, fosforescenční, Raman, SERS, refrakční, disperzní spektrometrie, atd.) [4, 7, 21-23].

1.2.2 ELEKTROCHEMICKÉ PŘEVODNÍKY

Elektrochemická detekce je dalším možným způsobem transdukce, který je využíván v biosenzorech. Vzhledem k tomu, že řada stanovovaných analytů není fluorescenční a nelze tedy využít optickou detekci, může být velmi užitečná elektrochemická detekce, jako je např. voltametrie, amperometrie, konduktometrie, elektrochemiluminiscence, impedimetrie a

potenciometrie. Kombinací citlivosti elektrochemického měření se selektivitou, kterou poskytuje bioreceptor, lze dosáhnout detekčních limitů srovnatelných s fluorescenčními biosenzory [24, 25].

1.2.3 HMOTNOSTNÍ PŘEVODNÍKY

Další forma transdukce, která je pro biosenzory využívána, je měření malých změn hmotnosti. Princip měření spočívá v použití piezoelektrických krystalů. Tyto krystaly lze přimět k vibracím o specifické frekvenci působením elektrického pole. Frekvence kmitání je tedy závislá na velikosti elektrického napětí aplikovaného na krystal a také na hmotnosti krystalu. Když se tedy hmotnost zvýší v důsledku vazby chemických látek, frekvence krystalu se zvyšuje a výslednou změnu lze změřit elektrochemickým záznamem a využít ji k určení dodatečné hmotnosti krystalu, a tedy stanovované látky [26, 27].

2 APTAMERY

Aptamery lze klasifikovat jako malé ligandy nukleových kyselin jednořetězcové deoxyribonukleové kyseliny (ssDNA), ribonukleové kyseliny (RNA) a peptidové molekuly [28]. Mohou se vázat na cílové molekuly včetně virů, buněk, proteinů a některých malých organických látek. Aptamery jsou dostatečně flexibilní, aby se mohly ohýbat do přesně definovaných sekundárních struktur a vázat se na své cíle s vysokou specifitou a afinitou [29].

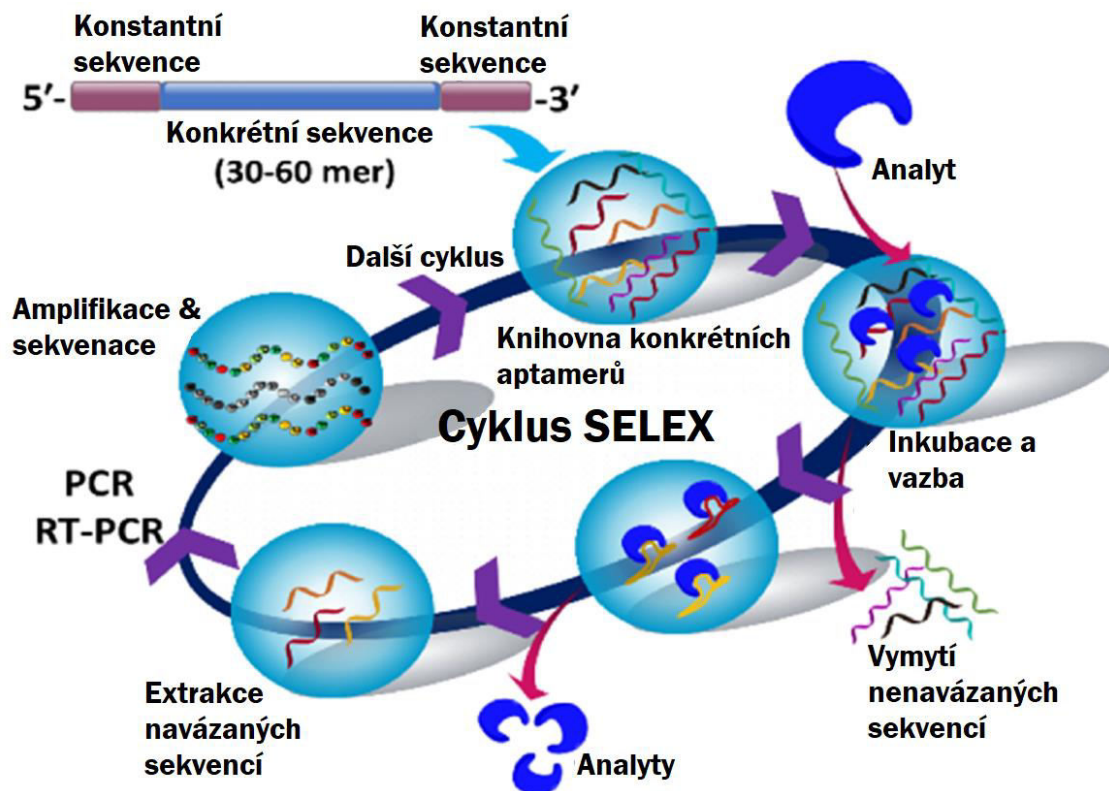
Jejich afinita závisí na struktuře cílové molekuly [30]. Aptamery lze připravit chemickou syntézou a mohou být modifikovány některými funkčními skupinami a linkery [31]. Díky tomu technologie spojené s aptamery nachází uplatnění v různých oblastech [32].

Aptamery vykazují vysokou chemickou stabilitu, vratnou tepelnou denaturaci a jsou odolné vůči náročné předúpravě, bez ztráty bioaktivity, což z aptamerů činí konkurenty pro běžně využívané protilátky. Je uváděno, že aptamery mají, ve srovnání s protilátkami, řadu výhod. Jedná se o čistě specifické nukleové kyseliny tvořené biologickým procesem. Syntéza aptamerů nezahrnuje imunizaci hostitelských zvířat, protože jsou syntetizovány chemickou cestou prostřednictvím selekce nukleových kyselin [33].

Výše uvedené vlastnosti významně podporují jejich využití jako součást selektivních biologických rozpoznávacích systémů pro různé aplikace související s biotechnologiemi. Například jednu třídu aptamerů, jimiž jsou modifikovány magnetické kuličky, lze využít k purifikaci a koncentraci analytů z tělních tekutin [34]. Dále spojení aptamerů s kapalinovou

chromatografií s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) biofluidů může být využito v diagnostice rozpoznávání patogenů [35] nebo biomarkerů nádorových [36], kardiovaskulárních (AMI zdroj) a neurologických [37] onemocnění [38].

Pro vývoj biosenzorů nabízejí aptamery možnosti exkluzivní detekce díky své menší velikosti, vysoké stabilitě, a schopnosti funkcionalizace a strukturního přepínání [39].



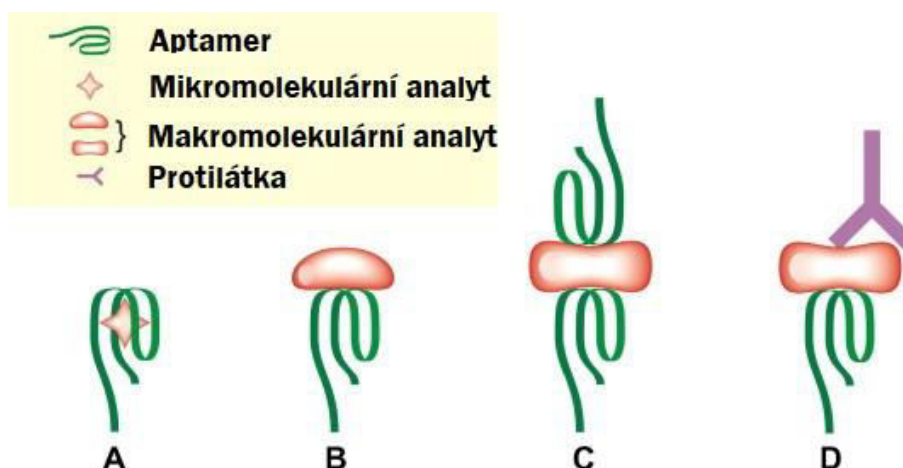
Obrázek 2 Schematické znázornění procesu pro systematický vývoj aptamerů exponenciálním obohacováním (SELEX).
Převzato a upraveno z [36].

První aplikace aptamerů ve spojení s biosenzory byly představeny v roce 1996, kdy byly popsány optické biosenzory založené na fluorescenčně značených aptamerech [40]. Poprvé byl aptasenzor jako takový představen v roce 2004. Pro konstrukci senzoru byly použity aptamery značené enzymem glukóza dehydrogenázou k vývoji sendvičového amperometrického aptasenzoru [41].

Aptamery jsou pro cílové analyty (např. proteiny, buňky a viry) vybírány pomocí *in vitro* screeningu zvaného SELEX (Obrázek 2) [39]. Proces SELEX začíná inkubací cílových analytů s vytvořenými sekvencemi náhodné DNA nebo RNA knihovny, které umožňují vazbu specifických sekvencí na analyty. Sekvence, které se nenavážou jsou odstraněny. Navázané sekvence jsou extrahovány nebo eluovány a amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) nebo RT-PCR pro následný SELEX cyklus k identifikaci sekvence aptameru s nejvyšší afinitou [42].

2.1 USPOŘÁDÁNÍ TESTŮ VYUŽÍVAJÍCÍCH APTAMERY

Analogicky k imunosenzorům založeným na interakci antigen-protilátka mohou být i aptasenzory v různém uspořádání. A to vzhledem k tomu, že aptamery jsou vybrány tak, aby vázaly rozdílné analyty, od malých molekul až po makromolekuly, jako jsou proteiny. Ve většině případů jsou děleny do dvou kategorií: založené na vazbě na jedno místo (mikromolekul a makromolekul) a na dvojmístné vazbě (s dalším aptamerem nebo protilátkou) (Obrázek 3)[43].



Obrázek 3 Formáty testů na bázi aptamerů. (A) Cílová malá molekula skrytá ve vazebných kapsách aptamerových struktur; (B) formát s jedním místem; (C) vazebný formát se dvěma místy „sendvičový formát“ se dvěma aptamery a (D) „sendvičový“ vazebný formát s aptamerem a protilátkou.

Převzato a upraveno z [43].

Konstrukce aptasenzorů se opírá o rozdílné způsoby rozpoznávání každého páru aptamer-cílová molekula. Pro malé molekuly potvrdila analýza nukleární magnetickou rezonancí (NMR), že jsou často skryty ve vazebných kapsách aptamerových struktur (Obrázek 3A), což ponechává málo prostoru pro interakci s druhou molekulou. Kvůli tomuto omezení jsou malé molekuly obvykle založeny na jedno-vazebném uspořádání. Naproti tomu proteinové cíle, které jsou strukturně komplikovanější umožňují vzájemné interakce (např. stohování, tvarová komplementarita, elektrostatické a vodíkové interakce). V důsledku toho mohou být pro proteinové cíle uspořádání jak prostřednictvím vazby na jedno místo (Obrázek 3B), tak prostřednictvím vazby na dvě místa (Obrázek 3C) [43]. Za zmínku stojí, že dvojmístná vazba také závisí na dostupnosti dvojice aptamerů, které se vážou na různá místa v různých oblastech proteinu [44].

Test dvojmístné vazby, známý také jako „sendvičový“ test, je jedním z nejpoužívanějších formátů konfigurace testu. Při tomto přístupu je analyt spojen párem aptamerů (Obrázek 3C), jeden záchytný aptamer a druhý detekční aptamer. Záchytné sondy jsou často imobilizovány

na povrchu pevných nosičů (např. elektrod, skleněných čipů, nanočástic nebo mikročástic), zatímco detekční aptamery jsou často konjugovány se signálními značkami (např. fluorofory, enzymy nebo nanočásticemi). Obecně řečeno, záchytné a detekční aptamery mají různé sekvence nukleových kyselin, avšak v omezených případech některé proteiny (např. dimerní) obsahují dva identické vazebné řetězce a umožňují tak použití jediného aptameru pro sendvičový test. V případech, kdy neexistují žádné dva aptamery sdílející identickou nebo překrývající se vazbu na cíli zájmu, je možné použít jako druhou složku protilátku místo aptameru (Obrázek 3D) [43].

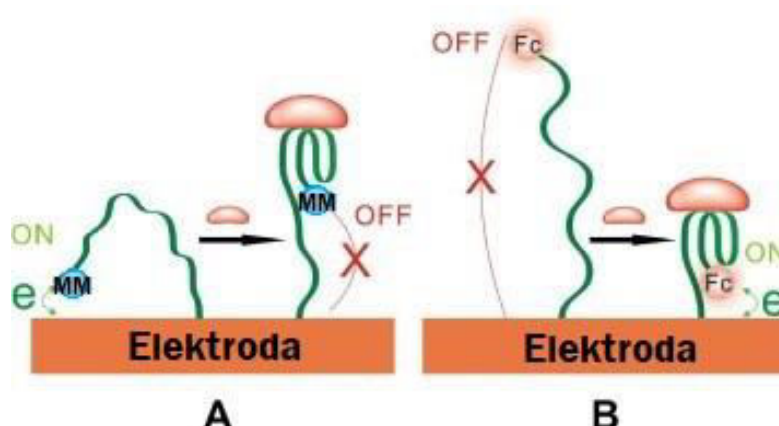
2.2 METODY DETEKCE VYUŽÍVANÉ V APTASENZORECH

Aptasenzory se v zásadě rozdělují, stejně jako ostatní biosenzory, podle způsobu detekce signálu do tří hlavních kategorií: 1) elektrochemické aptasenzory, 2) optické aptasenzory a 3) hmotnostní detekce aptasenzorů [43].

2.2.1 ELEKTROCHEMICKÉ APTASENZORY

Za předpokladu, že aptamery jsou imobilizovány na vodivém povrchu nosiče, umožňuje flexibilita aptameru redoxně aktivním částem vazbu a identifikaci tvorby komplexů aptamer-cíl měřením přenosu elektronů redoxních částic pevných 3D komplexů. Na základě této strategie byla vyvinuta řada elektrochemických aptasenzorů [43].

Xiao a kol. (2005) zkonstruovali elektrochemický aptasenzor pro stanovení trombinu založený na imobilizaci atitrombinového aptameru značeného redoxně aktivní methylenovou modří (MM) na elektrodu. Flexibilní konformace aptameru vedla po vazbě trombinu k uspořádání aptameru do G-kvadruplexu a stínění signálu MM (Obrázek 4A) [45].



Obrázek 4 Schéma elektrochemických senzorů "signal-off" a "signal-on". (A) Po navázání na trombin se aptamer značený MM sám sestaví do podoby G-kvadruplexové struktury a chrání MM před přenosem elektronů z elektrody, což vede k negativnímu signálu; (B) tvorba komplexu trombinu a aptameru činí konfiguraci G-kvadruplexu rigidní a vede k orientaci ferrocenových jednotek v blízkosti elektrody, což vede ke snadnému přenosu elektronů mezi elektroaktivními ferrocenovými jednotkami a elektrodou a vytváří pozitivní signál
Převzato a upraveno z [43].

Proto bylo uspořádání později modifikováno. Jeden z přístupů využíval bifunkcionalizovaný antitrombinový aptamer označený terminální elektroaktivní ferrocenovou skupinou jako redoxní značkou a thiolovou skupinou na druhém konci. Dlouhý, flexibilní, modifikovaný řetězec aptameru zabraňoval elektrickému kontaktu ferrocenové značky s elektrodou. Vlivem vytvoření komplexu trombinu s aptamerem došlo ke změně konfigurace G-kvadruplexu aptameru a orientaci ferrocenových jednotek směrem k elektrodě (Obrázek 4B) a byl generován signál. V této konformaci byla měřena koncentrace trombinu metodou impedanceční spektroskopie v rozmezí 5,0-35,0 nM s limitem detekce (LOD) 0,5 nM [46].

Voltametrická detekce

Cyklická voltametrie (CV) je běžnou elektrochemickou detekční metodou v biosenzorech a aptasenzorech založených na mechanismu redoxních reakcí [47]. Poskytuje informace o reverzibilitě elektrodového děje. Lze určit nejen koncentraci stanovované látky, ale také získat informace o termodynamice redoxních dějů, kinetice přenosu elektronů nebo adsorpci a desorpci molekul na povrch elektrody. Je zaznamenáván proud procházející pracovní elektrodou v závislosti na vkládaném potenciálu [48].

U diferenční pulzní voltametrie (DPV) je potenciál na elektrodu vkládán v podobě pulzů a v daných časových intervalech je zaznamenáván proud. Tím se snižuje nabíjecí proud vznikající v důsledku polarizace elektrody, a zvyšuje se tak citlivost stanovení a snižuje se detekční limit [36].

Výhody metody square-wave voltametrie (SWV), v porovnání s klasickými voltametrickými metodami spočívají ve zvýšené citlivosti a vysoké rychlosti, čímž se zlepšuje poměr signálu k šumu. Má široký dynamický rozsah a nízké hodnoty LOD [36].

Amperometrická detekce

Amperometrie v chemii je detekce iontů v roztoku na základě elektrického proudu nebo změny elektrického proudu. Používá se v elektrofyziologii ke studiu událostí uvolňování vezikul pomocí elektrody z uhlíkových vláken. Na rozdíl od techniky „*patch clamp*“ se elektroda používaná pro amperometrii nezavádí do buňky ani se k ní nepřipojuje, ale přivádí se do těsné blízkosti buňky. Měření z elektrody pocházejí z oxidační reakce obsahu vezikulu uvolněného do média. [49]

Konduktometrická detekce

Pro vývoj konduktometrických aptasenzorů není potřeba specifická chemická reakce k detekci signálů. Kromě toho tento typ elektrochemických senzorů poskytuje vysokou citlivost a je cenově výhodný [36].

Elektrochemiluminiscenční detekce

Detekce elektrochemiluminiscenčního signálu má znatelnou výhodu, jako je jednoduchá kontrolovatelnost, nízký LOD a rychlá detekce. Vzhledem k vnitřním vlastnostem elektrochemiluminiscence některých nanostruktur, jako jsou kvantové tečky (QDs), jsou široce používány pro detekci a měření [50].

Impedimetrická detekce

Přítomnost nádorových buněk způsobuje změny v odolnosti přenosů elektronů, což je základem procesu měření v oblasti impedimetrických aptasenzorů, které jsou zvláště výhodné v případě přítomnosti mediátorů, jako jsou enzymy [51].

Potenciometrická detekce

Potenciometrické snímání v biosenzorech a aptasenzorech je založeno na registraci nábojového potenciálu pracovní elektrody v nepřítomnosti proudu. Tyto systémy poskytují velmi nízký LOD díky použití iontově selektivních elektrod [36].

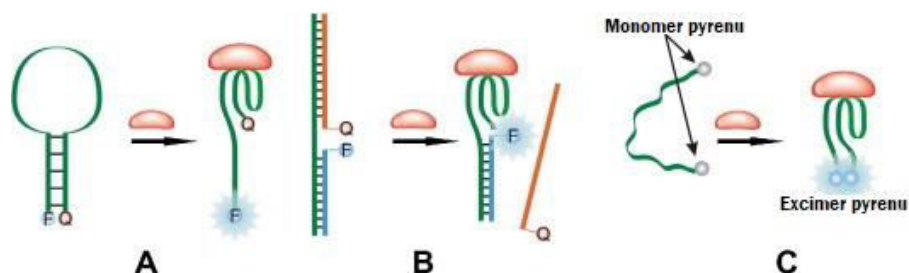
2.2.2 OPTICKÉ METODY DETEKCE APTAMERŮ

Aptamery se také hojně používají jako biologické rozpoznávací prvky v optických biologických testech. Z těchto formátů testů jsou fluorescence a kolorimetrie dvě nejpoužívanější detekční techniky [43].

Fluorescenční detekce je široce využívána díky snadnému značení aptamerů fluorescenčními barvivy a snadné dostupnosti mnoha různých fluoroforů, zhášeců. Bylo vyvinuto několik hlavních strategií pro značení aptamerů na fluorochromy (Obrázek 5). Často využívaným formátem je tzv. molekulární maják na bázi aptameru („aptabeacon“). Ten umísťuje sekvenci aptameru do vlásenkové struktury, která je na konci značena fluoroforem a zhášedlem. Vazba s cílovou strukturou (analytem) naruší stopku, čímž se oddělí fluorofor od zhášedla a je generován fluorescenční signál (Obrázek 5A) [52].

Další často používaný formát využívá fluoroforem značený aptamer v duplexní struktuře s komplementární sekvencí DNA značenou zhášedlem. Přítomnost cílů nutí komplementární

řetězec uvolnit aptamer, což vede ke zvýšení fluorescence (Obrázek 5B). Doposud umožňovaly výše uvedené fluorescenční testy, založené na zhášecích, pouze kvalitativní nebo semikvantitativní biologické testy [53].



Obrázek 5 Molekulární maják na bázi aptameru. (A) Sekvence aptamerů ve vlásenkové struktuře podobné molekulárnímu majáku na konci označena fluoroforem (F) a zhášecem (Q) a princip vazby cíle s oddělením F od Q a produkci signálu; (B) fluoroforem značený aptamer v duplexní struktuře s komplementární sekvencí DNA značenou zhášecem je po vazbě oddělen od komplementární sekvence DNA značené zhášecem vedoucí k nárůstu fluorescence; (C) aptamer značený jedním pyrenem na každém konci přepínal svou fluorescenční emisi a vytvářel stabilní signály po navázání analytu.

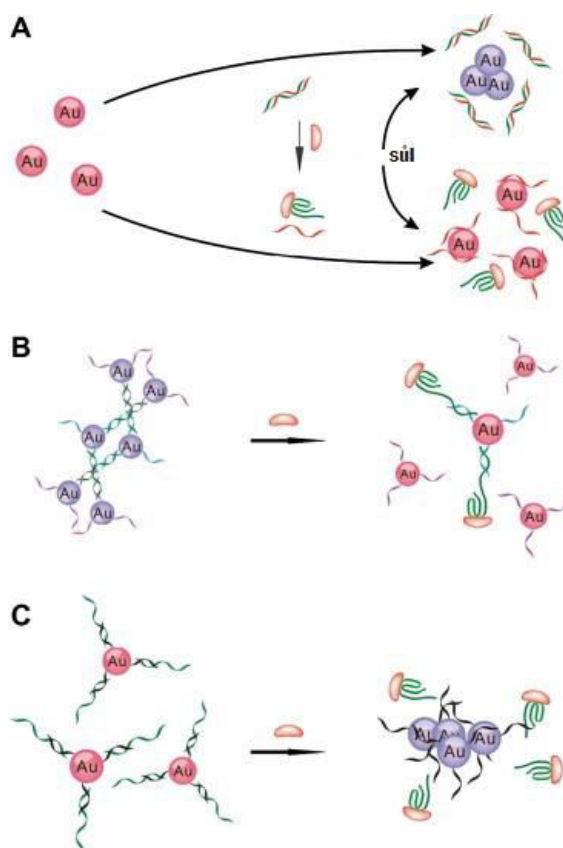
Převzato a upraveno z [43].

V poslední době jsou využívány místo organických fluorescenčních barviv QDs, které umožňují zlepšení účinnosti testu a k detekci dodání léčiv do buněk. Alternativním formátem je použití fluorescenčního rezonančního přenosu (FRET (fluorescence resonance transfer)), který se opírá o tzv. přenos energie mezi dvěma fluorescenčními molekulami (donorem a akceptorem). Nicméně, i přes velké úsilí, které se v minulosti vynakládalo na optimalizaci duálně značených oligonukleotidů, bylo dosaženo jen malého pokroku v kvantifikaci pomocí techniky FRET. To je pravděpodobně z toho důvodu, že zlepšení metody FRET závisí na mnoha faktorech (např. povaha barviv, délka aptameru nebo na vztahu barvivo-barvivo). Důležitější je, že fluorescenční zhášení nebo FRET jsou obtížně použitelné pro přímou analýzu cíle v jeho přirozeném prostředí, kvůli rušivému signálu pozadí [54].

Další možností je aptamer s posunem vlnové délky pro rychlou a citlivou detekci růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (PDGF). Aptamer je na každém konci označen jedním pyrenem a tím přepíná svou fluorescenční emisi ze ≈ 400 nm (pyrenový monomer s dobou fluorescence ≈ 5 ns) na ≈ 485 nm (pyrenový excimer s dobou fluorescence ≈ 40 s) po navázání PDGF (Obrázek 5C). V důsledku toho tato konstrukce obcházela významný problém pozadí signálu, který je vlastní složitým biologickým vzorkům [55].

Velká pozornost byla před patnácti lety věnována použití tzv. nanomateriálů (např. AuNP), které umožňují vyvinout jednoduché kolorimetrické formáty biologických testů. V jednom z těchto postupů byly nemodifikované AuNP použity k rozlišení rozložené a složené DNA. To poskytlo nový přístup k biologickému rozpoznávání aptamerů kolorimetricky (Obrázek 6A). DNA aptamer je v roztoku podobný náhodné spirále, která se může pevně vázat na

AuNP a stabilizovat je proti agregaci vyvolané solí. Po přidání analytu a navázání vytvořil aptamer 3D struktury (např. G-kvadruplex) a již nechránil AuNP před agregací. Důsledkem toho se projeví barevné změny nemodifikovaných AuNP viditelné pouhým okem. Tato strategie byla úspěšně použita k detekci proteinů [56].



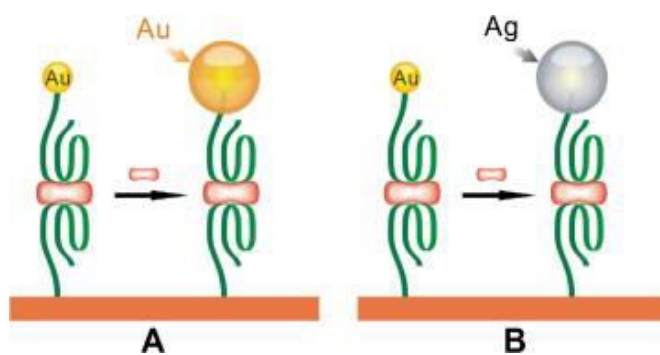
Obrázek 6 Schéma aptasenzoru založeném na kolorimetrické změně AuNPs na základě jejich agregačního stavu. (A) Po navázání na analyt vytvořil aptamer 3D strukturu a vedl k agregaci AuNP; (B) fialově zbarvený DNA modifikovaný agregát AuNP byl v přítomnosti cílových molekul rozptýlen do červeně zbarvených jednotlivých AuNP; a (C) AuNP funkcionalizované krátkou komplementární ssDNA a aptamery byly po navázání analytu nestabilní vůči agregátům vyvolaným solí, což vedlo ke změně barvy z červené na fialovou.
Převzato a upraveno z [43].

Aptamery byly použity také k seskupování nanočástic a provádění biosenzorických testů. V související studii byly aptamery použity jako linkery k sestavení ssDNA funkcionalizovaných AuNP [57]. V přítomnosti cílových molekul přizpůsobil aptamer svou strukturu a NP se disociovaly (Obrázek 6B). Výsledkem bylo, že se fialově zbarvené agregáty rozdělily na červeně zbarvené jednotlivé NP. Tento formát testu je aplikovatelný k analýze různých typů molekul jednoduchou záměnou aptamerových sekvencí. Byl použit k detekci adenosinu a kokainu v séru pomocí jednoduchého „proužkového“ testu [58].

V jiném testu byl aptamer DNA nejprve hybridizován s krátkou komplementární ssDNA značenou AuNPs. Směs byla v roztoku dobře dispergována a částice vypadaly červeně. Po navázání analytu došlo u aptamerových vláken ke změně struktury, která vedla k jejich

disociaci od AuNP. V případě přítomnosti stejné koncentrace soli byly nehybridizované AuNP nestabilní a okamžitě agregovaly, což vedlo k rychlé změně barvy z červené na fialovou (Obrázek 6C) [59].

Aptamery značené AuNPs byly také využity pro zesílenou optickou detekci proteinů v sendvičovém uspořádání. Na maleimidem funkcionalizovanou siloxanovou monovrstvu byl kovalentně navázán antitrombinový aptamer, který vázal stanovený trombin. Na něj byl dále navázán druhý antitrombinový aptamer značený AuNP. Viditelné rozhraní AuNP bylo poté zesíleno v roztoku obsahujícím HAuCl_4 , cetyltrimethylamonium bromid, jako povrchově aktivní látku, a redukční činidla (Obrázek 7A). Zvětšení AuNP výrazně zlepšilo citlivost kolorimetrické detekce, kdy bylo možné detekovat 2 nM koncentrace trombinu [60].



Obrázek 7 "Sendvičový" typ kolorimetrie na bázi aptamerů s amplifikací zlatem (A) a stříbrem (B).
Převzato z [43].

Na podobném principu sestavili aptasenzor i Li a kol. (2007), kteří využívali zvýraznění stříbra (Obrázek 7B). Jejich test současně využíval AuNP značený aptamer a biotinový aptamer, který se vázal na PDGF-BB (homodimer PDGF), který dosáhl extrémě nízkého LOD 83 aM [61].

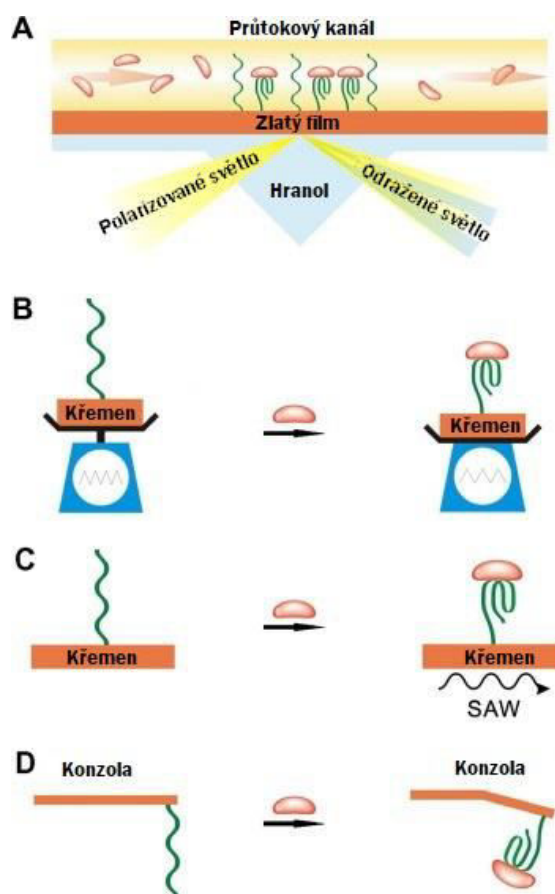
2.2.3 HMOTNOSTNÍ DETEKCE

Biosenzor s hmotnostní detekcí je definován jako jakékoli zařízení, které měří vlastnost, která se měří úměrně hmotnosti spojené s jeho citlivým povrchem nebo s ním vázané záchytné sondy. Hmotnostně citlivé biosenzory založené na aptamerech jsou třídou tzv. label-free senzorů založených např. na povrchové plasmonové rezonanci (SPR), akustických vlnách (např. křemenné mikrováčky (QCM) či povrchové akustické vlně (SAW)). Často se označují jako „hmotnostně citlivé“ techniky z důvodu měření jejich hmotnosti nebo tloušťky u tenkých vrstev [43].

Senzory SPR jsou zařízení schopná registrovat hmotnost na základě související změny indexu lomu při povrchu. Protože SPR může určit vazbu konstanty aptamerů a jejich cílů, využívá se

tato technologie v procesu SELEX. Metoda SPR se rovněž používá pro diagnostické aplikace využívající aptamery. Při tomto diagnostickém formátu je selektivní povrch vytvořen imobilizací aptameru. Analyt je poté přidán, zatímco přístroj měří změny rezonančního úhlu, ke kterým dochází na povrchu. Úhel se mění, když se aptamer váže na analyt (Obrázek 8A). Bylo zjištěno, že signál je úměrný navázaným molekulám, což umožňuje tzv. label-free detekci v konfiguraci s vazbou na jedno místo [62].

Mascini a kol. (2005) vytvořili potup, kde byl aptamer specifický pro protein HIV-1 Tat imobilizován na SPR čipy pomocí avidin-biotin interakce. Vysoká specifita testu byla potvrzena pomocí kontrolního proteinu HIV-1 Rev, který byl podobný proteinu HIV-1 Tat. Při použití dvou-vazebného modelu bylo zjištěno, že zesílení signálu systému lze zapojit do vývoje vysoce citlivých a specifických biologických testů SPR [63].



Obrázek 8 Hmotnostně citlivé aptasenzory. (A) Aptasenzor na bázi SPR; (B) aptasenzor na bázi QCM; (C) aptasenzor na bázi SAW a (D) mikromechanický konzolový aptasenzor na bázi SAW.
Převzato a upraveno z [43]

Mikrogravimetrická analýza na QCM byla použita k detekci interakce aptamerů a jejich cílů. Frekvence křemenného krystalu je řízena změnami v hmotnosti spojené s krystalem, a proto asociace analytu na krystalech modifikovaných aptamery zvyšuje hmotnost na snímači, což má za následek snížení rezonanční frekvence krystalu (Obrázek 8B). Byly použity dvě

podobné metody využívající biotinylovaný aptamer imobilizovaný na krystalu Au/křemen pro mikrgravimetrickou detekci trombinu a HIV-1 Tat proteinu s hodnotami LOD 1 nM a 0,25 ppm [63].

Parametry aptasenzorů založených na QCM byly také vyhodnoceny a optimalizovány s cílem zlepšit jejich analytické vlastnosti [64]. Kromě aplikací v QCM se piezoelektrické křemenné krystaly využívají také k výrobě aptasenzorů typu SAW. Speciální typ SAW, Love-wave, byl vyvinut k detekci serinové proteázy trombinu a peptidu Rev [65] (Obrázek 8C). Jeho LOD byly přibližně 72 pg/cm² pro trombin a 77 pg/cm² pro peptid Rev. Dále byl použit aptasenzor Love-wave, založený na stejném principu, pro sledování tvorby komplexů v procesu srážení krve [66].

Mikrobiosenzory mají nízký šum a vysokou škálovatelnost (schopnost pracovat s náhlými změnami) díky jejich malým rozměrům. Nízký šum poskytuje vyšší rozlišení, zatímco škálovatelnost umožňuje použití mnoha senzorů paralelně pro systémy v místě měření. V takovýchto aptamerových testech jsou aptamery navázány na horní povrch mikrokonzole. Vazba aptamerů s cílovými molekulami vede ke sterickému vytěsnění, které nutí konzolu k ohybu. Tento ohyb lze detekovat opticky nebo elektronicky (Obrázek 8D) [43].

3 APTASENZORY V DIAGNOSTICE

3.1 APTASENZORY V DIAGNOSTICE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Rakovina je zhoubný nádor, který ohrožuje lidský život různými způsoby a více než 60 lidských orgánů může být ovlivněno různými typy rakoviny. Proto rostou požadavky na včasnou, přesnou a efektivní detekci biomarkerů nádorových onemocnění a následně prevenci malignit. Biomarker je biomolekula, která se nachází v tělních tekutinách (např. v krvi, moči, slinách) nebo tkáních, slouží jako indikátor fyziologických nebo patogenních procesů a vytváří farmakologickou odpověď nebo terapeutický účinek [67].

Vzhledem k tomu, že rakovina je multifaktoriální onemocnění a že mnoho biomarkerů se na něm podílí, byly zavedeny různé metody detekce biomarkerů jako např.: Mikrofluidní proteinové čipy a pole, nanočástice, oligonukleotidové mikročipy, nanobiočip. Kromě toho se používají imunoanalytické indikátorové metody, jako je ELISA (enzymová imunoanalýza na pevné fázi), Luminex a Nanosphere. Jedná se o konvenční metody detekce biomarkerů rakoviny. Kvůli dlouhotrvajícímu postupu, kolísání afinity protilátek a nízké účinnosti jsou vyžadována nákladná činidla, což činí protilátky celosvětově obtížnými a nespolehlivými pro

přesnou detekci. V posledních letech se jako jedna z metod pro včasnou diagnostiku nádorových biomarkerů objevilo použití aptasenzorů [68–73].

3.1.1 ELEKTROCHEMICKÉ APTASENZORY

Kompatibilita mezi biomolekulami a elektrochemií umožňuje citlivou detekci. Použití pevných elektrod se specifickými nanostrukturami obsahujícími elektroaktivní značky otevřelo novou oblast detekce biomolekul. Elektrochemické aptasenzory pro detekci markerů nádorových onemocnění jsou: voltametrie, konduktometrie, elektrochemiluminiscence, impedimetrie a potenciometrie [74].

Tabulka 1 shrnuje některé příklady elektrochemických aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů s využitím aptasenzorů.

Tabulka 1 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů.

Typ rakoviny	Biomarker	Uspořádání	Značka	Detekční metoda	LOD	Ref. rozmezí	Ref.
Kolorektální karcinom, rakovina prsu, plic, vaječníku a jater	Karcinoembryonální antigen (CEA)	sendvičové	AuNP	Amperometrie	5 fM	50 fM – 500pM	[75]
Přítomnost nádoru	VEGF	sendvičové	Bimetalické nanoklastry Ag/Pt	Amperometrie	4,6 pmol/l	6,0-20 pmol/l	[76]
Leukemie	HL-60	jednovazebné	AuNP	Electrochemiluminiscence	56 buněk/ml	0-5,6·10 ⁶ buněk/ml	[77]
Přítomnost nádoru	VEGF	jednovazebné	CdS:Eu nanokrystal	Electrochemiluminiscence	0,2 pM	1 pM – 20 nM	[78]
Přítomnost nádoru	Mucin 1	jednovazebné	2D zirkoniové nanolisty	Impedimetrie	0,12 a 0,65 pg/ml	0,001-0,5 ng/ml	[79]
Přítomnost nádoru	BRCA1	jednovazebné	AuNP	Impedimetrie	1 pM	1 pM – 500 nM	[80]
Hepatocelulární karcinom	HepG2	sendvičové	AuNP	Impedimetrie	15 buněk/ml	1·10 ² - 1·10 ⁷ buněk/ml	[81]
Přítomnost nádoru	PDGF	jednovazebné	Uhlíkové nanovláknko	Potenciometrie	5 fM	---	[82]
Přítomnost nádoru	VEGF	jednovazebné	Polypyrrolové nanotrubičky	Potenciometrie	400 fM	---	[83]
Rakovina prsu	MCF-7	sendvičové	AuNP/GO	Voltametrie	8 buněk/ml	10-10 ⁵ buněk/ml	[84]
Myeloidní leukemie	Buňky K562	sendvičové	Au nanokvět	Voltametrie	10 buněk/ml	---	[85]

Rakovina prsu, žaludku, vaječníků, dělohy a plic	HER2	jednovazebné	GO	Voltametrie	0,21 ng/ml	0,5-2 ng/ml a 2-75 ng/ml	[86]
Leukemie	Leukemické buňky	jednovazebné	Magnetické NP	Voltametrie	10 buněk/ml	10-10 ⁶ buněk/ml	[87]

3.1.2 OPTICKÉ APTASENZORY

Pro detekci biomarkerů, jako jsou proteiny a ionty kovů související s přítomností nádorových buněk, byly vyvinuty optické aptasenzory. Optické aptasenzory jsou založeny na absorpci a luminiscenčních změnách v důsledku interakce s cílovým analytem. Tyto aptasenzory zahrnují jednoduché značení i rychlé a efektivní postupy [88]. Existují různé typy optických aptasenzorů jako jsou fluorescenční, kolorimetrické a chemiluminiscenční [89].

Tabulka 2 shrnuje některé příklady optických aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů s využitím aptasenzorů.

Tabulka 2 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci nádorových biomarkerů.

Typ rakoviny	Biomarker	Uspořádání	Značka	Detekční metoda	LOD	Ref. rozmezí	Ref.
Rakovina prsu	MCF-7	Jednovazebné	SiO ₂ NP	Fluorescence	62 buněk/ml	180-8·10 ⁷ buněk/ml	[90]
Leukemie	HL-60	Jednovazebné	SiO ₂ NP	Fluorescence	70 buněk/ml	210-7·10 ⁷ buněk/ml	[90]
Myeloidní leukemie	K562	Jednovazebné	SiO ₂ NP	Fluorescence	65 buněk/ml	200-7·10 ⁷ buněk/ml	[90]
Rakovina prsu a prostaty	CD44	Jednovazebné	AuNP	Fluorescence	1·10 ¹ CFU/ml	1·10 ¹ -1·10 ⁷ CFU/ml	[91]
Rakovina prsu	SK-BR-3	Jednovazebné	ZnO/grafen	Fotoelektro chemie	58 buněk/ml	1·10 ² -1·10 ⁶ buněk/ml	[92]
Přítomnost nádoru	miRNA a nádorové buňky	Sendvičové	AuNP	SPR	0,6 fM	---	[93]
Rakovina prsu	MCF-7	Jednovazebné	Au nanotyče	SPR	100 buněk/ml za 30 minut	1·10 ² -1·10 ⁵ buněk/ml	[94]
Rakovina prsu	MCF-7	Sendvičové	Magnetické NP	SPR	500 buněk/ml	---	[95]

3.2 APTASENZORY V DIAGNOSTICE KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ

Kardiovaskulární onemocnění (CVD) a onemocnění koronární artérie, srdeční selhání a hypertenzní srdeční choroby jsou onemocnění srdce a cév. Toto je hlavní příčinou nemoci a invalidity a předčasných úmrtí na celém světě. Mezi CVD patří také ischemická choroba srdeční (např. akutní infarkt myokardu (AMI), nestabilní angina pectoris a srdeční selhání). Pro zvládnutí AMI je zásadní včasné a přesné odhalení tohoto fatálního onemocnění a s ním spojeného rizika úmrtnosti. Elektrokardiografie (EKG) a měření koncentrací srdečních biomarkerů (např. srdečních troponinů (cTn), kreatinkinázy-MB, myoglobinu (Mb) a C-reaktivního proteinu (CRP)) jsou běžnými diagnostickými metodami [96, 97]. Zejména EKG je nejučinnější a oblíbenou diagnostickou metodou AMI; někdy však vykazuje nedignostické nebo nevýrazné signály, které ztěžují diagnózu, vzhledem k přítomnosti blokády levé svazkové větve. Proto je nejučinnější metodou pro diagnostiku AMI vysoce přesné a citlivé měření koncentrací srdečních biomarkerů v lidských tělesných tekutinách [98].

Několik analytických metodik, včetně optických metod a ELISA metod, elektrochemiluminiscenci nebo na metodách piezoelektrické imunoanalýzy, jakož i optomagnetické nebo elektrochemické metody, pro detekci koncentrací srdečních biomarkerů, již bylo vyvinuto. Elektrochemické snímací/biosnímací metody nabízí výhodu nízkých nákladů, krátkou dobu snímání, přenosnost a požadavek na malý objem vzorků (cca 1 μ l) [99–104]. Kromě toho elektrochemické metody nabízejí též schopnost rozlišovat malé změny v proudu, potenciálu a odporu redoxního indikátoru (např. $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$) indukovaného molekulou vyskytující se na povrchu elektrody, čímž je label-free detekce srdečních biomarkerů stejně dobrá, jako detekce dalších biologických sloučenin, kterých již bylo dosaženo [105, 106]. Tyto výhody elektrochemických senzorů/biosenzorů umožňují vlastní monitoring testování v místě péče a v místě potřeby, ačkoli dlouhodobou stabilitu, přesnost a spolehlivost těchto senzorů je třeba ještě určit pro praktické použití detekce biomarkerů [104].

Tabulka 3 shrnuje některé příklady elektrochemických aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů AMI s využitím aptasenzorů.

Tabulka 3 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů souvisejících s AMI.

Biomarker	Uspořádání	Značka	Detekční metoda	LOD	Referenční rozmezí	Ref.
cTnI	Jednovazebné	AuNP	DPV	4,32 pg/ml	0,024 – 26,4 ng/ml	[107]
cTnI	Jednovazebné	AuNP/In ₂ O ₃	DPV	60 pg/ml	0,1 – 1 · 10 ³ ng/ml	[108]
cTnI	Jednovazebné	Au nanodestičky	DPV	8 pg/ml	0,05 – 500 ng/ml	[109]
cTnI	Jednovazebné	MoS ₂	EIS	25,26 pg/ml	0,24 – 24 · 10 ³ ng/ml	[110]
cTnI	Jednovazebné	ZnFe ₂ O ₄ NP	SWV	1 pg/ml	1 · 10 ⁻³ – 200 ng/ml	[111]
cTnI	Jednovazebné	Au@SiO ₂ @AuNP	SWV	29,52 pg/ml	0,24 – 24 · 10 ⁴ ng/ml	[110]
cTnT	Jednovazebné	MPAuN	DPV	23 pg/ml	0,05 – 5 ng/ml	[112]
Mb	Jednovazebné	AuNP/BNNS	DPV	34,6 ng/ml	100 – 1 · 10 ⁵ ng/ml	[113]
Mb	Jednovazebné	PEI-rGO	DPV	0,97 pg/ml (v PBS) 2,1 pg/ml (v lidském séru)	1 · 10 ⁻³ – 1 · 10 ³ ng/ml	[114]
CRP	Sendvičové (se značenou protilátkou)	Magnetické nanokuličky potažené streptavidinem	DPV	54 fg/ml	1 · 10 ² – 5 · 10 ⁴ ng/ml	[115]
CRP	Jednovazebné	pRhNP	EIS	0,814 ng/ml	0,23 – 23 μg/ml	[116]

3.3 APTASENZORY V DIAGNOSTICE NEUROLOGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

Neurologické poruchy (ND) jsou onemocnění mozku, míchy a nervů, které je spojují a představují druhou příčinu úmrtí a hlavní příčinu invalidity, přičemž postihují široké spektrum společnosti na celém světě [37].

ND jsou jako Alzheimerova choroba, schizofrenie, traumatické poranění mozku, migréna, roztroušená skleróza, demence, epilepsie, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, tauopatie a mnoho dalších vede k několika patologickým stavům. Ty jsou charakterizovány poškozením neuronů, které nakonec způsobuje smrt neuronů [117]. Patofyziologie neurologických onemocnění zahrnuje agregaci nesprávně složených proteinů, jako je

amyloid β , α -synuklein a prionových proteinů v mozku. Ačkoli vztah mezi chybně složenými proteiny a neurodegenerativními onemocněními je dosud neznámý, uvádí se, že genetické mutace, stárnutí, metabolické příčiny a faktory životního prostředí mohou vést ke vzniku onemocnění [118].

Za posledních 25 let incidence, prevalence, mortalita a míra postižení neurologickými poruchami celosvětově vzrostla navzdory zavádění nových diagnostických strategií a ochranných programů [119]. Kromě toho jsou k dispozici informace o nákladově efektivních metodách zlepšení diagnózy zůstávají omezené. V současné době spočívá diagnostika ND v hodnocení klinických příznaků, využití zobrazovacích metod [120], snímáním pohybu pacienta [121] a stanovení specifických biomarkerů [122]. Vzhledem k obtížím při identifikaci ND je zásadní objevit spolehlivé a slibné biomarkery pro včasnou diagnostiku a cílenou léčbu ND. Biomarkery používané při diagnostice nebo léčbě onemocnění by měly zahrnovat specifčnost, selektivitu, dědičnost a ko-segregaci s neurologickými poruchami v rámci rodiny [123]. Zásadní výhody biomarkerů z nich činí vysoce přesné a spolehlivé pro potenciální přípravu různých typů aptasenzorů pro ND [124]. Tyto biomarkery by mohly být účinně stanoveny pomocí protilátkových platforem s vysokou afinitou k jejich cílům. Nicméně tyto protilátky vykazují některé nevýhody, jako je nízká stabilita, nízká imunogenicita a zvýšená toxicita. S aptamery, které jsou také definovány jako syntetické biorozpoznávací látky, představují zásadní volbu namísto protilátek [125].

V poslední době bylo vyvinuto mnoho aptasenzorů založených na různých technikách jako je fluorescence, chemiluminiscence, kolorimetrie, elektrochemie, mikromechanické a hmotnostně citlivé metody [126–129]. Z nich elektrochemické aptasenzory pro diagnostické přístupy v biologických vzorcích zaznamenaly díky svým vynikajícím vlastnostem významný pokrok, včetně miniaturizace elektrochemických přístrojů, vysoké citlivosti a jednoduchého ovládání [130]. Elektrochemické aptasenzory kombinují funkční vlastnost aptameru s citlivostí elektrochemických technologií pro stanovení různorodosti biomarkerů [131].

Tabulka 4 shrnuje některé příklady elektrochemických aptasenzorů a Tabulka 5 shrnuje některé příklady optických aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů ND s využitím aptasenzorů.

Tabulka 4 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů ND.

Onemocnění	Biomarker	Uspořádání	Povrch elektrody	Detekční metoda	LOD	Ref. rozmezí	Ref.
Parkinsonova choroba	α -syno	Jednovazebné	Apt/ERGO/GC E	DPV	0,64 fM	1 fM – 1 nM	[132]
Parkinsonova choroba	α -syno	Jednovazebné	Apt/-PPy-COOH/SPCE	EIS	$1 \cdot 10^{-6}$ pM	$1 \cdot 10^{-8}$ – 0,1 nM	[133]
Alzheimerova choroba	$A\beta_0$	Jednovazebné	Apt/AuPt/CFP	DPV	0,16 pg/ml	0,5 – 10 000 pg/ml	[134]
Alzheimerova choroba	$A\beta_0$	Jednovazebné	MCH/Apt/Au elektroda	EIS	3,25 fM	10 fM – 0,1 μ M	[135]
Alzheimerova choroba	$A\beta_0$	Jednovazebné	TA/GNPs-STP/Apt/Au elektroda	DPV	0,5 fM	1 fM – 10 pM	[136]
Alzheimerova choroba	$A\beta_0$	Sendvičové	Apt/AuNP/Cu-MOF/GCE	DPV	0,45 nM	1 nM – 2 μ M	[137]
Autismus	BCM-7	Jednovazebné	BSA/Apt/AuNR /SPCE	DPV	334 aM	1 fM – 25 nM	[138]
Autismus	BCM-7	Jednovazebné	Apt/NiONP /SPCE	DPV	166,6 aM	$0,5 \cdot 10^{-9}$ – 1,5 μ M	[139]
Autismus	BCM-7	Jednovazebné	BSA/Apt/AuNP @ZnSQDs/GCE	EIS	350 aM	1 fM – 0,6 μ M	[140]
Alzheimerova choroba, autoimunitní encefalomyelitida	Trombin	Jednovazebné	Apt/Au elektroda	DPV	0,126 pM	0,18 pM – 1,8 nM	[141]
Alzheimerova choroba, autoimunitní encefalomyelitida	Trombin	Jednovazebné	Apt/Hemin/ITO elektroda	DPV	42 fM	0,1 pM – 100 nM	[142]

Tabulka 5 Příklady aptasenzorů vyvinutých pro detekci biomarkerů ND.

Onemocnění	Biomarker	Uspořádání	Rozpoznávací prvek	Detekční metoda	LOD	Referenční rozmezí	Ref.
Alzheimerova choroba	$A\beta$	Jednovazebné	Ru(II)-Apt- $A\beta$	Luminiscence	50 nM	0 – 80 μ M	[143]
Alzheimerova choroba	$A\beta$	Jednovazebné	PDANS/Apt	Fluorescence	12,5 nM	0,02 – 10 μ M	[144]
Alzheimerova choroba	$A\beta$	Jednovazebné	Apt-GO	Fluorescence	0,1 nM	0,1 – 40 nM	[145]
Alzheimerova choroba	$A\beta_{400}$	Sendvičové (cyklické)	Apt@AuNP	Kolorimetrie	10 nM	35 – 700 nM	[146]
Alzheimerova choroba	Tau	Jednovazebné	Biotin-Apt/Tau/strep-MBs/strep-HRP	Kolorimetrie	153 pg/ml	300 – 600 pg/ml	[147]

ZÁVĚR

Důležitým podkladem pro tuto práci bylo nastudování informací o principech stanovování klinických biomarkerů, obzvláště pak způsoby detekce testů a jejich uspořádání. Dále pak nastudování využití aptamerů jako takových v biosenzorových aplikacích a jejich využití v klinické diagnostice pro stanovení významných klinických biomarkerů. Motivací k vytvoření tohoto shrnutí byla snaha o sjednocení informací získaných v oblasti využití aptamerů v klinické diagnostice nádorových, kardiovaskulárních a neurologických onemocnění.

V první části bakalářské práce byly popsány biosenzory. Primárně zde byla zaměřena pozornost na jejich základní strukturu a možnosti složení čistě z obecného pohledu.

Druhá část byla zaměřena na aptamery a jejich uspořádání v testech. Dále se pak podrobněji věnovala způsobům jejich detekce.

Poslední kapitola byla zaměřena na využití aptasenzorů v klinické diagnostice biomarkerů. Tato kapitola byla rozdělena podle typu onemocnění (nádorové, kardiovaskulární a neurologické). V této kapitole byly shrnuty některé aplikace detekčních metod a jejich výsledky.

Výsledkem této práce je, že se aptasenzory jeví jako velmi progresivní nástroj detekce biomarkerů spojených s výskytem nádorů, neurologických a kardiovaskulárních onemocnění. V posledních letech byl vyvinut velký pokrok směrem k aplikaci těchto technik v klinické diagnostice. Aptasenzory by jednou mohly plnohodnotně nahradit dnes běžně využívané protilátkové biosenzory jako levnější a citlivější nástroj pro detekci významných klinických biomarkerů.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] TURNER, A. P. F., KARUBE I. a WILSON, G.S.. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. B.m.: Oxford University Press, 1989. Oxford science publications. ISBN 9780198547242. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=S1FRAAAAMAAJ>
- [2] CAVALCANTI, A., SHIRINZADEH, B., ZHANG M., KRETLY, L. C. Nanorobot Hardware Architecture for Medical Defense. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2008, **8**(5), 2932–2958. Dostupné z: doi:10.3390/s8052932
- [3] VO-DINH, T., CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, **366**(6), 540–551. Dostupné z: doi:10.1007/s002160051549
- [4] VO-DINH, T., TROMBERG, B. J., GRIFFIN, G. D., AMBROSE, K. R., SEPANIAK, M. J., GARDENHIRE, E. M. Antibody-Based Fiberoptics Biosensor for the Carcinogen Benzo(a)pyrene. *Applied Spectroscopy*, 1987, **41**(5), 735–738. Dostupné z: doi:10.1366/0003702874448076
- [5] PATHAK, S. S., SAVELKOUL, H. F. Biosensors in immunology: the story so far. *Immunology today*, 1997, **18**(10), 464–467. Dostupné z: doi:10.1016/s0167-5699(97)01124-9
- [6] KIENLE, S., LINGLER, S., KRAAS, W., OFFENHÄUSSER, A., KNOL, W., JUNG, G. Electropolymerization of a phenol-modified peptide for use in receptor–ligand interactions studied by surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 1997, **12**(8), 779–786. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(97\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(97)00044-4)
- [7] TROMBERG, J. B., SEPANIAK, M. J., VO-DINH, T., GRIFFIN G. D. Fiber-optic chemical sensors for competitive binding fluoroimmunoassay. *Analytical Chemistry*, 2002, **59**(8), 1226–1230. Dostupné z: doi:10.1021/ac00135a033
- [8] DIAMOND, Dermot. *Principles of chemical and biological sensors*. B.m.: Wiley. 1998. ISBN 978-0-471-54619-1.
- [9] SAWATA, S., KAI, E., IKEBUKURO, K., IIDA, T., HONDA, T., KARUBE, I. Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, **14**(4), 397–404. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(99)00018-4
- [10] NIEMEYER, C. M., BOLDT, L., CEYHAN, B., BLOHM, D. DNA-Directed Immobilization: Efficient, Reversible, and Site-Selective Surface Binding of Proteins by Means of Covalent DNA–Streptavidin Conjugates. *Analytical Biochemistry*, 1999, **268**(1), 54–63. Dostupné z: doi:10.1006/ABIO.1998.3017
- [11] MARRAZZA, G., CHIANELLA, I., MASCINI, M. Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, **14**(1), 43–51. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(98)00102-X
- [12] PIEHLER, J., BRECHT, A., GAUGLITZ, G., ZERLIN, M., MAUL, C., THIERICKE, R., GRABLEY, S. Label-Free Monitoring of DNA–Ligand Interactions. *Analytical Biochemistry*, 1997, **249**(1), 94–102. Dostupné z: doi:10.1006/ABIO.1997.2160
- [13] GOODING, J. J., HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1999, **18**(8),

525–533. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(99)00133-8

- [14] PEMBERTON, R. M., HART, J. P., STODDARD, P., FOULKES, J. A. A comparison of 1-naphthyl phosphate and 4 aminophenyl phosphate as enzyme substrates for use with a screen-printed amperometric immunosensor for progesterone in cows' milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, **14**(5), 495–503. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(99)00019-6
- [15] HARA-KUGE, S., OHKURA, T., SEKO, A., YAMASHITA, K. Vesicular-integral membrane protein, VIP36, recognizes high-mannose type glycans containing $\alpha 1 \rightarrow 2$ mannosyl residues in MDCK cells. *Glycobiology*, 1999, **9**(8), 833–839. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/9.8.833
- [16] ZHAO, Y. B., WEN, M. L., LIU, S. Q., LIU, Z. H., ZHANG, W.D., YAO, Y., WANG, CH. Y. Microbial Sensor for Determination of Tannic Acid. *Microchemical Journal*, 1998, **60**(3), 201–209. Dostupné z: doi:10.1006/MCHJ.1998.1667
- [17] SCHMIDT, A., STANDFUSS-GABISCH, C., BILITEWSKI, U. Microbial biosensor for free fatty acids using an oxygen electrode based on thick film technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, **11**(11), 1139–1145. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(96)82336-0
- [18] ZHANG, W., CANZIANI, G., PLUGARIU, C., WYATT, R., SODROSKI, J., SWEET, R., KWONG, P., HENDRICKSON, W., CHAIKEN, I. Conformational Changes of gp120 in Epitopes near the CCR5 Binding Site Are Induced by CD4 and a CD4 Miniprotein Mimetic. *Biochemistry*, 1999, **38**(29), 9405–9416. Dostupné z: doi:10.1021/bi990654o
- [19] COSTELLO, R. F., PETERSON, I. R., HEPTINSTALL, J., WALTON, D. J. Improved gel-protected bilayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, **14**(3), 265–271. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(99)00003-2
- [20] RAMSTRÖM, Olof a Richard J ANSELL. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. *Chirality* [online]. 1998, **10**(3), 195–209. ISSN 0899-0042. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(1998)10:3<195::AID-CHIR1>3.0.CO;2-9
- [21] CULLUM, B. M., GRIFFIN, G. D., MILLER, G. H., VO-DINH, T. Intracellular Measurements in Mammary Carcinoma Cells Using Fiber-Optic Nanosensors. *Analytical Biochemistry*, 2000, **277**(1), 25–32. Dostupné z: doi:10.1006/ABIO.1999.4341
- [22] VO-DINH, T, NOLAN, T., CHENG, Y. F., SEPANIAK, M. J., ALARIE, J. P. Phase-Resolved Fiber-Optics Fluoroimmunosensor. *Applied Spectroscopy*, 1990, **44**(1), 128–132. Dostupné z: http://opg.optica.org/as/abstract.cfm?URI=as-44-1-128
- [23] ISOLA, R. N., STOKES, D. L., VO-DINH, T. Surface-Enhanced Raman Gene Probe for HIV Detection. *Analytical Chemistry*, 1998, **70**(7), 1352–1356. Dostupné z: doi:10.1021/ac970901z
- [24] WANG, J., ZHANG, X., PRAKASH, M. Glucose microsensors based on carbon paste enzyme electrodes modified with cupric hexacyanoferrate. *Analytica Chimica Acta*, 1999, **395**(1–2), 11–16. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(99)00306-2
- [25] RÜDEL, U., GESCHKE, O., CAMMANN, K. Entrapment of enzymes in

- electropolymers for biosensors and graphite felt based flow-through enzyme reactors. *Electroanalysis*, 1996, **8**(12), 1135–1139. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/elan.1140081212>
- [26] MUTLU, S., SABER, R., KOÇUM, C., PISKIN, E. An Immunosensor: Immobilization of Anti-HBs Antibody on Glow-Discharge Treated Piezoelectric Quartz Crystal for HBs-Ag Detection. *Analytical Letters*, 1999, **32**(2), 317–334. Dostupné z: doi:[10.1080/00032719908542823](https://doi.org/10.1080/00032719908542823)
- [27] ZHIHONG, M., XIAOHUI, L., WEILING, F. A new sandwich-type assay of estrogen using piezoelectric biosensor immobilized with estrogen response element. *Analytical Communications*, 1999, **36**(7), 281–283. Dostupné z: doi:[10.1039/A902872B](https://doi.org/10.1039/A902872B)
- [28] BLIND, M., BLANK, M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2015, **4**(1), e223. Dostupné z: doi:[10.1038/MTNA.2014.74](https://doi.org/10.1038/MTNA.2014.74)
- [29] Farokhzad, C. O., JIANJUN, CH., TEPLY, A. B., INES, S., SANGYONG, J. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, **103**(16), 6315–6320. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.0601755103](https://doi.org/10.1073/pnas.0601755103)
- [30] CIVIT, L., TAGHDISI, S. M., JONCZYK, A., HASSEL, S. K., GRÖBER, C., BLANK, M., STUNDEN, H. J., BEYER, M., SCHULTZE, J., LATZ, E., MAYER, G. Systematic evaluation of cell-SELEX enriched aptamers binding to breast cancer cells. *Biochimie*, 2018, **145**, 53–62. Dostupné z: doi:[10.1016/J.BIOCHI.2017.10.007](https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2017.10.007)
- [31] MISHRA, R. K., HAYAT, A., CATANANTE, G., ISTAMBOULIE, G., MARTY, J. L. Sensitive quantitation of Ochratoxin A in cocoa beans using differential pulse voltammetry based aptasensor. *Food Chemistry*, 2016, **192**, 799–804. Dostupné z: doi:[10.1016/J.FOODCHEM.2015.07.080](https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.07.080)
- [32] WILLNER, I., ZAYATS, M. Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, **46**(34), 6408–6418. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/anie.200604524>
- [33] KEEFE, A. D., PAI, S., ELLINGTON, A. Aptamers as therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, **9**(7), 537–550. Dostupné z: doi:[10.1038/nrd3141](https://doi.org/10.1038/nrd3141)
- [34] NAJAFABADI, M. E., KHAYAMIAN, T., HASHEMIAN, Z. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles for extraction of adenosine from urine followed by electrospray ion mobility spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, **107**, 244–250. Dostupné z: doi:[10.1016/J.JPBA.2015.01.021](https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2015.01.021)
- [35] ZHANG, Y., LAI, B. S., JUHAS, M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*, 2019, **24**(5), 941. Dostupné z: doi:[10.3390/molecules24050941](https://doi.org/10.3390/molecules24050941)
- [36] EIVAZZADEH-KEIHAN, R., PASHAZADEH-PANAHI, P., BARADARAN, B., MALEKI, A., HEJAZI, M., MOKHTARZADEH, A., DE LA GUARDIA, M. Recent advances on nanomaterial based electrochemical and optical aptasensors for detection of cancer biomarkers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, **100**, 103–115. Dostupné z: doi:[10.1016/J.TRAC.2017.12.019](https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2017.12.019)
- [37] ERKMEN, C., AYDOĞDU TIĞ, G., MARRAZZA, G., USLU, B. Design strategies,

- current applications and future perspective of aptasensors for neurological disease biomarkers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2022, **154**, 116675. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2022.116675
- [38] DRABIK, A., NER-KLUZA, J., MIELCZAREK, P., CIVIT, L., MAYER, G., SILBERRING, J. Advances in the Study of Aptamer–Protein Target Identification Using the Chromatographic Approach. *Journal of Proteome Research*, 2018, **17**(6), 2174–2181. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jproteome.8b00122
- [39] RADI, A-E., RAGAA ABD-ELLATIEF, M. Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. *Diagnostics*, 2021, **11**, 104. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics11010104
- [40] DAVIS, K. A., ABRAMS, B., LIN, Y., JAYASENA, S. D. Use of a High Affinity DNA Ligand in Flow Cytometry. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(4), 702–706. Dostupné z: doi:10.1093/nar/24.4.702
- [41] IKEBUKURO, K., KIYOHARA, CH., SODE, K. Electrochemical Detection of Protein Using a Double Aptamer Sandwich. *Analytical Letters*, 2004, **37**(14), 2901–2909. Dostupné z: doi:10.1081/AL-200035778
- [42] LEE, T., LEE, Y., PARK, S. Y., HONG, K., KIM, Y., PARK, CH., CHUNG, Y. H., LEE, M. H., MIN, J. Fabrication of electrochemical biosensor composed of multi-functional DNA structure/Au nanospire on micro-gap/PCB system for detecting troponin I in human serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, **175**, 343–350. Dostupné z: doi:10.1016/J.COLSURFB.2018.11.078
- [43] SONG, S., WANG, L., LI, J., FAN, CH., ZHAO, J. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008, **27**(2), 108–117. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2007.12.004
- [44] THOMAS, H., DINSHAW, P. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, 2000, **287**(5454), 820–825. Dostupné z: doi:10.1126/science.287.5454.820
- [45] XIAO, Y., LUBIN, A. A., HEEGER, A. J., PLAXCO, K. W. Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor, *Angewandte Chemie*. 2005, **44**, 5456–5459. Dostupné z: doi:10.1002/ange.200500989
- [46] RADI, A-E, SÁNCHEZ, J. L. A., BALDRICH, E., O’SULLIVAN, C. K. Reagentless, Reusable, Ultrasensitive Electrochemical Molecular Beacon Aptasensor. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **128**(1), 117–124. Dostupné z: doi:10.1021/ja053121d
- [47] TAJABADI, M. T., SOOKHAKIAN, M., ZALNEZHAD, E., YOON, G. H., HAMOUDA, A. M. S., AZARANG, M., BASIRUN, W. J., ALIAS, Y. Electrodeposition of flower-like platinum on electrophoretically grown nitrogen-doped graphene as a highly sensitive electrochemical non-enzymatic biosensor for hydrogen peroxide detection. *Applied Surface Science*, 2016, **386**, 418–426. Dostupné z: doi:10.1016/J.APSUSC.2016.06.045
- [48] JIN, H., GUI, R., YU, J., LV, W., WANG, Z. Fabrication strategies, sensing modes and analytical applications of ratiometric electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **91**, 523–537. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2017.01.011
- [49] MOSHAROV, E. V., SULZER, D. Analysis of exocytotic events recorded by

- amperometry. *Nature Methods*, 2005, **2**(9), 651–658. Dostupné z: doi:10.1038/nmeth782
- [50] MOKHTARZADEH, A., EIVAZZADEH-KEIHAN, R., PASHAZADEH, P., HEJAZI, M., GHARAATIFAR, N., HASANZADEH, M., BARADARAN, B., DE LA GUARDIA, M. Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2017, **97**, 445–457. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2017.10.005
- [51] KHOSRAVI, F., LOEIAN, M., PANCHAPAKESAN, B. Ultrasensitive Label-Free Sensing of IL-6 Based on PASE Functionalized Carbon Nanotube Micro-Arrays with RNA-Aptamers as Molecular Recognition Elements. *Biosenzors*, 2017, **7**, 17. Dostupné z: doi:10.3390/bios7020017
- [52] YAMAMOTO, R., BABA, T., KUMAR, P. K. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2000, **5**(5), 389–396. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2443.2000.00331.x
- [53] NUTIU, R., LI, Y. Structure-Switching Signaling Aptamers: Transducing Molecular Recognition into Fluorescence Signaling. *Chemistry – A European Journal*, 2004, **10**(8), 1868–1876. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/chem.200305470
- [54] HYUN CHOI, J., HAO CHEN, K., STRANO, M. S. Aptamer-Capped Nanocrystal Quantum Dots: A New Method for Label-Free Protein Detection. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**(49), 15584–15585. Dostupné z: doi:10.1021/ja066506k
- [55] JAMES, Y. CH., JOCKUSCH, S., VINCENS, M., TURRO, N. J., WEIHONG, T. Light-switching excimer probes for rapid protein monitoring in complex biological fluids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, **102**(48), 17278–17283. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0508821102
- [56] WEI, H., LI, B., LI, J., WANG, E., DONG, S. Simple and sensitive aptamer-based colorimetric sensing of protein using unmodified gold nanoparticle probes. *Chem. Commun.*, 2007, (36), 3735–3737. Dostupné z: doi:10.1039/B707642H
- [57] LIU, J., LU, Y. Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. *Nature Protocols*, 2006, **1**(1), 246–252. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.38
- [58] LIU, J., MAZUMDAR, D., LU, Y. A Simple and Sensitive „Dipstick" Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures. *Angewandte Chemie*, 2006, **45**, 7955-7959. Dostupné z: doi:10.1002/ange.200603106
- [59] ZHAO, W., CHIUMAN, W., BROOK, M. A., LI, Y. Simple and Rapid Colorimetric Biosensors Based on DNA Aptamer and Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation. *ChemBioChem*, 2007, **8**, 727-731. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.200700014
- [60] PAVLOV, V., XIAO, Y., SHLYAHOVSKY, B., WILLNER, I. Aptamer-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Optical Detection of Thrombin. *Journal of the American Chemical Society* 2004, **126**(38), 11768–11769. Dostupné z: doi:10.1021/ja046970u
- [61] LI, Y-Y., ZHANG, CH., LI, B-S., ZHAO, L-F., LI, X-B., YANG, W-J., XU, S-Q.

- Ultrasensitive Densitometry Detection of Cytokines with Nanoparticle-Modified Aptamers, 2007. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2006.082271
- [62] LUZI, E., MINUNNI, M., TOMBELLI, S., MASCINI, M. New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, **22**(11), 810–818. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(03)01208-1
- [63] TOMBELLI, S., MINUNNI, M., LUZI, E., MASCINI, M. Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**(2), 135–141. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOELECTCHEM.2004.04.011
- [64] BINI, A., MINUNNI, M., TOMBELLI, S., CENTI, S., MASCINI, M. Analytical Performances of Aptamer-Based Sensing for Thrombin Detection. *Analytical Chemistry*, 2007, **79**(7), 3016–3019. Dostupné z: doi:10.1021/ac070096g
- [65] SCHLENSOG, M. D., GRONEWOLD, T. M. A., TEWES, M., FAMULOK, M., QUANDT, E. A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, **101**(3), 308–315. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2004.03.015
- [66] GRONEWOLD, T. M. A., GLASS, S., QUANDT, E., FAMULOK, M. Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**(10), 2044–2052. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2004.09.007
- [67] BROZA, Y. Y., ZHOU, X., YUAN, M., QU, D., ZHENG, Y., VISHINKIN, R., KHATIB, M., WU, W., HAICK, H. Disease Detection with Molecular Biomarkers: From Chemistry of Body Fluids to Nature-Inspired Chemical Sensors. *Chemical Reviews*, 2019, **119**(22), 11761–11817. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.9b00437
- [68] MALHOTRA, R., PATEL, V., CHIKKAVEERIAIAH, B. V., MUNGE, B. S., CHING CHEONG, S., ZAIN, R. B., ABRAHAM, M. T., DEY, D. K., SILVIO GUTKIND, J., RUSLING, J. F. Ultrasensitive Detection of Cancer Biomarkers in the Clinic by Use of a Nanostructured Microfluidic Array. *Analytical Chemistry* 2012, **84**(14), 6249–6255. Dostupné z: doi:10.1021/ac301392g
- [69] CHINEN, A. B., GUAN, CH. M., FERRER, J. R., BARNABY, S. N., MERKEL, T. J., MIRKIN, CH. A. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews* 2015, **115**(19), 10530–10574. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.5b00321
- [70] LODES, M. J., CARABALLO, M., SUCIU, D., MUNRO, S., KUMAR, A. Detection of Cancer with Serum miRNAs on an Oligonucleotide Microarray. *PLoS ONE*, 2009, **4**(7), 6229. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0006229
- [71] RAAMANATHAN, A., SIMMONS, G. W., CHRISTODOULIDES, N., FLORIANO, P. N., FURMAGA, W. B., REDDING, S. W., LU, K. H., BAST, R. C., MCDEVITT, J. T. Programmable Bio-Nano-Chip Systems for Serum CA125 Quantification: Toward Ovarian Cancer Diagnostics at the Point-of-Care. *Cancer Prevention Research*, 2012, **5**(5), 706–716. Dostupné z: doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0508
- [72] RIFAI, N., GILLETTE, M. A., CARR, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**(8), 971–983. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1235

- [73] ALBANI, S., PRAKKEN, B. T Cell Epitope-Specific Immune Therapy for Rheumatic Diseases. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 2006, **54**(1), 19–25. Dostupné z: doi:10.1002/art.21520
- [74] SADIK, O. A., ALUOCH, A. O., ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosensors and Bioelectronics* 2009, **24**(9), 2749–2765. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2008.10.003
- [75] WANG, P., WAN, Y., DENG, S., YANG, S., SU, Y., FAN, CH., ALDALBAHI, A., ZUO, X. Aptamer-initiated on-particle template-independent enzymatic polymerization (aptamer-OTEP) for electrochemical analysis of tumor biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 2016, **86**, 536–541. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2016.07.025
- [76] FU, X. M., LIU, Z. J., CAI, S. X., ZHAO, Y.P., WU, D. Z., LI, CH. Y., CHEN, J. H. Electrochemical aptasensor for the detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) based on DNA-templated Ag/Pt bimetallic nanoclusters. *Chinese Chemical Letters*, 2016, **27**(6), 920–926. Dostupné z: doi:10.1016/J.CCLET.2016.04.014
- [77] FENG, Q. M., LIU, Z., CHEN, H. Y., XU, J. J. Paper-based electrochemiluminescence biosensor for cancer cell detection. *Electrochemistry Communications*, 2014, **49**, 88–92. Dostupné z: doi:10.1016/J.ELECOM.2014.10.015
- [78] ZHANG, H., LI, M., LI, C., GUO, Z., DONG, H., WU, P., CAI, CH. G-quadruplex DNAzyme-based electrochemiluminescence biosensing strategy for VEGF165 detection: Combination of aptamer–target recognition and T7 exonuclease-assisted cycling signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics* 2015, **74**, 98–103. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2015.05.069
- [79] LI, J., SUN, K., CHEN, Z., SHI, J., ZHOU, D., XIE, G.. A fluorescence biosensor for VEGF detection based on DNA assembly structure switching and isothermal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **89**, 964–969. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2016.09.078
- [80] YANG, Y., LI, CH., YIN, L., LIU, M., WANG, Z., SHU, Y., LI, G. Enhanced Charge Transfer by Gold Nanoparticle at DNA Modified Electrode and Its Application to Label-Free DNA Detection. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, **6**(10), 7579–7584. Dostupné z: doi:10.1021/am500912m
- [81] SUN, D., LU, J., ZHONG, Y., YU, Y., WANG, Y., ZHANG, B., CHEN, Z. Sensitive electrochemical aptamer cytosensor for highly specific detection of cancer cells based on the hybrid nanoelectrocatalysts and enzyme for signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, **75**, 301–307. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2015.08.056
- [82] JUN, J., SEOP LEE, J., HOON SHIN, D., JANG, J. Aptamer-Functionalized Hybrid Carbon Nanofiber FET-Type Electrode for a Highly Sensitive and Selective Platelet-Derived Growth Factor Biosensor. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, **6**(16), 13859–13865. Dostupné z: doi:10.1021/am5032693
- [83] KWON, O. S., PARK, S. J., JANG, J. A high-performance VEGF aptamer functionalized polypyrrole nanotube biosensor. *Biomaterials*, 2010, **31**(17), 4740–4747. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.02.040
- [84] WANG, K., HE, M. Q., ZHAI, F. H., HE, R. H., YU, Y. L. A novel electrochemical biosensor based on polyadenine modified aptamer for label-free and ultrasensitive detection of human breast cancer cells. *Talanta*, 2017, **166**, 87–92. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2017.04.014

z: doi:10.1016/J.TALANTA.2017.01.052

- [85] LIU, J., UI, M., NIU, L., ZHOU, H., HANG, S. Enhanced Peroxidase-Like Properties of Graphene-Hemin-Composite Decorated with Au Nanoflowers as Electrochemical Aptamer Biosensor for the Detection of K562 Leukemia Cancer Cells. *Chemistry A European Journal*, 2016, **22**, 18001-18008. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201604354
- [86] TABASI, A., NOORBAKHS, A., SHARIFI, E. Reduced graphene oxide-chitosan-aptamer interface as new platform for ultrasensitive detection of human epidermal growth factor receptor 2. *Biosensors and Bioelectronics* 2017, **95**, 117–123. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2017.04.020
- [87] KHOSHFETRAT, S. M., MEHRGARDI, M. A. Amplified detection of leukemia cancer cells using an aptamer-conjugated gold-coated magnetic nanoparticles on a nitrogen-doped graphene modified electrode. *Bioelectrochemistry* 2017, **114**, 24–32. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOELECTCHEM.2016.12.001
- [88] ZENG, X., ZHANG, X., YANG, W., JIA, H., LI, Y. Fluorescence detection of adenosine triphosphate through an aptamer–molecular beacon multiple probe. *Analytical Biochemistry*, 2012, **424**(1), 8–11. Dostupné z: doi:10.1016/J.AB.2012.01.021
- [89] PASHAZADEH, P., MOKHTARZADEH, A., HASANZADEH, M., HEJAZI, M., HASHEMI, M., DE LA GUARDIA, M. Nano-materials for use in sensing of salmonella infections: Recent advances. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **87**, 1050–1064. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2016.08.012
- [90] LIANG, L., SU, M., LI, L., LAN, F., YANG, G., GE, S., YU, J., SONG, X. Aptamer-based fluorescent and visual biosensor for multiplexed monitoring of cancer cells in microfluidic paper-based analytical devices. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, **229**, 347–354. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2016.01.137
- [91] JEONG, H. Y., BAEK, S. H., CHANG, S. J., CHEON, S. A., PARK, T. J. Robust fluorescence sensing platform for detection of CD44 cells based on graphene oxide/gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, **135**, 309–315. Dostupné z: doi:10.1016/J.COLSURFB.2015.07.083
- [92] LIU, F., ZHANG, Y., YU, J., WANG, S., GE, S., SONG, X. Application of ZnO/graphene and S6 aptamers for sensitive photoelectrochemical detection of SK-BR-3 breast cancer cells based on a disposable indium tin oxide device. *Biosensors and Bioelectronics* 2014, **51**, 413–420. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2013.07.066
- [93] LIU, R., WANG, Q., LI, Q., YANG, X., WANG, K., NIE, W. Surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of microRNA and cancer cell using multiple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics* 2017, **87**, 433–438. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2016.08.090
- [94] LI, Y., ZHANG, Y., ZHAO, M., ZHOU, Q., WANG, L., WANG, H., WANG, X., ZHAN, L. A simple aptamer-functionalized gold nanorods based biosensor for the sensitive detection of MCF-7 breast cancer cells. *Chem. Commun*, 2016, **52**, 3959. Dostupné z: doi:10.1039/c6cc01014h
- [95] CHEN, H., HOU, Y., YE, Z., WANG, H., KOH, K., SHEN, Z. SHU, Y.. Label-free surface plasmon resonance cytosensor for breast cancer cell detection based on nano-conjugation of monodisperse magnetic nanoparticle and folic acid. *Sensors and*

- Actuators B: Chemical*, 2014, **201**, 433–438. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2014.04.040
- [96] DHINGRA, R., VASAN, R. S. Biomarkers in cardiovascular disease: Statistical assessment and section on key novel heart failure biomarkers. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2017, **27**(2), 123–133. Dostupné z: doi:10.1016/J.TCM.2016.07.005
- [97] WANG, X-Y., ZHANG, F., ZHANG, CH., ZHENG, L-R., YANG, J. The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *BioMed Research International*, **2020**, 2018035. Dostupné z: doi:10.1155/2020/2018035
- [98] REZA, M., PUR, K., HOSSEINI, M., FARIDBOD, F., GANJALI, M. R. Highly sensitive label-free electrochemiluminescence aptasensor for early detection of myoglobin, a biomarker for myocardial infarction. *Microchim Acta*, 2017, **184**, 3529–3537. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-017-2385-y
- [99] REGAN, B., O’KENNEDY, R., COLLINS, D. Point-of-Care Compatibility of Ultra-Sensitive Detection Techniques for the Cardiac Biomarker Troponin I-Challenges and Potential Value. *Biosensors*, 2018, **8**, 114. Dostupné z: doi:10.3390/bios8040114
- [100] CHO, I. H., PAEK, E. H., KIM, Y. K., KIM, J. H., PAEK, S. H. Chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor based on cross-flow chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2009, **632**(2), 247–255. Dostupné z: doi:10.1016/J.ACA.2008.11.019
- [101] WANG, M., LIU, J., QIN, X., NIE, X., DONG, Y., LIANG, X., ZHU, Z., YANG, D., SHAO, Y. Electrochemiluminescence detection of cardiac troponin I based on Au-Ag alloy nanourchins . *Cite this: Analyst*, 2020, **145**, 873. Dostupné z: doi:10.1039/c9an01904a
- [102] FONSECA, R. A. S., RAMOS-JESUS, J., KUBOTA, L. T., DUTRA, R. F. A Nanostructured Piezoelectric Immunosensor for Detection of Human Cardiac Troponin T. *Sensors*, 2011, **11**, 10785–10797. Dostupné z: doi:10.3390/s111110785
- [103] POURALI, A., RASHIDI, M. R., BARAR, J., PAVON-DJAVID, G., OMIDI, Y. Voltammetric biosensors for analytical detection of cardiac troponin biomarkers in acute myocardial infarction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, **134**, 116123. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2020.116123
- [104] ADEEL, M., RAHMAN, M. M., CALIGIURI, I., CANZONIERI, V., RIZZOLIO, F., DANIELE, S. Recent advances of electrochemical and optical enzyme-free glucose sensors operating at physiological conditions. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, **165**, 112331. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2020.112331
- [105] GE, CH-Y., RAHMAN, M. M., ZHANG, W., SIRAJ LOPA, N., JIN, L., YOON, S., JANG, H., XU, G-R., KIM, W. An Electrochemical Immunosensor Based on a Self-Assembled Monolayer Modified Electrode for Label-Free Detection of α -Synuclein. *Sensors*, 2020, **20**, 617. Dostupné z: doi:10.3390/s20030617
- [106] RAHMAN, M. M., KIM, Y. J., LEE, J-J.. Label-Free Detection of DNA Hybridization by Using Charge Perturbation on Poly(thionine)-Modified Glassy Carbon and Gold Electrodes. *Journal of The Electrochemical Society*, 2015, **162**(7), B159–B162. Dostupné z: doi:10.1149/2.0291507jes

- [107] LOPA, N. S., RAHMAN, M. M., AHMED, F., RYU, T., SUTRADHAR, S. CH., LEI, J., KIM, J., KIM, D. H., LEE, Y. H., KIM, W. Simple, low-cost, sensitive and label-free aptasensor for the detection of cardiac troponin I based on a gold nanoparticles modified titanium foil. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, **126**, 381–388. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2018.11.012
- [108] SHI, Y-M., ZHANG, X., MEI, L., HU, K., CHAO, L-Q., LI, X-M., MIAO, M-S. 2D Accordion-like MXene Nanosheets as a Sensitive Electrode Material for Baicalin Sensing. 2021. Dostupné z: doi:10.1002/elan.202060535
- [109] NEGAHDARY, M., BEHJATI-ARDAKANI, M., SATTARAHMADY, N., YADEGARI, H., HELI, H. Electrochemical aptasensing of human cardiac troponin I based on an array of gold nanodumbbells-Applied to early detection of myocardial infarction. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, **252**, 62–71. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2017.05.149
- [110] QIAO, X., LI, K., XU, J., CHENG, N., SHENG, Q., CAO, W., YUE, T., ZHENG, J. Novel electrochemical sensing platform for ultrasensitive detection of cardiac troponin I based on aptamer-MoS₂ nanoconjugates. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, **113**, 142–147. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2018.05.003
- [111] RAUF, S., MANI, V., LAHCEN, A. A., YUVARAJA, S., BEDUK, T., SALAMA, K. N. Binary transition metal oxide modified laser-scribed graphene electrochemical aptasensor for the accurate and sensitive screening of acute myocardial infarction. *Electrochimica Acta* 2021, **386**, 138489. Dostupné z: doi:10.1016/J.ELECTACTA.2021.138489
- [112] NEGAHDARY, M., BEHJATI-ARDAKANI, M., HELI, H. An electrochemical troponin T aptasensor based on the use of a macroporous gold nanostructure. *Microchimica Acta*, 2019, **186**, 377. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-019-3472-z
- [113] ADEEL, M., RAHMAN, M. M., LEE, J. J. Label-free aptasensor for the detection of cardiac biomarker myoglobin based on gold nanoparticles decorated boron nitride nanosheets. *Biosensors and Bioelectronics* 2019, **126**, 143–150. ISSN 0956-5663. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2018.10.060
- [114] SHARMA, A., BHARDWAJ, J., JANG, J. Label-Free, Highly Sensitive Electrochemical Aptasensors Using Polymer-Modified Reduced Graphene Oxide for Cardiac Biomarker Detection. *ACS Omega*, 2020, **5**(8), 3924–3931. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b03368
- [115] CENTI, S., SANMARTIN, L. B., TOMBELLI, S., PALCHETTI, I., MASCINI, M. Detection of C Reactive Protein (CRP) in Serum by an Electrochemical Aptamer-Based Sandwich Assay. *Electroanalysis*, 2009, **21**, 1309-1315. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200804560
- [116] KIM, J., PARK, J-A., YIM, G., JANG, H., KIM, T-H., SOHN, H., LEE, T. Fabrication of an electrochemical biosensor composed of multi-functional Ag ion intercalated DNA four-way junctions/rhodium nanoplate heterolayer on a micro-gap for C-reactive protein detection in human serum . *Cite this: Analyst*, 2021, **146**, 2131. Dostupné z: doi:10.1039/d0an02135k
- [117] BOUVIER-MÜLLER, A., DUCONGÉ, F. Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases. *Biochimie*, 2018, **145**, 73–83. Dostupné

z: doi:10.1016/J.BIOCHI.2017.10.026

- [118] CASSANO, T., STEARDO, L., PEARCE, B. D., SETH, P., DELEIDI, M., JÄGGLE, M., RUBINO, G. Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience* | www.frontiersin.org, 2015, **1**, 172. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2015.00172
- [119] DRORI, T., CHAPMAN, J. Neurological Disorders. *Mosaic of Autoimmunity: The Novel Factors of Autoimmune Diseases* 2019, 541–548. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814307-0.00048-7
- [120] POLITIS, M., PICCINI, P. Positron emission tomography imaging in neurological disorders. *Journal of Neurology*, 2012, **259**, 1769–1780. Dostupné z: doi:10.1007/s00415-012-6428-3
- [121] PULLIAM, CH. L., HELDMAN, D. L., ORCUTT, T. H., MERA, T. O., GIUFFRIDA, J. P., VITEK, J. L. Motion sensor strategies for automated optimization of deep brain stimulation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2015, **21**(4), 378–382. Dostupné z: doi:10.1016/J.PARKRELDIS.2015.01.018
- [122] GARCÍA-BLANCO, A., PEÑA-BAUTISTA, C., OGER, C., VIGOR, C., GALANO, J. M., DURAND, T., MARTÍN-IBÁÑEZ, N., BAQUERO, M., VENTO, M. CHÁFER-PERICÁS, C. Reliable determination of new lipid peroxidation compounds as potential early Alzheimer Disease biomarkers. *Talanta*, 2018, **184**, 193–201. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2018.03.002
- [123] DUNCKLEY, T., COON, K. D. STEPHAN, D. A. Discovery and development of biomarkers of neurological disease. *Drug Discovery Today*, 2005, **10**(5), 326–334. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(04)03353-7
- [124] LI, S., KERMAN, K. Electrochemical biosensors for biometal-protein interactions in neurodegenerative diseases. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, **179**, 113035. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2021.113035
- [125] CHARBGOO, F., SOLTANI, F., TAGHDISI, S. M., ABNOUS, K., RAMEZANI, M. Nanoparticles application in high sensitive aptasensor design. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016, **85**, 85–97. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/J.TRAC.2016.08.008
- [126] ZIU, I., LARYEA, E. T., ALASHKAR, F., WU, C. G., MARTIC, S. A dip-and-read optical aptasensor for detection of tau protein. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, **412**, 1193–1201. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-019-02350-8
- [127] NEGAHDARY, M., HELI, H. An ultrasensitive electrochemical aptasensor for early diagnosis of Alzheimer's disease, using a fern leaves-like gold nanostructure. *Talanta*, 2019, **198**, 510–517. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2019.01.109
- [128] SUN, Y., LIN, Y., DING, CH., SUN, W., DAI, Y., ZHU, X., LIU, H., LUO, CH. An ultrasensitive and ultraspecific chemiluminescence aptasensor for dopamine detection based on aptamers modified magnetic mesoporous silica @ graphite oxide polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, **257**, 312–323. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2017.10.171
- [129] CHEN, W., GAO, G., JIN, Y., DENG, CH. A facile biosensor for A β 40 based on fluorescence quenching of prussian blue nanoparticles. *Talanta*, 2020, **216**, 120930.

Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2020.120930

- [130] HIANIK, T., WANG, J. Electrochemical Aptasensors-Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis*, 2009, **21**, 1223-1235. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200904566
- [131] HERNANDEZ, F. J., OZALP, V. C. Graphene and Other Nanomaterial-Based Electrochemical Aptasensors. *Biosensors*, 2012, **2**, 1–14. Dostupné z: doi:10.3390/bios2010001
- [132] JANG, S. J., LEE, CH-S, KIM, T. H. α -Synuclein Oligomer Detection with Aptamer Switch on Reduced Graphene Oxide Electrode. *Nanomaterials*, 2020, **10**, 832. Dostupné z: doi:10.3390/nano10050832
- [133] KIM, S., CHO, M., LEE, Y. Point-of-Care Platform for Early Diagnosis of Parkinson's Disease. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, **3**(12), 8997–9001. Dostupné z: doi:10.1021/acsabm.0c01242
- [134] LIU, Y., XU, Q., ZHANG, Y., REN, B., HUANG, L., CAI, H., XU, T., LIU, Q., ZHANG, X. An electrochemical aptasensor based on AuPt alloy nanoparticles for ultrasensitive detection of amyloid- β oligomers. *Talanta*, 2021, **231**, 122360. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2021.122360
- [135] ZHANG, M., CHEN, Z., QIN, H., YANG, X., CAO, W., LIU, S. g-C₃N₄-heme bound to amyloid β peptides: In-situ generation of the secondary co-reactant for dual-enhanced electrochemiluminescence assay of amyloid β detection. *Electrochimica Acta*, 2020, **361**, 137096. Dostupné z: doi:10.1016/J.ELECTACTA.2020.137096
- [136] WANG, X., GU, X., LI, L., YU, B., LV, L., CHEN, Q., XU, M. An excellent electrochemical aptasensor for amyloid- β oligomers based on a triple-helix aptamer switch via target-triggered signal transduction DNA displacement events. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, **413**, 3707-3716. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-021-03319-2/Published
- [137] ZHOU, Y., LI, C., LI, X., ZHU, X., YE, B., XU, M. A sensitive aptasensor for the detection of b-amyloid oligomers based on metal-organic frameworks as electrochemical signal probes, 2018. Dostupné z: doi:10.1039/c8ay00736e
- [138] SHAHDOST-FARD, F., ROUSHANI, M. Designing of an ultrasensitive BCM-7 aptasensor based on an SPCE modified with AuNR for promising distinguishing of autism disorder. *Talanta*, 2020, **209**, 120506. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2019.120506
- [139] SHAHDOST-FARD, F., ROUSHANI, M. Architecting of a biodevice based on a screen-printed carbon electrode modified with the NiONP nanolayer and aptamer in BCM-7 detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020, **190**, 110932. Dostupné z: doi:10.1016/J.COLSURFB.2020.110932
- [140] ROUSHANI, M., FAROKHI, S., SHAHDOST-FARD, F. Determination of BCM-7 based on an ultrasensitive aptasensor fabricated of gold nanoparticles and ZnS quantum dots. *Materials Today Communications*, 2020, **23**, 101066. Dostupné z: doi:10.1016/J.MTCOMM.2020.101066
- [141] CHENG, L., XU, CH., CUI, H., LIAO, F., HONG, N., MA, G., XIONG, J., FAN, H. A sensitive homogenous aptasensor based on tetraferrocene labeling for thrombin

- detection. *Analytica Chimica Acta*, 2020, **1111**, 1–7. Dostupné z: doi:10.1016/J.ACA.2020.03.017
- [142] LIAO, X., ZHANG, C., MACHUKI, J. O., WEN, X., CHEN, D., TANG, Q., GAO, F. Proximity hybridization triggered hybridization chain reaction for label-free electrochemical homogeneous aptasensors. *Talanta* 2021, **226**, 122058. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2020.122058
- [143] BABU, E., MUTHU MAREESWARAN, P., SATHISH, V., SINGARAVADIVEL, S., RAJAGOPAL, S. Sensing and inhibition of amyloid- β based on the simple luminescent aptamer–ruthenium complex system. *Talanta* 2015, **134**, 348–353. Dostupné z: doi:10.1016/J.TALANTA.2014.11.020
- [144] LIU, L., CHANG, Y., YU, J., JIANG, M., XIA, N. Two-in-one polydopamine nanospheres for fluorescent determination of beta-amyloid oligomers and inhibition of beta-amyloid aggregation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, **251**, 359–365. Dostupné z: doi:10.1016/J.SNB.2017.05.106
- [145] ZHAO, Y., LI, X., YANG, Y., SI, S., DENG, CH., WU, H. A simple aptasensor for A β 40 oligomers based on tunable mismatched base pairs of dsDNA and graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics* 2020, **149**, 111840. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOS.2019.111840
- [146] DENG, CH., LIU, H., ZHANG, M., DENG, H., LEI, CH., SHEN, L., JIAO, B., TU, Q., JIN, Y., XIANG, L., DENG, W., XIE, Y., XIANG, J. Light-Up Nonthiolated Aptasensor for Low-Mass, Soluble Amyloid- β 40 Oligomers at High Salt Concentrations. *Analytical Chemistry* 2018, **90**(3), 1710–1717. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b03468
- [147] DUAN, CH., JIAO, J., ZHENG, J., LI, D., NING, L., XIANG, Y., LI, G. Polyvalent Biotinylated Aptamer Scaffold for Rapid and Sensitive Detection of Tau Proteins. *Analytical Chemistry* 2020, **92**(22), 15162–15168. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.0c03643