

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra analytické chemie

Analýza klinicky významných tělních
tekutin pomocí elektrochemických
biosenzorů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Petra Davidová

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2016

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Analytical Chemistry

Analysis of clinically significant body
fluids by electrochemical biosensors

BACHELOR WORK

AUTHOR: Petra Davidová

SUPERVISOR: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2016

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Davidová**
Osobní číslo: **C12536**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Analýza klinicky významných tělních tekutin pomocí elektrochemických biosenzorů**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Z dostupné literatury zpracujte rešerši obsahující základní charakterizaci enzymových elektrochemických biosenzorů pro stanovení klinicky významných látek. Klasifikujte a detailně popište ty enzymy, které lze eventuálně použít při konstrukci výše zmíněných biologických čidel.
2. Zaměřte se především na analýzu metabolitů vyskytujících se v tělních tekutinách, ať už se jedná o přímou katalýzu přítomným enzymem či inhibici. Ve vaší bakalářské práci prosím použijte přehledné tabulky a ilustруйте patřičnými mechanismy enzymatických reakcí.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexandr Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 26. 6. 2016

Petra Davidová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu této bakalářské práce, Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D., za poskytnutí odborných rad a nezbytných konzultací. Dále bych chtěla poděkovat všem ostatním, kteří mě během mé práce podporovali.

Děkuji Vám!

Souhrn

Celá bakalářská práce je věnována studiu možností využití různých enzymů k přípravě citlivých elektrochemických senzorů pro monitorování klinicky významných látek v tělních tekutinách. V úvodu jsou detailně popsány tělní tekutiny, jejich klasifikace a chemické složení. Další části jsou už věnovány katalytickým biosenzorům, klasifikaci elektrochemických převodníků a technikám potřebným pro imobilizaci enzymů. Poslední část je zaměřena na správný výběr daného enzymu a příslušného transduktoru pro stanovení konkrétní látky v některých zmíněných tělních tekutinách.

Klíčová slova

Enzym; elektrochemický převodník; biosenzor; tělní tekutina; biomarker.

Summary

The whole bachelor work is focused to study of possibilities of the different enzymes in preparation of sensitive electrochemical sensors suitable for monitoring clinically significant substances in body fluids. In the introduction, classification and chemical composition of body fluids is described in details. Other parts are already devoted at catalytic biosensors, electrochemical transducers and classification of techniques needed for the immobilization of enzymes. The last part is focused to the proper selection of an enzyme and the appropriate transducer for determination of specific substance in these mentioned body fluids.

Keywords

Enzyme; electrochemical transducer; biosensor; body fluid; biomarker.

OBSAH

| | |
|--|----|
| Seznam použitých zkratek..... | 11 |
| 1. Úvod..... | 12 |
| 2. Klinicky významné látky v tělních tekutinách..... | 13 |
| 2.1. Klasifikace tělních tekutin..... | 13 |
| 2.1.1. Krev..... | 13 |
| 2.1.2. Lymfa (míza)..... | 14 |
| 2.1.3. Mozkomíšní mok | 14 |
| 2.1.4. Moč | 14 |
| 2.1.5. Ušní maz | 15 |
| 2.1.6. Pot | 15 |
| 2.2. Klinicky významné organické látky..... | 15 |
| 2.2.1. Sacharidy..... | 16 |
| 2.2.2. Aminokyseliny | 16 |
| 2.2.3. Hormony | 16 |
| 2.2.4. Vitamíny..... | 17 |
| 2.2.5. Lipidy | 17 |
| 2.2.6. Nebílkovinné dusíkaté látky..... | 17 |
| 2.2.7. Bílkoviny..... | 18 |
| 2.2.8. Triterpeny | 19 |
| 2.2.9. Karboxylové kyseliny | 19 |
| 3. Enzymatické biosenzory | 20 |
| 3.1. Elektrochemické enzymové biosenzory..... | 21 |
| 3.1.1. Potenciometrické biosenzory | 21 |
| 3.1.2. Amperometrické biosenzory | 22 |
| 3.1.3. Konduktometrické biosenzory | 23 |
| 4. Možnosti imobilizace enzymů | 24 |
| 4.1. Přímé zakomponování do elektrodového materiálu..... | 24 |
| 4.2. Přímá adsorpce na povrch transduktoru..... | 24 |
| 4.3. Zachycení pomocí vodivého polymeru | 25 |
| 4.3.1. Klasifikace používaných polymerů..... | 26 |
| 4.3.1.1. Polyvinylalkohol (PVA)..... | 26 |
| 4.3.1.2. Hydroxyethylmethakrylát (HEMA)..... | 26 |
| 4.3.1.3. Polyuretany | 27 |

| | |
|---|----|
| 4.3.1.4. Akrylová pryskyřice..... | 27 |
| 4.3.1.5. Polyvinylchlorid (PVC) | 27 |
| 4.3.1.6. Polythiofen | 27 |
| 4.3.1.7. Polyanilin (PANI) | 27 |
| 4.3.1.8. Nafion..... | 28 |
| 4.4. Imobilizace enzymů kovalentní vazbou..... | 28 |
| 5. Využití enzymů v analýze tělních tekutin..... | 29 |
| 5.1. Základní klasifikace enzymů..... | 29 |
| 5.1.1 Oxidoreduktázy | 29 |
| 5.1.2 Transferázy..... | 29 |
| 5.1.3. Hydrolázy..... | 30 |
| 5.1.4. Lyázy..... | 30 |
| 5.1.5. Ligázy..... | 30 |
| 5.1.6. Isomerázy | 30 |
| 5.2. Elektrochemické enzymové biosenzory v analýze tělních tekutin..... | 30 |
| 6. Závěr | 33 |
| Použitá literatura | 34 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|------|---|
| ATP | adenosintrifosfát |
| ECT | extracelulární tekutiny |
| EDC | N-ethyl-N-(3-(dimethylamino)propyl) karbodiimid |
| HEMA | 2-hydroxyethylmethakrylát |
| ICT | intracelulární tekutiny |
| ISE | iontově selektivní elektroda |
| NHS | N-hydroxysukcinimid |
| PANI | polyanilin |
| PVA | polyvinylalkohol |
| PVC | polyvinylchlorid |
| T3 | trijodthyronin |
| T4 | tyroxin |
| TT | tělní tekutiny |

1. Úvod

Bakalářská práce je věnována studiu využití elektrochemických enzymových biosenzorů v analýze klinicky vyznaných látek v tělních tekutinách. Tudiž bylo nezbytné v úvodu definovat, klasifikovat, a popsat chemické složení tělních tekutin. Zastoupení organických látek v konkrétní tělní tekutině se liší v závislosti na její fyziologické funkci. Změny složení, ale i koncentrací těchto látek může poukázat na jisté změny spojené s nejrůznějšími onemocněními. Mezi tyto látky patří hormony, vitamíny, aminokyseliny, sacharidy atd.

Následující kapitola popisuje biosenzory jako analytické přístroje obsahující biologicky rozpoznávací prvek, který je připojen k fyzikálně-chemickému převodníku (transduktoru). Práce je především zaměřena na úzkou skupinu elektrochemických transduktorů. Principiálně se může jednat o potenciometrická, amperometrická či konduktometrická zařízení. Funkce jednotlivých typů transduktorů jsou vysvětleny na konkrétních případech.

Třetí kapitola se zabývá technikami potřebnými pro imobilizaci enzymů na povrch již zmíněných transduktorů. Je zcela zřejmé, že by jen tato kapitola mohla být tématem celé práce, a tudíž jsou zmíněny jen ty nejčastěji používané. V poslední a také nejdůležitější části celé bakalářské práce je vždy vypsán analyt obsažený v dané tělní tekutině a příslušný enzym s elektrochemickým převodníkem. Závěrem celé práce je shrnutí zjištěných poznatků.

2. Klinicky významné látky v tělních tekutinách

Tělní tekutiny (TT) jsou médiem mnoha důležitých látek v lidském těle, které zprostředkovávají přesuny vody a v ní obsažených látek uvnitř, dovnitř a ven z buněk, tkání a orgánů. TT lze rozlišit na intracelulární (ICT) nacházející se uvnitř buněk a extracelulární tekutiny (ECT), které zprostředkovávají transport životně nezbytných látek. V užším slova smyslu je tato bakalářská práce věnována možnostem využití katalytických biosenzorů v monitorování některých klinicky významných látek vyskytujících se právě v ECT. Tudíž je zřejmé, že některé látky budou zmíněny jen okrajově a jiným bude věnována větší pozornost.

Základem obsahu tekutin organismu je voda. V ECT jsou rozpuštěny, vázány nebo volně uloženy zdroje energie (glukóza), stavební látky (bílkoviny, aminokyseliny), minerální látky, vitamíny (látky nezbytné pro správnou funkci metabolismu), odpadní látky (produkty metabolismu), mediátory regulačních systémů (hormony), látky zodpovědné za imunitu (protilátky), dýchací plyny a bezpočet dalších látek (Darrow & Yannet, 1934).

2.1. Klasifikace tělních tekutin

Obecně lze TT klasifikovat do menších podskupin na základě jejich podobných funkcí, které mohou souviset s příjmem potravy, transportem živin, reprodukcí, vylučováním odpadních látek atd. (Squires, et al., 1951). Popis vybraných tělních tekutin včetně jejich chemického složení je uveden v odpovídajících kapitolách.

- trávicí (sliny, žaludeční šťáva, pankreatická šťáva, žluč a sekret střeva)
- transportní (krev, tkáňový mok a lymfa)
- odpadní (moč, pot a slzy)
- ochrannou funkci (hlen, slzy, ušní maz a plodová voda)
- reprodukční (ejakulát, vaginální lubrikace, poševní sekret atd.)
- vyživovací (mateřské mléko)

2.1.1. Krev

Krev lze definovat jako červenou viskózní kapalinu proudící uvnitř cévního oběhu. Poskytuje tělu živiny, transport kyslíku a odstraňování odpadních látek. Hlavní součástí krve

je plazma, červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky. V krvi je obsaženo velké množství klinicky významných látek jako např. minerály, glukóza, kreatinin, kyselina močová, vitamíny, dopamin (Lee & Chen, 2004), močovina, aminokyseliny (Folin, 1922), hormony (Nathanielsz, 1970), cholesterol a triacylglyceroly (Menezes, et al., 2015).

2.1.2. Lymfa (míza)

Lymfa vzniká v mezibuněčných prostorech z tkáňového moku, je to bezbarvá nebo nažloutlá tekutina, která obsahuje jen málo bílkovin. Sbírá se do mízních vlasečnic a pokračuje dále širšími cévami, kde se na různých místech nacházejí lymfatické uzliny. Jejím úkolem je odfiltrovat bakterie, viry, rakovinné buňky a jiné nežádoucí látky z těla. Z tohoto důvodu je zřejmé, že lymfa je bohatá na přítomnost bílých krvinek (Stamper & Woodruff, 1976). V menším množství obsahuje také albumin, kde ale jeho stanovení úzce souvisí se stanovením v krvi (Zarins, et al., 1978).

2.1.3. Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok, též známý jako likvor, je čirá a bezbarvá tekutina, která je produkována z arteriální krve v plexus choroideus (Rao, et al., 1999) z mozkových komor, ale i z mozkových kapilár a podél komorových stěn. Chrání proti infekci, podporuje žilní dutinu, vyživuje a zabezpečuje mozek a míchu. Tato tělní tekutina je bohatá na bílkoviny, albuminy tak i globuliny (Ganrot & Laurell, 1974) a laktát (Vries, et al., 2001).

2.1.4. Moč

Moč je čirá tekutina vylučována ledvinami se specifickým zápachem, který může být až čpavý uvolněním amoniaku při mikrobiálním rozkladu močoviny. Charakteristické žluté zabarvení je způsobené přítomným urochromem. Pro lidský organismus je moč primárním způsobem vylučování rozpuštěných odpadních látek tělesného metabolismu, produktů rozkladů odumřelých buněk a krevních částic, přebytečných či nevyužitých stopových prvků, vitamínů, hormonů, pro organismus nevhodných chemických látek a toxinů z těla atd. V moči se dá stanovit mnoho klinicky významných látek, za zmínku stojí kyselina močová, glukóza, kreatinin, kyselina askorbová, dopamin (Lee & Chen, 2004), bilirubin (Naumann, 1936),

močovina, amoniak (Cuthbertson, 1930) atd. Jejich přítomnost nebo vysoká či nízká hladina může o ledasčem napovídat, především pak při lékařském vyšetření.

2.1.5. Ušní maz

Ušní maz je žlutohnědý sekret produkovaný drobnými žlázami, který chrání citlivou kůži vnějšího zvukovodu. Svou přítomností působí jako štít mezi bubínkem a vnějším světem, a tak udržuje správné prostředí v uchu. Do zvukovodu se často dostávají různé nečistoty, jako prach, špína, pyl, odumřelá povrchová vrstva kůže, uvolněné chlupy atd. Ty smícháním produktů výše zmíněných žláz představují nám známý voskovitý maz, který je bohatý především na látky jako cholesterol, skvalen, lanosterol a v malém množství triacylglyceroly. Za normálních okolností je tento maz po svém vzniku posouvám směrem k zevnímu ústí zvukovodu, kde vypadne i se všemi nečistotami (Schwaab, et al., 2009).

2.1.6. Pot

Pot je produktem ekrinních potních žláz, jehož produkce je řízena vegetativním nervovým systémem. Je pro tělo důležitý z ohledu termoregulační funkce, kdy organismus prostřednictvím pocení reguluje tělesnou teplotu, aby nedošlo k přehřátí. Dále pot plní vylučovací funkci, kde s potem odchází z těla i zplodiny látkové výměny. Pot obecně udržuje nízkou hladinu pH, která slouží jako ochrana vůči mikroorganismům. Jedná se o hypotonickou tekutinu (Kreyden & Scheidegger, 2004) obsahující vodu, sůl, glukózu, kyselinu mléčnou (laktát), močovinu, kyselinu pantotenovou, alanin, kyselinu asparagovou, glycin, izoleucin, leucin, fenylalanin (Harvey, et al., 2010), kyselinu močovou, kreatinin (Huang, et al., 2002), mastné kyseliny a cholesterol (Nunome, et al., 2010).

2.2. Klinicky významné organické látky

Tato kapitola pojednává pouze o organických látkách vyskytující se ve výše popsaných tělních tekutinách, které mají význam v diagnostice onemocnění. Celá bakalářská práce je koncipována na využití enzymů k přípravě elektrochemických biosenzorů, které by sloužili k monitorování hladin těchto látek v tělních tekutinách. Pro lepší přehlednost jsou tyto látky součástí větších celků na základě podobnosti chemických vlastností.

2.2.1. Sacharidy

Ze sacharidů má v klinické diagnostice největší význam monosacharid glukóza. Její fyziologické rozmezí v moči kolísá od 0,05 do 0,8 mmol.l⁻¹. Zvýšené množství glukózy v glomerulárním filtrátu může být způsobené diabetem, akutní pankreatitidou, sepsí, podáváním léků (anestetik) atd. V krvi se koncentrace glukózy pohybuje kolem 4,9 až 6,9 mmol.l⁻¹. Snížené hodnoty glukózy poukazují na hypoglykémii, které mohou poukázat na možný rozvoj rakovinového bujení, neschopnost štěpení glykogenu atd. Naproti tomu zvýšené hodnoty indikují už výše zmiňovaný diabetes mellitus, endokrinní onemocnění spojené se zvýšenou tvorbou hormonů, ale i popáleniny, poškození nervů, selhávání ledvin a riziko srdečních chorob (Amaral & Wolf, 2008).

2.2.2. Aminokyseliny

V krvi stanovitelné aminokyseliny jsou glycin, kyselina glutamová, leucin, fenylalanin, tyrosin. (Folin, 1922) a v potu jsou obsaženy alanin, kyselina asparagová, glycin, izoleucin, leucin, fenylalanin (Harvey, et al., 2010). Největší význam má stanovení esenciálních aminokyselin a celkový profil v krvi či sekretech pohlavního ústrojí (Kanazawa & Teshima, 1981).

2.2.3. Hormony

Mezi často sledované látky v krvi bývají hormony tyroxin (T4) a trijodthyronin (T3) produkované štítnou žlázou. Jejich zvýšené hodnoty poukazují na zvýšenou činnost štítné žlázy a naopak snížené hodnoty bývají často způsobeny sníženou činností (Nathanielsz, 1970).

Katecholaminy, steroidní hormony a serotonin se často objevují v moči. Analýza moči na obsah metabolitů výše uvedených hormonů má význam v diagnostice rakoviny (zvýšená hladina vanilmandlové kyseliny) (John, et al., 1999) nebo těhotenství (choriový chonadotropin) (Krantz, et al., 2004). Mezi stanovované katecholaminy v moči patří dopamin. Jeho hladina je zvýšená u Parkinsonovy choroby, cirhózy jater, diabetu (Bischoff & Torres, 1962).

2.2.4. Vitamíny

Vitamíny lze obecně klasifikovat jako esenciální organické sloučeniny nezbytné pro správnou funkci lidského metabolismu. Jejich nedostatek či nadbytek (lipofilní vitamíny) se může projevit fyziologickými změnami nebo dokonce až vyústit v závažná onemocnění. Tudíž je zřejmé, že jejich analýza v tělních tekutinách při podezření lékaře je nezbytná. Stanovují se často vitamíny z řady B jako je kyselina pantotenová (B₅) (Harvey, et al., 2010), riboflavin (B₂), kyselina listová (B₉) atd. Nesmíme opomenout také vitamin C (kyselinu L-askorbovou), jehož nedostatek způsobuje kurděje, svalovou slabost a podkožní krvácení (Lee & Kader, 2000).

2.2.5. Lipidy

Mezi nejvýznamnější klinicky stanovitelné lipidy patří látky steroidní povahy. Cholesterol je pro organismus nepostradatelný, neboť je prekurzorem pohlavních hormonů, vitamínu D atd. Zvýšená hladina cholesterolu způsobuje jistá rizika spojená s rozvojem aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, cerebrovaskulárního onemocnění a periferního arteriálního onemocnění. Jeho referenční rozmezí v krvi je 3,5 až 5,2 mmol.l⁻¹. Zvýšená produktivita ušního mazu, jenž je bohatý na cholesterol, lze často pozorovat u dermatitidy, ekzému a chronické otitidy (Plat & Mensink, 2005).

V klinické diagnostice mají význam i triacylglyceroly. Jejich fyziologické hodnoty v séru jsou do 2 mmol.l⁻¹. Při vyšší koncentraci je rizikovým faktorem vznik aterosklerózy, která se nachází u mnoha typů hyperlipoproteinémie, nefrotického syndromu, diabetu, alkoholismu, obezity a jaterních onemocnění (Farquhar, et al., 1966).

2.2.6. Nebílkovinné dusíkaté látky

Vyšetření nebílkovinných dusíkatých sloučenin v tělních tekutinách je důležité především pro sledování stavu jater, kde se odehrává podstatná část metabolismu těchto látek. V ledvinách se pak přednostně vylučují. Z biochemického hlediska je nejvýznamnější močovina, kreatinin, kyselina močová a amoniak, které se stanovují pro klinické účely.

Referenční rozmezí močoviny v krvi je od 1,7 do 8,3 mmol.l⁻¹ a v moči od 167 do 390 mmol.l⁻¹ (Eggenstein, et al., 1999). Snížené hodnoty mohou indikovat těžké

jaterní poruchy, snížený přísun proteinů, absenci některého z enzymů podílejícím se na tvorbě močoviny, dědičné poruchy syntézy proteinů atd. Také může docházet ke ztrátám močoviny močí, způsobené zvýšenou filtrací v ledvinách. Zvýšené hladiny mohou být způsobeny nadměrným množstvím bílkovin v potravě, zvýšeným katabolismem (sepsa, pooperační stav), vyšší produkcí kortikoidů nebo látek jako je chloramfenikol a nedostatečným renálním vylučováním (funkční selhání ledvin, renální selhání, snížené prokrvení ledvin) (Faisst, et al., 2010). Močovina se také nachází v potu, kde její hodnoty zvyšuje ischemie a arteriální okluze (Heyningen & Weiner, 1952).

Fyziologické rozmezí kyseliny močové v krvi u žen je od 150 do 300 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, u mužů od 210 do 420 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a v moči od 1,5 do 4,5 mmol.l^{-1} . Snížené hladiny mohou být způsobeny enzymatickými defekty, podáním léků, tak těhotenstvím. Naopak zvýšené hladiny mohou indikovat vznikající aterosklerózu, zvýšenou degradaci nukleových kyselin (např. hemolytická anémie, zvýšený příjem purinů v potravě) a nedostatečné vylučování kyseliny močové ledvinami (selhání ledvin) (Nieto, et al., 2000).

U kreatininu zvýšené hodnoty poukazují na sníženou glomerulární filtraci při chronickém selhávání ledvin, pokročilém diabetu, při traumatech, popáleninách, svalové dystrofii a také jsou spojeny se zvýšenou mortalitou u hypertenzních osob, starších osob a pacientů s infarktem myokardu a s vyšším krevním tlakem. Naopak snížené hodnoty mohou být u gigantismu a nadměrné fyzické námaze. Referenční hodnoty v krvi jsou od 76 do 129 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a v moči od 3 do 12 mmol.l^{-1} (Wannamethee, et al., 1997). Běžné hodnoty amoniaku jsou kolem 0 až 60 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Snížené hodnoty se projevují po požití některých antibiotik, u osob s vysokým krevním tlakem a zvýšené u selhání jaterní funkce, otravy jater, velké krvácení do trávicího ústrojí, některé léky (např. morfin, heparin) (Lockwood, et al., 1991, Bessman & Besaman, 1954).

2.2.7. Bílkoviny

Z klinického hlediska lze často stanovit albumin, globuliny a bilirubin. Hodnoty albuminu v likvoru jsou vyšší u pacientů s encefalitidou (Franciotta, et al., 2001). Naopak bilirubin se nejčastěji vyšetřuje při podezření na infekční hepatitidu, biliární cirhózu a obstrukci žlučových cest (Tallack & Sherlock, 1954).

2.2.8. Triterpeny

Jedná se o přírodní organické látky (např. skvalen, lanosterol), běžně se vyskytující v lidském těle. Význam jejich analýzy nemá v klinické diagnostice velký význam, i když mohou poskytnout dodatečné informace o metabolismu cholesterolu, neboť z něj vznikají (Schwaab, et al., 2009).

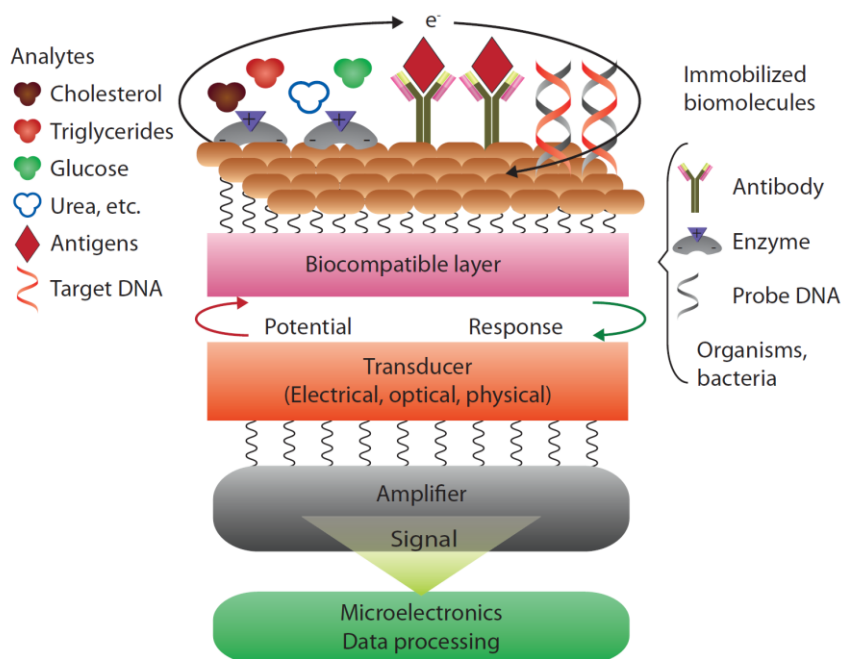
2.2.9. Karboxylové kyseliny

V tělních tekutinách je stanovitelná sůl kyseliny mléčné (laktát). Zvýšené hladiny poukazují na laktátovou acidózu, kdy se jedná o překyselení vnitřního prostředí organismu (Cai, et al., 2010). V potu má stanovení laktátu význam při vyšetření na ischemii, poruchu žláz atd. (Heyningen & Weiner, 1952).

3. Enzymatické biosenzory

Biosenzory lze definovat jako analytické přístroje obsahující biologicky rozpoznávací prvek (enzym, nukleová kyselina, protilátka atd.), který je připojen k fyzikálně-chemickému převodníku (Scheller, et al., 1985). Biologický prvek je schopen snímání přítomnosti aktivity nebo koncentrace analytu v roztoku. V našem případě se může jednat o výše zmíněné organické látky, kde má jejich monitorování v tělních tekutinách význam v diagnostice nejrůznějších onemocnění. Enzymatické biosenzory jsou taková čidla, kde tím biologickým prvkem je právě enzym (biokatalyzátor). Z tohoto hlediska je zřejmé, že enzymatické biosenzory lze použít pro stanovení jen jedné nebo úzké skupiny látek (substrátů), neboť enzymatické reakce jsou dosti specifické. Tento fakt, zaručuje enzymatickým biosenzorům vysokou selektivitu, která je u složitých matic (tělní tekutiny) nezbytná.

Fyzikálně-chemické převodníky (transduktory) dělíme na základě měřeného signálu (Thévenot, et al., 2001). Pokud je tímto signálem elektrický proud, potenciál či vodivost mluvíme pak o elektrochemických biosenzorech (D'Orazio, 2003). Samotným převodníkem u těchto typů biosenzorů je poločlánek (elektroda). Z předchozích sdělení vyplývá, že existují různé druhy biosenzorů, které mohou být klasifikovány podle biologicky aktivní složky, použitého transduktoru nebo analytu, který monitorují. Na Obr. 1 je názorně vysvětlen princip biosenzorů, kde jsou uvedené i některé analyty, které mají klinický význam. V této práci je největší důraz kladen právě na enzymatické biosenzory s elektrochemickým převodníkem.



Obr. 1. Struktura a princip biosenzorů (Solanki, et al., 2011).

3.1. Elektrochemické enzymové biosenzory

Tato kapitola pojednává o klasifikaci a funkci jednotlivých elektrochemických enzymových biosenzorech. Pro tuto práci jsou důležité potenciometrické, amperometrické a konduktometrické biosenzory, kterými lze stanovit analyt (tělní tekutinu).

3.1.1. Potenciometrické biosenzory

Potenciometrie je založena na měření rozdílu potenciálů mezi pracovní a referenční elektrodou za nulového proudu. Obě elektrody (poločlánky) jsou ponořené do elektrolytu a odděleny solným můstkem nebo fritou. Společně pak tvoří článek. V užším slova smyslu lze chápat potenciometrický biosenzor jako iontově selektivní elektrodu (ISE) potaženou imobilizovanou vrstvou obsahující konkrétní enzym (Lei, et al., 2006). ISE mají vysokou selektivitu definovanou vlastnostmi selektivní membrány, která je v kontaktu s okolním roztokem. Membrány mohou být vyrobeny z řady materiálu, nejčastěji se jedná o skleněné, monokrystalické, polykrystalické a polymerní membrány (Lazcka, et al., 2007; Yuqing, et al., 2003). Za zakladatele biosenzorů lze považovat profesora Clarka, který jako první konstruoval ISE pro stanovení aktivity kyslíku. První biosenzory byly tedy založeny na měření spotřeby kyslíku během enzymatické reakce, neboť oxidázy katalyzují oxidaci substrátu vzdušným kyslíkem (Marrazza, et al., 2016). Potenciál ISE pro daný iont je pak dán Nikolského rovnicí (1),

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{z_i \cdot F} \cdot \ln \left[a_i + \sum_j K_{ij} (a_j) \right]^{z_i/z_j} \quad (1)$$

kde E je potenciálový rozdíl z elektrochemického článku sestaveného z referenční elektrody a ISE; E^0 je tak zvaný standardní potenciál ISE; R představuje univerzální plynovou konstantu ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$); T udává absolutní teplotu v Kelvinech (K); F je Faradayova konstanta ($F = 96487 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$); a_i , a_j , jsou aktivity indikovaného a rušivého iontu; K_{ij} , je konstanta selektivity rušivého iontu; z_i , z_j jsou náboje příslušných iontů. Čím nižší je hodnota konstanty selektivity, tím méně příslušný rušivý iont interferuje. Rozsah měřitelných koncentrací je závislý na vlastnostech odpovídající ISE (Vlasov, et al. 2008).

Odezva potenciometrických senzorů je logaritmická. Jedná se o rozmezí většinou od $10 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pro konečné biosenzory od $0,1 \times 10^{-3}$ až $10 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Citlivost ISE závisí na velikosti z měřeného napětí. Přestože jsou potenciometrické biosenzory často používané v analýze mnoha látek především díky jejich spolehlivosti a nízké ceně, mají i řadu nevýhod. Mezi ně patří např. velký ohmický odpor, nízká mechanická odolnost, erozivita a citlivost na kapacitu pufrů při měření roztoků (Lakard, et al., 2004). Potenciometrická čidla mohou být také citlivá i na pH v širokém rozsahu (Karyakin, et al., 1996).

3.1.2. Amperometrické biosenzory

Tyto biosenzory jsou založeny na měření proudu při konstantním napětí vloženém na pracovní elektrodu. Velikost prošlého proudu za určitý čas pak udává náboj odpovídající molárnímu množství přeměněné látky na pracovní elektrodě (Sethi, 1994). Nejdůležitějším faktorem je přenos elektronů mezi redox centrem enzymu, mediátoru, nebo během oxidace či redukce produktu biokatalýzy (Gerard, et al., 2002).

V instrumentaci se ampérometrie nijak neliší od voltametrie. Pracuje se většinou v tříelektrodovém uspořádání, které je univerzální, ale vyžaduje potenciostat udržující konstantní potenciál pracovní elektrody vůči referentní elektrodě (Pang, et al., 2009). Za použití mikroelektrod je pak možno pracovat i ve dvouelektrodovém zapojení, což se běžně používá u průtokových analýz (Wijayawardhana, et al., 1999). Pracovní elektroda je obvykle vyrobena z kovu (Pt nebo Au) nebo z materiálu na bázi uhlíku. Jako referentní elektroda se velmi často používá Ag/AgCl (Karyakin, et al., 1995) a pomocnou elektrodu často představuje platinový drát, uhlík nebo měrná cela z nerezové oceli (Pang, et al., 2009).

Tyto biosenzory jsou specifické vysokým stupněm přesnosti, dynamickým rozsahem signálu, jsou rychlé, citlivé a jsou vhodné pro detekce nízkých koncentrací substrátu (Karyakin, et al., 1995). Existuje řada měřících technik podle časového průběhu potenciálu pracovní elektrody např. chromoamperometrie umožňující získat informace o předchozích elektrodových jevech, pulzní amperometrie zvyšuje podíl signálu vůči šumu. Citlivost může být zvýšena sníženým aplikovaným potenciálem (Liu, et al., 1997). Selektivita se řídí vlastnostmi použité biologické složky a redox potenciálem přítomných látek (Corcuera, et al., 2005; Prodromidis & Karayannis, 2002). Amperometrické biosenzory byly široce rozvinuty pro stanovení biologicky odbouratelných organických látek ve vodných roztocích (Lei, et al., 2006), ale i klinicky významných látek (Sethi, 1994).

3.1.3. Konduktometrické biosenzory

Konduktometrické biosenzory tvoří širokou základnu biosenzorů využívající přímou elektrickou odezvu (Lee, et al., 2000). Konduktometrie je založena na stanovení vodivosti nebo měrné vodivosti elektrolytů (D’Orazio, 2003). Z tohoto důvodu není zapotřebí jakákoliv přítomnost referenční elektrody (Dzyadevych, et al., 2002). Podmínkou pro úspěšná konduktometrická měření je dostatečná elektrická izolace, neboť sebe menší změny vodivosti lze pak považovat za odezvu. Elektrický odpor vodiče R je dán výrazem (2),

$$R = \rho \cdot \frac{l}{S} = \frac{1}{\gamma} \cdot \frac{l}{S} = \frac{1}{\gamma} \cdot C \quad (2)$$

kde ρ znamená měrný odpor, l je délka vodiče, S jeho průřez, γ je měrná vodivost a C je odporová konstanta konduktometrické cely. Měrná vodivost elektrolytů závisí na koncentraci iontů a jejich pohyblivosti, čehož lze využít v řadě praktických měření.

Princip takového konduktometrického biosenzoru lze snadno vysvětlit na konkrétním příkladě stanovení močoviny, kdy enzym ureáza štěpí močovinu na NH_4^+ , HCO_3^- a OH^- ionty. Tudíž dochází k výraznému zvýšení vodivosti přítomností vzniklých produktů, které nesou náboj a jsou velmi pohyblivé (Zhylyak, et al., 1995).

Mnoho enzymatických reakcí je spojeno se spotřebou nebo produkcí nabitých částic. Z toho vyplívá možnost využití vodivostních transduktorů v analýze klinicky významných látek. Enzymové reakce mohou být monitorovány s vodivostním zařízením za použití mikroelektrod (Thévenot, et al., 2001). Hlavní výhody těchto senzorů jsou malé rozměry použitých elektrod, jednoduchost instrumentace, nízká nákladnost a nízká spotřeba elektrické energie. Jejich použití je však omezené z důvodu nižší citlivosti. Velkou nevýhodou je vlastní vodivost pracovního prostředí. Citlivost by měla být konstantní po dobu životnosti, jinak se změny citlivosti kompenzují recalibrací. To samozřejmě platí i pro výše zmíněná čidla (Dzyadevych, et al., 2001).

4. Možnosti imobilizace enzymů

Imobilizace je proces, při kterém dochází k převedení rozpustného biopolymeru (enzymu) na formu nerozpustnou. Úkolem je pevné zachycení biologické složky k převodníku. Zmíněná složka vyžaduje maximální kontakt pro dosažení maximální účinnosti finálního čidla (Newman & Setford, 2006). Nejčastěji jsou imobilizovány enzymy na povrchu pevných elektrodových substrátů (Schuabb, et al., 2016). Tímto způsobem byla vyřešena životnost a údržba biosenzoru.

Samotná imobilizace pak závisí na mnoha faktorech, jako je povaha biologické složky, použitý typ transduktoru (elektrodový materiál), fyzikálně-chemické vlastnosti stanovované látky a provozní podmínky (složení elektrolytu). V úvahu je potřeba brát také celkové uspořádání detekční cely, tudíž se jedná o klasické (sádkové) nebo průtokové uspořádání (Amine, et al., 2006).

Stabilita imobilizované vrstvy enzymu je dána počtem vytvořených vazeb mezi enzymem a nosičem, ať už se jedná o vazby chemické (kovalentní; enzym-enzym, enzym-elektroda a jejich kombinace) nebo fyzikální (nekovalentní; micely, polymery, adsorpce atd.) (Cao, 2005). Nejčastější uspořádání je takové, že reaktant je ve vodné fázi, která prochází přes pevnou fázi obsahující katalyzátor. Existují však i případy, kdy je reaktant ve fázi plynné nebo kapalné, která je nemísitelná s vodou (Newman & Setford, 2006).

4.1. Přímé zakomponování do elektrodového materiálu

Jedná se o přímé zakomponování enzymu nebo biologické složky obsahující enzym (část houby, ovoce či zeleniny, vysušené bakterie atd.) do uhlíkové pasty. Uhlíková pasta je připravována smísením práškového uhlíku s hydrofobní, málo těkavou kapalinou, např. parafinovým olejem (Rubianes & Rivas, 2003).

Jednoduchý polyfenoloxidázový senzor lze připravit právě přimícháním extraktu z banánu nebo brambor. Tyto extrakty jsou zdrojem enzymů. Obdobně lze přimíchat do pasty extrakt z hub nebo jiných organismů. Nevýhodou těchto biosenzorů je však nízká aktivita enzymů (Dutta & Sarkar, 2014).

4.2. Přímá adsorpce na povrch transduktoru

Adsorpce je nejstarší, ale jedním z nejjednodušších a nejrychlejších způsobů imobilizace enzymů na povrch transduktorů. Tento způsob imobilizace využívá řadu

interakcí, které mohou záviset na různých podmínkách jako je teplota, pH, iontová síla, přidání rozpouštědla, atd.

Obecně jsou známy dva typy. Jedním je fyzikální adsorpce, ke které dochází pomocí van der Waalsových sil mezi enzymem a pevným povrchem. Druhým typem je adsorpce, za vzniku vodíkových vazeb (Albareda-Sirvent, et al., 2000).

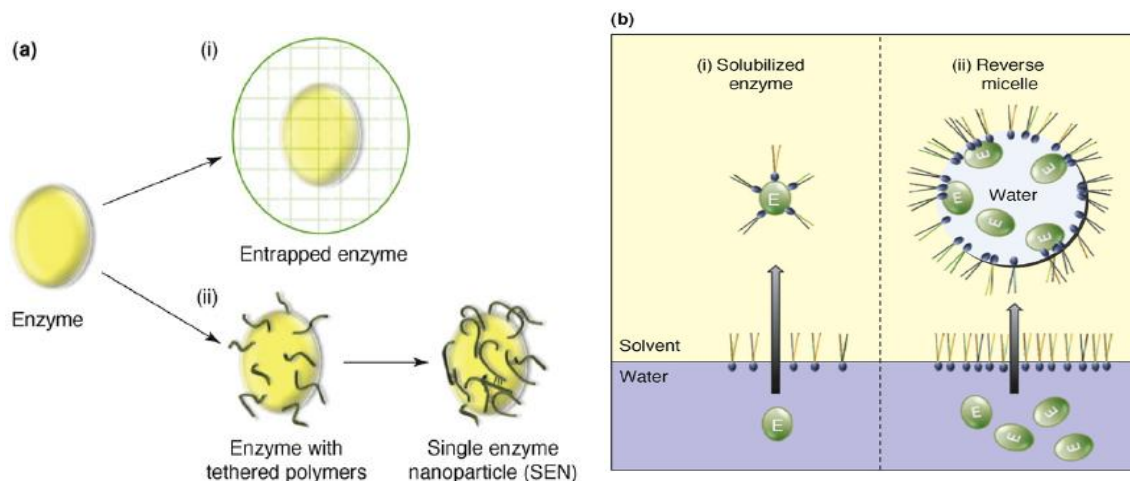
Jako běžně používané adsorbenty mohou být oxid hlinitý, uhlík, celulóza, jíly, hydroxyapatit, sklo, pryskyřice aj. Enzymy adsorbované na skleněné povrchy mají kupodivu delší životnosti a tak mohou být používány opakovaně bez ztrát aktivity (Weetall, 1974).

4.3. Zachycení pomocí vodivého polymeru

Zachycení enzymu do struktury membrány z vodivého polymeru nabízí snadný způsob imobilizace (Sheldon, 2007). Zachycení pomocí polymerní struktury dovolí substrátu a produktům enzymatických reakcí volně procházet, ale enzym zůstane vždy zachycen (Weetall, 1974). Na povrchu pracovní elektrody lze vytvořit polymerní film, za stálé hodnoty potenciálu, za stálého proudu nebo metodou cyklických změn potenciálu. Důležitou roli hraje vodivost polymerních vrstev, které umožňují snadnější přenos elektronů mezi elektrodou a biomolekulami. Nicméně výsledný polymer obsahuje často vysoký podíl vody, což je nežádoucí, protože dochází ke zhoršení mechanických vlastností biomembrány (Weetall, 1974). Biovrstvy nejsou příliš stabilní a tak časem dochází k uvolnění zachycených biomolekul.

Mezi běžně používané polymery k imobilizaci biomolekul patří polyanilin (PANI), polythiofen, polyvinylchlorid (PVC), polyvinylalkohol (PVA), 2-hydroxyethylmethakrylát (HEMA), polyuretany, Nafion a akrylová pryskyřice (Albareda-Sirvent, et al., 2000; Sheldon, 2007; Weaver, et al., 2004).

Jak je znázorněno na Obr. 2a, tak enzym může využívat reverzní micely bez tvorby jakékoliv kovalentní vazby mezi enzymem a obalem. Enzym je zachycen ve dvou krocích. V prvním kroku dochází k syntetizování polymerů na povrch enzymu a ve druhém dochází k zasítování, což má za následek polymerní síť, která je vázána na povrch enzymu. Naopak na Obr. 2b je znázorněná absence reverzních micel, z nichž každá molekula enzymu je iontově spárována. S malým množstvím povrchově aktivních molekul, které jsou opačně nabitě vůči náboji na povrchu enzymu (Kim, et al., 2008).



Obř. 2 Imobilizace enzymu s reverzní micelou (a) a s absencí micely (b) (Kim, et al., 2008).

4.3.1. Klasifikace používaných polymerů

Polymer je makromolekula tvořená z molekul jednoho atomu, více druhů atomů nebo skupin spojených navzájem v tak velkém počtu, že řada fyzikálních nebo chemických vlastností této látky se nezmění přidáním nebo odebráním jedné nebo několika konstitučních jednotek. Tyto řetězcové struktury vznikají polymerizací nebo polykondenzací (Mohanty, et al., 2000). Jednotlivé polymery jsou popsány v následujících kapitolách.

4.3.1.1. Polyvinylalkohol (PVA)

Jedná se o hydrofilní, ve vodě bobtnající polymer používaný k imobilizacím. Přípravuje se hydrolýzou polyvinylacetátu, který je ve formě oligomerů sloužící pro zasíťování konečného polymeru např. tri-izokyanátem. Na povrch senzoru se nejprve nanese enzym a až poté samotný PVA (Sheldon, 2007).

4.3.1.2. Hydroxyethylmethakrylát (HEMA)

HEMA je další hydrofilní a biokompatibilní polymer, často používaný ve zdravotnictví vykazující vysoký stupeň hydratace (Weaver, et al., 2004).

4.3.1.3. Polyuretany

Patří do skupiny polymerů s dobrými adhezními vlastnostmi. Polyuretany jsou velmi rozsáhlá třída makromolekulárních látek. Jejich složení a struktura se mohou měnit v širokých mezích. Některé z nich jsou jemné a elastické, zatímco jiné jsou tuhé. Vychází z oligomerů, které se zasítují např. difenylmethanem di-izokyanátem v přítomnosti enzymu (Dieterich, 1981; Chattopadhyayl & Webster, 2009).

4.3.1.4. Akrylová pryskyřice

Akrylová pryskyřice je makroporézní kopolymer. Je vysoce hydrofilní a stabilní, a to jak chemicky tak i mechanicky. Váže proteiny reakcí oxiranových skupin s volnými aminoskupinami enzymu za vzniku kovalentních vazeb, které mají dlouhodobou stabilitu (Sheldon, 2007).

4.3.1.5. Polyvinylchlorid (PVC)

Je nejpoužívanější, nerozpustný ve vodě, olejích ani v koncentrovaných anorganických kyselinách a zásadách (Albareda-Sirvent, et al., 2000). Nevýhodou je velmi nízká vodivost. Z tohoto důvodu se přednostně využívá k přípravě iontově selektivních membrán u potenciometrických senzorů.

4.3.1.6. Polythiofen

Jedná se o polymer nerozpustný ve vodě a vyžaduje vyšší pracovní potenciál pro elektropolymeraci (Ruiz, et al., 2013).

4.3.1.7. Polyanilin (PANI)

Polyanilin patří do skupiny polo-flexibilních polymerů, je druhým nejperspektivnějším vodivým polymerem. Je známý svojí vysokou elektrickou vodivostí. Využívá se proto často k přípravě amperometrických biosenzorů (Cao, et al., 1992).

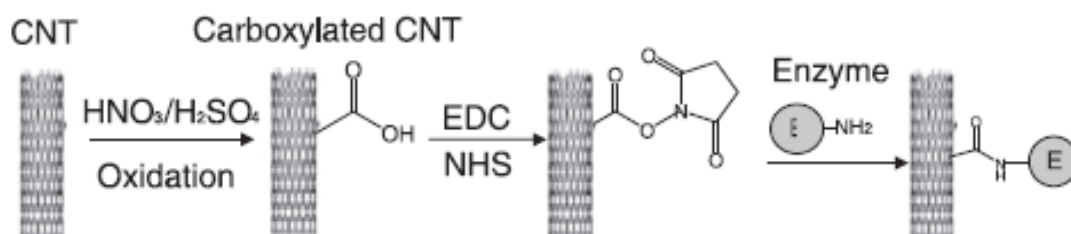
4.3.1.8. Nafion

Nafion je sulfonovaný fluoropolymer (terafluorethylen) na bázi kopolymeru. Má vynikající tepelnou a mechanickou stabilitu, proto je používán jako protonový vodič pro výměnu protonů palivových článků. Je to polymer dodávaný v rozpuštěném stavu ve směsi alkoholu s vodou. Funguje i jako iontoměnič (Lee, al. 1998).

4.4. Imobilizace enzymů kovalentní vazbou

Další možnosti imobilizace enzymů je chemické navázání enzymu s vodivým nosičem pomocí kovalentní vazby. Jedná se o univerzální a stabilní metodu. Ke vzniku vazby dochází mezi chemickými skupinami enzymu a skupinami na povrchu nosiče. Výhodou této metody je, že enzym není po reakci uvolněn do roztoku. Při tomto procesu je nezbytná aktivace nosiče a vytvoření příslušných chemických skupin. Nevýhodou vazby je, že enzym může být inaktivován při změně konformace (Albareda-Sirvent, et al., 2000).

Příkladem kovalentní imobilizace enzymů je přichycení na povrch uhlíkových nanotrubic, jak je znázorněno na Obr. 3., kde EDC značí N-ethyl-N-(3-(dimethylamino)propyl) karbodiimid a NHS znamená N-hydroxysukcinimid. Tyto nanotrubičky mají jedinečné fyzikální a chemické vlastnosti, neboť vykazují mnohem reaktivnější zakončení. Jsou to podlouhlé útvary, jejichž stěny jsou tvořeny atomy uhlíku. Mohou být jednostěnné i vícevěnné. Tato imobilizace je vyvolána reakcí volných aminových skupin generovaných elektrochemickou oxidací nebo redukcí dané sloučeniny na povrchu proteinů s karboxylovými skupinami nosiče. Proces využívá jednoelektronovou redukci cílenou na volné radikály, které jsou generovány za přítomnosti elektrické energie. Následně jsou připojeny kovalentní vazbou na povrch uhlíkových nanotrubic (Feng & Peijun, 2011).



Obr. 3 Znáznornění konjugace enzymů na povrch uhlíkových nanotrubic (Feng & Peijun, 2011).

5. Využití enzymů v analýze tělních tekutin

V této kapitole jsou uvedeny klinicky významné látky nacházející se v různých tělních tekutinách, které jakož to substráty odpovídajících enzymů mohou být stanoveny elektrochemickými biosenzory obsahující právě tuto biologicky aktivní komponentu. Výčet jednotlivých analytů a příslušných (eventuálních) biosenzorů, které by bylo možno v klinické analýze použít, je uveden v Tab. 1. Nicméně se domnívám, že nejprve by bylo vhodné alespoň popsat a klasifikovat vůbec samotné enzymy. Tudíž v následujících podkapitolách naleznete jednotlivé třídy enzymů s popisem jejich biologických funkcí.

5.1. Základní klasifikace enzymů

Enzymy jsou katalyzátory biologických systémů; zkráceně biokatalyzátory. Z chemického hlediska se jedná o proteiny obsahující specifickou nebílkovinou část (kofaktor), která je zodpovědná za funkci daného enzymu. Enzymy zásadně ovlivňují rychlost reakce, neboť snižují aktivační energii, takzvanou Gibbsovu funkci (ΔG). Tato kapitola je věnována základní klasifikaci enzymů. Enzymy lze na základě podobnosti rozdělit do šesti tříd. Mezi tyto třídy patří oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy (Shen & Chou, 2007; Huang, et al., 2007).

5.1.1 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy jsou nejpočetnější skupinou enzymů. Katalyzují redoxní děje spojené se vznikem nebo spotřebou energie. Oxidoredukční děje jsou spojeny nejčastěji s přenosem vodíku, kyslíku nebo pouze samotných elektronů, a proto se tyto enzymy hojně používají k přípravě elektrochemických biosenzorů. Jedná se o dehydrogenázy, oxidázy, oxygenázy, hydroxylázy a cytochromy. Právě oxidázy jsou nezbytnou výbavou katabolických drah, při kterých dochází ke vzniku jednodušších produktů (katabolitů) a uvolnění energie; nejčastěji ve formě adenosintrifosfátu (ATP) (Huang, et al., 2007).

5.1.2 Transferázy

Tyto enzymy přenášejí funkční skupiny, např. methyl, acetyl- nebo fosfátovou skupinu z donoru na akceptor. Účastní se biosyntetických dějů (anabolismu), při kterých dochází

ke spotřebě energie. Mezi transferázy patří aminotransferázy, transglykosylázy, transmethylyázy, hexokinázy atd. (Huang, et al., 2007).

5.1.3. Hydrolázy

Katalyzují hydrolytické štěpení vazeb jako amidové nebo esterové. Hydrolázy se podílejí na rozkladných procesech vyšších makromolekul. Na základě substrátů se dělí na proteázy, lipázy, esterázy, glukosidázy aj. (Huang, et al., 2007; Fishman, 1978).

5.1.4. Lyázy

Katalyzují nehydrolytické štěpení C-C a C-N vazeb bez přístupu vody. S chemického hlediska se jedná o složité bílkoviny. Mezi lyázy patří například syntázy vytvářející složitější produkty z jednoduchých substrátů bez potřeby štěpení ATP. Mezi lyázy řadíme dekarboxylázy, aldehydlyázy a dehydratázy (Huang, et al., 2007; Fishman, 1978).

5.1.5. Ligázy

Ligázy jsou enzymy katalyzující spojení dvou molekul kovalentní vazbou za spotřeby ATP. Ligázy jsou nezbytnou součástí anabolických drah, neboť se podílejí na nejrůznějších biosyntézách (Huang, et al., 2007; Fishman, 1978).

5.1.6. Isomerázy

Tyto enzymy katalyzují izomerizační reakce. Uvnitř molekul dochází k přesunům atomů nebo dokonce celých funkčních skupin. Izomerázy jsou nejméně početnou skupinou enzymů. Mezi tyto biokatalyzátory řadíme cis-(trans)-izomerázy, epimerázy, mutázy a racemázy (Huang, et al., 2007; Fishman, 1978).

5.2. Elektrochemické enzymové biosenzory v analýze tělních tekutin

Tuto poslední část své bakalářské práce považuji za nejdůležitější, neboť jsou zde uvedené jednotlivé analyty obsažené v daných tělních tekutinách s odpovídajícím enzymem a příslušným elektrochemickým transduktorem. Enzymové biosenzory využívají spojení substrátové specifity enzymu, který je v tenké vrstvě nanesen na povrch měřicí elektrody. Enzym je vybírán tak, aby katalyzoval požadovanou reakci, v které vystupuje analyt jako substrát či produkt. Volba elektrochemické metody závisí na enzymatických

systemech, např. využití amperometrie při použití oxidáz a dehydrogenáz; využití potenciometrie při použití dekarboxyláz (Wolfbels, 1991).

Tab. 1: Souhrn jednotlivých analys a jejich enzymů s příslušným transduktorem

| Tělní tekutina | Analyt | Enzym | Transduktor | Reference |
|------------------|--------------------|---------------------------|------------------|---|
| Krev | Glukóza | Glukozoxidáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Kreatinin | Kreatinkináza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Kyselina močová | Urikáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Dopamin | Dekarboxyláza | Amperometrický | Kissinger, et al., 1977 |
| | Močovina | Glutamát-dehydrogenáza | Konduktometrický | Zhylyak, et al., 1995 Wolfbels, 1991 |
| | Glycin | Aminolevulát syntáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Kyselina glutamová | Glutamát-dehydrogenáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Leucin | Leucin-dehydrogenáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Fenylalanin | Fenylalanin-dekarboxyláza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Tyrosin | Tyrosinhydroxyláza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Tyroxin | Thyropoxidáza | Amperometrický | Schall, et al., 1978 |
| | Trijodthyronin | Thyropoxidáza | Amperometrický | Schall, et al., 1978 |
| | Cholesterol | Cholesterolesteráza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 Wolfbels, 1991 |
| Triacylglyceroly | | Lipoproteinová lipáza | Potenciometrický | Havel, et al., 1973 |
| Likvor | Laktát | Laktátdehydrogenáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 Wolfbels, 1991 |
| Moč | Kyselina močová | Urikáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Glukóza | Glukozoxidáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Kreatinin | Kreatinkináza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Kyselina askorbová | Askorbátoxidáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |

| Tělní tekutina | Analyt | Enzym | Transduktor | Reference |
|----------------|---------------------|--------------------------|------------------|---|
| | Dopamin | Dekarboxyláza | Amperometrický | Kissinger, et al., 1977 |
| | Močovina | Glutamát-dehydrogenáza | Konduktometrický | Zhylyak, et al., 1995 Wolfbels, 1991 |
| | Bilirubin | Bilirubinoxidáza | Amperometrický | Wolfbels, 1991 |
| | Amoniak | Glutamát-dehydrogenáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| Ušní maz | Cholesterol | Cholesterolesteráza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 Wolfbels, 1991 |
| | Skvalen | Skvalensyntáza | Potenciometrický | Amin, et al., 1992 |
| | Lanosterol | Lanosterolsyntáza | Potenciometrický | Amin, et al., 1992 |
| | Triacylglyceroly | Lipoproteinová lipáza | Potenciometrický | Havel, et al., 1973 |
| Pot | Glukóza | Glukozoxidáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Laktát | Laktátdehydrogenáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 Wolfbels, 1991 |
| | Močovina | Glutamát-dehydrogenáza | Konduktometrický | Zhylyak, et al., 1995 Wolfbels, 1991 |
| | Alanin | Alaninaminotransferáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Kyselina asparagová | Aspartátaminotransferáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Glycin | Aminolevulát syntáza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Izoleucin | Oxidaza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Leucin | Oxidaza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Fenylalanin | Dekarboxyláza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 |
| | Kyselina močová | Urikáza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Kreatinin | Kreatinináza | Amperometrický | D'Orazio, 2003 Wolfbels, 1991 |
| | Cholesterol | Cholesterolesteráza | Potenciometrický | Lakard, et al., 2004 Wolfbels, 1991 |

6. Závěr

V bakalářské práci je shrnuta klasifikace a složení tělních tekutin. Důraz je především kladen na klinicky významné organické látky, jako jsou např. aminokyseliny, lipidy, nebílkovinné dusíkaté látky, hormony atd., které lze stanovit pomocí elektrochemických enzymových biosenzorů. Snížené nebo zvýšené hodnoty těchto látek mohou upozornit na rozvoj nejrůznějších onemocnění. V dnešní době jsou právě biosenzory často využívány, ale stále je možné najít řadu požadavků na zlepšení, jako je větší přesnost, rychlost odezvy nebo větší selektivita. Sama věřím, že se jejich využití bude dále rozvíjet.

Dle mého názoru výzkum nejrůznějších způsobů zakotvení enzymů k elektrodovým substrátům může do budoucna zajistit získání enzymového preparátu s dostatečnou aktivitou, selektivitou a především požadovanou stabilitou.

Velkou roli hraje také i ekonomické hledisko a nutnost brát ohled na podmínky enzymatické reakce. Současné tendence ve vývoji enzymatických biosenzorů vyvíjejí tlak na zvýšení životnosti enzymů, tak aby nebyly jen zájmem akademické obce, ale mohli i být použity přímo v praxi. Glukózový amperometrický biosenzor je příklad úspěšného a dnes už rutinního používání v oblasti medicíny. V závěru bych ráda také podotkla, že v současnosti je velký rozvoj biotechnologických procesů v různých průmyslových odvětvích, ať už se jedná o potravinářství, medicínu či dokonce v papírenství.

Použitá literatura

- Albareda-Sirvent M., Merkoci A., Alegret S.: *Sensors and Actuators B*, 69 (2000) 153-163.
- Amaral C. E. F., Wolf B.: *Medical engineering & Physics*, 30 (2008) 541-549.
- Amin D., Coenell S. A., Gustafson S. K., Needle S. J., Ullrich J. W., Bilder G. E., Perrone M. H.: *Journal of Lipid Research*, 33 (1992) 1657-1663.
- Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G.: *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2006) 1405-1423.
- Bartlett P. N., Cooper J. M.: *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 362 (1993) 1-12.
- Cai X., Yan J., Chu H., Wu M., Tu Y.: *Sensors and Actuators B*, 143 (2010) 655-659.
- Cao L.: *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 (2005) 217-226.
- Cao Y., Smith P., Heeger A. J.: *Synthetic Metals*, 48 (1992) 91-97.
- Corcuera J. I. R., Cavalieri R. P., Powers J. R.: *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 575 (2005) 229-241.
- Cuthbertson D. P.: *Biochemical Journal*, 24 (1930) 1244-1263.
- Bessman S. P., Bessman A. N.: *Journal of Clinical Investigation*, (1954) 622-628.
- Bischoff F., Torres A.: *Clinical Chemistry*, 8 (1962) 370-377.
- Darrow D. C., Yannet H.: *Journal of Clinical Investigation*, 14 (1935) 266-275.
- Dave B. C., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I.: *Analytical Chemistry*, 66 (1994) 1120A-1127A.
- Dieterich D.: *Progress in Organic Coatings*, 9 (1891) 281-340.
- D'Orazio P.: *Clinica Chimica Acta*, 334 (2003) 41-69.
- Dutta K., Sarkar P.: *International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 1 (2014) 435-439.
- Dzyadevych S. V., Arkhypova V. N., Korpan Y. I., El'skaya A. V., Soldatkin A. P., Jaffrezic-Renault N., Martelet C.: *Analytica Chimica Acta*, 445 (2001) 47-55.
- Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Chovelon J. M.: *Analytica Chimica Acta*, 459 (2002) 33-41.

- Eggenstein C., Borchardt M., Diekmann Ch., Gründig B., Dumschat Ch., Cammann K., Knoll M., Spener F.: *Biosensors & Bioelectronics*, 14 (1999) 33-41.
- Faisst M., Wellner U. F., Utzolino S., Hopt U. T., Keck T.: *Journal of Critical Care*, 25 (2010) 105-111.
- Farquhar J. W., Frank A., Gross R. C, Gerald M.: *Journal of Clinical Investigation*, 45 (1966) 1648-1656.
- Feng W., Peijun J.: *Biotechnology Advances*, 29 (2011) 889-895.
- Fishman M. M.: *Analytical Chemistry*, 50 (1978) 261R-274R.
- Folin O.: *The Journal of Biological Chemistry*, 153 (1922) 233-238.
- Franciotta D., Martino G., Zardini E., Furlan R., Bergamaschi R., Andreoni L., Cosi V.: *Journal of Neuroimmunology*, 115 (2001) 192-198.
- Ganrot K., Laurel C. B.: *Clinical Chemistry*, 20 (1974) 571-573.
- Gerard M., Chaubey A., Malhotra B. D.: *Biosensors & Bioelectronics*, 17 (2002) 345-359.
- Harvey Ch. J., LeBouf R. F., Stefaniak A. B.: *Toxicology in Vitro*, 24 (2010) 1790-1796.
- Havel R. J., Fielding Ch. J., Olivecrona T., Shore G., Fielding P., Egelrud T.: *Biochemistry*, 12 (1973) 1828-1833.
- Heyningen R., Weiner J. S.: *The Journal of Physiology*, 116 (1952) 404-413.
- Huang Ch. T., Chen M. L., Huang L. L., Mao I. F., *Chinese Journal of Physiology*, 45 (2002) 109-115.
- Huang W. L., Chen H. M., Hwang S. F., Ho S. Y.: *Biosystems*, 90 (2007) 405-413.
- Chattopadhyay D. K., Webster D. C.: *Progress in Polymer Science*, 34 (2009) 1068-1133.
- John H., Ziegler W. H., Hauri D., Jaeger P.: *Urology*, 53 (1999) 679-683.
- Kanazawa A., Teshima S-i.: *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47 (1981) 1375-1377.
- Karyakin A. A., Gitelmacher O. V., Karyakina E. E.: *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2419-2423.
- Karyakin A. A., Bobrova O. A., Lukachova L. V., Karyakina E. E.: *Sensors and Actuators B*, 33 (1996) 34-38.

- Kim J., Grate J. W., Wang P.: *Trends in Biotechnology*, 26 (2008) 639-646.
- Kissinger P. T., Bruntlett C. S., Davis G. C., Felice L. J., Riggin R. M., Shoup R. E.: *Clinical Chemistry*, 23 (1977) 1449-1455.
- Krantz D., Goetzl L., Simpson J. L., Thom E., Zachary J., Hallahan T. W., Silver R., Pergament E., Platt L. D., Filkins K., Johnson A., Mahoney M., Hogge W. A., Wilson R. D., Mohide P., Hershey D., Wapner R.: *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191 (2004) 1452-1458.
- Kreyden O. P., Scheidegger E. P.: *Clinics in Dermatology*, 22 (2004) 40-44.
- Lakard B., Herlem G., Lakrd S., Antoniou A., Fahys B.: *Biosensors and Bioelectronics*, 19 (2004) 1641-1647.
- Lazcka O., Campo J. D., Munoz F. X.: *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1205-1217
- Lee H. L., Chen S. Ch.: *Talanta*, 64 (2004) 750-757.
- Lee S. J., Mukerjee S., McBreen J., Rho Y. W., Kho Y. T., Lee T. H.: *Electrochimica Acta*, 43 (1998) 3693-3701.
- Lee S. K., Kader A. A.: *Postharvest Biology and Technology*, 20 (2000) 207-220.
- Lee W. Y., Kim S. R., Kim T. H., Lee K. S., Shin M. Ch., Park J. K.: *Analytica Chimica Acta*, 404 (2000) 195-203.
- Lei Y., Chen W., Mulchandani A.: *Analytica Chimica Acta*, 568 (2006) 200-210.
- Liu H., Ying T., Sun K., Li H., Qi D.: *Analytica Chimica Acta*, 344 (1997) 187-199.
- Lockwood A. H., Yap E. W. H., Wong W. H.: *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11 (1991) 337-341.
- Marrazza G., Minunni M., Palchetti I.: *Trends in Analytical Chemistry*, 79 (2016) 2-8.
- Menezes F. G., Neves A. C. O., de Lima D. F., Lourenco S. D., da Silva L. C., de Lima M. G.: *Quimica Nova*, 4 (2015) 588-594.
- Mohanty A. K., Misra M., Hinrichsen G.: *Macromolecular Materials and Engineering*, 276/277 (2000) 1-24.
- Nathanielsz P. W.: *The Journal of Physiology*, 206 (1970) 701-710.
- Naumann H. N.: *Biochemical Journal*, 30 (1936) 762-764.

Newman J. D., Setford S. J.: *Molecular Biotechnology*, 32 (2006) 249-266.

Nieto F. J., Iribarren C., Gross M. D., Comstock G. W., Cutler R. G.: *Atherosclerosis*, 148 (2000) 131-139.

Nunome Y., Tsuda T., Kitagawa K.: *Analytical sciences*, 26 (2010) 917-919.

Pang X., He D., Luo S., Cai Q.: *Sensors and Actuators B*, 137 (2009) 134-138.

Plat J., Mensink R. P.: *American Journal of Cardiology*, 96 (2005) 15D-22D.

Prodromidis M. I., Karayannis M. I.: *Electroanalysis*, 14 (2002) 241-261.

Rao V. V., Dahlheimer J. L., Bardgett M. E., Snyder A. Z., Finch R. A., Sartorelli A. C., Piwnica-Worms D.: *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 96 (1999) 3900-3905.

Rubianes M. D., Rivas G. A.: *Electrochemistry Communications*, 5 (2003) 689-694.

Ruiz V., Roldán S., Villar I., Blanco C., Santamaría R.: *Electrochimica Acta*, 95 (2013) 225-229.

Sethi R. S.: *Biosensors & Bioelectronics*, 9 (1994) 243-264.

Sheldon R. A.: *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (2007) 1289-1307.

Shen H. B., Chou K. Ch.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364 (2007) 53-59.

Shirakawa H., Louis E., MacDiarmid A. G., Chiang Ch. K., Heeger A. J.: *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 16 (1977) 578-580.

Schall R. F., Fraser A. S., Hansen H. W., Kern C. W., Tenoso H. J.: *Clinical Chemistry*, 24 (1978) 1801-1804.

Scheller F. W., Schubert F., Renneberg R., Müller H. G., Jänchen M., Weise H.: *Biosensors*, 1 (1985) 135-160.

Schuabb V., Cinar S., Czeslik C.: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140 (2016) 497-504

Schwabb M., Hansen S., Gurr A., Schwabb T., Minovi A., Sudhoff H., Dazert S.: *European archive sof oto-rhino-laryngology*, 266 (2009) 1699-1702.

Solanki P. R., Kaushik A., Agrawal V. V., Malhotra B. D.: *NPG Asia Mater*, 3 (2011) 17-24.

Squires R. D., Crosley A. P., Elkinton J. R.: *Circulation*, 4 (1951) 868-880.

- Stamper H. B., Woodruff J. J.: *The journal of experimental medicine*, 144 (1976) 828-833.
- Tallack J. A., M. B, Ch. B., Sherlock S., M. D., F. R. C. P.: *British Medical Journal*, 2 (1954) 212-213.
- Thévenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S.: *Biosensors & Bioelectronics*, 16 (2001) 121-131.
- Vlasov Y. G., Legin A. V., Rudnitskaya A. M.: *Russian Journal of General Chemistry*, 78 (2008) 2532-2544.
- Vries J., Thijssen W. A. M. H., Snels S. E. A., Menovsky T., Peer N. G. M., Lamers K. J. B.: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 71 (2001) 671-674.
- Wannamethee S. G., Shaper A. G., Perry I. J.: *Stroke*, 28 (1997) 557-563.
- Weaver J. V. M., Bannister I., Robinson K. L., Bories-Azeau X., Armes S. P., Smallridge M., McKenna P.: *Macromolecules*, 37 (2004) 2395-2403.
- Weetall H. H.: *Analytical Chemistry*, 46 (1974) 602A-615A.
- Wijayawardhana C. A., Halsall H. B., Heineman R.: *Analytica Chima Acta*, 399 (1999) 3-11.
- Wolfbels O. S.: *Analytica Chimia Acta*, 250 (1991) 181-201.
- Yuqing M., Jianguo G., Jianrong Ch.: *Biotechnology Advances*, 21 (2003) 527-534.
- Zarins Ch. K., Rice Ch. L., Peters R. M., Virgilio R. W.: *Circulation research*, 43 (1978) 925-930.
- Zhylyak G. A., Dzyadeyich S. C., Korpan Y. I., Soldatkin A. P., El'skaya A. V.: *Sensors and Actuators B*, 24/25 (1995) 145-148.