

MOŽNOSTI VYUŽITÍ CHOLINESTERÁZ KE KONSTRUKCI BIOSENZORŮ

¹Miroslav POHANKA, ^{2,3}Kamil KUČA, ^{2,3}Daniel JUN

¹Ústřední vojenský zdravotní ústav, Centrum biologické ochrany, Těchonín

²Univerzita obrany, Centrum pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

³Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové

Souhrn

Negativní působení organofosfátů a karbamátů na skupinu cholinesteráz lze využít pro stanovení těchto látek. Biosenzory využívající cholinesterázy jako biorekogniční složku byly využity ke stanovení jak organofosfátů, tak i karbamátů v řadě modifikací. V tomto přehledovém článku jsou porovnány některé z možností vizualizace enzymové reakce a imobilizace cholinesteráz jako důležitých faktorů v přípravě biosenzoru.

Klíčová slova: Biosenzor, Cholinesteráza, Organofosfát, Karbamát, Analýza.

The Possibilities of Cholinesterases for Biosensor Construction

Summary

The harmful effect of organophosphates and carbamates on natural enzymes from the group of cholinesterases can be employed for analytical purposes. The biosensors based on cholinesterases as biorecognition components were used for an analysis of organophosphates and carbamates several times. In this review article, some enzyme reaction visualizations as well as immobilization procedures have been compared as important parameters of biosensor construction.

Key words: Biosensor; Cholinesterase; Organophosphate; Carbamate; Analysis.

Úvod

Dvě skupiny toxických látek vykazují podobný mechanismus toxického působení (23) – jsou to:

- organofosfáty, mezi které patří např. pesticidy chlorfevinphos, dichlorvos, paraoxon, případně nervově paralytické látky sarin, soman, tabun, VX;
- karbamáty s často zmiňovanými zástupci: aldicarb, carbaryl, carbofuran, methomyl, propoxur.

Tyto sloučeniny nekompetitivně inhibují důležité enzymy v organismu – cholinesterázy, cestou jejich fosforylace (karbamylace) a tím zamezují jejich fyziologické funkci (27). Potlačení toxického efektu je možné vhodným antidotem (20). Pro tyto účely se zdají být vysoce efektivní některé nové reaktivátory AChE (10, 11).

Mluvíme-li o cholinesterázách, máme na mysli skupinu serinových hydroláz schopných štěpit ester acylcholinu na cholin a příslušnou kyselinu (26). V živém organismu je v relativně větší míře zastoupena acetylcholinesteráza (AChE; EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesteráza (BChE; EC 3.1.1.8). AChE je pře-

vážně lokalizována v cholinergních synapsích, kde se podílí na přenosu nervového signálu hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu (29). Úloha BChE v organismu není tak vyhraněná jako u AChE. Její substráty mohou být butyrylcholin, propionylcholin a dokonce i acetylcholin (16).

Přítomnost organofosfátů a karbamátů může být jednoduše detekována právě na základě jejich schopnosti inhibovat aktivitu cholinesteráz (28). V příkladech můžeme vysledovat biosenzory pracující na elektrochemickém (2, 8, 13, 41), optickém (3, 5) a piezoelektrickém (1, 17) principu.

Tento přehledový článek je zaměřen na problematiku konstrukce biosenzorů založených na rekogniční schopnosti cholinesteráz. Pozornost je věnována způsobům vizualizace enzymové reakce a dostupným technikám imobilizace cholinesteráz.

Vizualizace enzymové reakce

Výběr vizualizace enzymové reakce je důležitým aspektem přípravy biosenzoru obsahujícího cho-

linesterázu. Reakce katalyzovaná cholinesterázou je pak převáděna vhodným způsobem na signál. Pro vyhodnocení se používají 2 modely: pokles signálu po inkubaci s inhibítorem (organofosfát, karbamát) nebo určení kinetiky poklesu signálu (32, 34). Vlastní reakce může být vizualizována několika způsoby ve shodě s použitým fyzikálně-chemickým převodníkem. Velice jednoduché je sledování hladiny H^+ (pH) v reakčním médiu při použití pH elektrody jako fyzikálně-chemického převodníku. Probíhající reakce je pak totožná s reakcí probíhající v organismu, např. pro AChE (viz schéma 1).

Tento způsob využití biosenzoru byl několikrát úspěšně aplikován (7, 12, 39) a může být dokonce použit i v kombinaci s amperometrickým převodníkem, pokud povrch biosenzoru současně s cholinesterázou obsahuje i cholinoxidázu (ChOD). Díky její přítomnosti vznikající cholin v přítomnosti kyslíku reaguje následujícím způsobem (viz schéma 2). Reakce katalyzovaná ChOD umožňuje využít amperometrický převodník dvěma způsoby. Při zabránění přístupu dalšího vzduchu do média lze amperometrickou Clarkovou kyslíkovou elektrodou měřit spotřebu rozpuštěného kyslíku (21) nebo je možné elektrochemicky rozkládat vznikající peroxid vodíku za využití zlaté nebo platinové amperometrické elektrody (42).

Amperometrický převodník je možné použít také

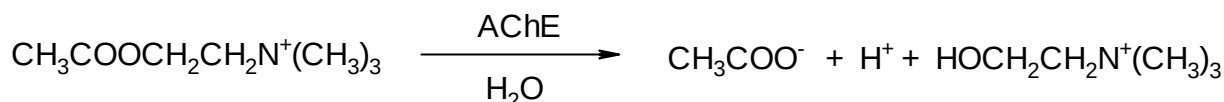


Schéma 1: Enzymová hydrolýza acetylcholinu

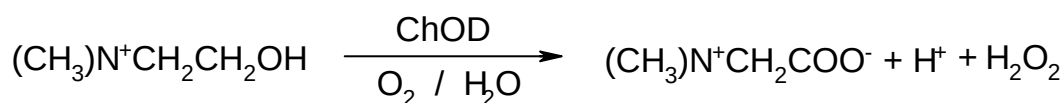


Schéma 2: Oxidace cholinu cholinoxidázou

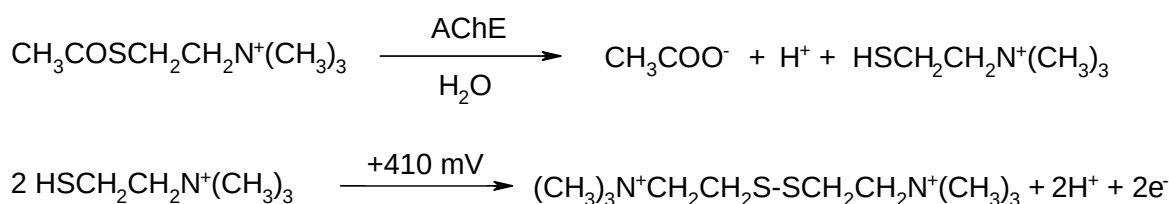


Schéma 3: Enzymová hydrolýza acetylthiocholinu a následná oxidace vloženým napětím

v případě využití acetylthiocholinu namísto acetylcholinu. Acetylthiocholin je v přítomnosti AChE hydrolyzován na thiocholin a kyselinu octovou. Při vloženém napětí do reakční směsi vznikající thiocholin podstupuje oxidoredukční reakci. Celkový princip můžeme vyjádřit následovně (viz schéma 3).

Na tomto principu fungující biosenzor využíval AChE imobilizovanou na Pt elektrodu a Ag/AgCl referenční elektrodu, mezi elektrody byl vložen potenciál +410 mV (40). V jiné aplikaci byla pracovní elektroda tvořena grafitovým kompozitem a vkládalo se na ní napětí +700 mV proti Ag/AgCl referenční elektrodě (18).

Thiocholin vznikající z acetylthiocholinu může být využit i optickými biosenzory. V tomto případě se do reakční směsi přidává 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), známá pod názvem Ellmanovo činidlo. Nárůst absorbance je pozorován při 412 nm díky vznikající 2-nitro-5-merkaptobenzoové kyselině (viz schéma 4). Optický biosenzor využívající Ellmanovo činidlo byl využit např. pro reálné stanovení insekticidů (30).

Některé optické metody, zejména ty založené na nelineární optice, jsou schopné pracovat bez přítomnosti chromogenu. Měřicí metoda je pak založena na sledování konformačních změn použité cholinesterázy, případně na adsorpci produkovaného thiocholinu (14).

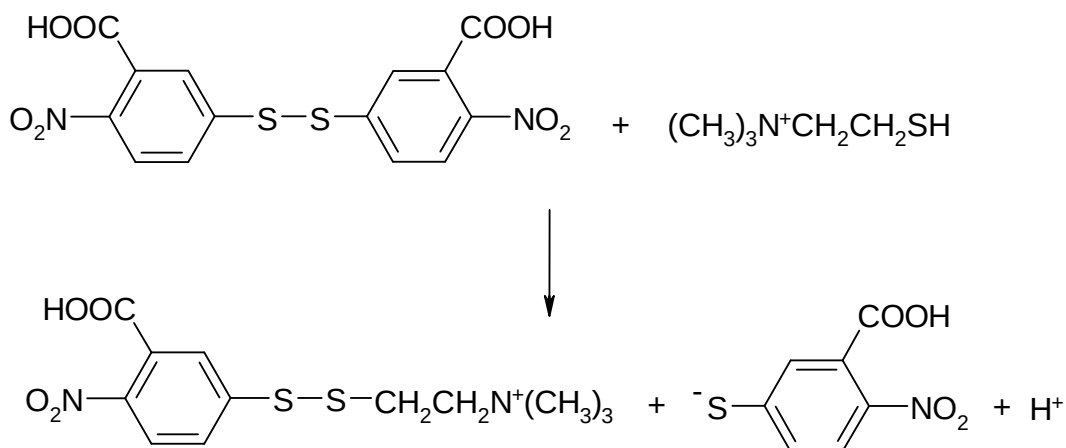


Schéma 4: Reakce Ellmanova činidla s thiocholinem

Imobilizace

Pro konstrukci biosenzorů se využívá široká škála fyzikálně-chemických převodníků a tomu odpovídá i množství různých imobilizačních technologií. V některých případech je možné jednoduše zachytit cholinesterázu do uhlíkové pasty (31) nebo na povrch hlazeného uhlíku (37). Elektrochemické vlastnosti elektrod lze vylepšit tzv. modifikantem. Uhlíkovou pastu lze modifikovat tetrakyanochinondimetanem, tato úprava umožnila amperometrické vyhodnocení s vloženým napětím zmenšeným na +300 mV proti Ag/AgCl referenční elektrodě (19). Cholinesteráza byla zachycena i v grafitové pastě amperometrické elektrody s přidavkem modifikantu kobalt ftalokyaninu a stabilizované celulózy (33, 36), v jiné obdobné aplikaci byl namísto kobalt ftalokyaninu použit modifikant pruská modř (4). Poly(diallyldimethylammonium) chloridová membrána s mechanicky zachycenou AChE na grafitovém povrchu umožnila snížit vložené napětí v klasickém amperometrickém uspořádání až na +150 mV (15).

Potenciometrický biosenzor využívající jako převodník LAPS (light-addressable potentiometric sensor) byl testován s cholinesterázou imobilizovanou do akrylamidové membrány (22), v jiné práci byla směs obsahující albumin, AChE a modifikant (pruská modř) imobilizována na povrch síťotiskové uhlíkové elektrody za použití Nafion membrány (38). Další úspěšně testovanou metodou imobilizace AChE bylo zachycení do polyvinyl alkoholu nesoucího styrylpyridinium (PVA-SbQ) (6). V jiné aplikaci využívající PVA-SbQ byly analytické parametry biosenzoru vylepšeny modifikantem 7,7,8,8-tetra-

kyanochinondimetanem (24). Vhodnou možností k imobilizaci cholinesterázy se jeví i nylonová vlákna, na něž byla například s úspěchem vázána směs obsahující AChE, albumin a glutaraldehyd, celá biorekogniční složka byla překryta celofánovou membránou (9).

Při výběru fyzikálně-chemického převodníku pro amperometrické biosenzory jsou často vybírány platinové elektrody. Platinový povrch je stabilní a neúčastní se nežádoucích chemických reakcí se složkami reakční směsi. Imobilizační postup je relativně jednoduchý. Směs obsahující cholinesterázu, albumin a glutaraldehyd – stejně jako ve výše uvedené imobilizaci na nylonová vlákna – se injektuje na povrch a nechá se pozvolně vyschnout. Na tomto principu konstruované biosenzory byly například použity pro stanovení pesticidů ve vodě a některých potravinových komoditách (35, 25). Při konstrukci amperometrických biosenzorů bývá obvykle dosaženo dobrých výsledků i se zlatými elektrodami, nicméně v případě cholinesteráz a použití thiocholinu je značná nevýhoda v samovolné reakci thiocholinu se zlatým povrchem. V nedávné době byl zkonstruován optický biosenzor pracující na principu SPR (surface plasmon resonance) využívající chemickou reakci mezi zlatým povrchem a thiocholinem jako zdroj signálu (14).

Závěr

Schopnost některých látek specificky inhibovat enzymovou aktivitu může být využita k jejich stanovení. V tomto článku se diskutovalo o některých možnostech konstrukce biosenzorů využívajících

cholinesterázy jako biorekogniční složky pro stanovení jejich specifických inhibitorů: organofosfátů a karbamátů. Následně byly představeny možnosti vizualizace reakce katalyzované cholinesterázou a některé možnosti imobilizace cholinesteráz. Zvážení výše uvedených parametrů by mělo předcházet navrhování nových účinnějších biosenzorů na bázi cholinesteráz.

Poděkování

Tato práce je podporována grantem Ministerstva průmyslu a obchodu ČR: No.2A-1TP1/007

Literatura

1. ABAD, JM. – PARIENTE, F. – HERNANDEZ, L., et al. Determination of organophosphorous and carbamate pesticides using piezoelectric biosensors. *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, no. 14, p. 2848–2855.
2. BACHMANN, TT. – SCHMID, RD. A disposable multi-electrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxin and carbofuran at high resolution. *Anal. Chim. Acta*, 1999, vol. 401, no. 1, p. 95–103.
3. CHOI, JW. – KIM, YK. – LEE, IH., et al. Optical organophosphorus biosensor consisting of acetylcholinesterase/viologen hetero Langmuir-Blodgett film. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, vol. 16, no. 9, p. 937–943.
4. CIUCU, A. – CIUCU, C. Organic phase amperometric biosensor for detection of pesticides. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 2002, vol. 7, no. 2, p. 667–676.
5. DANET, AF. – BADEA, M. – MARTY, JL., et al. Flow analysis for determination of paraoxon with use of immobilized acetylcholinesterase reactor and new type of chemiluminescent reaction. *Biopolymers*, 2000, vol. 57, no. 1, p. 37–42.
6. DEVIC, E. – LI, D. – DAUTA, A., et al. Detection of anatoxin-a(s) in environmental samples of cyanobacteria by using a biosensor with engineered acetylcholinesterase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, vol. 68, no. 8, p. 4102–4106.
7. FLORES, F. – ARTIGAS, J. – MARTY, JL., et al. Development of an EnFET for the detection of organophosphorous and carbamate insecticides. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol. 376, no. 4, p. 476–480.
8. GHINDILIS, AL. – MORZUNOVA, HC. – BARMIN, AV., et al. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis. *Biosens. Bioelectron.*, 1996, vol. 11, no. 8, p. 837–880.
9. GULLA, KC. – GOUDA, MD. – THAKUR, MS., et al. Reactivation of immobilized acetyl cholinesterase in an amperometric biosensor for organophosphorus pesticide. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, vol. 1597, no. 1, p. 133–139.
10. KUČA, K. – JUN, D. – BAJGAR, J. Currently used cholinesterase reactivators against nerve agent intoxication: comparison of their effectivity in vitro. *Drug. Chem. Toxicol.*, 2007, vol. 30, no. 1, p. 31–40.
11. KUČA, K. – PATOČKA, J. – CABAL, J., et al. Reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase by quaternary pyridinium aldoximes. *Neurotox. Res.*, 2004, vol. 6, no. 7, p. 565–570.
12. LEE, HS. – KIM, YA. – CHO, YA., et al. Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere*, 2002, vol. 46, no. 4, p. 571–576.
13. LEE, HS. – KIM, YA. – CHUNG, DH., et al. Determination of carbamate pesticides by a cholinesterase-based flow injection biosensor. *Int. J. Food Sci. & Tech.*, 2001, vol. 36, no. 3, p. 263–269.
14. LIN, TJ. – HUANG, KT. – LIU, CY. Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 22, no. 4, p. 513–518.
15. LIU, G. – LIN, Y. Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, no. 4, p. 835–843.
16. MAIN, A. – SOUCIE, W. – BUXTON, I., et al. The purification of cholinesterase from horse serum. *Biochem. J.*, 1974, vol. 143, no. 3, p. 733–744.
17. MAKOWER, A. – HALÁMEK, J. – SKLÁDAL, P., et al. New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezoelectric biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, vol. 18, no. 11, p. 1329–1337.
18. MARTORELL, D. – CÉSPEDES, F. – MARTÍNEZ-FABREGAS, E., et al. Amperometric determination of pesticides using a biosensor based on a polishable graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta*, 1994, vol. 290, no. 3, p. 343–348.
19. MARTORELL, D. – CÉSPEDES, F. – MARTÍNEZ-FABREGAS, E., et al. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a biosensor based on a polishable, 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane-modified, graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta*, 1997, vol. 337, no. 3, p. 305–313.
20. MERCURIO-ZAPPALA, M. – HACK, JB. – SALVADOR, A., et al. Pralidoxime in carbaryl poisoning: an animal model. *Hum. Exp. Toxicol.*, 2007, vol. 26, no. 2, p. 125–129.
21. MIZUTANI, F. – TSUDA, K. Amperometric determination of cholinesterase with use of an immobilized enzyme electrode. *Anal. Chim. Acta*, 1982, vol. 139, no. 1, p. 359–362.
22. MOURZINA, IG. – YOSHINOBU, T. – ERMOLENKO, YE., et al. Immobilization of urease and cholinesterase on the surface of semiconductor transducer for the development of light-addressable potentiometric sensors. *Microchim. Acta*, 2004, vol. 144, no. 1, p. 41–50.
23. NEWMARK, J. Nerve agents. *Neurologist*, 2007, vol. 13, no. 1, p. 20–32.
24. NUNES, GS. – JEANTY, G. – MARTY, JL. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. *Anal. Chim. Acta*, 2004, vol. 523, no. 1, p. 107–115.
25. OKAZAKI, S. – NAKAGAWA, H. – FUKUDA, K., et al. Re-activation of an amperometric organophosphate pesticide biosensor by 2-pyridinealdoxime methochloride. *Sens. Actuat. B*, 2000, vol. 66, no. 1, p. 131–134.

26. PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 2004, vol. 47, no. 4, p. 215–228.
27. PATOČKA, J. – CABAL, J. – KUČA, K., et al. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus ester: *In vitro* kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.*, 2005, vol. 3, no. 2, p. 91–99.
28. POHANKA, M. – KUČA, K. – JUN, D. Biosenzory pro stanovení nervově-paralytických látek. *Zprav. voj. Farm.*, 2007, roč. 17, č. 1, s. 3–5.
29. SCHUMACHER, M. – CAMP, S. – MAULET, Y., et al. Primary structure of *Topedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature*, 1986, vol. 319, no. 6052, p. 407–409.
30. SIADAT, OR. – LOUGARRE, A. – LAMOUREUX, A., et al. The effect of engineered disulfide bonds on the stability of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase. *BMC Biochem.*, 2006, vol. 7, no. 12, p. 1–7.
31. SKLÁDAL, P. Determination of organophosphate and carbamate pesticides using a cobalt phthalocyanine-modified carbon paste electrode and a cholinesterase enzyme membrane. *Anal. Chim. Acta*, 1991, vol. 252, no. 1, p. 11–15.
32. SKLÁDAL, P. Detection of organophosphate and carbamate pesticides using disposable biosensors based on chemically modified electrodes and immobilized cholinesterase. *Anal. Chim. Acta*, 1992, vol. 269, no. 2, p. 281–287.
33. SKLÁDAL, P. Compensation of temperature variations disturbing performance of an amperometric biosensor for continuous monitoring. *Sens. Actuat. B*, 1995, vol. 28, no. 1, p. 59–62.
34. SKLÁDAL, P. Biosensors based on cholinesterase for detection of pesticides. *Food Technol. Biotechnol.*, 1996, vol. 34, no. 1, p. 43–49.
35. SKLÁDAL, P. – KREJČÍ, J. Performance of the amperometric biosensor with immobilized butyrylcholinesterase in organic solvents. *Collect. Czech Chem. Commun.*, 1996, vol. 61, no. 7, p. 985–991.
36. SKLÁDAL, P. – NUNES, GS. – YAMANAKA, H., et al. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensor. *Electroanalysis*, 1997, vol. 9, no. 14, p. 1083–1087.
37. SOTIROPOULOU, S. – CHANIOTAKIS, NA. Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 530, no. 2, p. 199–204.
38. SUPRUN, E. – EVTUGYN, G. – BUDNIKOV, H., et al. Acetylcholinesterase sensor based on screen-printed carbon electrode modified with prussian blue. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 383, no. 4, p. 597–604.
39. TIMUR, S. – TELEFONCU, A. Acetylcholinesterase (AChE) electrodes based on gelatin and chitosan matrices for the pesticide detection. *Artif. Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol.*, 2004, vol. 32, no. 3, p. 427–442.
40. TURDEAN, GL. – POPESCU, IC. – ONICIU, L., et al. Sensitive detection of organophosphorus pesticides using a needle type amperometric acetylcholinesterase-based bioelectrode. Thiocholine electrochemistry and immobilized enzyme inhibition. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2002, vol. 17, no. 2, p. 107–115.
41. VILLATE, F. – SCHULZE, H. – SCHMID, RD., et al. A disposable acetylcholinesterase-based electrode biosensor to detect anatoxin-a(s) in water. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 372, no. 2, p. 322–326.
42. YAO, T. Flow injection analysis for cholinesterase in blood serum by use of a choline-sensitive electrode as an amperometric detector. *Anal. Chim. Acta*, 1983, vol. 153, no. 1, p. 169–174.

Korespondence: Npor. RNDr. Miroslav Pohanka
Ústřední vojenský zdravotní ústav
Centrum biologické ochrany
561 66 Těchonín
e-mail: rau@atlas.cz

Do redakce došlo 12. 6. 2007