

**Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**



# **Biosenzory pro testování inhibitorů cholinesteras**

**Diplomová práce**

**Bc. Ondřej Keresteš**

**Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.**

**Konzultant: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.**

**Hradec Králové, 2020**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové

.....  
Bc. Ondřej Keresteš

Rád bych zde poděkoval své školitelce paní PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. a svému konzultantovi pplk. prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. Oběma děkuji za vedení, rady a konzultace nejen během mé praktické činnosti, konečně také za trpělivost při závěrečném vypracovávání této práce.

Děkuji prof. Fabianě Arduini a jejímu týmu v laboratoři na Fakultě věd Univerzity Tor Vergata v Římě za přijetí, bezplatně poskytnutý materiál a cenné rady v průběhu praktické stáže v rámci projektu Erasmus+.

Děkuji své rodině, že tu stále je. Děkuji Veronice, po jejíž boku stále rostu jako člověk.

Tato práce vznikla i za podpory programu SVV 260 547.

# Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam použitých zkratek .....	8
1. Úvod.....	10
2. Cíle práce .....	11
3. Teoretická část .....	12
3.1. Cholinesterasy.....	12
3.1.1 Acetylcholinesterasa .....	12
3.1.2. Butyrylcholinesterasa.....	14
3.2. Inhibitory acetylcholinesterasy .....	15
3.2.1. Testované inhibitory .....	17
3.3. Biosenzor .....	19
3.3.1. Obecná definice biosenzoru.....	19
3.3.2. Převodníky signálu .....	19
3.3.3. Biosenzory založené na cholinesterasách .....	20
3.3.4. Imobilizační techniky .....	26
3.3.5. Praktické využití biosenzorů ve zdravotnictví.....	28
4. Experimentální část.....	29
4.1. Pomůcky .....	29
4.1.1. Enzymy .....	29
4.1.2. Technické pomůcky .....	29
4.1.3. Chemikálie .....	30
4.1.4. Spotřební materiál.....	31
4.1.5. Software .....	31
4.2. Příprava roztoků.....	32
4.3. Postupy plnění jednotlivých cílů práce .....	34

4.3.1. Optimalizace metodiky pH metrického stanovení aktivity AChE pomocí sondy s iontově-senzitivním tranzistorem s efektem pole (ISFET).....	34
4.3.2. Imobilizace AChE na chitosanovou membránu a pH-metrické testování její aktivity .....	34
4.3.3. Imobilizace AChE na magnetické částice a testování její aktivity pomocí spektrofotometrického stanovení dle Ellmana, jeho optimalizace pro měření s částicemi .....	35
4.3.4. Konstrukce jednorázového papírového proužku pro chronoamperometrické stanovení aktivity AChE .....	37
4.3.5. Srovnání konstant Michaelise a Mentenové ( $K_M$ ) získaných v rámci různých detekčních přístupů .....	38
4.3.6. Stanovení 50% inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) pro fyzostigmin a takrin, stanovení limitů detekce (LOD) použitých metod.....	39
5. Výsledky a diskuse .....	40
5.1. Optimalizace metodiky pH metrického stanovení aktivity AChE pomocí sondy s iontově-senzitivním tranzistorem s efektem pole (ISFET).....	40
5.2. Imobilizace AChE na chitosanovou membránu a pH-metrické testování její aktivity.....	41
5.3. Imobilizace AChE na magnetické částice a testování její aktivity pomocí spektrofotometrického stanovení dle Ellmana, jeho optimalizace pro měření s částicemi. ....	43
5.4. Konstrukce jednorázového papírového proužku pro chronoamperometrické stanovení aktivity AChE .....	44
5.5. Srovnání konstant Michaelise a Mentenové ( $K_M$ ) získaných v rámci různých detekčních přístupů .....	46
5.6. Stanovení 50% inhibiční konstanty ( $IC_{50}$ ) pro fyzostigmin a takrin, stanovení limitů detekce (LOD) použitých metod .....	48
6. Závěr .....	52
Citovaná literatura.....	53

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Student: Bc. Ondřej Keresteš

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Název diplomové práce: Biosenzory pro testování inhibitorů cholinesteras

Acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) štěpí acetylcholin v nervovém systému. Vazba acetylcholinu na receptor a následné hydrolytické štěpení v centrálních synapsích nebo na nervosvalových ploténkách umožňuje opakovaný přenos nervového vzruchu. Tím je zabezpečen vědomý pohyb a optimální kognitivní schopnosti člověka. Při styku AChE s inhibitorem dojde k jejímu zablokování, tedy ke zhoršení kognitivních funkcí a zasaženého postihnou křeče, při delší expozici může nastat smrt.

Cílem práce bylo otestovat různé přístupy v měření aktivity AChE inhibované fyzostigminem a takrinem. Dalším cílem byla příprava biosenzorů pomocí vybraných imobilizačních technik. Vyzkoušeny byly tři postupy imobilizace – dva s použitím elektrochemických detektorů, kdy byla cílem optimalizace metody stanovení aktivity AChE měřením rozdílu pH (AChE kotvena v chitosanové membráně), nebo chronoamperometricky (AChE sorbována na tištěné elektrodě). Třetí zkoumanou cestu zahrnovala imobilizace AChE na magnetické částice, kdy analýza probíhala spektrofotometricky, a to optimalizovanou Ellmanovou metodou. Použita byla AChE z paúhoře elektrického, v případě tištěných zařízení byla použita i lidská rekombinantní forma AChE.

Byly stanoveny Michaelisovy konstanty AChE ( $K_M$ ) a tzv. 50% inhibiční koncentrace, tj. koncentrace inhibitoru, při nichž je AChE zablokována z 50 % ( $IC_{50}$ ).

V současné době probíhá výzkum analytických metod v oblasti biosenzoriky jak pro ochranu před zásahem nervově paralytickými látkami, tak pro zkoumání účinku inhibitorů užívaných k léčbě Alzheimerovy nemoci. Další možností použití biosenzorického stanovení inhibitorů je oblast analýzy životního prostředí (stanovení přítomnosti pesticidů). Biosenzory tak mají potenciálně velmi širokou uplatnitelnost.

## **Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Bc. Ondřej Keresteš

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Consultant: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Title of diploma's thesis: Biosensors for testing of cholinesterases' inhibitors

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) cleaves acetylcholine in the nervous system. Binding of acetylcholine to the receptor and subsequent hydrolytic cleavage at central synapses or neuromuscular junction allows the repeated transmission of nerve impulses. This ensures controlled movement and optimal human cognitive abilities. In case of contact of AChE with the inhibitor, it becomes blocked, thus deteriorating cognitive functions and affects convulsions, with prolonged exposure death can occur.

The aim of this work was to test various approaches to measurement of the activity of cholinesterases exposed to two inhibitors, as well as the preparation of biosensors using selected immobilization techniques. Three immobilization procedures were tested. Two of them were using electrochemical detectors and the aim was to optimize the method of quantification activity of AChE by measuring the pH difference (AChE was anchored by the chitosan membrane) and chronoamperometrically (AChE was adsorbed on the printed electrode). The third procedure involved immobilization of AChE to magnetic particles and the analysis was performed spectrophotometrically by the optimized Ellman method. AChE from the electric eel was used, and in the case of printed devices the human recombinant AChE was used also.

Michaelis constants ( $K_M$ ) and 50% inhibitory concentrations for the AChE were determined ( $IC_{50}$ ).

Research is currently underway in the field of biosensorics, both for protection against nerve agents and for investigating the effect of inhibitors that are used for Alzheimer's disease therapy. Another promising application of the cholinesterase-based bioassay is in the field of environmental analysis and pesticides assay. Thus, biosensors have potentially a very broad applicability.

## Seznam použitých zkratk

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATCh	acetylthiocholin
ATChCl	acetylthiocholin-chlorid
CB/PB	černouhelný prach modifikovaný pruskou modří (carbon black/prussian blue)
CNS	centrální nervový systém
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina)
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylkarbodiimid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FIA	průtoková injekční analýza (Flow injection analysis)
IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru, která sníží aktivitu enzymu o 50 %
ISFET	iontově senzitivní tranzistory s efektem pole (ion-sensitive field-effect transistor)
K <sub>M</sub>	konstanta Michaelise a Mentenové – koncentrace substrátu v polovině limitní rychlosti

LOD	mez stanovitelnosti (limit of detection)
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NPL	nervově paralytické látky
OP	organofosfáty (organophosphate)
OPCW	Organizace pro zákaz chemických zbraní (Organisation for the Prohibition of Chemical weapons)
PAS	periferní anionické místo (peripheral anionic site)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PNS	periferní nervový systém
rAChE	rekombinantní acetylcholinesterasa
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SIA	sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)
SPE	plošně tištěné elektrody (screen-printed electrodes)
TNB	2-nitro-5-sulfanylbenzoová kyselina)
$V_{lim}$	limitní rychlost enzymové reakce
$\Delta pH$	rozdíl hodnot pH v čase $t = 0$ a v čase odečítání

# 1. Úvod

První, kdo naznačil existenci enzymu, který štěpí estery cholinu v nervovém systému, byl Sir Henry Dale. [1] Dnes již víme, že takové enzymy jsou dva a tím nejdůležitějším je acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7, AChE). Její fyziologie i patologie je hojně zkoumána, ať už z důvodu snahy vyléčit choroby nervového systému, nebo z důvodu vývoje látek, které pomáhají reaktivovat cholinesterasu (např. oximy [2, 3]).

Ve své diplomové práci jsem se zabýval přípravou a testováním biosenzorů pro stanovení aktivity AChE z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) a lidské AChE (*Homo sapiens*). Biosenzorem rozumíme zařízení, které dokáže převést výsledky biochemického děje zachyceném přes biorekogniční element do měřitelné podoby. [4] Biorekogniční elementy jsou kompatibilní s různými fyzikálně-chemickými převodníky vedoucími přeložený signál k vyhodnocovacímu centru, které pomocí software zobrazuje výslednou odezvu v odpovídající podobě.

V rámci svých experimentů pod vedením konzultanta, pplk. prof. RNDr. Miroslava Pohanky, Ph.D., DSc., na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové jsem optimalizoval metodiku stanovení AChE pomocí potenciometrického měření, kde se lze například zaměřit na měření pH (během hydrolyzy esterů thiocholinu vzniká organická kyselina). [5, 6] Mohl jsem také využít a rozvinout již zavedenou spektrofotometrickou metodu, jakou je Ellmanova metoda, která již prošla řadou optimalizací pro různé typy matric vzorku a arteficiálních substrátů. [3, 7–14] Tuto metodu jsem používal v rámci svých studií AChE imobilizované na magnetické částice, kdy jsem naměřená data porovnával i s daty získanými v rámci pilotní studie při vypracovávání své bakalářské práce. [13]

Během své praktické stáže v rámci projektu Erasmus+ na Univerzitě Tor Vergata v Římě jsem vyvíjel biosenzor pro chronoamperometrické měření aktivity AChE. Mým úkolem bylo připravit jednoduchý tištěný papírový biosenzor založený na paúhoří a lidské AChE, kdy jsem vycházel ze zavedené metodiky již dříve publikované týmem zabývajícím se vývojem biosenzorů pro stanovení pesticidů a nervově paralytických látek (NPL), avšak s použitím jiného enzymu. [15]

## 2. Cíle práce

1. Optimalizace metodiky pH metrického stanovení aktivity AChE pomocí sondy s iontově-senzitivním tranzistorem s efektem pole (ISFET).
2. Imobilizace AChE na chitosanovou membránu a pH-metrické testování její aktivity.
3. Imobilizace AChE na magnetické částice a testování její aktivity pomocí spektrofotometrického stanovení dle Ellmana, jeho optimalizace pro měření s částicemi.
4. Konstrukce jednorázového papírového proužku pro chronoamperometrické stanovení aktivity AChE.
5. Srovnání konstant Michaelise a Mentenové ( $K_M$ ) získaných v rámci různých detekčních přístupů.
6. Stanovení 50% inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) pro fyzostigmin a takrin, stanovení limitů detekce (LOD) použitých metod.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Cholinesterasy

##### 3.1.1 Acetylcholinesterasa

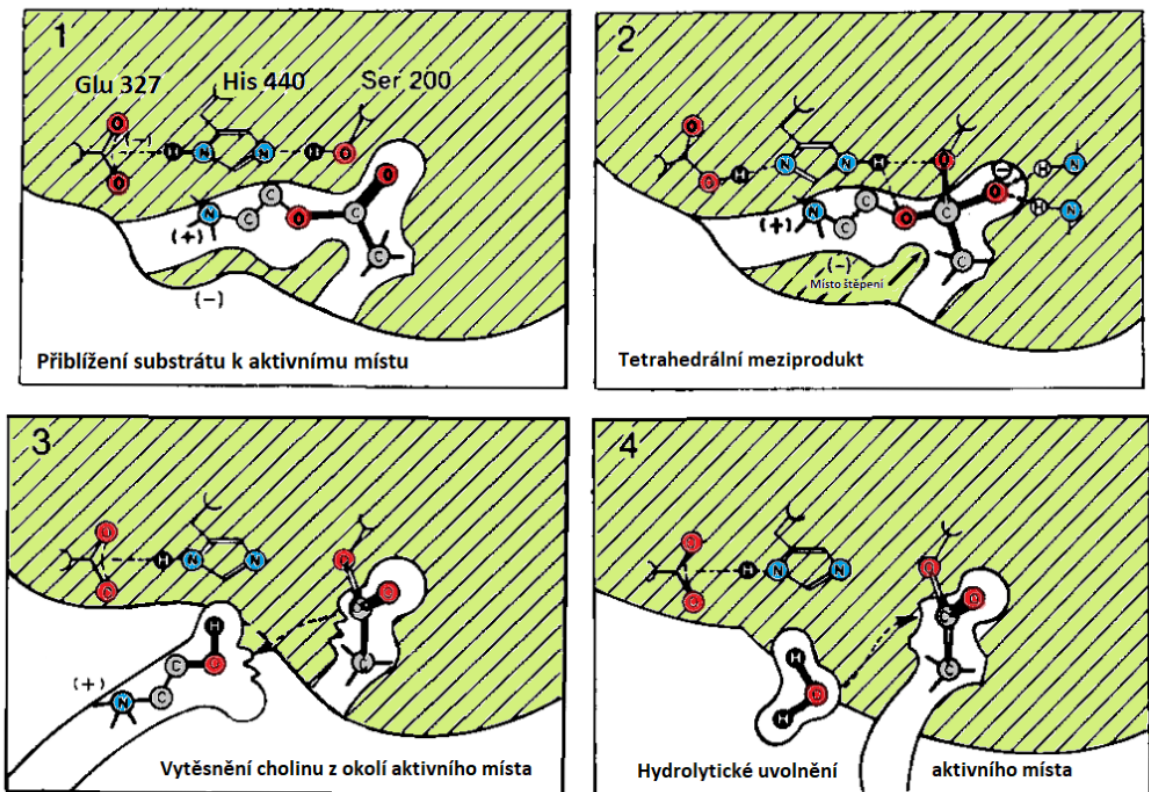
Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7, AChE) plní nezastupitelnou funkci v nervovém systému. Jejím přirozeným substrátem je acetylcholin (ACh), který je AChE hydrolyzován v synapsích cholinergních neuronů. Nachází se zejména v mozku, na nervosvalových ploténkách kosterních svalů a na membránách erytrocytů. [1, 16, 17]

Aktivní místo AChE je uvnitř kavity. Zde se nachází jak katalytická triáda, tak zde najdeme tzv.  $\alpha$ -anionické místo (v něm se nalézají zbytky aminokyselin Trp 84, Tyr 121 a Phe 330 u AChE paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*), Gly 121, Gly 122 a Ala 204 u AChE lidského původu).

Tzv. katalytická triáda v aktivním místě enzymu je u AChE paúhoře elektrického tvořena zbytky aminokyselin Ser 200, His 440 a Glu 327. U AChE lidského původu jde o zbytky Ser 203, His 447 a Glu 334. [17, 18] Molekula substrátu se váže přímo na katalytickou triádu přes aminokyselinu serin (průběh reakce ukazuje Obrázek 1).

Vnější vstup do kavity u AChE paúhoře elektrického je tvořen skupinou aminokyselinových zbytků Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 a Tyr 334 (jsou hlavními zbytky aminokyselin zajišťující prostorovou orientaci pro snazší vniknutí vstupujících molekul). Ty tvoří tzv.  $\beta$ -anionické, periferní anionické místo (PAS). PAS je důležité pro správnou prostorovou koordinaci vstupu substrátu do aktivního místa. Pro kinetické studie s AChE se často místo ACh užívá zejména acetylthiocholinu (ATCh), sirného analogu ACh. Bylo například zjištěno, že pokud koncentrace ATCh výrazně vzroste, dojde k inhibici nadbytkem substrátu, protože ATCh navázaný na PAS zabrání odstupu cholinu (viz bod 2 na Obrázku 1). [19, 20]

AChE nalezneme i u mnoha dalších vyšších živočichů (paúhoře elektrického, parejnoka, aj.), [21] a jsou funkčně velice podobné. Můžeme tak používat k modelovým studiím i AChE získanou z těchto živočichů. [18]



Obrázek 1: Fáze hydrolyzy acetylcholinu v AChE z elektrického úhoře (převzato od Taylora [1], kolorováno, upraveno dle Colletiera a kol. [20] a Pohanky [18]):

1) Substrát se přiblíží ke dnu kavity kolem periferního anionického místa (PAS) (část 1) a vytvořením kovalentní vazby vznikne komplex enzym-substrát v esteratické části aktivního místa AChE. Vytvoří se tak tetrahedrální meziprodukt. Jednou z jeho hran je zbytek aminokyseliny serinu (Ser 200) (část 2).

2) Po rozpadu intermediátu je první odstupující molekulou cholin, Ser 200 je stále acetylován (část 3).

3) Dojde k hydrolytickému odštěpení acetátového zbytku a tím pádem uvolnění aktivního místa a obnově funkce AChE (část 4)

### 3.1.2. Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa (EC 3.1.1.8, BChE) patří stejně jako AChE mezi serinové hydrolasy. V přepočtu na hmotu je v těle zastoupena 10× více než AChE, a to zejména v krevní plazmě, do které je vylučována jaterními buňkami. Dokáže vázat organofosfáty a hydrolyzovat různé exogenní látky, jako je sukcinylcholin, prokain, heroin, nebo kyselina acetylsalicylová. Po dlouhou dobu se jevila jako klinicky bezvýznamná pro léčbu Alzheimerovy choroby, avšak studie na myších dokázaly, že se v nervovém systému taktéž BChE vyskytuje a také dokáže AChE při plné depleci jejího genu adekvátně zastoupit. [22–24]

Podle dat z přelomu roku 2014 a 2015 bylo známo 75 různých variant lidského genu pro BChE. [25] Z klinického hlediska je důležité zdůraznit různou expresi a zbytkovou aktivitu BChE u variant jejího genu. Varianta K je jednou z nejvýznamnějších vrozených mutací, co se týče incidence. Disponuje jí jeden ze čtyř lidí europoidní rasy. Rozdíl proti původnímu typu BChE spočívá v záměně aminokyselin v pozici 539 sekvence proteinu. Alanin ve stávající sekvenci nově nahradí threonin. U pacientů s K variantou BChE se může po podání sukcinylcholinu objevit apnoická pauza. Důvodem je o třetinu nižší aktivita této mutantní formy, přestože přímo v aktivním místě k záměně aminokyselin nedošlo. Výsledkem snížení aktivity BChE je prodloužení účinku podaného sukcinylcholinu, protože došlo ke zpomalení jeho odbourávání pomocí BChE. [26, 27] Byla popsána mimo jiné i další mutace BChE mimo aktivní místo, která v konečném důsledku zapříčiní zborcení samotné katalytické triády a při podání sukcinylcholinu tak také dojde k apnoické pauze. [28]

Biologický poločas BChE trvá zhruba 10 dní. [27, 29] Protože albumin jako hlavní plazmatická bílkovina má biologický poločas 3–4 týdny, hladina plazmatické cholinesterasy se používala jako ukazatel stavu jaterní proteosyntézy. [27] Bylo zjištěno, že hladina BChE koresponduje s množstvím svalové hmoty a její snížení by tak mohlo sloužit jako biomarker pro odhalení sarkopenie u starých lidí. [30]

## 3.2. Inhibitory acetylcholinesterasy

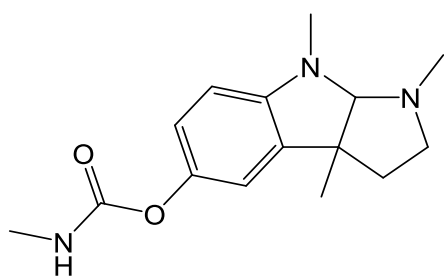
Inhibitory AChE snižují její aktivitu, tj. schopnost štěpit přirozený substrát acetylcholin (ACh), a tím působí nepřímo cholinomimeticky. Podle délky působení je lze rozdělit na reversibilní a ireversibilní. Mezi reversibilní patří inhibitory kompetitivní (podobné substrátu, soupeřící o vazbu na aktivní místo) a nekompetitivní. [31]

Ve farmacii se využívá reversibilních a pseudoreversibilních inhibitorů AChE. Princip terapie spočívá v podobnosti inhibitoru a ACh jakožto substrátu pro AChE. Inhibitor může substrát vytěsnit z aktivního místa a na nějaký čas zpomalit odbourávání ACh. ACh pak může v synapsi nebo na nervosvalové ploténce působit déle.

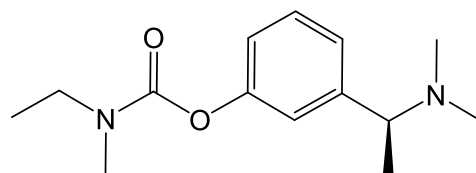
U tzv. pseudoreversibilních inhibitorů, jakými jsou inhibitory karbamátového typu (např. fyzostigmin a od něj odvozené látky), hydrolytické odštěpení karbamátové skupiny z aktivního místa AChE (tzv. dekarbamoylace) trvá déle než hydrolytické odštěpení acetátové skupiny (deacetylace, viz Obrázek 1). Důvodem je stabilnější vazba karbamátové funkční skupiny inhibitoru v aktivním místě AChE v porovnání s acetátovou funkční skupinou ACh.

Existují i molekuly, které se reversibilně váží jak na  $\alpha$ -anionické místo (např. takrin), tak na PAS (např. donepezil) acetylcholinesterasy a brání tak vstupu nové molekuly substrátu. [32]

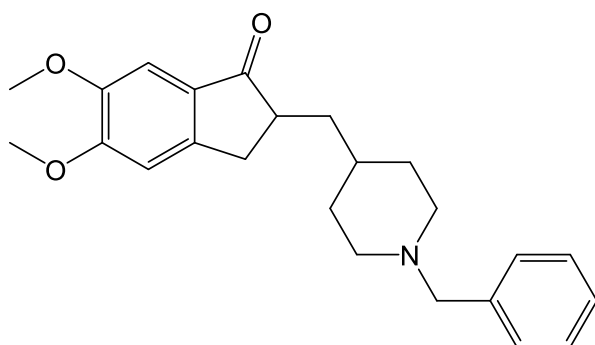
Konkrétní léčivo je vybráno podle toho, zda je cílem ovlivnění aktivity centrálního nebo periferního nervového systému (CNS, PNS). Používáním léčivých přípravků obsahujících rivastigmin, galantamin nebo donepezil cílíme na CNS a můžeme tak ovlivnit progres Alzheimerovy choroby. [33] Motorické neurony v periférii ovlivňujeme při léčbě onemocnění *Myastenia gravis* přípravky obsahujícími neostigmin, pyridostigmin, nebo distigmin, viz Obrázek 2. [32, 34, 35]



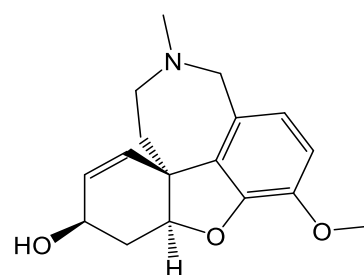
fyzostigmin



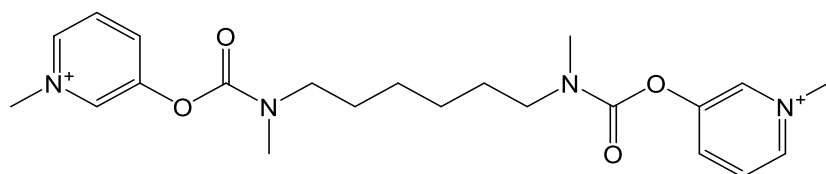
rivastigmin



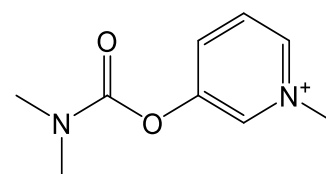
donepezil



galantamin



distigmin



pyridostigmin

Obrázek 2: Inhibitory AChE užívané ve farmacii

Ireversibilní inhibitory na bázi organofosfátů, jako jsou sarin, VX, soman, nebo tabun, patří mezi látky, jejichž vazba na aktivní místo je ještě mnohem pevnější než u karbamátových inhibitorů. Bez použití antidota nedochází k obnově funkce enzymu. To v krajním případě vede i ke smrti zasaženého. [18] Organofosfáty jako je paraxon, dichlorvos, nebo chlorpyrifos byly v zemích EU zakázány. Povolené jsou např. glyfosát nebo malathion. [36]

Účinku, jaký má inhibice AChE na lidský organismus, bylo zneužíváno nejen ve válečných taženích. V nedávné minulosti se objevily i případy zneužití ireversibilních inhibitorů AChE na bázi organofosfátů ve formě pesticidů nebo otravných plynů, tzv. nervově paralytických látek (NPL). Zaznamenány byly případy použití ve válečných

konfliktech (jako např. použití herbicidů během války ve Vietnamu, nebo použití sarinu a ve válce v Perském zálivu [37, 38]).

Podle tvrzení Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) byl v dubnu 2017 ve městě Khan Shaykun v Sýrii vypuštěn sarin. [39] Z dalších případů užití NPL jmenujme např. vypuštění sarinu sektou Óm širikjó v soupravách tokijského metra, [40] vraždu Kim Čong-Nama látkou VX na letišti v Malajsi, [41] či otravu Sergeje Skripala a jeho dcery látkou typu „novičok“ ve Spojeném království. [42]

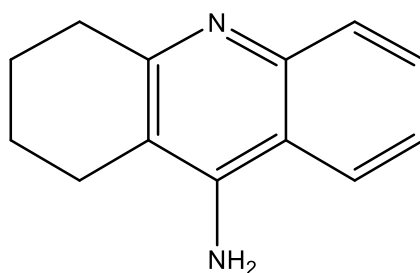
### **3.2.1. Testované inhibitory**

#### **3.2.1.1. Fyzostigmin**

Fyzostigmin sloužil v minulosti jako modelová sloučenina přírodního původu pro přípravu nových látek fungujících na principu karbamátových inhibitorů cholinesterasy – neostigminu, rivastigminu, pyridostigminu (viz Obrázek 2).

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, fyzostigmin a od něj odvozené látky působí jako tzv. pseudoreversibilní inhibitory cholinesterasy. Současně jde o kompetitivní inhibitory. Karbamátová funkční skupina se váže podobně jako acetylcholin (kovalentně přímo na Ser 200 v případě AChE paúhoře elektrického, Ser 203 u lidské AChE) a molekula fyzostigminu tak podstoupí stejný proces jako ACh, přirozený substrát AChE (viz Obrázek 1). Karbamoyl vytvoří v porovnání s vazbou acylu pevnější vazbu s hydroxylovou skupinou serinu. I tato skupina ale může být hydrolyticky odštěpena. Dojde k tzv. dekarbamoylaci. [18, 43, 44]

### 3.2.1.2. Takrin



Obrázek 3: Molekula takrinu

Takrin (viz Obrázek 3) byl v roce 1945 syntetizován jako jedna z nových látek při plnění úkolu v projektu hledání nových antibakteriálních látek pro léčení ran vojáků. Neprojevilo se však jako účinný. [45, 46]

Takrin byl prvním schváleným lékem pro léčbu Alzheimerovy choroby. FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration, USA) ho schválil k použití v roce 1993. [46] Mechanismus působení takrinu na AChE je odlišný od působení fyzostigminu. Takrin se neváže přímo na katalytickou triádu, ale zadrží se na  $\alpha$ -anionickém místě díky  $\pi$ - $\pi$  interakcím s aromatickými aminokyselinami. Bohužel se u takrinu vyskytly vedlejší účinky jako nevolnosti, zvracení, průjemy, časté močení, křeče nebo svalové slabosti, a v neposlední řadě hepatotoxicita a agranulocytosa. Proto přestal být užíván a v květnu roku 2012 byl nakonec i stažen z amerického trhu. Stále probíhá výzkum a hledání nových látek založených na takrinu, které by nevykazovaly zmíněné vedlejší účinky a měly zároveň slibnou inhibiční aktivitu k AChE. [18, 46–54]

### 3.3. Biosenzor

#### 3.3.1. Obecná definice biosenzoru

Biosenzor představuje zařízení, které dokáže detekovat analyt za použití vhodného převodníku signálu, který je spojený s vyhodnocovacím zařízením. Intenzita signálu odpovídá změně koncentrace produktu probíhající reakce v soustavě. [27, 55–57]

Základní součástí biosenzoru je čidlo, tzv. biorekogniční element, přítomný v měřeném prostředí. Ten reaguje na změnu prostředí a poskytuje signál. Dotyčnou změnou může být úspěšná biokatalýza enzymové reakce nebo vazba specifického analytu. Na biorekogniční element navazuje pomocí různých imobilizačních technik fyzikálně-chemický převodník (angl. transducer). Přebodník signál zpracuje a odešle do softwaru k vyhodnocení. Podoba výsledné odpovědi závisí na použitém převodníku. [7, 58–60]

#### 3.3.2. Přebodníky signálu

Po zachycení biorekogničním elementem se signál převádí pomocí fyzikálně-chemického převodníku založeném na elektrochemické detekci (měření potenciálu, elektrického proudu, použití vodivostních detektorů) nebo optické detekci (měření za použití metod nelineární optiky, nebo např. pomocí optického vlákna) případně jiném fyzikálním principu. Lze i detekovat změnu hmotnosti (např. piezoelektrickými převodníky), konečně také změnu teploty (kalorimetricky). U biosenzorů založených na cholinesterasách se uplatňují zejména elektrochemické a optické převodníky. [7, 61, 62]

Vůbec první biosenzor fungoval na principu elektrochemické detekce. Představili ho Clark a Lyons. Na povrch kyslíkové elektrody imobilizovali glukosooxidasa a vyrobili tak první biosenzor pro stanovení glukosy. Glukosooxidasa reaguje s přítomnou glukosou za vzniku peroxidu vodíku, ten pak podléhá elektrolyze a záporně nabitě částice kyslíku jsou poté zachyceny na anodě. Velikost vzniklého elektrického proudu odpovídá koncentraci glukosy ve vzorku. [58, 63, 64]

### 3.3.3. Biosenzory založené na cholinesterasách

První metoda měření aktivity cholinesteras v krvi pomocí potenciometrie byla vyvinuta v roce 1949, nazývaná podle tvůrce – Michelova. [65, 66] Byla vhodná jak pro práci s plnou krví, tak s plazmou. [67]

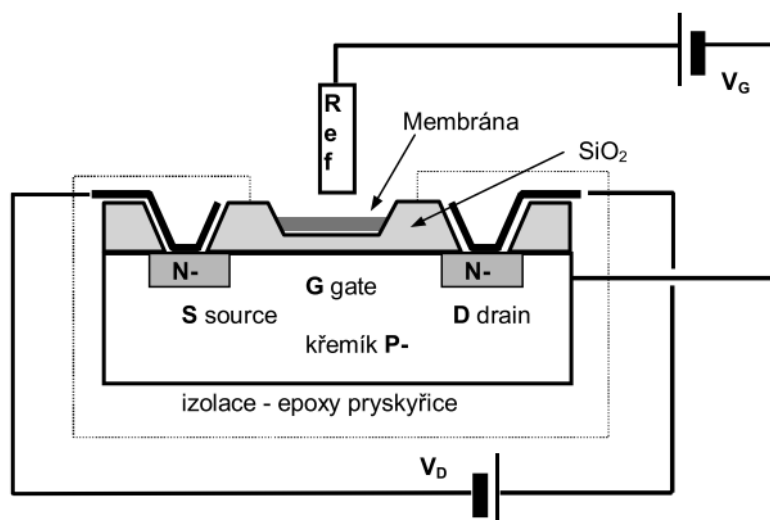
V posledních desítkách let došlo k vývoji i dalších analytických přístupů, jak měřit aktivitu a inhibici cholinesterasy pomocí změn pH nebo elektrochemického potenciálu. Za zmínku stojí stanovení proužky, které vycházelo z Michelovy metody. Šlo o sledování změny pH v průběhu jedné hodiny a tzv. cholinesterasového čísla. To udávalo stonásobek poměru změny pH za hodinu. [66]

Při dalším vývoji metody bylo nutné zohlednit skutečnost, že s ACh reagují obě cholinesterasy, [22, 68] tudíž při analýze plné krve nebo jejích částí hrají obě svou roli. [67] Mohammad a kol. vycházeli také z Michelovy metody, ale zkrátili čas na 20 min a pomocí selektivního inhibitoru zablokovali při měření AChE, aby tak mohli stanovit aktivitu plazmatické BChE. [6]

#### Elektrochemické biosenzory založené na cholinesterasách

Elektrochemické biosenzory můžeme rozdělit na potenciometrické, amperometrické nebo konduktometrické.

Potenciometrické senzory, jejichž příkladem může být ISFET (iontově selektivní palem řízený tranzistor, ion-sensitive field-effect transistor), pracují na principu hromadění potenciálu na membráně. Při stanovení pH pomocí ISFET se využívá toho, že membrána v hradle (gate, G) je selektivní pro určité ionty (v našem případě pro protony). Při konstantním napětí na hradle se podle obsahu iontů v membráně hradla mění potenciál. Rozdíl potenciálu se určuje proti referenční elektrodě. Viz Obrázek 4. [4, 69, 70]



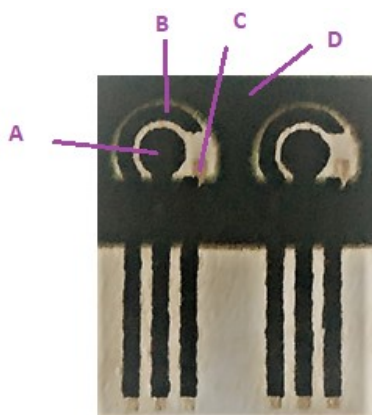
Obrázek 4: Schéma zapojení zařízení ISFET. Obrázek převzat od Skládala. [4]

Amperometrické senzory jsou jednoduchá zařízení, které zachycují vznikající elektrický proud v jejich obvodu. Pro zviditelnění reakce lze pracovat při konstantním vkládaném napětí. [71]

Voltametrické biosenzory zachycují vznik Faradayova proudu následkem probíhající redoxní reakce. Prakticky nejvíce využívanou metodou je chronoamperometrie (viz Obrázek 6). Na rozdíl od cyklické voltametrie, nebo square-wave voltametrie není napětí zvyšováno a snižováno v cyklech, nebo pulzech. Po celou dobu měření je mezi elektrody vloženo konstantní napětí a k měření proudu dochází kontinuálně, či v určitý čas po započetí reakce. [4, 71]

Elektrochemické biosenzory lze vyrobit z různých nosných materiálů, na kterém jsou elektrody natištěny. Mohou být vyrobeny z pevnějších materiálů a následně modifikovány v laboratořích podle požadované aplikace [72, 73] nebo lze jako nosný materiál použít např. filtrační papír, na který se vytisknou elektrody a pomocí vosku a sušení za horka dojde k vytvoření biosenzoru (viz Obrázek 5). Měřicí plocha takto vyrobeného biosenzoru pak je od okolí izolována a nedochází tak k úniku roztoku mimo vymezenou oblast. Principiálně se jedná o miniaturizovaný systém pro elektrochemická měření složený ze tří elektrod. Pracovní a pomocná elektroda je grafitová, tzv. pseudoreferenční elektroda je argentschloridová (viz Obrázek 5). Během hydrolyzy substrátu (např. lze užít acetylthiocholin-chlorid ATChCl) vzniká nabitý thiocholin, který svým nábojem změní odezvu senzoru. S konstantním vkládaným potenciálem úměrně

s koncentrací substrátu narůstá výsledný Faradayův proud. Hodnotu proudu měříme po uplynutí daného času (viz Obrázek 6). [15, 74–76]



Obrázek 5: Elektrody natištěné na filtrační papír: Kulatá měrná grafitová elektroda (A), Polokruhovitá grafitová elektroda pomocná (B), pseudoreferenční elektroda argentschloridová (C), vosk (D)

### Optické biosenzory založené na cholinesterasách

Optické biosenzory mohou využívat různá fyzikální uspořádání, ty jednodušší pracují na principu prosté absorpce světla, kdy podle Lambert-Beerova zákona dochází v roztocích k absorpci optického záření měřenou látkou či jejím reakčním produktem nebo substrátem (viz Rovnice 1). Tento přístup má ale jisté omezení. K měření musí docházet v přímé rovině, tj. zářič světla, vzorek i detektor musí být seřazeny za sebou ve směru proudu světelných paprsků vycházejících ze zdroje. [4, 71]

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

Rovnice 1: Matematické vyjádření Lambert-Beerova zákona. Výpočet absorbance (A) pomocí:

1) záporného logaritmu transmitance (poměr intenzit prošlého (I) a emitovaného ( $I_0$ ) paprsku o stejné vlnové délce.

2) součinu molárního absorpčního koeficientu ( $\varepsilon$ ), molární koncentrace absorbující látky v roztoku (c) a tloušťky absorbující vrstvy (L)

Pro spektrofotometrické stanovení aktivity byla použita optimalizovaná metoda dle Ellmana. Spočívá v hydrolytickém štěpení acetylovaného thiocholinu cholinesterasou. Vzniklý thiocholin pak atakuje molekulu 5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoové kyseliny)

(DTNB), a z reakce odstupuje 2-nitro-5-sulfanylbenzoová kyselina (TNB) s absorpčním maximem o vlnové délce 412 nm (viz Obrázek 6). Měříme koncentraci podle Lambert-Beerova zákona. [8] Aktivitu cholinesterasy vypočítáme dle Rovnice 2.

$$\alpha = \frac{\Delta A}{\varepsilon * \Delta t}$$

*Rovnice 2: Výpočet aktivity s využitím Lambert-Beerova zákona.  $\Delta A$ : rozdíl absorbance roztoku před spuštěním a po ukončení reakce,  $\varepsilon$  molární absorpční koeficient absorbující složky (TNB)*

Ellmanova metoda prošla s léty řadou upřesnění a modifikací. Došlo k nalezení optimální vlnové délky vhodné pro měření reakce v různě sekundárně absorbujících maticích vzorku. [14] Dále byly upřesněny podmínky měření objasněním změn molárního absorpčního koeficientu pro odlišné teploty a v závislosti na použitém pufru. [11] Bylo otištěno několik specifických aplikací této analytické metody. Jedná se o upravené stanovení aktivity AChE při její reaktivaci, dále o uzpůsobení metody pro měření analytickými proužky. [7, 9, 12]

Příkladem biosenzoru založeném na absorpci světla je biosenzor vyvinutý Andreouem a Clonisem. Jako biorekogniční prvek byla užita imobilizovaná cholinesterasa společně s bromkresolovým purpurem. Hydrolyza acetylcholinu vyvolá změnu pH a s tím spojenou změnu absorbance bromkresolového purpuru při 600 nm. Absorbance je měřena pomocí spektrofotometru. Metoda je testována pro dichlorvos a karbaryl. [77]

### *Fluorimetrické biosenzory*

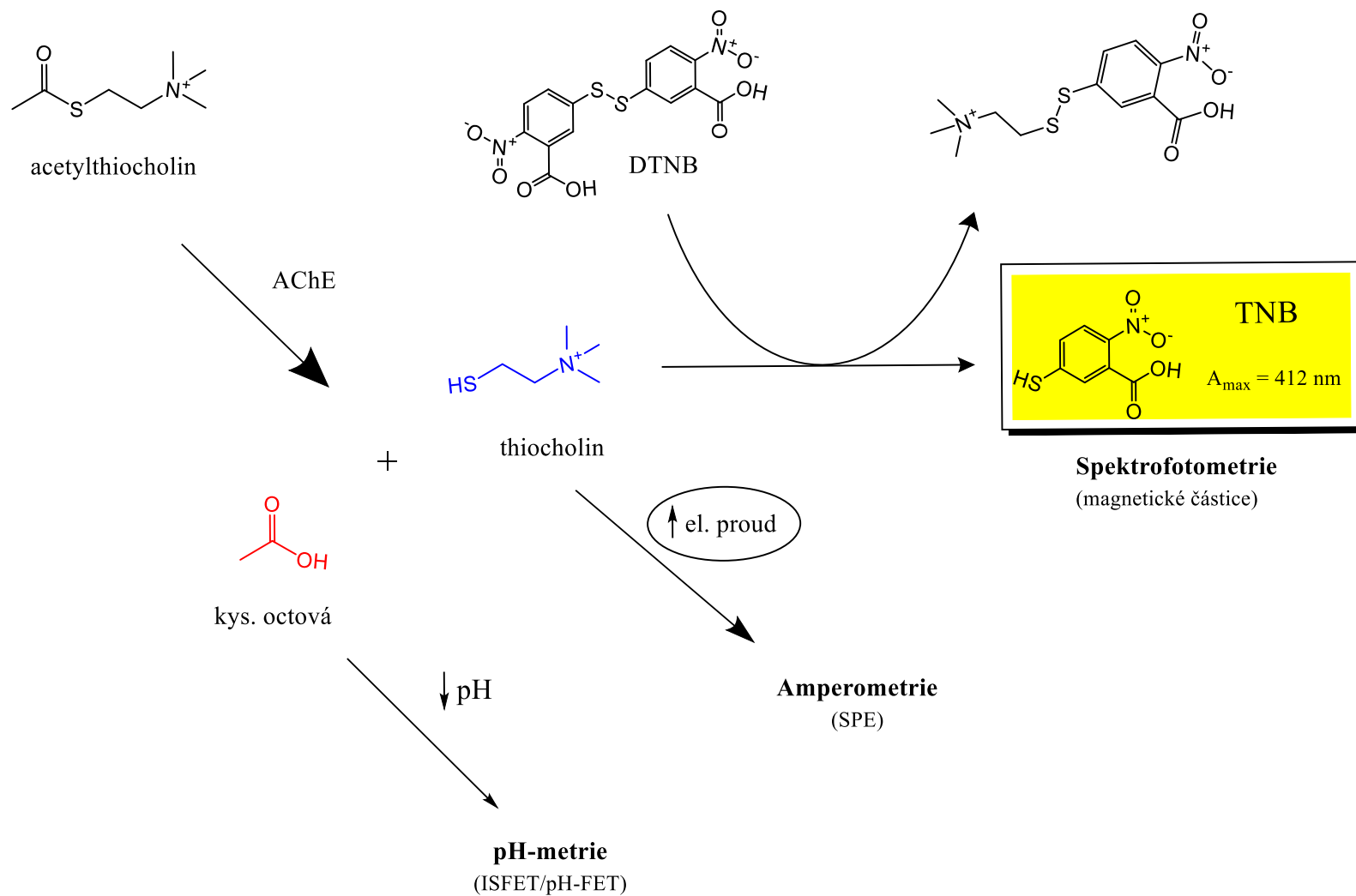
Protože se stává, že v roztoku je pohromadě více absorbujících složek, můžeme se opřít ještě o jednu metodu, a to o fluorimetrii. Při ní využíváme skutečnosti, že neměříme pohlcené světlo, ale zachycujeme záření emitované molekulami po excitaci valenčních elektronů zářením o vyšší energii, tzv. budícím. Elektrony po přijetí energie přejdou do vyšších energetických hladin, následně nejprve dochází k uvolnění části energie tzv. nežářivým přechodem a zbylá část energie se uvolní zářením o vyšší vlnové délce, které je detekováno. [71, 78]

Příkladem fluorimetrické metody může být stanovení dichlorvosu pomocí AChE a cholinoxidasy jako druhého enzymu, nebo stanovení parathionu a paraoxonu měřením aktivity AChE, kdy jsou enzymy imobilizované na tzv. kvantových tečkách. [79, 80] Další

možností je modifikovaná Ellmanova metoda pro fluorimetrické stanovení, kdy se thiocholin váže na fluorescenční probu a v porovnání se standardním spektrofotometrickým stanovením nabízí citlivější, navíc miniaturizované stanovení aktivity cholinesterasy. [81]

### *Senzory povrchové plazmonové rezonance*

Pokročilou metodou pro převod signálu z biorekogničního elementu biosenzoru je měření povrchové plazmonové rezonance (surface plasmon resonance, SPR). Patří mezi nelineární optické metody a je založena na lomu světla na rozhraní kovu (nejčastěji zlata [82], stříbra [83], mědi, titanu, nebo chromu) a dielektrika. [71] Fotony, které procházejí dielektrikem, interagují s elektrony atomů kovu a dochází k šíření elektromagnetického záření na rozhraní kov/dielektrikum. Lze využít planárního uspořádání, kdy se sleduje změna úhlu dopadu záření, [82] nebo uspořádání se speciálně upraveným optickým vláknem, na kterém je imobilizována jak AChE, tak je na něm upoutána vrstva stříbra. Měření probíhá v průtočné cele. [83]



Obrázek 6: Přehled použitých přístupů ke stanovení aktivity AChE

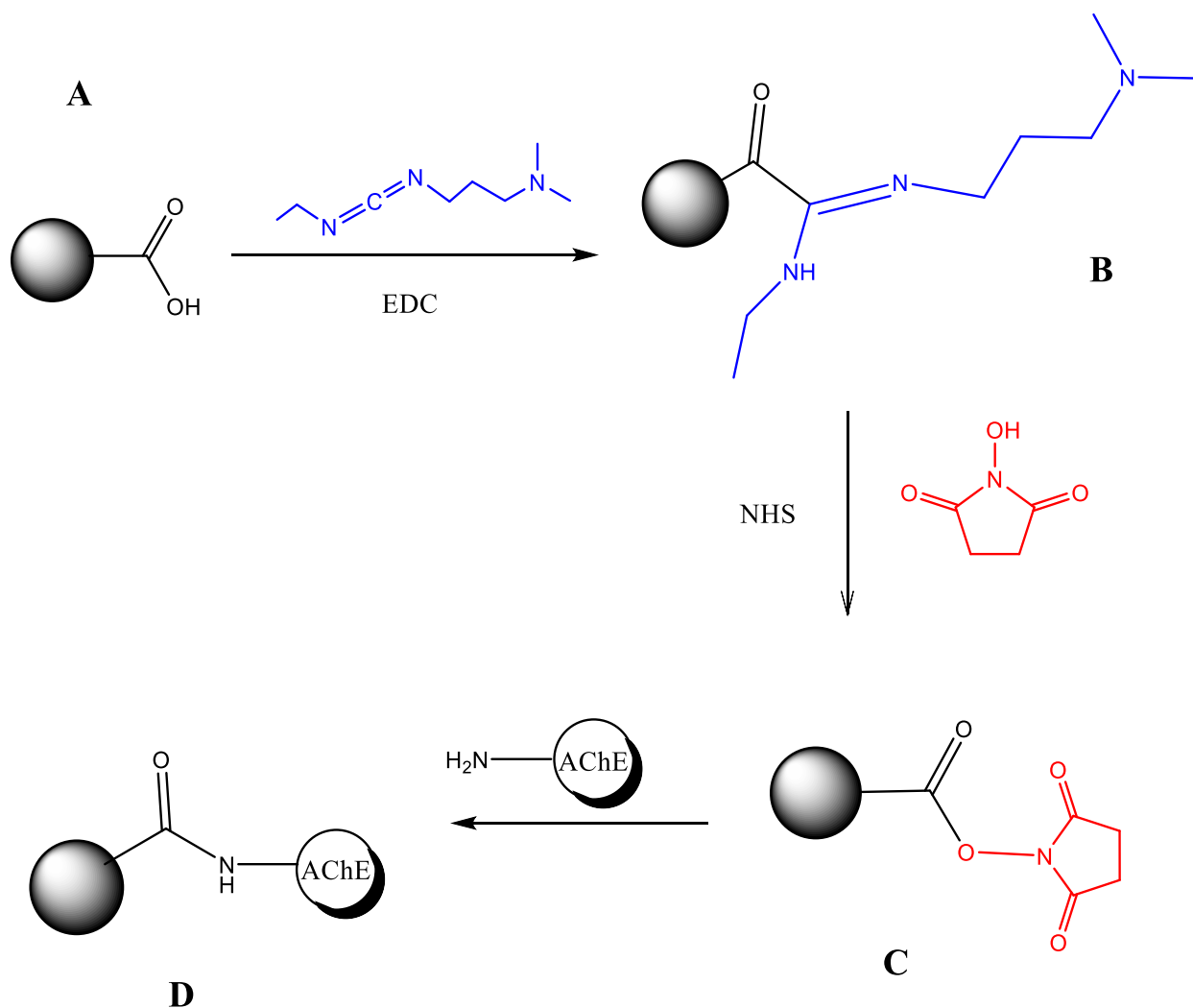
### 3.3.4. Imobilizační techniky

Enzym může být jako rozpoznávací prvek biosenzoru různě vázaný. Imobilizovaný enzym definujeme obecně jako enzym, který pevně upoutáme na specifický podklad, na kterém se prodlouží jeho životnost. Navázaný enzym pak lze používat při vhodném zacházení kontinuálně a opakovaně při zachování jeho funkčnosti v řádu dní až měsíců. [84, 85]

Existuje řada podkladů a matric, na které lze enzym ukotvit. Lze jej upoutat do gelové membrány (např. z želatiny, nebo chitosanu), na povrch komerčních částic, či na tzv. plošně tištěné elektrody (tzv. screen-printed electrodes, SPE). Tisknout lze na filtrační papír, případně látku nebo plast. [86–90]

#### Imobilizace na povrch částice

Jednou z možností, jak upoutat enzym k podkladu, je kovalentní modifikace povrchu, například magnetických částic pro následné zachycení enzymu. [88, 89] Příkladem je používání karbodiimidů, např. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimidu (EDC). Tento je rozpustný ve vodě. Tyto spojovací články umožní kovalentně propojit enzym s karboxylovaným povrchem částice. Dále je doporučováno používat zároveň další činidlo, *N*-hydroxysukcinimid (NHS), a to zejména u citlivějších bílkovin. Princip reakce obou činidel ukazuje Obrázek 7. Nejdříve dochází k vazbě EDC na magnetické částice obohacené z výroby o karboxylovou skupinu. Již takto modifikovaná částice je schopná kovalentně vázat enzym přes jeho aminoskupiny. Modifikace ale může pokračovat za přítomnosti NHS. Jde o snazší a z pohledu efektivity lepší reakci, protože při kombinaci obou činidel nedochází po vazbě bílkoviny na karboxylovou skupinu částice k tvorbě reaktivních meziproductů jako při použití samotného EDC. Dojde však ke vzniku stabilního meziproductu spojením obou činidel. Ta pak jsou před použitím úspěšně modifikovaných částic odstraněna ze suspence. [4, 91, 92]



Obrázek 7: Průběh kovalentní modifikace karboxylové skupiny magnetických částic a navázání AChE přes aminoskupinu

### Imobilizace na membránu

Chitosan je deacylovaný derivát přírodního polymeru chitinu. Díky své zachované biokompatibilitě, biodegradabilním a absorpčním vlastnostem nabízí několik možností využití. Může být oporou pro růst kůže při hojení popálenin, kdy dokáže ránu zakrýt a urychlit tvorbu nové pojivové tkáně. Výhodně využije již probíhajícího zánětlivého procesu, protože lysozym produkovaný leukocyty postupně štěpí chitosan v nižších vrstvách gelu na *N*-acetylglukosamin. Tento produkt štěpení může sloužit jako prostředník pro zpevnění pojiva bez přemrštěné imunitní odpovědi. Děje se tak pravděpodobně díky volným aminoskupinám *N*-acetylglukosaminu. [93–95]

Chitosan je obsažen i ve speciální gáze ke krytí větších ran v terénu, nebo jako savý materiál podobný houbě při zastavování krvácení, např. z nosu. [96, 97] Dále může být pro svou odolnost proti poškrábání používán i k povrchové úpravě fotografických materiálů. [95]

Podstatnou vlastností, které lze u chitosanu využít, je tedy zejména přítomnost aminoskupin v jeho molekule. Je tak ideálním nosným médiem pro bílkoviny, protože se na něj mohou vázat svými karboxylovými skupinami. Případně lze použít EDC k modifikaci chitosanu pro optimalizaci uchycení proteinu. Proteiny navíc mohou reagovat s aldehydy, které se používají při imobilizaci jako stabilizační činidlo. Dojde tak k zesílení a následně pevnějšímu ukotvení molekuly enzymu na povrchu chitosanové membrány. [4, 95, 98, 99]

### **3.3.5. Praktické využití biosenzorů ve zdravotnictví**

V praxi se biosenzory na stejném principu jako ten Clarkův běžně používají ve zdravotnictví v režimu laboratorního testování přímo u lůžka pacienta (tzv. point of care testing, POCT). Do tohoto spadají jednak přístroje určené pro domácí testování (nejčastěji glukometry [100]), zejména ale v tomto režimu dochází k zapůjčení přístrojů na lůžkovou oddělení nebo na oddělení akutní péče. [101] Zde dochází k měření základních parametrů z krve pacienta, jako jsou plazmatické koncentrace glukosy, laktátu a některých základních minerálů. Stejným způsobem se vyšetřují např. i krevní plyny. [102] Výsledek měření slouží okamžitě jednak přímo ošetřujícímu lékaři na daném oddělení, jednak se archivuje v laboratorním informačním systému. Centralizovaná laboratoř zajišťuje revizi zařízení, zaškolení personálu a začlenění přístroje do systému kontroly kvality. [27, 51]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Pomůcky

#### 4.1.1. Enzymy

Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7)

- z paúhoře elektrického, *Electrophorus electricus* (typ V-S, Merck, SRN)
- lidský rekombinantní enzym (buněčný lyzát, aktivita 2 U/ml, Gene&GreenTK, Francie)

#### 4.1.2. Technické pomůcky

UV-VIS spektrofotometr Evolution 201 (Thermo Scientific, USA)

pH-metr H160 s pH sondou typu ISFET (Hach, USA)

EmStat 3 (PalmSens, Nizozemsko)

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf, SRN)

Tiskárna Color Cube 8580 (Xerox, USA)

Semi-mikrováhy CPA225D (Sartorius AG, SRN)

Jednokanálové pipety Transferpette® S o rozsahu 1–100 µl, 1–200 µl, 100–1000 µl, 0,5–5 ml (Brand GmbH, SRN)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

Magnetická míchačka IKAMAG™ Color Squid (IKA, USA)

Kancelářský papír Fabriano Copy 2 (80 g/m<sup>2</sup>, Fedrigoni, Itálie)

Filtrační papír 67 g/m<sup>2</sup> (Cordenons, Itálie)

Počítač ThinkPad T420 (Lenovo, USA)

### 4.1.3. Chemikálie

Acetylthiocholin-chlorid (ATChCl,  $\geq 99$  % (w/w))

5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB,  $\geq 98$  % (w/w))

Fosfátový pufr (PBS, pH 7,4)

Hovězí sérový albumin (BSA,  $\geq 98$  % (w/w))

2-propanol ( $\geq 99,5$  % (V/V))

Chitosan ( $M_m = 190\,000$  Da –  $310\,000$  Da)

Mikročástice, magnetické, s karboxylovou funkční skupinou ( $c = 18\text{--}22$  mg/ml),  
produktové číslo 00239

Methanol (LC-MS grade, Avantor, USA)

Ethanol (absolutní, 95 % (V/V))

Trihydrát hexakyanidoželeznatanu draselného ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ,  $\geq 99$  % (w/w))

Fyzostigmin ( $\geq 98$  % (w/w))

Takrin-hydrochlorid ( $\geq 99$  % (w/w))

Glutaraldehyd (Grade II, v  $H_2O$ , 25 % (V/V))

Chlorid sodný (NaCl,  $\geq 99,5$  % (w/w))

Inkousty pro tisk elektrod:

- Inkoust s obsahem Ag/AgCl (Electrodag 477 SS); (Acheson, Itálie)
- Inkoust na bázi grafitu (Electrodag 421); (Acheson, Itálie)

Uhelný prášek CB N220 (Cabot Corp, Italy)

*N*-hydroxysukcinimid (NHS, 98 % (w/w))

*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid (EDC,  $\geq 97$  % (w/w))

#### **4.1.4. Spotřební materiál**

Centrifugační zkumavky 15 a 50 ml (Techno Plastic Products, Švýcarsko)

Jednorázové semi-mikro kyvety 1,5 ml s optickou dráhou 10 mm (Brand GmbH, SRN)

Plastové špičky do Transferpette® S (Brand GmbH, SRN)

Jednorázové mikrozukavky 2ml (Eppendorf, SRN)

Parafilm® (Bemis Company, Inc., USA)

Chemikálie, u kterých není vysloveně uveden výrobce nebo dodavatel, byly zakoupené u firmy Sigma-Aldrich (nyní Merck, SRN)

#### **4.1.5. Software**

GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA)

PS Trace (PalmSense, Nizozemí)

Mendeley desktop (Elsevier, Nizozemí)

ChemOffice 2016 (PerkinElmer Informatics, USA)

## 4.2. Příprava roztoků

### Vzorky acetylcholinesterasy

#### pH-metrie, spektrofotometrie

Lyofilizovaný enzym (AChE z elektrického úhoře, *Electrophorus electricus*, navážka 50 mg) byl rozpuštěn v PBS (pH 7,4). Aktivita roztoku AChE byla ředěním pomocí PBS upravena ředěním tak, aby 25  $\mu$ l standardní dávka roztoku enzymu v 1 ml reakční směsi s obsahem 0,4 mM DTNB a 1 mM ATChCl způsobila nárůst absorbance v rozmezí 0,5–1 v rozmezí 2–5 min inkubace při laboratorní teplotě. Výsledný roztok byl stabilizován přidávkem hovězího albuminu (0,5 mg/ml roztoku) a po 1 ml rozdělen do mikrokumavek. Skladován byl při -20 °C.

#### Chronoamperometrie

Základní roztok enzymu (AChE z elektrického úhoře, *Electrophorus electricus*) o aktivitě 250 IU/ml byl upraven ředěním PBS (pH 7,4) tak, že k 10  $\mu$ l koncentrátu AChE bylo přidáno 990  $\mu$ l roztoku PBS. Tak vznikl roztok s enzymovou aktivitou 2,5 IU/ml, který byl dále užíván. Skladován byl při -20 °C

Lyofilizovaný buněčný lyzát s obsahem enzymu (lidská rekombinantní AChE, *Homo sapiens*) ve zkumavce byl po přidání 100  $\mu$ l PBS promíchán a následně centrifugován (15 000 $\times$  g při 4 °C, 10 min). Skladován pak byl při -20 °C.

### Vzorky inhibitorů acetylcholinesterasy

Pro rozpuštění fyzostigminu i takrinu byl použit čistý propan-2-ol.

Rozsah koncentrací kalibračních roztoků byl u fyzostigminu 0,0488  $\mu$ M – 50  $\mu$ M (odpovídá 0,275 mg fyzostigminu v 1 ml propan-2-olu pro 50  $\mu$ M roztok)

Rozsah koncentrací kalibračních roztoků byl u takrin-hydrochloridu 0,9 nM – 1 mM (odpovídá 0,235 mg takrin-hydrochloridu v 1 ml propan-2-olu pro 1 mM roztok).

Všechny připravené kalibrační roztoky inhibitorů byly skladovány při 4 °C.

## Vzorky reagensů

### pH-metrie, spektrofotometrie

Roztoky DTNB (1 mM) a ATChCl (100 mM) byly připraveny rozpuštěním základní látky ve fyziologickém roztoku pro měření pH, nebo v PBS (pH 7,4) pro spektrofotometrické stanovení. Stěna zkumavky s roztokem DTNB byla krytá hliníkovou folií z důvodu citlivosti DTNB na světlo. [103] Fyziologický roztok byl připraven smícháním 0,9 g chloridu sodného se 100 ml deionizované vody.

### Chronoamperometrie

Roztok substrátu (100 mM ATChCl) byl čerstvě připraven rozpuštěním základní látky (19,8 mg) v 1 ml PBS (pH 7,4). Rozsah použitých koncentrací ATChCl byl 3,13 – 100 mM.

### Suspense CB/PB

Nanočástice pro chronoamperometrické stanovení byly připraveny a laskavě poskytnuty týmem prof. Fabiany Arduini z Univerzity Tor Vergata, Řím. Jednalo se o uhelný prášek obohacený o Pruskou modř (CB/PB – „carbon black/prussian blue“ nanočástice). Další zpracování pro potřeby této práce proběhlo dle následujícího postupu:

#### *Příprava prachové suspence:*

10 mg práškové směsi CB/PB bylo dispergováno v 10 ml směsi DMF + voda (1:1) a vloženo na 1 h do ultrazvukové lázně. Takto připravená suspence byla aplikována na pracovní elektrody. Skladování hotové směsi probíhalo při laboratorní teplotě a v temnu. [74, 104]

### 4.3. Postupy plnění jednotlivých cílů práce

#### 4.3.1. Optimalizace metodiky pH metrického stanovení aktivity AChE pomocí sondy s iontově-senzitivním tranzistorem s efektem pole (ISFET)

Měření probíhalo v mikrozkušavce, kde byl k fyziologickému roztoku (0,9% vodný roztok NaCl) přidáván vzorek stabilizovaného roztoku AChE a kalibrační roztok substrátu (ATChCl, rozsah koncentrace substrátu v reakční směsi po naředění byl 0,1–20 mM), zatímco elektroda byla neustále ponořena. Míchání reakční směsi probíhalo při přidávání roztoku substrátu pipetou při startu reakce. Společně s odstartováním reakce začalo měření pH. Sledování probíhalo přesně 5 min. Hodnoty pH těsně před přidáním substrátu a po 5 min měření byly zaznamenány a dále byl používán jen jejich rozdíl vyjádřený jako průměrná změna pH v čase za 5 min. Stanovení probíhalo vždy v triplicátu proti slepému pokusu (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Dávkovací schéma pro optimalizaci měření pH v roztoku s rozpuštěnou AChE

	Vzorek	Slepý pokus
Měřený objem	1 ml	1 ml
Enzym	50 $\mu$ l	Nepřidáván
Roztok ATChCl	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Fyziologický roztok	850 $\mu$ l	900 $\mu$ l

#### 4.3.2. Imobilizace AChE na chitosanovou membránu a pH-metrické testování její aktivity

10 mg středně-molekulárního chitosanu bylo přidáno k 1 ml roztoku kyseliny octové (0,2 M) a v kádince s plochým dnem mícháno elektromagnetickou míchačkou 50 min. Poté bylo přidáno 80  $\mu$ l roztoku enzymu a míchání pokračovalo dalších 10 min. Takto připravená směs byla po 100  $\mu$ l nadávkovaná do mikrozkušavek s kónickým dnem. Po 30 min tuhnutí při laboratorní teplotě bylo přidáno 25  $\mu$ l 0,05 M roztoku hydroxidu

sodného. Po dalších 15 min tuhnutí byly takto vyrobené membrány na závěr překryty 5  $\mu$ l pracovního roztoku glutaraldehydu (1% vodný roztok) a ponechány ke konečnému tuhnutí přes noc v chladničce při 4 °C.

Před prvním a každým dalším použitím bylo nutné membrány trojnásobně promýt 500  $\mu$ l PBS (pH 7,4).

Dávkování roztoků reagensů k promyтым membránám v mikrozkušavkách probíhalo dle schématu v Tabulce 2, měření probíhalo stejně jako v soustavě s rozpuštěným enzymem v roztoku (viz postup v oddílu 4.3.1). Koncentrace substrátu v reakční směsi byla 25  $\mu$ M – 0,75 mM.

Tabulka 2: Dávkovací schéma pro optimalizaci měření pH s AChE imobilizovanou na chitosanové membráně

	Vzorek	Slepý pokus
Měřený objem	1 ml	1ml
Fyziologický roztok	900 $\mu$ l	1 ml
Roztok ATChCl	100 $\mu$ l	Nepřidáván

### 4.3.3. Imobilizace AChE na magnetické částice a testování její aktivity pomocí spektrofotometrického stanovení dle Ellmana, jeho optimalizace pro měření s částicemi

Imobilizace probíhala za pomoci EDC (*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimidu), anebo kombinací EDC + NHS (*N*-hydroxysukcinimid). K 1 ml zakoupeného roztoku magnetických částic, po jejich trojnásobném promytí PBS a odsátí co nejvíce kapaliny ze suspence, byl přidán 0,5 ml roztoku modifikátoru (0,05 M EDC nebo směs obsahující 0,05 M EDC + 0,05 M NHS)<sup>1</sup>. Suspence byla třepána 1 hod při 600 RPM. Následovalo další trojnásobné promytí. Tentokrát ale promývání probíhalo způsobem, kdy se odsávalo a přidávalo stejné množství PBS do doby, než byla suspence čirá (zpravidla se vyčeřila po třetím až čtvrtém promytí). K této směsi byl přidán 1 ml roztoku AChE a třepání

<sup>1</sup> Směs EDC a NHS byla připravena smícháním 250  $\mu$ l 0,1M EDC rozpuštěného v PBS a 250  $\mu$ l 0,1M NHS rozpuštěného v absolutním ethanolu. Tak bylo dosaženo stejné koncentrace a ethanol po promytí byl ze suspence odstraněn, aby případně neinhiboval AChE

proběhlo znovu naprosto stejným způsobem. Z takto připravené suspence se pro každý vzorek odebíralo vždy 100  $\mu$ l. Příprava vzorků pro samotné měření probíhala podle Tabulky 3 s tím, že stanovení proběhlo v triplikátu.

Tabulka 3: Ředění reagensů pro měření AChE imobilizované na magnetických částicích

	Vzorek	Slepý pokus
Měřený objem	1 ml	1 ml
DTNB (1mM)	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Suspence magn. částic (*)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
PBS	400 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Roztok ATChCl	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

(\*Slepý pokus proběhl za využití magnetických částic bez imobilizovaného enzymu)

Roztoky byly dávkovány do plastových kyvet podle postupu, který ukazuje Tabulka 3. Reakce byla spuštěna přidáním substrátu. Rozsah koncentrace ATChCl v kyvetě byl 0,03 mM – 1 mM. Byla měřena absorbance při 412 nm proti slepému pokusu. Při samotném měření docházelo po přidání substrátu jednak k promíchání reakční směsi pipetou (vypouštění a nasávání roztoku do pipety po dobu asi 5 sekund), jednak bylo nutné odtáhnout částice ke zvlněné stěně kyvety, aby nedocházelo k interferencím odrazem nebo absorpcí světla. Čas pro celou operaci od přidání vzorku po vložení kyvety s vyčerenou reakční směsí do spektrofotometru a prvním měřením nebyl delší než 1 min. Doba mezi prvním a druhým měřením byla přesně 5 min. V mezičase mezi měřeními bylo postaráno o pravidelnou disperzi částic v roztoku pomocí magnetu manuálně střídavým přikládáním magnetu k protilehlým stěnám kyvety.

Z výsledných hodnot rozdílu absorbance prvního měření po přidání substrátu a druhém měření po uplynutí stanovené doby 5 min byla vypočítána aktivita AChE podle Rovnice 2, tyto hodnoty byly zprůměrovány a zaneseny do grafu.

Promývání částic mezi měřeními jednotlivých kalibračních roztoků substrátu probíhalo tak, že docházelo k odsátí 500  $\mu$ l staré reakční směsi z kyvety a vymývání 500  $\mu$ l PBS do stavu, kdy roztok byl bezbarvý. Ve většině případů stačilo promýt 5–8 $\times$ . Objem dávkovaný na promývání byl při přípravě další přípravě reakční směsi nahrazen DTNB

a roztokem substrátu. V případě měření s inhibítorem byl objem zvolený pro promývání o 50  $\mu\text{l}$  větší, tj. 550  $\mu\text{l}$ , aby došlo k vymytí a zároveň přípravě květ s částicemi pro další sérii měření.

#### **4.3.4. Konstrukce jednorázového papírového proužku pro chronoamperometrické stanovení aktivity AChE**

Nosným materiálem pro konstrukci biosenzoru byl filtrační papír, z jehož archu byly nařezány kusy formátu A4. Na tyto výřezy bylo třeba sytě vytisknout pruhy s pravidelně rozmístěnými polokruhovými otvory o rozměrech přibližně  $1 \times 1$  cm. Standardně byl vyroben zdrojový soubor podkladu pro tisk elektrod a druhý pro aplikaci substrátu. Templát souborů pro tisk mi byl laskavě zapůjčen k dílčím úpravám týmem prof. Fabiany Arduini z Univerzity Tor Vergata, Řím.

Vosk, ze kterého je tvořena náplň do použité tiskárny umožňuje to, že při použití vysoké teploty dojde k tomu, že roztaje a pronikne do hloubky papíru. Tak docílíme zadržení později aplikovaných roztoků v definovaném prostoru.

Papíry s vytištěným základem pro elektrody nebo pro substrát vložíme na 2 min do sušárny nastavené na 100 °C. Dojde k prosáknutí vosku skrz papír a prostor bez inkoustu zůstane stále savý a od okolí izolovaný.<sup>2</sup> Podle předlohy z polyesterové tkaniny byla vytištěna nejprve vrstva vodivého inkoustu s obsahem Ag/AgCl. Potištěné papíry byly sušeny 40 min při 70 °C. Po této době byla přes první vrstvu vytištěná druhá vrstva vodivého inkoustu s obsahem grafitu. Následovalo pak konečné sušení po dobu 20 min při 70 °C.

Pro modifikaci pracovní elektrody byla použita suspence CB/PB, kdy se aplikovaly 2  $\mu\text{l}$  této směsi doprostřed pracovní elektrody, jež bylo žádoucí co nejvíce rozetřít, avšak jemně kvůli možnosti narušení povrchu.

---

<sup>2</sup> Je třeba dát pozor na to, že delší doba sice zajistí vyšší pravděpodobnost průniku vosku celou vrstvou papíru, nicméně v některých případech docházelo k tomu, že se papír smrští, nebo vosk papírem difundoval horizontálně tak, že příliš zmenšil plochu pro tisk elektrod.

Imobilizace AChE byla provedena po zaschnutí suspence CB/PB aplikováním 2  $\mu$ l roztoku enzymu do stejného prostoru. Aktivita jak lidské, tak úhoří AChE, byla 2,5 U/ml.

V této fázi mohla být již elektroda připojena přes rozhraní do PC s programem PS Trace s modem chronoamperometrie. Na vytištěné plochy pro substrát bylo aplikováno vždy 20  $\mu$ l ATChCl v rozmezí koncentrací 1–100 mM. Pro slepé měření byl roztok substrátu vyměněn za čistý PBS. Po odpaření rozpouštědla mohly být obě plochy spojeny a reakce mohla být započata přidáním 20  $\mu$ l PBS. Spojené plochy byly neprodleně přitlačeny svorkou k sobě a zároveň byl spuštěno odpočítávání 2 min reakce. Následně došlo ke spuštění měření za podmínek, kdy vkládaný potenciál byl 0,3 V; interval mezi záznamy 0,1 s. Celé měření probíhalo 100 s. Stanovení probíhalo v triplikátu.

Jako výsledná hodnota byla odečítána hodnota elektrického proudu na konci měření. Hodnocení probíhalo proti měření s čistým PBS, které dle předpokladů mělo vykazovat nejmenší hodnoty proudu kvůli absenci substrátu.

Elektroda sloužila k jednorázovému stanovení.

#### **4.3.5. Srovnání konstant Michaelise a Mentenové ( $K_M$ ) získaných v rámci různých detekčních přístupů**

Naměřená data byla zpracována graficky a výpočetně v programu GraphPad Prism 8.0 s využitím kinetického modelu dle Michaelise a Mentenové. Linearizované výnosy jsou pro svou jednoduchost zpracování dat vhodné pouze pro přípravu a předběžný odhad v rámci pokusů. [31]

#### 4.3.6. Stanovení 50% inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>) pro fyzostigmin a takrin, stanovení limitů detekce (LOD) použitých metod

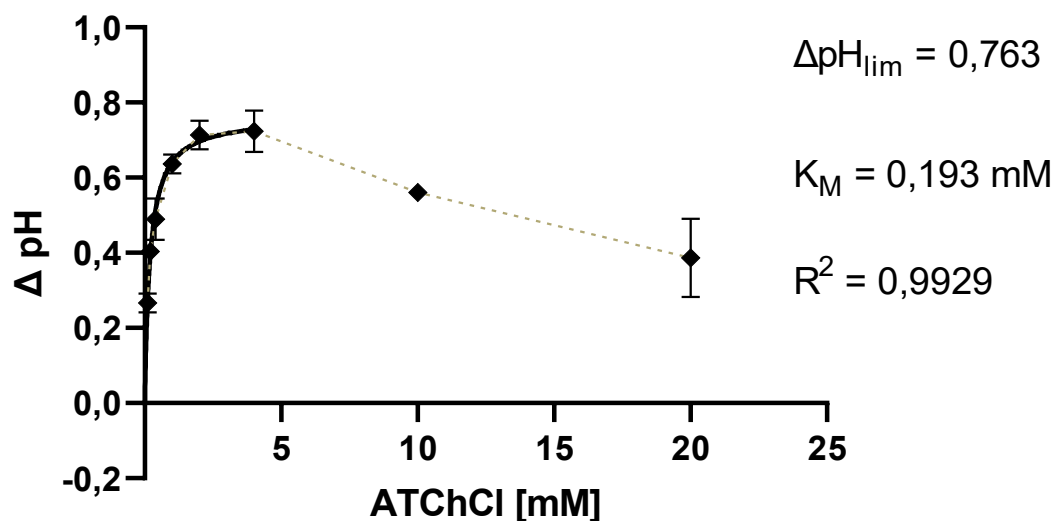
Měření spolu s inhibitory probíhalo za stejných podmínek jako bez nich (viz postupy v oddílech 4.3.1 a 4.3.3). Bylo ale dále nutné před startem reakce substrátem dodržet čas inkubace AChE s inhibitorem. Požadovaný čas inkubace ukazuje Tabulka 4. Zároveň bylo třeba inhibitor přidat ke slepému pokusu (byl použit nejkonzentrovější roztok inhibitoru). To bylo zajištěno dávkováním 50  $\mu$ l roztoku inhibitoru ve všech případech jejich stanovení. Jako negativní kontrola při stanovení aktivity AChE bez inhibitoru se k reakční směsi přidal stejný objem čistého propan-2-olu. Pro zachování 1 ml reakční směsi musel pak být o 50  $\mu$ l snížen objem přidávaného PBS.

Tabulka 4: Koncentrace inhibitorů po přidání do reakční směsi

	Volná AChE	Vázaná AChE	Čas inkubace s AChE (min)
Fyzostigmin	1,2 nM – 1,25 $\mu$ M	2,5 pM – 2,5 $\mu$ M	7 (podle [13])
Takrin	0,024 nM – 1,56 $\mu$ M	2,4 nM – 2,5 $\mu$ M	2,5

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Optimalizace metodiky pH metrického stanovení aktivity AChE pomocí sondy s iontově-senzitivním tranzistorem s efektem pole (ISFET)

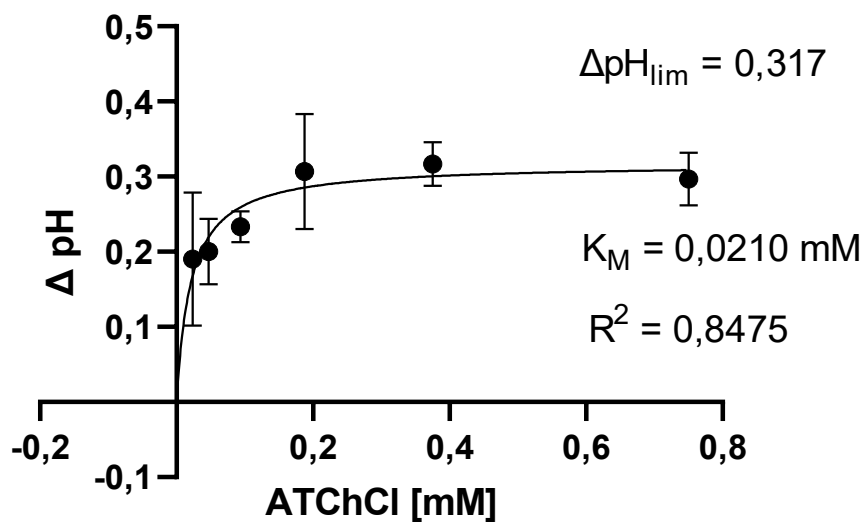


Graf 1: Saturační křivka závislosti změny pH na rostoucí koncentraci ATChCl

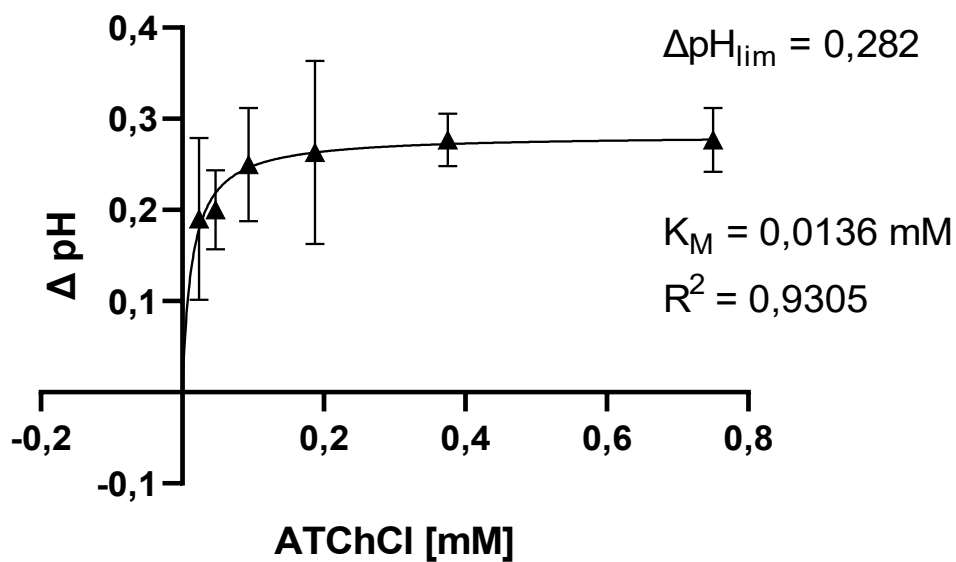
Jako první krok byla optimalizována metoda měření aktivity AChE pomocí ISFET elektrody (viz Graf 1), kdy bylo nutné zjistit optimální koncentraci substrátu, při které bude reakce katalyzovaná AChE probíhat co nejrychleji. Jak je možno vyčíst z Grafu 1, saturační křivka kulminuje v rozmezí 3–5 mM ATChCl. Poté aktivita enzymu s rostoucí koncentrací substrátu klesá. Tento jev byl již popsán a je pravděpodobně způsobený tím, že se ATCh navázal na AChE i v okolí kavity a vazbou na PAS zabránil jednak odstupu thiocholinu z aktivního místa a jednak hydrolytickému odštěpení acetátového zbytku z aktivního místa AChE. [20, 105]

Pro další analýzy inhibitorů byla zvolena koncentrace ATChCl 3 mM, aby byla zajištěna maximální rychlost enzymové reakce.

## 5.2. Imobilizace AChE na chitosanovou membránu a pH-metrické testování její aktivity



Graf 2: Saturační křivka paúhoří AChE imobilizované na chitosanové membráně. 1. použití



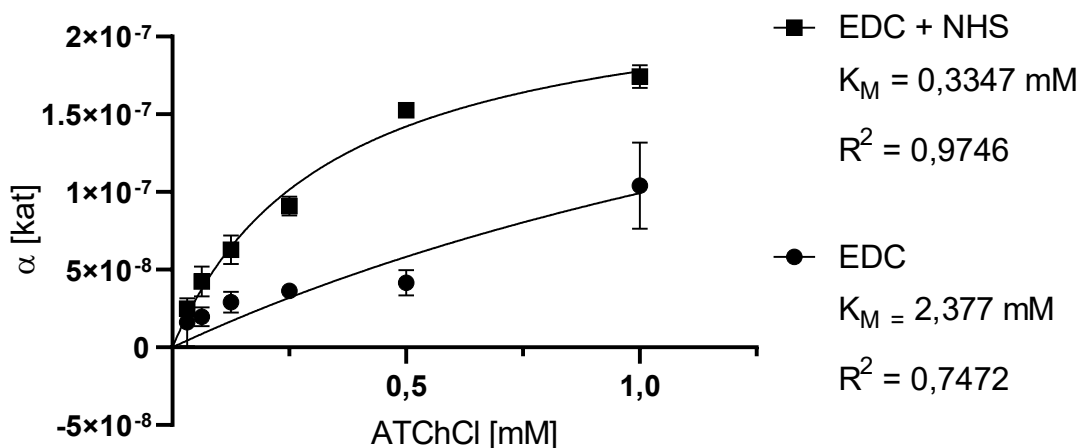
Graf 3: Saturační křivka paúhoří AChE imobilizované na chitosanové membráně. 2. použití

Grafy 2 a 3 ukazují hodnoty z testování biosenzoru, kde je paúhoří AChE imobilizovaná na chitosanové membráně. Při srovnání výsledků při prvním a druhém použití si povšimněme dvou aspektů, které mohou jít vzájemně proti sobě:

- a) očekávané snížení limitní rychlosti enzymové reakce při druhém použití o více než 10 %.
- b) Snížení  $K_M$  o více než 30 % při druhém použití membrány. To může být způsobeno i zkrácením programem při vyhodnocování (3. kalibrační bod na Grafu 3 je mírně vychýlen vzhůru, což mohlo zapříčinit změnu tvaru křivky a tím snížení  $K_M$ ).

Dlouhodobá stabilita AChE v této práci nebyla testována. Avšak na pracovišti, kde byla vypracována i tato diplomová práce, byly provedeny studie docházející k závěru, že AChE imobilizovaná na chitosanové nebo želatinové membráně může být za určitých podmínek stabilní několik týdnů. Existují však jevy, které je třeba vzít v potaz. [90, 99] Jedním z nich je efekt stárnutí membrány. Drobník a kol. zkoumali AChE imobilizovanou na želatinové membráně a v rámci testování trvajících 16 týdnů dospěli k závěru, že takto imobilizovaná AChE vydrží aktivní celou dobu měření, přičemž v prvních 3 týdnech dojde nejprve ke zvýšení aktivity, následně i ke snížení aktivity cca na polovinu. [90] Kostelník a Pohanka testovali stabilitu chitosanové membrány s imobilizovanou AChE. Jejich studie dlouhodobé stability v průběhu 4 týdnů ukázala nárůst aktivity AChE po 4 dnech a následně ke snížení aktivity o cca 20 %. Tuto aktivitu si pak AChE udržela po zbytek studie. [99] Pokles aktivity AChE na biosenzoru v průběhu času je tak další důležitý parametr, který je třeba brát v potaz. Jeho vliv lze minimalizovat použitím slepého pokusu, nicméně bude vždy nutné ověřit si u konkrétní soustavy, na kolik může snižování aktivity negativně ovlivnit limit detekce jednotlivých metod s přibývajícím časem.

### 5.3. Imobilizace AChE na magnetické částice a testování její aktivity pomocí spektrofotometrického stanovení dle Ellmana, jeho optimalizace pro měření s částicemi.

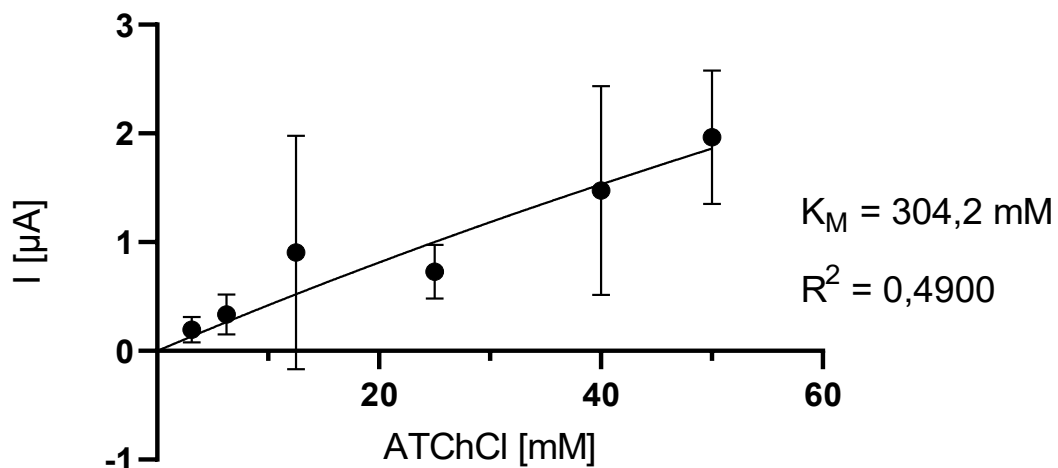


Graf 4: Saturační křivky páuhoří AChE imobilizované na magnetické částice

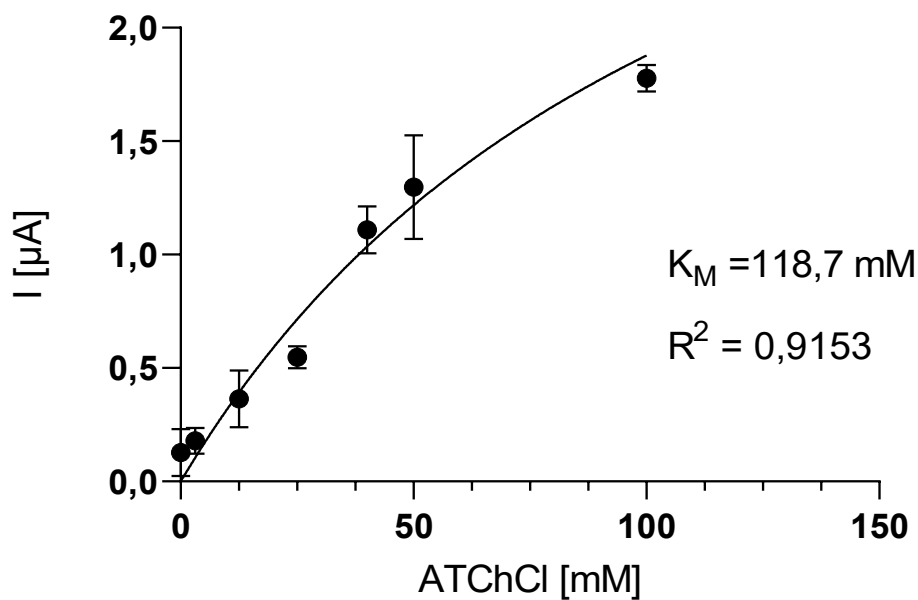
Graf 4 znázorňuje výsledek porovnání dvou variant imobilizace na magnetické částice s karboxylovou funkční skupinou. Povrch částic byl modifikován jednak pomocí *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid-hydrochloridu (EDC), dále pomocí směsi EDC a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS). Způsob navázání modifikátorů AChE na částice pomocí modifikátorů je popsán na Obrázku 7.

Podle nižší hodnoty konstanty Michaelise a Mentenové ( $K_M = 0,3347 \text{ mM}$ ) lze konstatovat, že na částice modifikované směsí EDC + NHC se pravděpodobně navázalo více AChE než na částice modifikované pouze EDC. Toto tvrzení lze potvrdit i o tím, že aktivita AChE při koncentraci 1 mM ATChCl je zřetelně vyšší, když se k imobilizaci užilo směsí činidel EDC a NHS. Použití směsi EDC + NHS tedy lze po vyhodnocení označit za efektivnější a pravděpodobně také šetrnější k proteinům, jak je uváděno v literatuře. [4]

#### 5.4. Konstrukce jednorázového papírového proužku pro chronoamperometrické stanovení aktivity AChE



Graf 5: Saturační křivka AChE (z paúhoře elektrického) imobilizované na papírové elektrodě



Graf 6: Saturační křivka AChE (lidské rekombinantní) imobilizované na papírové elektrodě

V rámci této práce byl konstruován biosenzor založený na tisku elektrod na papír (tzv. screen-printed electrodes). Při pohledu na Grafy 5 a 6 je patrné, že konstanta  $K_M$  lidské AChE je přibližně  $2,5\times$  menší v porovnání s  $K_M$  paúhoří AChE. Rozdíl mohla pravděpodobně způsobit větší viskozita vzorku lidské AChE. Při jejím nanesení na měrnou elektrodu zdlouhavě zasychala a nejspíše nepronikla tak hluboko do vrstvy částic CB/PB v porovnání s AChE z paúhoře. To mohlo napomoci snazšímu proniknutí substrátu do aktivního místa lidské AChE, což vyústilo ve vyšší odezvu.

Práce na podobných jednorázových senzorech využívající jak AChE, tak i BChE jako primární biorekogniční prvek jsou již publikované. Vyvinuty byly i biosenzory využívající i více než dvěma enzymy jako biorekogniční prvky. S podobnými biosenzory se v budoucnu počítá jako s průkazníky NPL nebo pesticidů. [15, 73, 74, 106–108]

## 5.5. Srovnání konstant Michaelise a Mentenové ( $K_M$ ) získaných v rámci různých detekčních přístupů

Tabulka 5: Konstanty Michaelise a Mentenové všech použitých metod detekce

$K_M$	Ellmanova metoda	pH-metrie	chronoamperometrie
AChE (paúhoří, volná)	0,0963 mM [13]	0,1926 mM	-----
AChE (paúhoří, vázaná)	0,3347 mM (EDC+NHS) 2,377 mM (EDC)	0,0136 mM 0,0210 mM	304,2 mM
AChE (lidská, vázaná)	-----	-----	118,7 mM

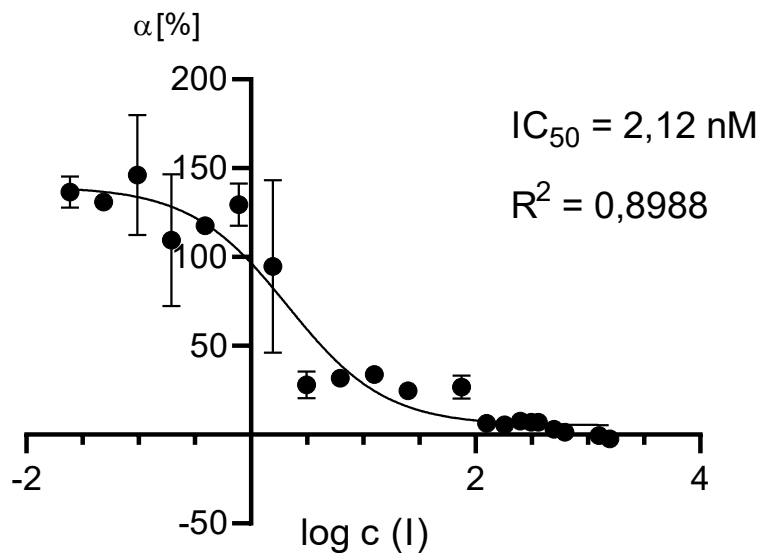
Při imobilizaci enzymu s vysokou pravděpodobně dochází ke zpomalení enzymové reakce z důvodu omezení přístupu substrátu k aktivnímu místu v porovnání se situací, kdy je enzym rozpuštěn a volně se pohybuje v roztoku. Hodnoty v Tabulce 5 to v případě Ellmanovy metody potvrzují, avšak v případě pH-metrie je tomu naopak. Důvodem může být např. orientace elektrody v mikrozkuhavce směrem k chitosanové membráně, kdy elektroda zachytí signál (přítomnost  $H^+$ ) dříve a ve větší intenzitě, než když je elektroda ponořena do roztoku s rozpuštěnou AChE, kde štěpení substrátu probíhá v celém objemu roztoku. Fakt, že se během měření pH po přidání substrátu míchalo obsahem pouze při startu reakce, tomu také napovídá.

Z údajů v Tabulce 5 můžeme vyzvednout ještě dva zajímavé jevy, a to že:

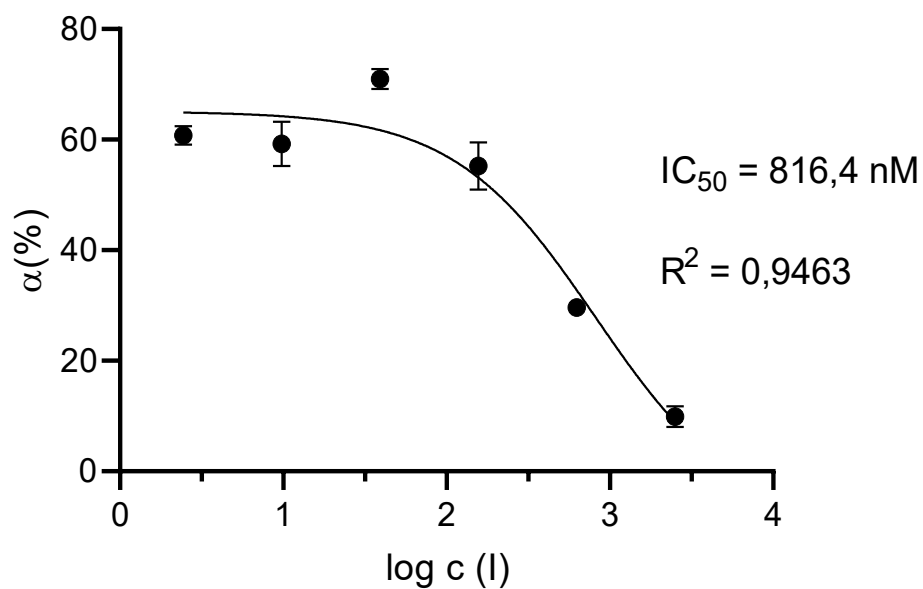
- 1) Při porovnání hodnot získaných chronometricky jde o řádový rozdíl proti ostatním metodám. Zde je třeba poznamenat, že reakční prostředí je docela jiné než při zkuhavkových stanoveních (vyšší koncentrace substrátu v nižším objemu reakční směsi, absence proudění) a tak to nemusí nutně znamenat, že metoda je horší. Vývoj této metody (stejně tak elektrochemických metod založených na tištěných senzorech) stále probíhá. [15, 74, 76, 107]

- 2) Přibližně třetinový rozdíl v aktivitě během měření s magnetickými částicemi modifikovanými pouze EDC, než v případě imobilizace pomocí směsi EDC + NHS. Pravděpodobně došlo k navázání menšího množství AChE, nežli při imobilizaci pomocí směsi EDC + NHS. Je to patrné i z Grafu 4, kdy i limitní rychlost reakce při imobilizaci s EDC (vyjádřená aktivitou) nedosáhne ve stanoveném čase tak vysoko, jako v případě použití směsi EDC + NHS. Můžeme tedy prohlásit, že použití směsi EDC + NHS přineslo viditelný benefit spočívající ve zvýšené funkční kapacitě biosenzoru díky pravděpodobně lepšímu navázání AChE na povrch částic.

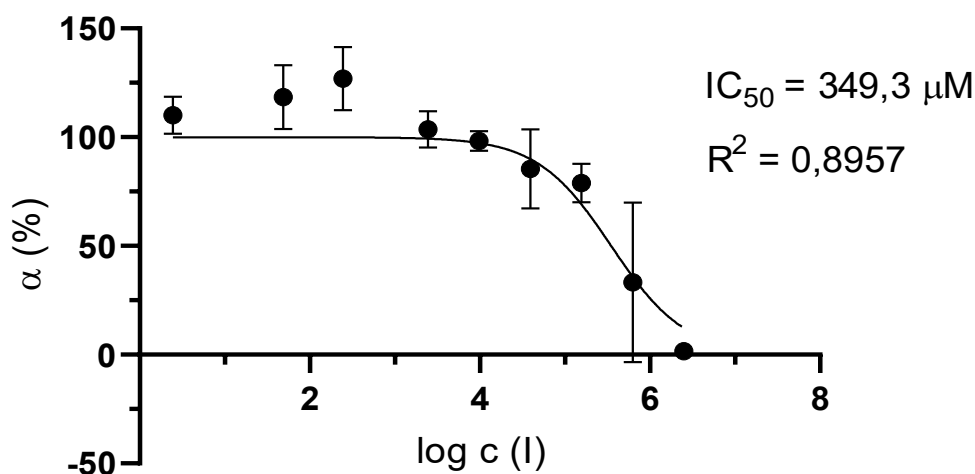
**5.6. Stanovení 50% inhibiční konstanty ( $IC_{50}$ ) pro fyzostigmin a takrin, stanovení limitů detekce (LOD) použitých metod**



Graf 7: Závislost zbytkové aktivity paúhoří AChE na koncentraci takrinu, pH-metrie, AChE volná



Graf 8: Závislost zbytkové aktivity paúhoří AChE na logaritmu koncentrace takrinu, Ellmanova metoda, imobilizace na magnetické částice



Graf 9: Závislost zbytkové aktivity AChE na logaritmu koncentrace fyzostigminu, Ellmanova metoda, AChE imobilizovaná na magnetické částice

Tabulka 6: Porovnání hodnot limitů detekce (LOD), kvantifikace (LOQ) a 50% inhibiční koncentrace zkoumaných inhibitorů AChE (IC<sub>50</sub>)

	Volná AChE		Imobilizovaná AChE	
	Spektrofotometrie	pH-metrie	Spektrofotometrie	Spektrofotometrie
Inhibitor	Fyzostigmin	Takrin	Fyzostigmin	Takrin
LOD	1,561 nM [13]	0,8888 nM	10,37 nM	8,238 nM
IC <sub>50</sub>	59,1 nM [13]	2,12 nM	349,3 μM	816,4 nM

Jako inhibitory byly zvoleny fyzostigmin a takrin, tj. modelové sloučeniny různých strukturních typů, které se váží na různá místa v kavitě enzymu. [43, 46, 47, 49, 109]

Na základě rozboru dat z Tabulky 6 a Grafů 7, 8 a 9 si můžeme povšimnout jednak rozdílu IC<sub>50</sub> obou inhibitorů při stanovení pomocí imobilizované AChE v porovnání s modelovou studií s volnou AChE. Pravděpodobně to bude dáno skutečností, že enzym na biosenzoru byl obtížněji dostupný jak pro substrát, tak pro inhibitor. Tomu napovídá i vyšší limit detekce při použití imobilizované AChE.

Spektrofotometrické stanovení dle Ellmana bylo zvoleno zejména z důvodu možné aplikace již optimalizované metodiky z mé bakalářské práce. [13] Tu bude možné ve spojení s magnetickými částicemi dále rozvinout například použitím průtokové cely v systému průtokové nebo sekvenční injekční analýzy (Flow injection analysis, FIA, Sequential injection analysis, SIA).

pH-metrická metoda je jednou z jednodušších a k jejímu provedení se nabízí relativně levné vybavení a možnost analyzovat vzorky stejným způsobem i v terénu. Jedná se totiž o přenositelné zařízení, které lze snadno napájet z baterie. Pakliže bude uspokojivě optimalizována výroba chitosanových membrán a stanovení bude opakovatelné (zatím se podařilo pouze dokázat, že je možné použít membránu znovu), může se tato metodika při relativně snadné přípravě vzorku stát skutečně použitelná pro environmentální analýzy. Stejnou perspektivu má také tištěný papírový elektrochemický proužek, který může být vhodným nástrojem pro stanovení pesticidů nebo NPL. [15]

Z analytického hlediska vykazují použité metody velmi nízké hodnoty LOD (viz Tabulka 6). Kostelník a kol. při stanovení AChE z elektrického úhoře imobilizované na magnetických částicích zveřejnili výsledky metody, kde její LOD pro takrin dosáhl 8,1  $\mu\text{M}$  [89]. Tento výsledek je srovnatelný s prací Bolloa a kol., kteří vyvinuli metodu pro stanovení takrinu mající pro takrin LOD 4,8  $\mu\text{M}$  při spektrofotometrické detekci a 0,68  $\mu\text{M}$  při polarografické detekci. [110] Vzorek uvedený v citované práci (Kostelník a kol. [89]) obsahoval sice stejný enzym, navíc imobilizovaný na stejných magnetických částicích, imobilizovaný byl ale pouze pomocí EDC. Lze tedy konstatovat, že by při použití EDC v kombinaci s NHS nejspíše také dosáhl nižšího limitu detekce. Navíc bylo užito i částečně jiného detekčního přístupu (square-wave voltametrie). Autorský kolektiv měl k dispozici také jiný kalibrační rozsah.

Flores a kol. (2003) vyvinuli elektrochemický biosenzor založený na AChE imobilizované na FET elektrodě. Stanovovali jím organofosfáty a neurotoxické karbamáty s detekčním limitem 10 nM. [111] Nestanovovali fyzostigmin, nicméně na základě mé předešlé práce, ve které byla porovnána rychlost vazby na AChE a  $\text{IC}_{50}$  karbofuranu a fyzostigminu, lze soudit, že stanovení karbofuranu by bylo možné s velmi podobným LOD jako pro fyzostigmin. Oba inhibitory totiž vykazovaly velmi podobné naměřené hodnoty  $\text{IC}_{50}$  (60,2 nM pro karbofuran, resp. 75,7 nM pro fyzostigmin) s AChE rozpuštěnou v roztoku, kdy měření probíhalo dle optimalizované Ellmanovy metody. [13]

Použití elektrochemických biosenzorů oproti optickým je výhodné například v matrici, která obsahuje různě barevné sloučeniny. V takovémto případě je velmi pravděpodobné, že dojde k interferenci při detekci signálu. U elektrochemických biosenzorů je naopak nutné počítat s případnou nízkomolekulárních antioxidantů. [112]

#### Poznámka k výběru rozpouštědla pro inhibitory

Z dostupných dat plyne, že míra inhibice propan-2-olem při jeho 5% koncentraci (V/V) v reakční směsi je sice relativně vysoká (cca 20 %), [90, 113] nicméně například u ethanolu je míra inhibice již 30 %. [90] Nevýhodou jiných rozpouštědel, např. dimethylformamidu a n-butanolu je snížení aktivity (lidské) AChE až cca o 60 %. [114] Dále dimethylsulfoxid (DMSO) vykazuje dva negativní efekty. Velmi významně interferuje při voltametrickém stanovení [89] a zároveň již při koncentraci 5 % (V/V) v podstatě zcela zablokuje AChE. [113] Bylo však popsáno, že méně jak 0,3 % (V/V) signifikantně neovlivňuje průběh spektrofotometrického stanovení. [115]

## 6. Závěr

V této práci jsem se věnoval testování imobilizačních a detekčních technik určených pro konstrukci biosenzorů s AChE jako biorekogničním prvkem.

Nejprve jsem zjišťoval možnosti použití ISFET elektrody pro měření pH v roztoku, kde dochází k hydrolytickému štěpení ATCh. Zde popsané pH-metrické stanovení takrinu a fyzostigminu umožňuje detekovat tyto inhibitory již o koncentraci 0,9 nM a 1,6 nM. Při tomto stanovení ale nebyl použitý imobilizovaný enzym, takže limit detekce může být po imobilizaci vyšší.

Vyzkoušel jsem různé přístupy k tvorbě a použití biosenzorických soustav. U spektrofotometrického stanovení pomocí optimalizované Ellmanovy metody jsem již pracoval s imobilizovanou AChE, a to na magnetických částicích. Snadná manipulace s částicemi snadno umožnila opakované stanovení aktivity AChE. Detekční limity této u metody byly pro takrin a fyzostigmin 8,2 nM, resp. 10,4 nM. Takto imobilizovaná AChE by byla vhodná např. pro spojení s průtokovými technikami. Směs modifikátorů EDC + NHS použitá k navázání AChE na magnetické částice nabízí citlivější a efektivnější způsob imobilizace v porovnání s imobilizací na stejné částice modifikované pomocí EDC v již publikované práci. [89]

Dále jsem ukotvil AChE pomocí chitosanové membrány na plastové zkumavce, což může právě spolu s ISFET představovat jednoduchý biosenzor s perspektivou pro použití v praxi.

Konečně tištěné biosenzory nabízejí levné a citlivé stanovení různých molekul. Biosenzory založené na AChE tištěné na filtrační papír nabízejí jednorázové stanovení NPL a pesticidů. Pro stanovení méně nebezpečných inhibitorů AChE lze vyvinout biosenzor vytištěný na jiném materiálu.

Nové alternativní zdroje energie, jakým může být plocha s vytištěnými cyanobakteriemi, mohou nabídnout dostatek elektrické energie pro použití jednorázových biosenzorů. [116] Po zvládnutí jejich spojení lze toto označit za slibnou možnost pro spojení jednorázových tištěných biosenzorů a jednoduchého detektoru. Jejich využití by se našlo právě při analýze NPL, nebo jiných ireversibilních inhibitorů AChE, kdy se enzym na senzoru neregeneruje.

## Citovaná literatura

- [1] TAYLOR, P. The cholinesterases. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 4025–4028. ISSN 00219258.
- [2] WILLE, T. et al. Investigation of kinetic interactions between approved oximes and human acetylcholinesterase inhibited by pesticide carbamates. *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, 206, 569–572. ISSN 00092797.
- [3] ŠINKO, G. et al. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal. Biochem.*, **2007**, 370, 223–227. ISSN 00032697.
- [4] SKLÁDAL, P. *Biosensory*. [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z <<http://www.conet.cz/rishare/venilie/dokumenty/biosensory.pdf>>.
- [5] TAMMELIN, L.E. An electrometric method for the determination of cholinesterase activity. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1953**, 5, 267–270. ISSN 00365513.
- [6] MOHAMMAD, F.K. et al. Electrometric measurement of plasma, erythrocyte, and whole blood cholinesterase activities in healthy human volunteers. *J. Med. Toxicol.*, **2007**, 3, 25–30. ISSN 1556-9039.
- [7] POHANKA, M. et al. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*, **2010**, 81, 621–624. ISSN 00399140.
- [8] ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88–95. ISSN 00062952.
- [9] ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, J. et al. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chem. List.*, **2010**, 104, 46–50. ISSN 00092770.
- [10] WANG, Z. et al. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, **2009**, 77, 67–73. ISSN 00456535.
- [11] EYER, P. et al. Molar absorption coefficients for the reduced ellman reagent: Reassessment. *Anal. Biochem.*, **2003**, 312, 224–227. ISSN 00032697.
- [12] DINGOVA, D. et al. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal. Biochem.*, **2014**, 462, 67–75. ISSN 10960309.
- [13] KERESTEŠ, O. Spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesterasy v přítomnosti karbamátových inhibitorů. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2017.
- [14] WOREK, F. et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta.*, **1999**, 288, 73–90. ISSN 0009-8981.
- [15] ARDUINI, F. et al. Origami multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 126, 346–354. ISSN 18734235.

- [16] SHEN, Z.X. Brain cholinesterases: II. The molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses*, **2004**, *63*, 308–321. ISSN 03069877.
- [17] SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, *175*, 3–10. ISSN 00092797.
- [18] POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.*, **2011**, *155*, 219–230. ISSN 12138118.
- [19] GOLZ, H.H. The benefits and hazards of organophosphorus insecticides. *J. Occup. Med.* **1967**, *9*, 435–438. ISSN 00961736.
- [20] COLLETIER, J.P. et al. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.*, **2006**, *25*, 2746–2756. ISSN 02614189.
- [21] PEZZEMENTI, L.; CHATONNET, A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, *187*, 27–33. ISSN 0009-2797.
- [22] MESULAM, M.M. et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*, **2002**, *110*, 627–639. ISSN 03064522.
- [23] MESULAM, M. et al. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.*, **2002**, *9*, 88–93. ISSN 09699961.
- [24] MANOHARAN, I. et al. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta*, **2007**, *378*, 128–135. ISSN 0009-8981.
- [25] LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.*, **2015**, *148*, 34–46. ISSN 1879016X.
- [26] BARTELS, C.F. et al. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.*, **1992**, *50*, 1086–103. ISSN 0002-9297.
- [27] RACEK, J. *Klinická biochemie*. 2. vyd., Galén, Praha 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [28] DELACOUR, H. et al. Characterization of a novel BCHE „silent" allele: Point mutation (p.Val204Asp) causes loss of activity and prolonged apnea with suxamethonium. *PLoS One*, **2014**, *9*, 1–9. ISSN 19326203.
- [29] WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*, **1980**, *35*, 174–197. ISSN 13652044.
- [30] CACCIATORE, F. et al. Butyryl-cholinesterase is related to muscle mass and strength. A new biomarker to identify elderly subjects at risk of sarcopenia. *Biomark. Med.*, **2015**, *9*, 669–678. ISSN 17520371.
- [31] KODÍČEK, M. et al. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 1. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
- [32] DOLEŽAL, M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. 1. dot. 1.vyd., Karolinum, Praha 2013. ISBN 978-80-246-2382-5.

- [33] SHEARDOVÁ, K. et al. Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Česká a Slov. Neurol. a Neurochir.*, **2007**, 70/103, 589–594. ISSN 1210-7859.
- [34] SANDERS, D.B. et al. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology*, **2016**, 87, 419–425. ISSN 1526632X.
- [35] DOLEŽAL, M. et. a. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 1. vyd., Karolinum, Praha 2009. ISBN 978-80-246-1633-9.
- [36] *EU Pesticides database* [on-line], [cit.2020-04-20]. Dostupné z: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>>
- [37] KMENTA, J. *Pouštní horečka*. 2. vyd., JKM - Jaroslav Kmenta, Nymburk 2011. ISBN 978-80-903603-8-9.
- [38] CLARK, F. et al. *Chemistry in Conflict* [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z: <[https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/11/Chemistry%20in%20Conflict%20workbook\\_3rd%20Edition\\_November%202018\\_2.pdf](https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/2018/11/Chemistry%20in%20Conflict%20workbook_3rd%20Edition_November%202018_2.pdf)>.
- [39] OPCW. *REPORT OF THE OPCW FACT-FINDING MISSION IN SYRIA REGARDING AN ALLEGED INCIDENT IN KHAN SHAYKHUN, SYRIAN ARAB REPUBLIC APRIL 2017* [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z: <[https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Fact\\_Finding\\_Mission/s-1510-2017\\_e\\_.pdf](https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Fact_Finding_Mission/s-1510-2017_e_.pdf)>.
- [40] MCCURRY, J. Japan executes sarin gas attack cult leader Shoko Asahara and six members. *The Guardian*. [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z: <<https://www.theguardian.com/world/2018/jul/06/japan-executes-sarin-gas-attack-cult-leader-shoko-asahara-and-six-members-reports>>.
- [41] MCCURRY, J; GRAHAM-HARRISON, E. Kim Jong-un's half-brother dies after „attack“ at airport in Malaysia. *The Guardian*. [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z: <<https://www.theguardian.com/world/2017/feb/14/kim-jong-un-half-brother-reportedly-killed-malaysia-north-korea>>.
- [42] BARRY, E. Large Dose of Poison Used in Attack on Ex-Spy in Britain. *The New York Times*. 3. květen 2018 [on-line], [cit.2020-05-07]. Dostupné z: <<https://www.nytimes.com/2018/05/03/world/europe/opcw-salisbury-novichok-skripal.html>>.
- [43] STOJAN, J.; ZORKO, M. Kinetic characterization of all steps of the interaction between acetylcholinesterase and eserine. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1997**, 1337, 75–84. ISSN 01674838.
- [44] FRANCIS, P.T. et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **1999**, 66, 137–147. ISSN 00223050.
- [45] ALBERT, A. et al. The Influence of Chemical Constitution on Antibacterial Activity. Part II: A General Survey of the Acridine Series. *Br. J. Exp. Pathol.*, **1945**, 26, 160.
- [46] JARROTT, B. Tacrine: In vivo veritas. *Pharmacol. Res.*, **2017**, 116, 29–31. ISSN 10961186.

- [47] KORÁBEČNÝ, J. et al. Tacrine and its derivatives in the therapy of Alzheimer's disease. *Česká a Slov. Farm.*, **2012**, 210–221. ISSN 1210-7816.
- [48] POHANKA, M. et al. New performance of biosensor technology for Alzheimer's disease drugs: in vitro comparison of tacrine and 7-methoxytacrine. *Neuroendocr. Lett.*, **2008**, 29, 18987590–290508. ISSN 0172-780X.
- [49] WU, G. et al. Design, synthesis and biological evaluation of tacrine-1,2,3-triazole derivatives as potent cholinesterase inhibitors. *Medchemcomm.*, **2018**, 9, 149–159. ISSN 20402511.
- [50] POPE, C.N.; BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem. Pharmacol.*, **2018**, 153, 205–216. ISSN 18732968.
- [51] ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 2. vyd., Galén, Praha 2006. ISBN 80-7262-324-9.
- [52] GRACON, S.I. et al. Safety of Tacrine: Clinical trials, treatment IND, and postmarketing experience. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **1998**, 12, 93–101. ISSN
- [53] *Tacrine Side Effects: Common, Severe, Long Term* [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <<https://www.drugs.com/sfx/tacrine-side-effects.html>>.
- [54] DAWSON, R.M. Reversibility of the inhibition of acetylcholinesterase by tacrine. *Neurosci. Lett.*, **1990**, 118, 85–87. ISSN 03043940.
- [55] BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.*, **2016**, 60, 1–8. ISSN 00711365.
- [56] PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.*, **2014**, 12, 1–15. ISSN 12140287.
- [57] THVENOT, D.R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.*, **1999**, 71, 2333–2348. ISSN 13653075.
- [58] MARTINKOVA, P. et al. Main streams in the construction of biosensors and their applications. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2017**, 12, 7386–7403. ISSN 14523981.
- [59] BRECHT, A.; GAUGLITZ, G. Optical probes and transducers. *Biosens. Bioelectron.*, **1995**, 10, 923–936. ISSN 0956-5663.
- [60] JUSTINO, C.I.L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2015**, 68, 2–17. ISSN 18793142.
- [61] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; VORČÁKOVÁ, K. Cholinesterase-based biosensors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, 31, 180–193. ISSN 1475-6366.
- [62] BUCUR, B. et al. Advances in enzyme-based biosensors for pesticide detection. *Biosensors*, **2018**, 8. ISSN 20796374.
- [63] CLARK, L.C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29–45. ISSN 17496632.
- [64] HEINEMAN, W.R.; JENSEN, W.B. Leland C. Clark Jr. (1918–2005). *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 1403–1404. ISSN 0956-5663.

- [65] HOLAS, O. et al. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opin. Drug Discov.*, **2012**, 7, 1207–1223. ISSN 1746-0441.
- [66] MICHEL, H.O. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **1949**, 34, 1564–1568. ISSN 0022-2143.
- [67] ALDRIDGE, W.N.; DAVIES, D.R. Determination of cholinesterase activity in human blood. *Brit. Med. J.* **1952**, 1951–1953. ISSN 1468-5833.
- [68] LANE, R.M. et al. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **2006**, 9, 101–124. ISSN 14611457.
- [69] POHANKA, M. Biosenzory založené na cholinesterasach. *Chem. List.*, **2013**, 107, 121–125. ISSN 00092770.
- [70] REHER, S. et al. The potentiometric biosensor acetylcholine esterase as a model system. *Mikrochim. Acta*, **2002**, 140, 15–20. ISSN 00263672.
- [71] POHANKA, M. *Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens*. 1.vyd..Univerzita obrany, Hradec Králové 2009. ISBN 978-80-7231-336-5.
- [72] POHANKA, M. Voltammetric assay of butyrylcholinesterase in plasma samples and its comparison to the standard spectrophotometric test. *Talanta*, **2014**, 119, 412–416. ISSN 0039-9140.
- [73] SOLNÁ, R. et al. Amperometric screen-printed biosensor arrays with co-immobilised oxidoreductases and cholinesterases. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 528, 9–19. ISSN 00032670.
- [74] CARATELLI, V. Integrated multiple paper-based electrochemical biosensors for pesticide detection. Diplomová práce. Univerzita Tor Vergata, Fakulta věd, Řím 2017.
- [75] CINTI, S. et al. Carbon black-modified electrodes screen-printed onto paper towel, waxed paper and parafilm m®. *Sensors*, **2017**, 17, 2267. ISSN 14248220.
- [76] CINTI, S. et al. Fully integrated ready-to-use paper-based electrochemical biosensor to detect nerve agents. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 93, 46–51. ISSN 18734235.
- [77] ANDREOU, V.G.; CLONIS, Y.D. A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use. *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, 17, 61–69. ISSN 09565663.
- [78] ATKINS, P.; PAULA, J.D.E. *Atkins' physical chemistry*. 8. vyd., Macmillan, Londýn 2006. ISBN 9780198700722.
- [79] MENG, X. et al. A simple and sensitive fluorescence biosensor for detection of organophosphorus pesticides using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive quantum dots/bi-enzyme. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 47, 402–407. ISSN 0956-5663.
- [80] ZHENG, Z. et al. Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 3081–3085. ISSN 0956-5663.

- [81] MUKHAMETGALIEVA, A.R. et al. A new sensitive spectrofluorimetric method for measurement of activity and kinetic study of cholinesterases. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2020**, *1868*, 140270. ISSN 18781454.
- [82] MILKANI, E. et al. Direct detection of acetylcholinesterase inhibitor binding with an enzyme-based surface plasmon resonance sensor. *Anal. Biochem.*, **2011**, *408*, 212–219. ISSN 0003-2697.
- [83] RAJAN et al. Surface plasmon resonance based fiber-optic sensor for the detection of pesticide. *Sensors Actuators, B Chem.*, **2007**, *123*, 661–666. ISSN 09254005.
- [84] PUNDIR, C.S. et al. Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, *140*, 111348. ISSN 0956-5663.
- [85] BAYINDIRLI, A. Immobilization of enzymes and potential applications in food industry. *GIDA*, **1995**, *20*. 113–116. [on-line], [cit.2020-05-07]  
Dostupné z: <<https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/79466>>.
- [86] PUNDIR, C.S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Anal. Biochem.*, **2012**, *429*, 19–31. ISSN 00032697.
- [87] ARDUINI, F. et al. Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. *Microchim. Acta*, **2014**, *182*, 643–651. ISSN 14365073.
- [88] VANZOLINI, K.L. et al. Acetylcholinesterase immobilized on modified magnetic beads as a tool for screening a compound library. *Microchim. Acta*, **2015**, *182*, 2209–2213. ISSN 14365073.
- [89] KOSTELNIK, A. et al. Electrochemical determination of activity of acetylcholinesterase immobilized on magnetic particles. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2016**, *11*, 4840–4849. ISSN 14523981.
- [90] DROBNÍK, O. Kolorimetrická metoda založená na imobilizované acetylcholinesterase pro stanovení účinnosti inhibitorů používaných v terapii. Rigorozní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
- [91] NGUYEN, H.H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.*, **2017**, *26*, 157–163. ISSN 2288-6559.
- [92] PLÁCIDO, A. et al. Electrochemical genoassays on gold-coated magnetic nanoparticles to quantify genetically modified organisms (GMOs) in food and feed as GMO percentage. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, *110*, 147–154. ISSN 18734235.
- [93] UENO, H. et al. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *52*, 105–115. ISSN 0169-409X.
- [94] ALSARRA, I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2009**, *45*, 16–21. ISSN 01418130.
- [95] RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, **2000**, *46*, 1–27. ISSN 13815148.

- [96] MEDTRADE PRODUCTS LTD. *Celox Medical - product informations* [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <<https://www.celoxmedical.com/cx-product/celox-rapid-eu/>>.
- [97] KAVITHA SANKAR, P.C. et al. Physico-chemical characterisation and biological evaluation of freeze dried chitosan sponge for wound care. *Mater. Lett.*, **2017**, *208*, 130–132. ISSN 18734979.
- [98] POSPISKOVA, K.; SAFARIK, I. Low-cost, easy-to-prepare magnetic chitosan microparticles for enzymes immobilization. *Carbohydr. Polym.*, **2013**, *96*, 545–548. ISSN 01448617.
- [99] KOSTELNIK, A.; POHANKA, M. Superficially Bound Acetylcholinesterase Based on a Chitosan Matrix for Neurotoxic Compound Assay by a Photographic Technique. *Anal. Lett.*, **2018**, *51*, 1622–1632. ISSN 0003-2719.
- [100] *iHealth Lab Inc. Glucose Meter, Blood Glucose Meters* [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <<https://ihealthlabs.com/glucometer/wireless-smart-gluco-monitoring-system/>>
- [101] ROCHE. *Accu-Check Inform II* [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <[www.accu-check.pl](http://www.accu-check.pl)>.
- [102] ABBOTT. *i-Stat test cartridges* [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <[https://www.pointofcare.abbott/shared/static-assets/other/2678.2\\_US\\_Only\\_CartridgeMenu\\_poc.abbott.pdf](https://www.pointofcare.abbott/shared/static-assets/other/2678.2_US_Only_CartridgeMenu_poc.abbott.pdf)>.
- [103] SIGMA-ALDRICH. Produktová informace k D8130 - Ellmanovo činidlo. [on-line], [cit.2020-05-07] Dostupné z: <[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8130?lang=en&region=CZ&gclid=CjwKCAjw4871BRAjEiwAbxXi26oWIDHLxEf8M2nF5z0PIzl6e15WRb0HYAjNeg\\_fvDczINZ4-qB\\_pBoCqbIQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d8130?lang=en&region=CZ&gclid=CjwKCAjw4871BRAjEiwAbxXi26oWIDHLxEf8M2nF5z0PIzl6e15WRb0HYAjNeg_fvDczINZ4-qB_pBoCqbIQAvD_BwE)>.
- [104] CINTI, S. et al. Carbon black assisted tailoring of Prussian Blue nanoparticles to tune sensitivity and detection limit towards H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by using screen-printed electrode. *Electrochem. commun.*, **2014**, *47*, 63–66. ISSN 13882481.
- [105] SHAFFERMAN, A. et al. Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the catalytic center. *EMBO J.*, **1992**, *11*, 3561–3568. ISSN 0261-4189.
- [106] ZHANG, W. et al. Nanomaterial Based Biosensors for Detection of Biomarkers of Exposure to OP Pesticides and Nerve Agents: A Review. *Electroanalysis*, **2017**, *29*, 1206–1213. ISSN 15214109.
- [107] CINTI, S. et al. Electroanalysis moves towards paper-based printed electronics: carbon black nanomodified inkjet-printed sensor for ascorbic acid detection as a case study. *Sensors Actuators, B Chem.*, **2018**, *265*, 155–160. ISSN 09254005.
- [108] TALARICO, D. et al. Screen-printed electrode modified with the carbon black nanoparticles as a cost-effective and sensitive sensor for phosphate detection. In: *Proceedings of the 2015 18th AISEM Annual Conference, AISEM 2015*. 2015. ISBN 9781479985913.
- [109] ZHU, J. et al. Synthesis, pharmacology and molecular docking on multifunctional tacrine-ferulic acid hybrids as cholinesterase inhibitors against Alzheimer's

- disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2018**, *33*, 496–506. ISSN 14756374.
- [110] BOLLO, S. et al. Electrochemical characterization of tacrine, an antialzheimer's disease drug, and its determination in pharmaceuticals. *Electroanalysis*, **2000**, *12*, 376–382. ISSN 10400397.
- [111] FLORES, F. et al. Development of an EnFET for the detection of organophosphorous and carbamate insecticides. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, *376*, 476–480. ISSN 16182642.
- [112] POHANKA, M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chem. Pap.*, **2015**, *69*, 4–16. ISSN 13369075.
- [113] VAVROŠOVÁ, P. Modulace aktivity acetylcholinesterasy vybranými organickými látkami. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci kárlové, Hradec Králové, 2013.
- [114] DRTINOVA, L. In vitro reaktivace cholinesteras inhibovaných pesticidy. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2010.
- [115] JÄRVINEN, P. et al. Potency determinations of acetylcholinesterase inhibitors using Ellman's reaction-based assay in screening: Effect of assay variants. *Anal. Biochem.*, **2011**, *408*, 166–168. ISSN 00032697.
- [116] SAWA, M. et al. Electricity generation from digitally printed cyanobacteria. *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 1–9. ISSN 20411723.