

## **FOTOGRAFICKÁ DETEKCE JAKO NÁSTROJ STANOVENÍ INHIBITORŮ CHOLINESTERAS**

Adam Kostelník<sup>1</sup>, Alexander Čegan<sup>1</sup> a Miroslav Pohanka<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita  
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

<sup>2</sup>*Katedra molekulární biologie a patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita  
obran, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové*

### **Abstract**

Smartphones are widely spread in today's society and they were successfully used in analytical chemistry as a simple detection tool. This work focuses on immobilization of acetylcholinesterase onto commercial pH strips with stabilization in gelatin membrane and use smartphone as detection tool. AChE cleaves acetylcholine into choline and acetate, which causes color change of acid-base indicator, while inhibitors block this process. Measurement was performed on 3D printed stand followed by photography evaluating in computer via RGB channels.

### **Souhrn**

Smartphony jsou v dnešní společnosti široce rozšířeny a s úspěchem již byly využity i v analytické chemie jako jednoduché detekční zařízení. Tato práce se zaměřuje na imobilizaci acetylcholinesterasy (AChE) na povrch komerčních pH proužků se stabilizací v želatinové membráně a využití smartphonu jako detekčního prvku. AChE rozkládá acetylcholin na cholin a acetát, který způsobuje barevný přechod indikátoru, cholinesterasové inhibitory tento proces blokují. Měření proběhlo na 3D tištěném stojanu s následným vyhodnocením fotografií v počítači použitím RGB bodů.

## **1. Úvod**

AChE je enzym štěpící v cholinergním systému acetylcholin na cholin a acetát čímž ukončuje nervových přenos [1]. Nejběžněji využívaná metoda pro stanovení enzymové aktivity je založena na reakci Ellmanova činidla s thiocholinem, rozkladného produktu acetylthiocholín, za vzniku žlutého zbarvení poskytovaného 5-thio-2-nitrobenzoovou kyselinou, které je spektrofotometricky měřitelné při 412 nm [2]. Další možností je elektrochemické stanovení [3,4] nebo použití acidobazických indikátorů [5,6]. Rovněž pro imobilizaci enzymů bylo navrženo bezpočet postupů a matric, včetně želatiny [7-9]. Prostá fyzikální adsorpce na povrch celulózy se stabilizací v želatinové membráně již byla v minulosti s úspěchem použita pro přípravu biosenzorů na bázi AChE [10,11]. Smartphony

jsou dnes široce rozšířeným zařízením a v některých oblastech analytické chemie již byly úspěšně využity i díky nenáročnosti jejich obsluhy [12,13]. Tato práce je zaměřena na přípravu biosenzoru s imobilizovanou AChE na povrchu pH proužků se stabilizací v želatinové membráně. Funkčnost biosenzoru byla ověřena použitím standardních roztoků inhibitorů i na reálných vzorcích a validována standardním spektrofotometrickým testem podle Ellmana. Hlavní předností biosenzoru je možnost spojení se smartphonem, jakožto detekčním zařízením, umožňující využití např. v méně vybavených laboratořích či v terénních podmínkách.

## **2. Experimentální část**

### **2.1 Materiál a zařízení**

AChE z elektrického úhoře, acetylcholin chlorid (AChCl), acetylthiocholine (ATChCl), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (DTNB), donepezil, galantamin, tetraisopropyl pyrofosforamid (iso-OMPA) a fosfátový pufr pH 7,4 dodala firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), želatinu firma PENTA (Praha, Česká republika), pH proužky firma Macherey-Nagel (Düren, Německo), 3D tiskárna Prusa i3 od Prusa Research (Praha, Česká republika). Použitý smartphone Sony Xperia s 5Mpx fotoaparátem a LED světlem.

### **2.2 Příprava pH proužku s kotvenou AChE**

Na povrch proužku bylo nanášeno 10  $\mu$ l AChE (aktivita 26 U), která se ponechala zaschnout při laboratorní teplotě. Poté byl proužek překryt vrstvou 10  $\mu$ l 1% želatiny a po zaschnutí při laboratorní teplotě byl až do použití skladován při teplotě 4  $^{\circ}$ C.

### **2.3 Měření se smartphonem**

Do mikrokumavky bylo napipetováno 450  $\mu$ l PBS 7,4 a 50  $\mu$ l 10 mM AChCl a proužek byl do tohoto roztoku ponořen. Po 15 min reakce byl proužek vyjmut, osušen od přebytečného reakčního média a smartphonem umístěným na 3D tištěném stojanu zaznamenána barevná změna. Stojan zajišťoval konstantní vzdálenost od podložky a zároveň plnil funkci tmavé komory, aby nedocházelo k ovlivnění fotografie okolními světelnými podmínkami.

### **2.4 Standardní Ellmanova metoda**

Pro validaci metody bylo provedeno měření standardní spektrofotometrickou metodou podle Ellmana. Do kyvety bylo postupně pipetováno 400  $\mu$ l DTNB, 25  $\mu$ l AChE, 475  $\mu$ l PBS 7,4

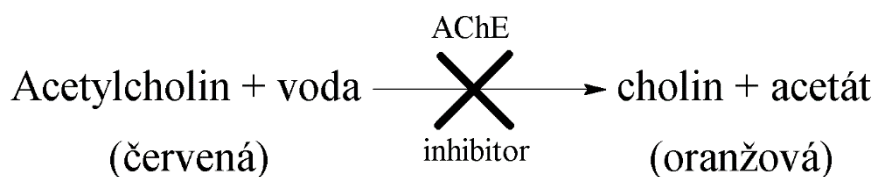
a 100  $\mu$ l ATChCl. Absorbance směsi byla proměřena ihned po přidavku substrátu a poté po 2 min reakce, rozdíl absorbancí odpovídá aktivitě enzymu.

## 2.5 Zpracování fotografií získaných smartphonem

Fotografie pořízené smartphonem byly dále zpracovány v počítači, kde byly v programu GIMP 2.8.16 získány hodnoty RGB (červená – zelená – modrá) bodů. Rozdíl barevné změny vynášený na ose Y byl získán následovně: Intenzita zbarvení před enzymovou reakcí – Intenzita zbarvení po enzymové reakci. Tento rozdíl odpovídá enzymové aktivitě při různých koncentracích substrátu nebo inhibitoru.

## 3. Výsledky a diskuze

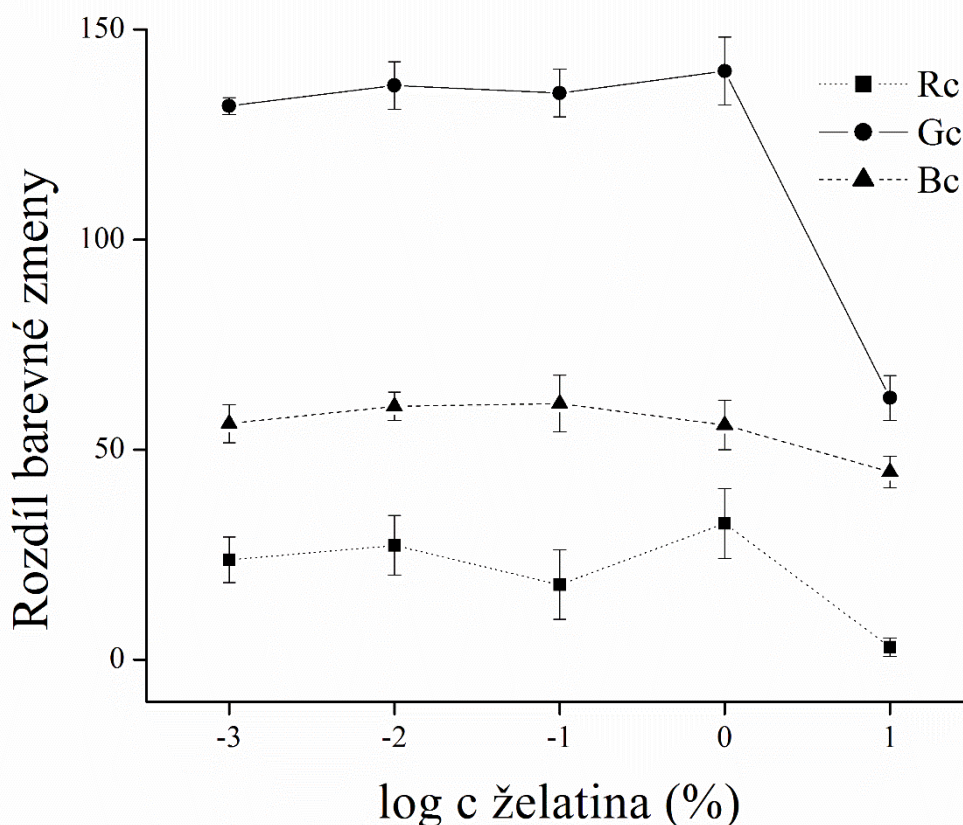
Metoda je založena na barevném přechodu indikátoru v pH citlivé zóně proužku z červené do oranžové (obr. 1). Barevná změna byla hodnocena ve všech třech barevných kanálech, nicméně pro další hodnocení byl sledován pouze zelený kanál, jelikož červený a modrý zůstaly beze změny.



Obrázek 1. Princip reakce využívající pH citlivých proužků.

### 3.1 Optimalizace množství želatiny

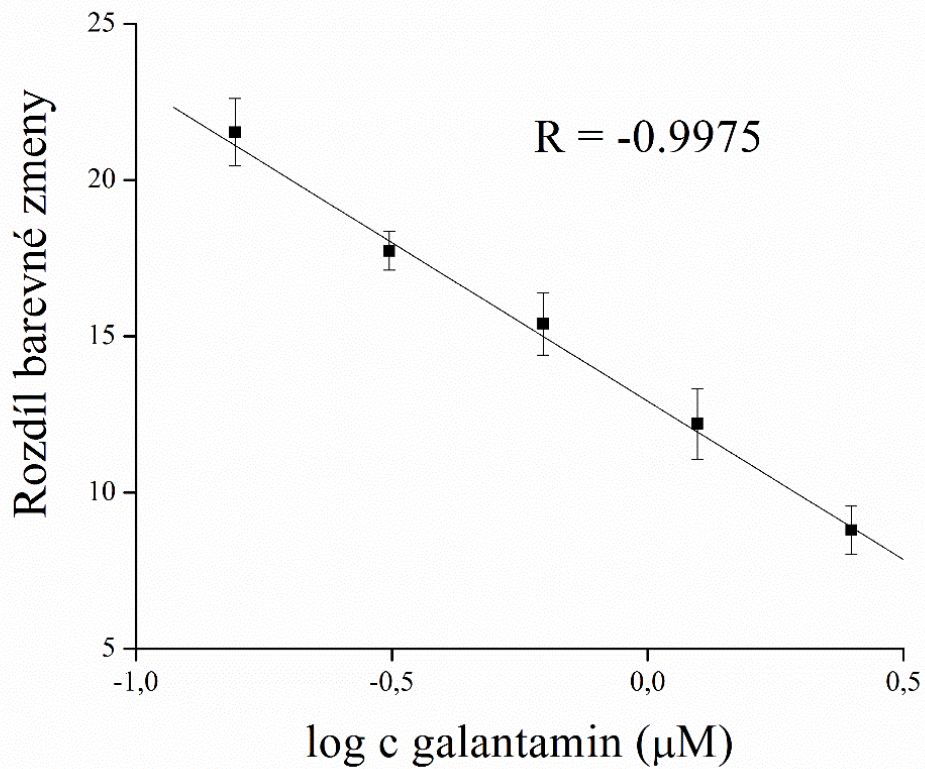
Želatina byla testována v koncentracích 0 %, 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 % a 10 %. Na povrch proužku bylo vždy nanášeno 10  $\mu$ l a následně byl proužek ponořen do PBS 7,4 a byl sledován barevný přechod do červené barvy (obr. 2). Želatina o koncentraci 10 % se ukázala jako nevhodná, jelikož zamezovala přístupu pufru na povrch proužku (na obrázku reprezentovaný poklesem rozdílu barevné změny v zeleném kanále). Koncentrace želatiny 1 % a menší již přístupu pufru k proužku nebránily, pro další měření byla proto zvolena želatina o koncentraci 1 %.



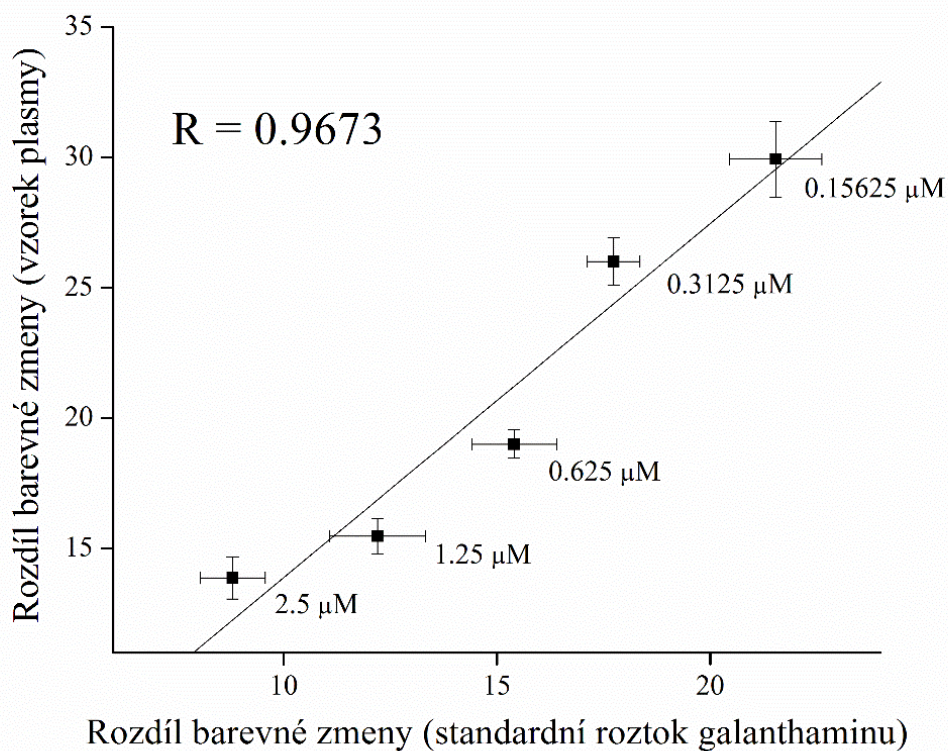
**Obrázek 2.** Optimalizace množství želatiny. Chybové úsečky pro  $n = 3 \pm \text{SEM}$ . Rc = červený kanál, Gc = zelený kanál, Bc = modrý kanál.

### 3.2 Měření inhibitorů

AChE je citlivá k neurotoickým látkám jako jsou léky, nervově paralytické látky či pesticidy. Některé z těchto látek jsou používány v léčbě Alzheimerovi nemoci [14]. Galantamin a donepezil můžeme uvést jako příklad v současnosti používaných látek [15]. Pro galantamin byla sestrojena kalibrační závislost v koncentračním rozmezí 0,156 až 2,5  $\mu\text{M}$  s LOD 149 nM (obr. 3). Podobných výsledků bylo dosaženo i dříve při měření koncentrace galantaminu cestou inhibice AChE [16,17]. Validace měření pro galantamin byla provedena Ellmanovou metodou s korelačním koeficientem 0,9922. Funkčnost metody byla ověřena na reálném vzorku plasmy (obr. 4). Tu bylo potřeba ošetřit přidavkem iso-OMPA, selektivním inhibitorem butyrylcholinesterasy, která je v plasmě fyziologicky přítomna a vykazuje afinitu k použitému substrátu.

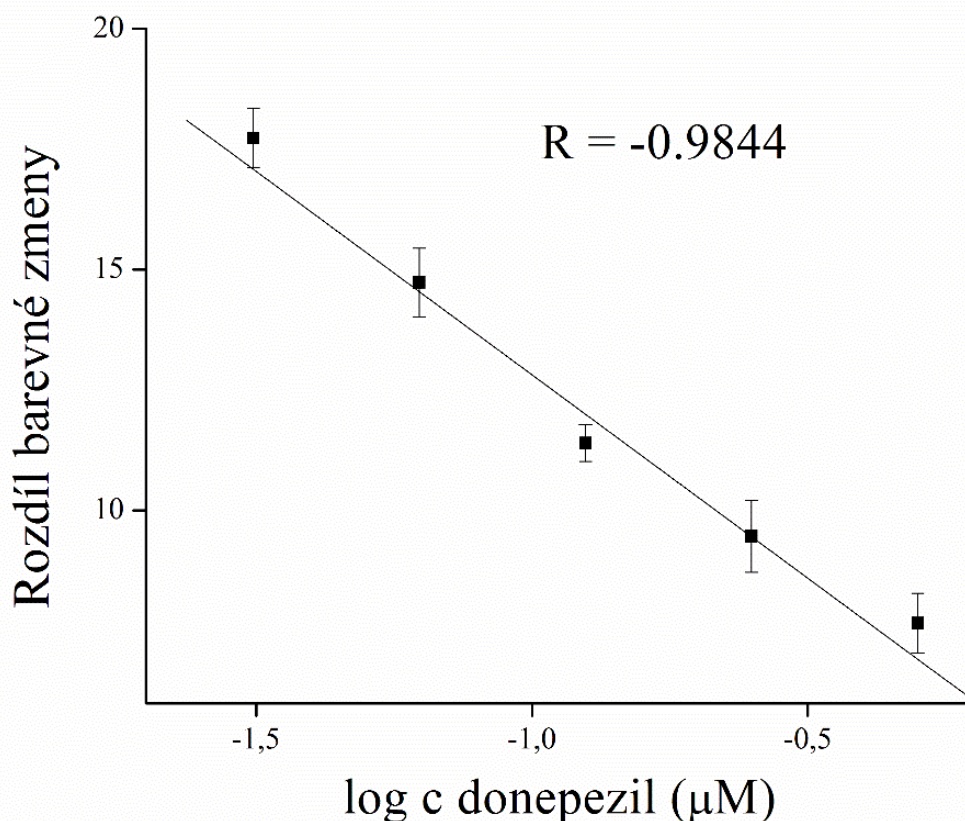


**Obrázek 3.** Kalibrační křivka galantaminu. Chybové úsečky pro  $n = 3 \pm \text{SEM}$ .



**Obrázek 4.** Korelační křivka standardního roztoku galantaminu vs. vzorek plasmy. Chybové úsečky pro  $n = 3 \pm \text{SEM}$ .

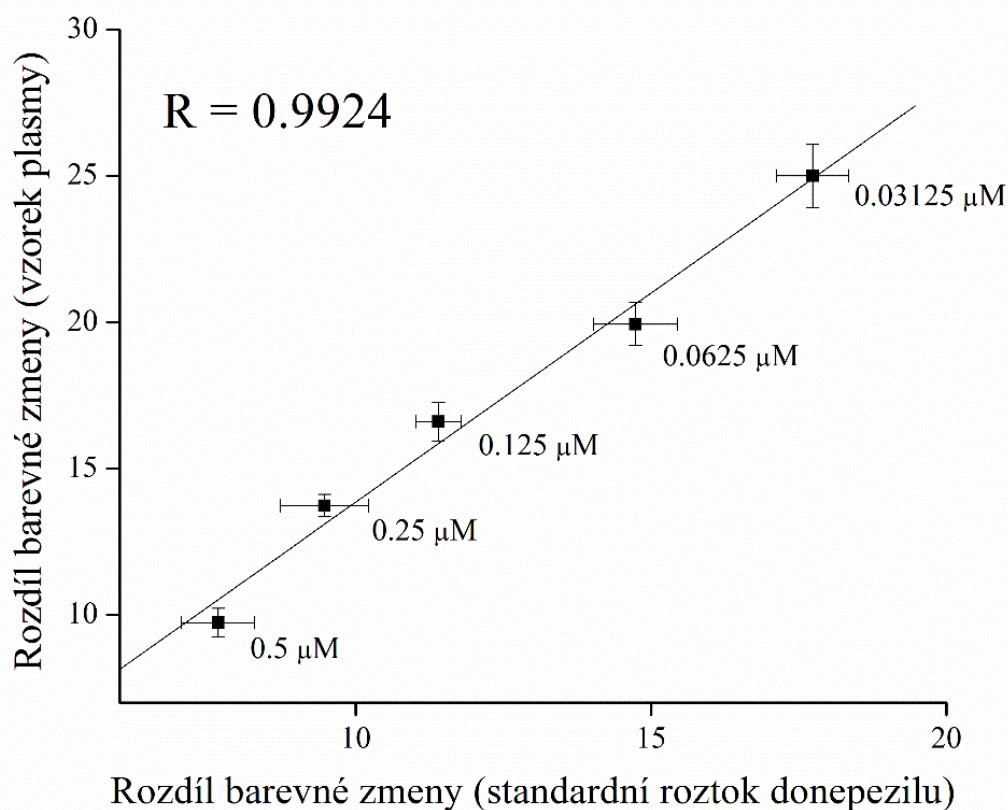
Pro stanovení donepezilu bylo vyvinuto množství chromatografických [18,19], stejně jako elektrochemických [20,21] či spektrofotometrických metod [22,23]. Nicméně nebyla nalezena zmínka o stanovení donepezilu prostřednictvím inhibice AChE. Byla sestrojena kalibrační křivka donepezilu v rozmezí koncentrací 0,031 až 0,5  $\mu\text{M}$  s LOD 22,3 nM (obr. 5). Validace byla provedena standardní Ellmanovou metodou s korelačním koeficientem 0,9895. Taktéž pro donepezil byla použitelnost metody ověřena na vzorku plasmy (obr. 6).



**Obrázek 5.** Kalibrační křivka donepezilu. Chybové úsečky pro  $n = 3 \pm \text{SEM}$ .

#### 4. Závěr

AChE byla imobilizována na povrch pH proužku a zastabilizována v želatinové membráně. Takto upravený proužek poté sloužil k měření cholinesterasových inhibitorů galantaminu a donepezilu s detekčními limity 149 nM, resp. 22,3 nM. Metoda byla úspěšně validována za pomoci standardní spektrofotometrické metody a ověřena na vzorcích plasmy. Výhodou metody je jednoduchost, nízká cena, rychlost, a především nepotřeba specializovaného laboratorního vybavení umožňující měření i v terénních podmínkách. Zde prezentované výsledky jsou pouze shrnutím, celá problematika je podrobněji popsána v publikovaném rukopise [24].



**Obrázek 6.** Korelační křivka standardního roztoku donepezilu vs. vzorek plasmy. Chybové úsečky pro  $n = 3 \pm \text{SEM}$ .

### Poděkování

Tato práce byla podpořena z Dlouhodobého výzkumného záměru č. 1011 (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany) a grantem SGSFCHT\_2017\_004.

### Literatura

1. M. Pohanka: *Biomedical Papers* **155** (2011) 219-223.
2. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres jr., R.M. Featherstone: *Biochemical Pharmacology* **7** (1961) 88-95.
3. A. Kostelnik, A. Cegan, M. Pohanka: *International Journal of Electrochemical Science* **11** (2016) 4840-4849.
4. A. Kostelnik, P. Kopel, A. Cegan, M. Pohanka: *Sensors* **17** (2017) 676-688.
5. A. Kostelnik, A. Cegan, M. Pohanka: *Sensors* **16** (2016) 1212-1222.
6. F. Morís-Varas, A. Shah, J. Aikens, N.P. Nadkarni, J.D. Rozzell, D.C. Demirjian: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7** (1999) 2183-2188.

7. S. Timur, A. Telefoncu: *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **32** (2004) 427-442.
8. M. Mogharabi, N. Nassiri-Koopaei, M. Bozorgi-Koushalshahi, N. Nafissi-Varcheh, G. Bagherzadeh, M.A. Faramarzi: *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2012** (2012) 6.
9. R. A. Sheldon: *Advanced Synthesis & Catalysis* **349** (2007) 1289-1307.
10. M. Pohanka: *Analytical Letters* **45** (2012) 367-374.
11. M. Pohanka: *Analytical Letters* **46** (2013) 1849-1868.
12. Y. Lu, W. Shi, J. Qin, B. Lin: *Electrophoresis* **30** (2009) 579-582.
13. M. Pohanka: *Sensors* **15** (2015) 13752-13762.
14. M. Pohanka, M. Hrabínová, J. Fusek, D. Hynek, V. Adam, J. Hubálek, R. Kizek: *International Journal of Electrochemical Science* **7** (2012) 50-57.
15. J.I. da Silva, M.C. de Moraes, L.C.C. Vieira, A.G. Corrêa, Q.B. Cass, C.L. Cardoso: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **73** (2013) 44-52.
16. B.J. White, J. Andrew Legako, H. James Harmon: *Sensors and Actuators B: Chemical* **89** (2003) 107-111.
17. M. Cuartero, M.S. García, F. García-Cánovas, J.Á. Ortuño: *Talanta* **110** (2013) 8-14.
18. N. Yasui-Furukori, R. Furuya, T. Takahata, T. Tateishi: *Journal of Chromatography B* **768** (2002) 261-265.
19. C. Apostolou, Y. Dotsikas, C. Kousoulos, Y.L. Loukas: *Journal of Chromatography B* **848** (2007) 239-244.
20. A. Golcu, S.A. Ozkan, *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **61** (2006) 760-765.
21. E. M. Ghoneim, M.A. El-Attar, M.M. Ghoneim: *Chemia Analytyczna* **54** (2009) 389-402.
22. M. Yasir, U. Sara: *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **6** (2014) 128-131.
23. C. Patel, N. Patel, C. Kothari: *Journal of Young Pharmacists* **6** (2014) 47-50.
24. A. Kostelnik, A. Cegan, M. Pohanka: *International Journal of Analytical Chemistry* **2017** (2017) 8.