

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Příprava cholinesterázového biosenzoru pro stanovení těžkých kovů

Petra Pořízková

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Construction of cholinesterase biosensor for the determination of heavy
metals

Bc. Petra Pořízková

Thesis

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Pořízková**
Osobní číslo: **C15635**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Příprava cholinesterázového biosenzoru pro stanovení těžkých kovů**
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 :

Teoretická část:

- a) Těžké kovy - význam, jedovatost, výskyt, využití, analýza.
- b) Acetylcholinesteráza a její vlastnosti.
- c) Biosenzory založené na acetylcholinesteráze.

Experimentální část:

- a) Práce s acetylcholinesterázou, stanovení její aktivity, kalkulování enzymových konstant.
- b) Chemická imobilizace acetylcholinesterázy.
- c) Stanovení těžkých kovů pomocí acetylcholinesterázy.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690. Chem. Listy 2001, 95, 431 - 438
2. Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690 - oprava chyb. Chem. Listy 2001, 95, 683 - 684
3. Pohanka, M.: Základy statistiky laboratorních experimentů. Vojenské zdravotnické listy 2010, 79(2), 60-63
4. Pohanka, M.: Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. Biomedical Papers, 2011, 155(3), 219-223
5. Pohanka, M. Acetylcholinesterase inhibitors; a patent review (2008-present). Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2012, 22 (8), 871-886
6. Pohanka, M. Biosensors based on cholinesterases (Biosenzory založené na cholinesterasach). Chemické listy, 2013, 107(2), 121-125

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.**
Univerzita obrany Hradec Králové

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

.....

Bc. Petra Pořízková

Poděkování:

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. a konzultantce paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracování diplomové práce.

ANOTACE

Acetylcholinesteráza je enzym, který se vyskytuje v nervosvalových spojeních a cholinergních synapsích, kde ukončuje synaptický přenos. Jeho schopnost hydrolyzovat acetylcholin a jeho inhibice toxickými látkami se využívá při konstrukci biosenzoru. Tato diplomová práce je zaměřena na využití acetylcholinesterázy pro stanovení těžkých kovů. Aktivita acetylcholinesterázy byla stanovována především pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody, byly ale testovány i jiné způsoby stanovení aktivity.

KLÍČOVÁ SLOVA

Acetylcholinesteráza, biosenzor, těžké kovy, Ellmanova metoda

ANNOTATION

Acetylcholinesterase is an enzyme that occurs in neuromuscular junctions and cholinergic synapses where terminating synaptic transmission. Its ability to hydrolyse acetylcholine and ability being inhibited by toxic substances is used in the construction of biosensors. This thesis focuses on the use of acetylcholinesterase for the determination of heavy metals. The activity of acetylcholinesterase was determined mainly using the spectrophotometric method of Ellman, have been tested but other methods of activity determination.

KEYWORDS

Acetylcholinesterase, biosensor, heavy metals, Ellman method

Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektrometrie
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
Asn	asparagin
ASV	anodická stripovací voltametrie (anodic stripping voltammetry)
ATCh	acetylthiocholin
ATChCl	acetylthiocholin chlorid
ATChI	acetylthiocholin jodid
BChE	butyrylcholinesteráza
ChE	cholinesteráza
ChO _x	cholinoxidáza
CV	cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
DPV	diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
E	enzym
EI	komplex enzym-inhibitor
ES	komplex enzym-substát
ESI	komplex enzym-substrát-inhibitor
ETAAS	elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
FAAS	plamenová atomová absorpční spektrometrie (flame atomic absorption spectrometry)
GA	glutaraldehyd
Glu	kyselina glutamová
His	histidin
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ISFET	ion citlivý tranzistor řízený polem (ion sensitive field effect transistor)
k_i	rychlostní konstanta
K_M	Michaelisova konstanta
OD	optická hustota (optical density)
P	produkt
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
Phe	fenylalanin

S	substrát
Ser	serin
SWV	voltametrie čtvercových vln (square wave voltammetry)
Trp	tryptofan
Tyr	tyrozin
V_{\max}	maximální rychlost reakce

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy	16
Obrázek 2: Hydrolýza acetylcholinu	16
Obrázek 3: Význam acetylcholinu a acetylcholinesterázy v neurotransmisi	18
Obrázek 4: Saturační křivka	19
Obrázek 5: Schéma Ellmanovy metody	23
Obrázek 6: Schéma využití indoxyl acetátu	23
Obrázek 7: Hydrolýza acetylthiocholinu a následná oxidace thiocholinu	33
Obrázek 8: Aplikace redoxních mediátorů	34
Obrázek 9: Využití AChE a ChOx při konstrukci biosenzoru	34
Obrázek 10: Typy imobilizace	35
Obrázek 11: Kyvety (reakce pro měření aktivity Ellmanovou metodou)	40
Obrázek 12: Kyvetová šachta	42
Obrázek 13: Použité typy jamek	49
Obrázek 14: Kyvety (reakce pro stanovení aktivity s fenolovou červení)	50
Obrázek 15: Kyvetová šachta	51
Obrázek 16: Chitosanová membrána: její uvolňování	64
Obrázek 17: Fluorescence s pufrům o různém pH	65
Obrázek 18: Fluorescence při inhibici	65
Obrázek 19: Fluorescence v tištěných jamkách	66
Obrázek 20: Porovnání AChE a BChE s indoxylacetátem	66

Obsah

ÚVOD.....	14
1. Teoretická část	15
1.1 Acetylcholinesteráza	15
1.1.1 Struktura.....	15
1.1.2 Hydrolyza acetylcholinu	16
1.1.3 Cholinergní systém	17
1.1.4 Popis enzymové kinetiky	18
1.1.5 Inhibice enzymů	19
1.1.6 Metody pro stanovení aktivity acetylcholinesterázy	22
Ellmanova metoda.....	22
Další metody stanovení aktivity.....	23
1.2 Těžké kovy.....	24
1.2.1 V životním prostředí	24
1.2.2 Zdroje těžkých kovů	24
1.2.3 Škodlivé účinky na lidské zdraví.....	25
1.2.4 Stanovení těžkých kovů	28
Spektrofotometrické techniky.....	28
Elektrochemické stanovení.....	29
Další metody stanovení	30
1.3 Biosenzory založené na acetylcholinesteráze	31
1.3.1 Optické biosenzory.....	32
1.3.2 Elektrochemické biosenzory.....	32
1.3.2.1 Potenciometrické biosenzory	33
1.3.2.2 Amperometrické biosenzory	33
1.3.2.3 Konduktometrický biosenzor	34
1.3.3 Imobilizace	35
1.3.4 Aplikace.....	36
2. Cíl práce.....	38
3. Experimentální část	39
3.1 Přístroje a pomůcky.....	39
3.2 Chemikálie	39
3.3 Ellmanova metoda.....	40

3.3.1	Stanovení enzymových konstant.....	40
3.3.2	Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl ₂ - spektrofotometr.....	41
3.3.3	Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl ₂ - optické vlákno.....	42
3.3.4	Imobilizace želatinou, saturační křivka a inhibice CuCl ₂ - spektrofotometr	43
3.3.5	Imobilizace želatinou (+GA), saturační křivka, CuCl ₂ - spektrofotometr	44
3.3.6	Želatinová membrána, stabilizace GA - optické vlákno	45
3.3.7	Chitosanová membrána, saturační křivka a inhibice CuCl ₂ - spektrofotometr	46
3.3.8	Chitosanová membrána – bez vyschnutí, - spektrofotometr	48
3.3.9	UV polymerace - spektrofotometr	48
3.4	Měření fluorescence u indoxyl acetátu.....	48
3.5	Fenolová červeň	50
3.5.1	Saturační křivka acetylcholin chloridu - spektrofotometr	50
3.5.2	Saturační křivka acetylcholin chloridu – optické vlákno	51
3.5.3	Inhibice takrinem – optické vlákno.....	51
3.5.4	Inhibice karbofuranem – optické vlákno	52
4	Výsledky a diskuze	53
4.1	Ellmanova metoda.....	53
4.1.1	Stanovení enzymových konstant.....	53
4.1.2	Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl ₂ - spektrofotometr.....	54
4.1.3	Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl ₂ - optické vlákno.....	56
4.1.4	Imobilizace želatinou, saturační křivka a inhibice CuCl ₂ - spektrofotometr	58
4.1.5	Imobilizace želatinou (+GA), saturační křivka, CuCl ₂ - spektrofotometr	59
4.1.6	Želatinová membrána + GA, optické vlákno.....	61
4.1.7	Chitosanová membrána, saturační křivka, inhibice CuCl ₂ , - spektrofotometr	63
4.1.8	Chitosanová membrána – bez vyschnutí, spektrofotometr.....	64
4.1.9	UV polymerace, spektrofotometr.....	65
4.2	Měření fluorescence u indoxyl acetátu.....	65
4.3	Fenolová červeň	67
4.3.1	Saturační křivka acetylcholin chloridu - spektrofotometr	67
4.3.2	Saturační křivka acetylcholin chloridu - optické vlákno.....	67

4.3.3	Inhibice takrinem – optické vlákno.....	68
4.3.4	Inhibice karbofuranem – optické vlákno.....	69
ZÁVĚR.....		71
Citovaná literatura.....		72

ÚVOD

Acetylcholinesteráza (AChE) je enzym, který hydrolyzuje neurotransmitter acetylcholin, který je uvolňován při nervovém vzruchu, na cholin a kyselinu octovou. Vyskytuje se především v nervosvalových spojeních a v cholinergních synapsích v centrální nervové soustavě, kde ukončuje synaptický přenos.

Acetylcholinesteráza je citlivá na řadu látek, které způsobují její inhibici. Mezi tyto látky patří například pesticidy a insekticidy, bojové chemické látky, některé léky proti Alzheimerově nemoci a těžké kovy. Této inhibice se pak využívá při konstrukci biosenzorů pro stanovení těchto látek. Biosenzory pak mají široké využití především v klinické biochemii a v oblasti životního prostředí. Jejich výhodou je nízká cena, rychlá analýza a možné použití i v terénu.

1. Teoretická část

1.1 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza (E.C. 3.1.1.7.) je enzym patřící mezi serinové hydrolázy a spolu s butyrylcholinesterázou jsou důležité pro správné fungování lidského organismu. Acetylcholinesteráza je převážně přítomna v centrálním nervovém systému, kde je vázána na buněčné membrány excitabilních tkání a účastní se nervových transmisních procesů [1]. Je ale přítomná i ve svalech a na membráně erytrocytů. Její hlavní funkce je katalýza hydrolýzy neuromediátoru acetylcholinu, který se uvolňuje při nervovém vzruchu do synaptické štěrbině, na cholin a kyselinu octovou. Tato funkce je nezbytná k návratu cholinergního neuronu do klidového stavu po aktivaci. Oproti AChE je význam butylcholinesterázy zatím předmětem výzkumu [2].

1.1.1 Struktura

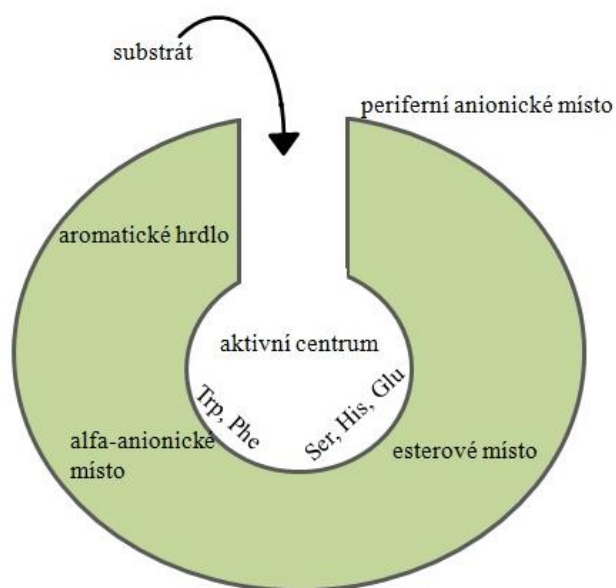
Cholinesterázy jsou typem α/β hydrolázy složené z α helix a β skládaného listu, který obsahuje katalytickou část složenou z katalytické triády Ser-His-Glu. Enzym se skládá ze tří částí: aktivního místa (vlastní katalytické centrum), které dále obsahuje esterové a alfa anionické místo, dále se skládá z aromatického hrdla (rokle) a periferního anionického místa (obr. 1) [3].

Periferní anionické místo je na povrchu enzymu. Toto místo obsahuje aromatické aminokyselinové zbytky Tyr 70, Asn 72, Tyr 121, Trp 279, Tyr 334, (číslování - *Electrophorus electricus*), které jsou seskupeny okolo vstupu do aktivního místa a jsou zodpovědné za interakce se substráty a inhibitory. Periferní anionické místo je cíl pro řadu toxinů ale i léků [4, 5].

Aromatické hrdlo je tvořeno z 14 aromatických aminokyselinových zbytků a zasahuje do poloviny enzymu. Aromatické hrdlo hraje roli v selektivitě, vybírá, jaký substrát bude pokračovat do aktivního místa. Přítomné aminokyseliny mají vyšší selektivitu k molekulám acetylcholinu. Prostup substrátu je umožněn interakcí mezi acetylcholinovým kvartérním amonným atomem a π elektrony aromatických jader fenyalaninu, tryptofanu a tyrozinu [3, 5].

Esterové místo se skládá ze tří aminokyselinových zbytků serinu 200, kyseliny glutamové 327 a histidinu 440 a je zodpovědné za hydrolýzu esterové vazby v acetylcholinu a jiných substrátech [5].

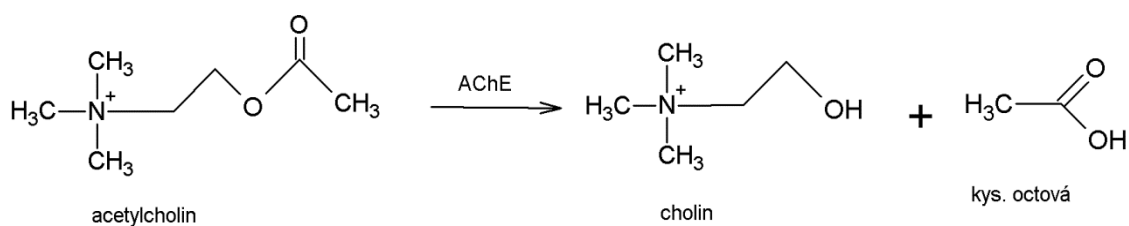
Alfa anionické místo je zodpovědné za správnou orientaci substrátu směrem k esterovému místu interakcí s acetylcholinovým kvartérním amonným iontem. Obsahuje tryptofan 84 a fenylalanin 330 (číslování: *Electrophorus electricus*) [3, 4, 5].



Obrázek 1: Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy

1.1.2 Hydrolýza acetylcholinu

Enzymatická hydrolýza acetylcholinu v aktivním místě AChE probíhá v několika krocích. Nejdříve je acetylcholin vázán svým kvartérním atomem dusíku na anionickém místě a zároveň hydroxylovou skupinou na esterickém místě AChE. Tím je vytvořen komplex enzym-substrát. Následuje oddělení cholinu a vznik meziprojektu acetyl-enzym, ten pak reaguje s vodou za vzniku komplexu kyselina-enzym, který se následně už samovolně rozpadá na volný enzym a kyselinu octovou (obr. 2). AChE má vysokou katalytickou aktivitu, každá molekula AChE rozkládá každou sekundu přibližně 25000 molekul ACh [6].



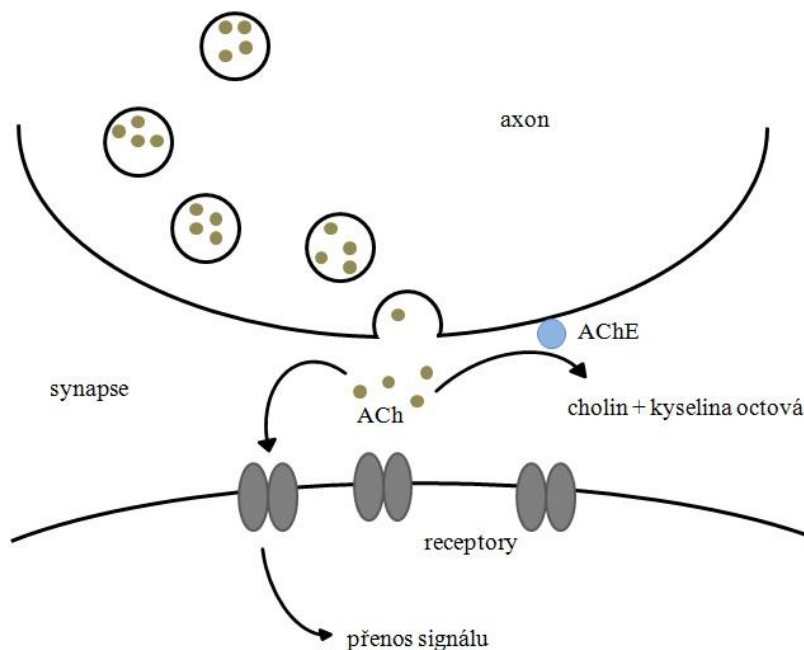
Obrázek 2: Hydrolýza acetylcholinu

1.1.3 Cholinerní systém

V cholinerním nervovém systému hraje AChE významnou roli, hydrolyzuje přebytečný acetylcholin a ukončuje tím přenos vzruchu a neuron se tak navrátí do klidového stavu. Acetylcholin obsahují neurony, které se nacházejí především v mozковém kmeni. Cholinerní systém tak ovlivňuje jak funkce motorické, tak i chování a paměť. Jako neurotransmitter působí i v nervech kosterních svalů [7].

Acetylcholin se syntetizuje v nervových zakončeních z acetyl-koenzymu A a cholinu za katalýzy cholinacetyltransferázy a je poté skladován v synaptických vezikulech. Po působení akčního potenciálu vstupují vápenaté ionty do nervového zakončení a způsobují posun synaptických vezikul k presynaptické membráně a následuje otevření vezikul [8, 9]. Acetylcholin se uvolní do synaptické štěrbiny, kde se váže na receptory na postsynaptické membráně a tím dojde k jejich aktivaci a přenosu signálu. Zbylý nenavázaný acetylcholin je následně hydrolyzován acetylcholinesterázou přítomnou na postsynaptické membráně (obr. 3). Pro její katalytickou funkci je nejdůležitější aminokyselinová triáda- glutamát, histidin a serin, jehož hydroxylová skupina napadá esterovou vazbu. Reakcí vzniká kyselina octová a cholin, který je následně transportován zpět do presynaptického neuronu a může tak být znovu využit k další syntéze acetylcholinu [8].

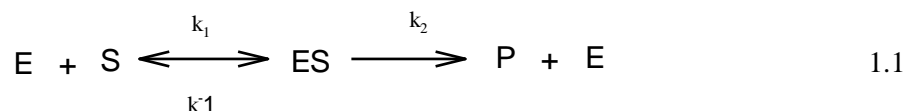
Acetylcholin pak působí na dva typy receptorů, jsou to nikotinové a muskarinové. Vazba na nikotinový receptor vyvolá tok vápenatých a sodných kationtů přes kanál, a způsobí depolarizaci postsynaptické membrány. Nikotinové receptory jsou pak kationtové kanály. Muskarinový receptor funguje pomocí G-proteinu, který řídí iontové kanály [7, 8].



Obrázek 3: Význam acetylcholinu a acetylcholinesterázy v neurotransmisí

1.1.4 Popis enzymové kinetiky

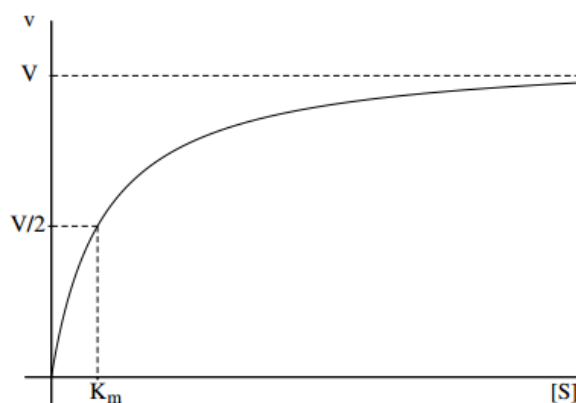
Prvním krokem všech enzymových reakcí je vazba substrátu na aktivní místo enzymu. Tento proces se pak dá popsat následujícím schématem (1.1).



Kde dochází k reakci mezi enzymem E a substrátem S a vzniká komplex enzym-substrát ES a k_i jsou rychlostní konstanty reakcí. Pokud budeme zvyšovat koncentraci substrátu, bude vznikat stále více komplexu enzym-substrát a rychlost reakce katalyzované substrátem se bude zvyšovat. Tato rychlost stoupá nejvíce na začátku reakce, kdy je ještě nízká koncentrace produktu, a stoupá až do té doby než je enzym substrátem zcela nasycen. Tato rychlost se pak označuje jako V_{\max} . Pokud je reakce v ustáleném stavu a substrát je v nadbytku a neinhibuje enzym, platí rovnice Michaelise a Mentenové (1.2), kde v je počáteční rychlost reakce a K_M je Michaelisova konstanta. Tato konstanta odpovídá právě takové koncentraci substrátu, při níž je rychlost reakce rovná jedné polovině V_{\max} nebo také koncentraci substrátu, při které je enzym nasycen z jedné poloviny. Michaelisova konstanta má rozměr koncentrace substrátu, tedy $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [7, 10].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad 1.2$$

Na obrázku č. 4 je saturační křivka pro enzym, pro který platí kinetika podle Michaelise a Mentenové, kde na ose y je rychlost reakce a na ose x je koncentrace substrátu S.



Obrázek 4: Saturační křivka

Závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu má tvar hyperboly, tato křivka pak limituje pro vysoké koncentrace substrátu k mezní rychlosti V_{max} . Pro vysoké koncentrace substrátu počáteční rychlost reakce již nezávisí na $[S]$ a jedná se proto o kinetiku prvního řádu. To že křivka limituje k určité hodnotě je dáno tím, že koncentrace enzymu je konstantní a při vysoké koncentraci substrátu budou všechna aktivní místa enzymu obsazena. V oblasti nízkých koncentracích substrátu můžeme zanedbat $[S]$ proti K_M a rovnice Michaelise a Mentenové pak má následující tvar (1.3) což je kinetická rovnice reakce prvního řádu [7].

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M} \quad 1.3$$

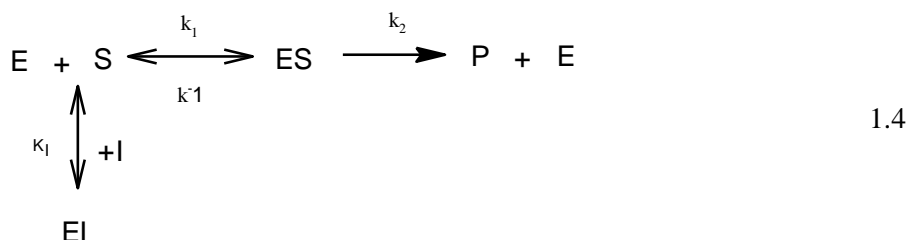
1.1.5 Inhibice enzymů

Jako inhibitor můžeme nazývat jakoukoliv látku, která snižuje rychlost enzymové reakce, tedy enzymovou aktivitu. Inhibice může být reversibilní a irreversibilní. U reversibilní inhibice je efekt pouze dočasný, zatímco u irreversibilní inhibice dochází k trvalé ztrátě enzymové aktivity. U reversibilní inhibice můžeme dále rozlišovat inhibici kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní [7].

Další případ inhibice je inhibice substrátem. Při měření saturační křivky si můžeme někdy všimnout, že s vyššími koncentracemi substrátu klesá reakční rychlost. To je způsobeno nahromaděním substrátu v aktivním místě enzymu. A ani jedna molekula substrátu nemůže zaujmout vhodnou pozici k aktivnímu místu, aby mohly proběhnout nekovalentní interakce a mohlo tak dojít k přeměně [7, 10].

Kompetitivní inhibice

Ke kompetitivní inhibici dochází, pokud je inhibitor strukturně podobný substrátu a inhibitor tedy soutěží se substrátem o vazebná místa enzymu. Nadbytkem substrátu můžeme inhibitor vytěsnit. Tuto inhibici lze popsat pomocí následujícího schématu (1.4) [7].



Kde K_I je inhibiční konstanta, což je disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor (1.5). Při této inhibici zůstává maximální rychlost zachována a Michaelisova konstanta je zvýšena v závislosti na koncentraci inhibitoru [7, 10]. Pro počáteční reakční rychlost platí rovnice 1.6.

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \tag{1.5}$$

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \tag{1.6}$$

Nekompetitivní inhibice

Vazba inhibitoru a substrátu je reversibilní. Inhibitor se váže na enzym a neovlivňuje vazbu substrátu. Enzym tedy obsahuje vazebná místa pro substrát i pro inhibitor. Inhibitor pak vyvolává svou vazbou konformační změnu na inaktivní formu a nedovolí tak přeměnu substrátu na produkt. Jedná se o ovlivnění polohy katalytických skupin nebo o znemožnění konformačních pohybů nezbytných pro enzymovou reakci.

Aby se jednalo o čistě nekompetitivní inhibici, musí být shodné hodnoty disociačních konstant komplexů (1.7, 1.8) [7, 10].

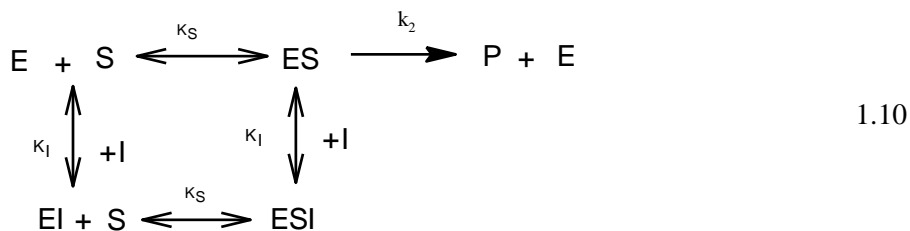
$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad 1.7$$

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad 1.8$$

Pro počáteční reakční rychlost v závislosti na koncentraci substrátu platí rovnice 1.9.

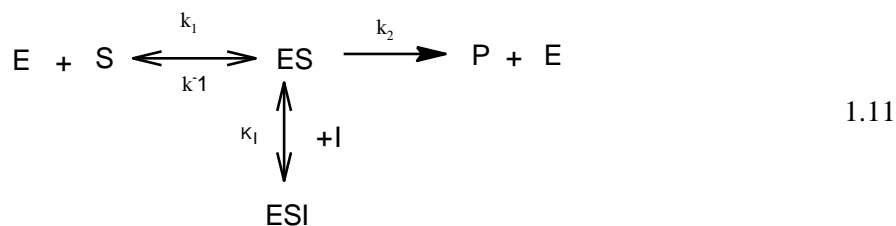
$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)(K_M + [S])} \quad 1.9$$

U této inhibice nedochází ke změně hodnoty Michaelisovy konstanty, ale snižuje se mezní rychlost reakce. Nekompetitivní inhibici je možné popsat reakčním schématem 1.10.



Akompetitivní inhibice

Při této inhibici se reversibilně váže inhibitor pouze na komplex enzym-substrát a znemožňuje tak jeho přeměnu na produkt. Inhibiční konstanta je pak disociační konstantou komplexu ESI a při této inhibici dochází k rovnoměrnému snížení K_M i mezní rychlosti [7, 10]. Akompetitivní inhibici vystihuje reakční schéma 1.11 a pro disociační konstantu a počáteční reakční rychlost platí rovnice 1.12 a 1.13.



$$K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad 1.12$$

$$v_0 = \frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} [S]}{\frac{K_M}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} [S]} \quad 1.13$$

Ireverzibilní inhibice

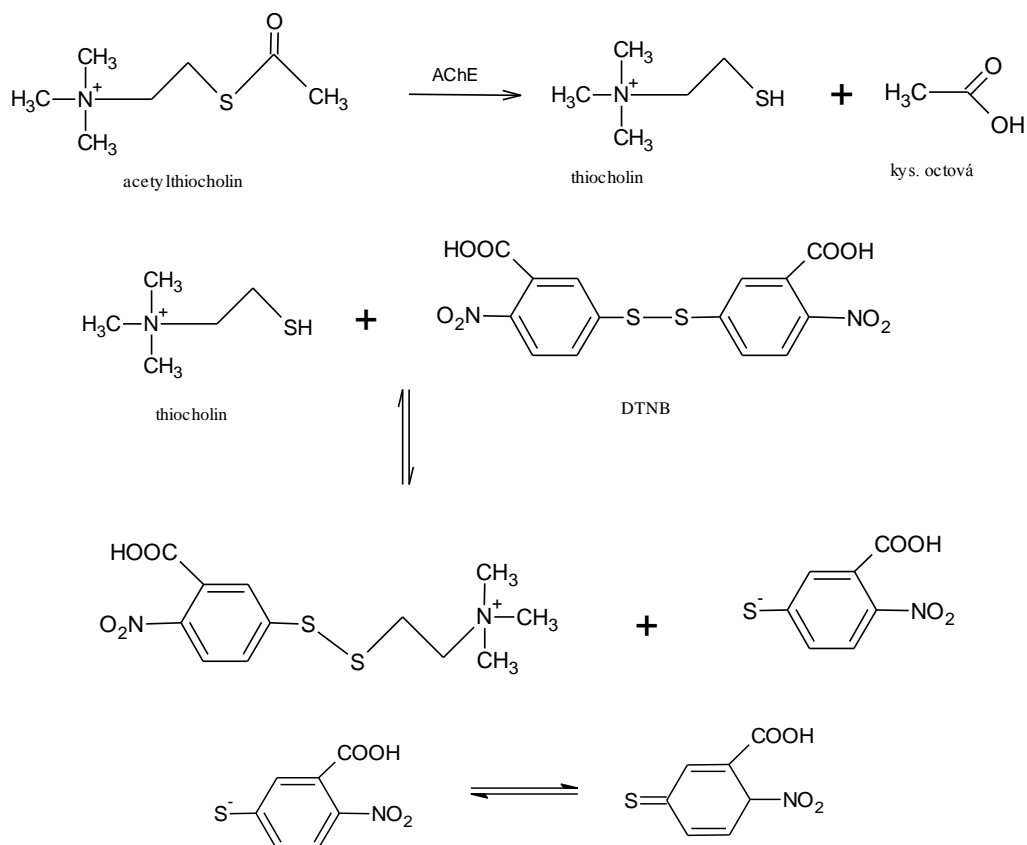
Předešlé inhibitory se vážou nekovalentně, ale existují inhibitory, které se vážou na enzym pevnou vazbou. Nevratně tak modifikují enzym chemickou reakcí. Například rtuťnaté ionty se nevratně vážou na sulfhydrylové zbytky v aktivním místě. Tato inhibice se podobá nekompetitivní inhibici, K_M zůstává stejné, ale mezní rychlost se snižuje, protože klesá koncentrace aktivního enzymu. [11, 12]

1.1.6 Metody pro stanovení aktivity acetylcholinesterázy

Ellmanova metoda

Cholinesterázy dobře hydrolyzují nízkomolekulární estery a mají podobnou afinitu i k thioesterům, takže jsou hydrolyzovány podobnou rychlostí. V roce 1960 Ellman a spolupracovníci navrhli metodu s acetylthiocholinem a 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou) kyselinou jako chromogenního činidla. Schéma této reakce je na obrázku č. 5. Reakce probíhá ve dvou krocích, v prvním kroku se hydrolyzuje acetylthiocholin na thiocholin a kyselinu octovou. Následně je pak thiocholin detekován pomocí svých SH skupin kyselinou 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou). Po této reakci se uvolňuje 5-thio-2-nitrobenzoová kyselina, jejíž anionická forma absorbuje při 412 nm [13, 14].

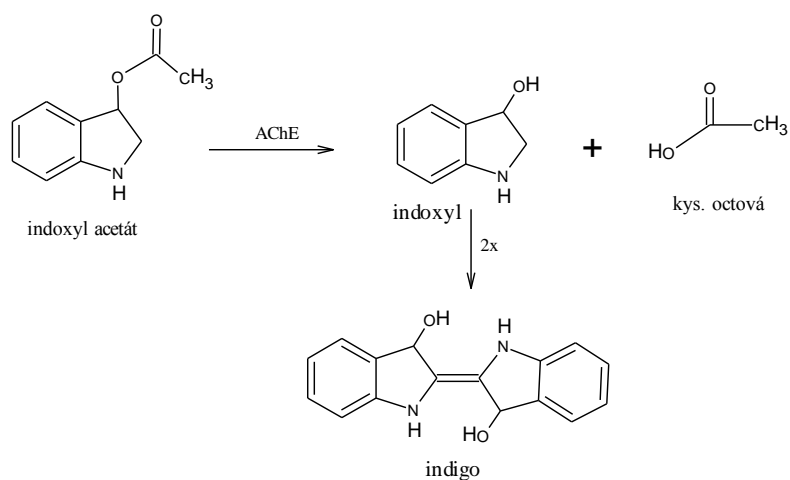
Tuto metodu lze provádět jak v mikrotitračních destičkách, tak ve standardních kyvetách. Výhodou této metody je jednoduchost, přesnost a je snadno přizpůsobitelná pro automatické analyzátoři a použitelná i pro měření v terénu. Mezi nevýhody patří interference hemoglobinu, který má stejné absorpční maximum. Další problém je pak reakce Ellmanova činidla se sulfhydrylovými skupinami ve vzorku, které mohou ovlivnit výsledek měření [2].



Obrázek 5: Schéma Ellmanovy metody

Další metody stanovení aktivity

Pro stanovení aktivity AChE lze použít i jiná činidla, jedním z nich je indoxyl acetát. Tato sloučenina poskytuje modré zbarvení a zároveň je možnost sledovat reakci i fluorometricky. Působením AChE dochází k hydrolyze indoxyl acetátu na kyselinu octovou a indoxyl. Indoxyl pak spontánně přechází na modře zbarvené indigo (obr. č. 6) [15].



Obrázek 6: Schéma využití indoxyl acetátu (převzato a upraveno z [15])

1.2 Těžké kovy

Těžké kovy jsou skupinou prvků, které mají určité vlastnosti, jako například specifická hmotnost vyšší než 5g/cm^3 . Existuje více jak 50 prvků, které jsou klasifikovány jako těžké kovy, patří mezi ně i některé přechodné kovy. 17 z nich je pak považováno za velmi toxické, například Pb, Hg, As, Cd. Některé z nich jsou nezbytné pro živé organismy, ale při vyšších koncentracích jsou všechny toxické (Cu, Zn, Ni, Se...) [16]. Některé tyto prvky se vyskytují přirozeně ve všech ekosystémech v různých koncentracích. Vyskytují se v elementární formě nebo ve formě různých chemických sloučenin. Každá forma nebo sloučenina má jiné vlastnosti a ty mají vliv na akumulaci v potravním řetězci i na toxicitu [17].

1.2.1 V životním prostředí

Těžké kovy jsou přirozenou součástí životního prostředí, ale lidská činnost změnila biochemickou rovnováhu. Následkem toho je uvolňování těžkých kovů do přírodních zdrojů. Znečištění životního prostředí těžkými kovy je dnes vážný problém ve světě a stává se dále závaznějším kvůli rozrůstajícímu se průmyslu [17]. Na rozdíl od organických látek jsou těžké kovy biologicky nedegradovatelné, a proto dochází k jejich hromadění v životním prostředí, kde mohou setrvávat desetiletí až staletí [16]. Nejzávažnější je akumulace ve vodách, v přírodě dnes už nelze najít čistou vodu. Voda se znečišťuje již při průchodu atmosférou, pokračuje to splachováním nečistot z povrchu a nakonec i vypouštěním průmyslových odpadních vod. Nebezpečná je i přítomnost kovů v půdách, odkud se mohou dostat do vod ale i do plodin, kde se akumulují. Tato akumulace ve vodách ale i v půdě představuje riziko pro životní prostředí a i pro lidské zdraví [18].

Těžké kovy hrají i důležitou roli v některých biologických systémech. Některé kovy potřebují organismy v malém množství pro jejich fyziologické a biochemické funkce. Příklady těchto kovů jsou Fe, Mn, Cu, Zn a Ni. Další těžké kovy jsou pak už nebezpečné a organismy pro ně nemají využití, patří mezi ně Cd, Pb, As, Hg a Cr [17].

1.2.2 Zdroje těžkých kovů

Těžké kovy vstupují do životního prostředí z přírodních a antropogenních zdrojů. Mezi přírodní zdroje patří hlavně zvětrávání nerostů, eroze a sopečná činnost. Mezi antropogenní zdroje těžkých kovů patří hornictví, tavení rud, používání pesticidů a hnojiv, průmyslový odpad, spalování uhlí a atmosférická depozice [17]. Narušením

rovnováhy v životním prostředí dochází k akumulaci jednoho či více těžkých kovů v půdě nebo ve vodách a vzniká tak riziko pro lidské zdraví, živočichy a rostliny [19].

První zdroj těžkých kovů vytvořený člověkem je zemědělství. Rostliny potřebují stopové prvky, jako jsou Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni a Zn, které jsou nezbytné pro růst rostlin a dodávají se rostlinám ve stopovém množství s hnojivý. Také používání pesticidů hlavně v minulosti bylo významným zdrojem kovů. Ještě v nedávné minulosti se vyskytovaly fungicidy a insekticidy, které obsahovaly vyšší koncentrace Cu, Hg, Mn, Pb a Zn. Těžké kovy se do půdy dostávají i prostřednictvím odpadních produktů dobytka, které se využívají k hnojení. Těmto zvířatům se do krmení přidává Cu a Zn pro dobrý růst a pokud se tato hnojiva používají opakovaně na stejných místech, může docházet k jejich akumulaci. Dalším zdrojem těžkých kovů může být dlouhodobé zavlažování zemědělské půdy odpadními vodami nebo zdroje šířené vzduchem. Ty zahrnují prach ze skladovacích ploch, vypařování během zpracování při vysoké teplotě a hlavně spalování fosilních paliv [20]. Tabulka č. 1 shrnuje antropogenní zdroje vybraných těžkých kovů v životním prostředí.

Tabulka 1: Antropogenní zdroje konkrétních těžkých kovů v životním prostředí [17]

As	Pesticidy a prostředky na ochranu dřeva
Cd	Barviva a pigmenty, plastové stabilizátory, plasty, hnojiva
Cr	Koželužny, ocelářský průmysl, elektrárenský popílek
Cu	Pesticidy, hnojiva
Hg	Uvolňování při těžbě Au-Ag a spalování uhlí, zdravotnický odpad
Ni	Průmyslové odpadní vody, ocelové slitiny, chirurgické nástroje
Pb	Letecké emise ze spalování olovnatého benzínu, výroba baterií, herbicidy, insekticidy

1.2.3 Škodlivé účinky na lidské zdraví

Těžké kovy mohou mít nepříznivé účinky na lidské zdraví, problematická je především akumulace těžkých kovů v potravním řetězci. Mnoho těžkých kovů je toxických a mohou způsobit nežádoucí účinky a vážné problémy i při velmi nízkých koncentracích. Mohou být nejen cytotoxické ale i karcinogenní a mutagenní. Těžké kovy způsobují oxidační stres a tvorbu volných radikálů hlavně tvorbu reaktivních forem kyslíku. Jejich zvýšená koncentrace pak může vést k poškození nebo odumření nervových buněk. Dále mohou nahradit základní kovy v pigmentech nebo enzymech, které narušují jejich funkci. Mezi nejvíce problematické patří Hg, Cd, Pb, As, Cu, Sn a Cr [17, 19].

Olovo

Olovo se v přírodě nejčastěji vyskytuje ve sloučeninách se sírou nebo s kyslíkem, jako například PbS , $PbSO_4$ a $PbCO_3$ [20]. Olovo je pro zdraví škodlivé i v nízkých koncentracích a do těla může vstupovat mnoha cestami, například i vdechnutím prachu z olověných barev nebo plynů z olovnatého benzínu, také se může uvolňovat při výrobě ložisek a krytů kabelů. Olovo také nalézáme ve stopovém množství v některých potravinách, především v rybách. Z našeho těla se odstraňuje hlavně močí, ale může docházet i k jeho hromadění a to zejména u dětí. Vysoká koncentrace olova může způsobit smrt nebo vážné poškození centrálního nervového systému, červených krvinek a ledvin. Toto poškození má pak za následek problémy v chování, hyperaktivitu, poruchy paměti, bolesti hlavy, zhoršení sluchu, bolesti svalů a kloubů a v neposlední řadě i problémy s reprodukcí. Účinky závisí na stupni a době expozice [18].

Kadmium

Kadmium se nalézá ve stopovém množství ve většině hornin, v ropě a uhlí. Kadmium se z hornin nejčastěji uvolňuje po kontaktu s kyselými vodami. Využívá se ve spojení s barvami, fotografií a nikl-kadmiových baterií a do životního prostředí se dostává z barviv, laků, stabilizátorů plastů, důlní a hutní činností, z průmyslových provozoven, ze spalování fosilních paliv a používáním hnojiv. Kadmium se hromadí s rostoucím věkem a to hlavně v ledvinách, v játrech a může nahrazovat vápník v kostech, to má za následek bolestivé onemocnění kostí a selhání ledvin. Nebezpečné je především jeho vdechování z tabákového kouře. Při nižších dávkách může kadmium způsobovat kašel, bolest hlavy a zvracení [18].

Měď

Do vody se měď dostává především korozí vodovodních trubek z mědi a z průmyslových odpadů. Do ovzduší se pak měď uvolňuje spalováním fosilních paliv a při těžbě měděných rud [21]. Měď je nezbytná pro lidský organismus, ale dlouhodobá expozice například v pitné vodě může vést k rozvoji anémie, poškození jater a ledvin. Při vyšší kontaminaci mědí dochází k bolestem břicha, zvracení, objevuje se nevolnost, průjem a bolest hlavy. Pokud se jedná o vysoké dávky tak ty jsou nebezpečné pro kojence a osoby s některými metabolickými poruchami. U tohoto kovu je nežádoucí i nedostatek, který způsobuje anémie, zpomalení růstu a nemoci krevního oběhu [18].

Molybden

Molybden se nachází v potravě a je součástí některých enzymů, například xantinoxidázy, a je tedy v nízkých koncentracích součástí lidského těla. Vyskytuje se hlavně v játrech, ledvinách a kostech. Bezpečná denní dávka je až do 15 mg/den, ale vyšší dávky mohou zasahovat do vstřebávání mědi. Molybden se vylučuje zabudováním do purinu a vylučuje se jako kyselina močová, a nadměrný příjem by tedy mohl způsobit příznaky dny, jako je bolest kloubů a otoky [18].

Nikl

Nikl se používá do slitin kovů, na pokovování proti korozi a při výrobě baterií. Nikl je esenciální stopový prvek, který je ale ve větším množství toxický a patří mezi karcinogeny [18]. Nikl se do vod dostává průmyslovou a zemědělskou činností, jako je například spalování fosilních paliv, uvolňování z elektráren a spalování odpadů [20]. Toxicita niklu se zvyšuje v přítomnosti jiných kovů ve vodách, jako například kobalt, měď, železo a zinek. Nikl ve vyšších koncentracích způsobuje vypadávání vlasů a zhoršování ekzémů [18].

Chrom

Mezi hlavní zdroje chromu v životním prostředí patří úniky z galvanických procesů a likvidace odpadů obsahující chrom a spalováním fosilních paliv, dále se využívá v kovových slitinách, v pigmentech pro nátěrové hmoty, při výrobě papíru a gumy. Při elektrolytickém pokovování může docházet k uvolňování oxidu chromu do vzduchu a to následně vede k přímému poškození kůže a plic. Dále se hromadí u vodních živočichů. Chronická expozice kyseliny chromové způsobuje dermatitidu a ulceraci kůže, dále poškození ledvin, jater a vážné poškození oběhové a nervové soustavy [18]. To způsobuje především Cr^{6+} , Cr^{3+} je pro savce esenciálním stopovým prvkem důležitým pro jejich metabolismus [21].

Arsen

Arsen se používá při výrobě prostředků na konzervaci dřeva, nebo se využívá v zemědělství pro výrobu pesticidů. Arsen je uvolňován při zpracování rud a je také přítomen v popelu ze spalování uhlí. Kovový arsen není jedovatý, ale je v těle přeměňován na toxické látky [21]. Zvýšená koncentrace má za následek poškození kůže, problémy s oběhovým systémem, rakovinu plic a kůže, zvýšené riziko nádorů

jater a ledvin. Při akutní vysoké expozici dochází k poškození buněk nervového systému, jater, ledvin a pokožky [20].

Zinek

Zinek se používá jako ochranný prostředek proti korozi a je součástí mnoha slitin i při výrobě barviv. Zinek se přirozeně v určitém množství vyskytuje v půdě, za zvýšené koncentrace může průmyslová činnost jako je těžba a zpracování zinkových rud, spalování odpadů a fosilních paliv nebo zpracování oceli. I některé potraviny a pitná voda mohou obsahovat určité množství zinku. Zinek je esenciální prvek v lidském těle a je nezbytný pro správný vývoj dětí [20]. Zvýšená koncentrace například v jídle v pozinkovaných nádobách pak způsobuje zdravotní problémy, jako jsou bolesti žaludku, zvracení, křeče a průjemy [21]. Zinek se neakumuluje v těle, ale dlouhodobá expozice může zvyšovat riziko srdečních chorob [20].

Rtuť

Rtuť se využívá při výrobě průmyslových chemikálií a v elektronice. Hlavním zdrojem rtuti v životním prostředí je spalování fosilních paliv a odpadů a zpracování rud s obsahem rtuti [20]. Dalším zdrojem mohou být hnojiva a fungicidy. Do lidského těla se rtuť může dostávat například z amalgámových zubních výplní nebo konzumací ryb. Rtuť se akumuluje v těle a velmi těžko se z těla vylučuje. Nejvíce se usazuje v ledvinách a příznaky otravy jsou nespecifické. Patří mezi ně úzkost, únava, ztráta paměti, ztráta vlasů, opakované infekce a autoimunitní nemoci [22].

1.2.4 Stanovení těžkých kovů

Těžké kovy jsou nebezpečné nejen pro člověka ale i pro životní prostředí, proto existuje mnoho metod pro jejich stanovení. Stanovení se provádí ve vzorcích vod, půdy, ovzduší, rostlinných materiálech a mnoha dalších.

Spektrofotometrické techniky

Pro stanovení těžkých kovů jsou široce využívány atomové spektrometrické techniky jako plamenová atomová absorpční spektrometrie (FAAS), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), elektrotermická atomová absorpční spektrometrie (ETAAS) a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) [23].

Mezi nejpoužívanější metody patří ICP-OES. Tato metoda je vhodná pro stanovení většiny těžkých kovů a dalších prvků v různých vzorcích vod, půdách a sedimentech po rozkladu [24]. ICP-OES lze použít pro simultánní nebo sekvenční stanovení velkého počtu prvků. Před použitím této techniky pro stopové množství stanovovaných prvků se musí ale použít další techniky pro zakoncentrování a úpravu vzorku, jako jsou například různé typy extrakce, srážení nebo i použití on-line zapojeného reaktoru. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a široce využívána především v laboratořích kontroly životního prostředí [25].

AAS je důležitá metoda pro stanovení stopových množství těžkých kovů především ve vzorcích vod. Metoda je to rychlá, levná ale omezená interferujícími složkami matrice [26]. AAS je standardizovaná metoda pro stanovení rtuti, kde se jiné metody běžně nevyužívají. Využívá se AAS metodou studených par nebo AAS po termickém rozkladu [27].

ICP-MS je vhodná metoda k analýze prvků, které jinými metodami nelze stanovit. Z těžkých kovů se touto metodou stanovují například Pb, Cd a As. Hlavní výhodou ICP-MS je velmi nízká spotřeba vzorku [28].

Další možnou metodou měření jsou luminiscenční techniky, které jsou díky stále lepšímu přístrojovému vybavení a detekčním technikám velmi účinné pro stanovení těžkých kovů zejména v biologických a environmentálních vzorcích. Velmi málo kovových iontů ale vykazuje přirozenou luminiscenci, proto je nutné tyto kovy vázat do komplexů s vhodnými ligandy [29]. Jako ligandy slouží deriváty di-2-picolylaminu jako je například N,N-di (pyridin-2-ylmethyl) ethan-1,2-diamin [30]. Dále se používá N, N-disubstituovaná N-acylthiourea. Syntéza této látky je jednoduchá a malými změnami může vznikat celá řada vhodných ligandů například N-methyl-N-9-(methylantracen)-N'-benzoylthiourea. Touto metodou byly stanoveny tyto kovy: Cu, Pd, Pt, Hg, Cd, Zn a Ni [29].

Elektrochemické stanovení

Elektrochemické stanovení je oblíbené díky svým výhodám, jako jsou nízké náklady, jednoduché postupy, miniaturizace, automatizace a rychlé analýzy. Mezi elektrochemické metody patří potenciometrie, voltametrie a konduktometrie. Různými modifikacemi pracovní elektrody lze dosáhnout zvýšení citlivosti, selektivity a reprodukovatelnosti senzoru [16]. Diferenční pulzní voltametrie (DPV) je vhodná pro stanovení stopových koncentrací iontů kovu, cyklická voltametrie (CV) je pak zase

vhodná pro pochopení redoxních procesů a pro analýzu meziproductů, voltametrie čtvercových vln (SWV) je citlivější a rychlejší než CV [31].

Mezi nejpoužívanější metodu pro stanovení těžkých kovů patří anodická rozpouštěcí (stripping) voltametrie (ASV) z důvodu vysoké selektivity a citlivosti. U ASV se využívá nahromadění analytu na pracovní elektrodě z roztoku za konstantního potenciálu. Redukované ionty kovu pak tvoří na povrchu rtuťové elektrody amalgám, který se po anodické polarizaci oxiduje a zase se rozpouští do roztoku a měří se anodický proud v závislosti na potenciálu, který je úměrný koncentraci kovu [32].

Další metody stanovení

Ke stanovení těžkých kovů se dále používá neutronová aktivační analýza. Jedná se o multi-elementární techniku, která je vhodná pro stanovení těžkých kovů, které se akumulovaly v různých biologických materiálech v širokém rozmezí koncentrací [33]. Metoda je to rychlá a relativně levná a nevyžaduje komplexní přípravu vzorku. Touto metodou mohou být bezproblémově stanoveny tyto prvky: Mn, Cr, Ni, Co, Fe, As, Zn, Ga, Sr, Se, Rb, Zr, Mo, Cd, Ag, In, Sn, Te, Sb, Ba, Cs, Hf, Hg, Ta a W [34]. Metoda je založená na měření gama záření, které vzniká rozpadem radioaktivních izotopů vyvolaných po ozáření vzorku neutrony. Každý takto aktivovaný prvek emituje charakteristické záření, které je kvantitativně měřeno s vysokou přesností [35].

1.3 Biosenzory založené na acetylcholinesteráze

Pod pojmem biosenzor si lze představit malý, přenosný, analytický přístroj, který je schopen poskytnout kvantitativní analytické informace. Využívá citlivost a selektivitu biologického rozpoznávajícího prvku (biochemický receptor), který je připojen na povrch převodníku. Ten reaguje na rozpoznávající prvek a transformuje biochemické nebo fyzikálně chemické vlastnosti na měřitelný signál [36]. Typy měřitelných signálů jsou v tabulce č 2. Jako rozpoznávací prvek může sloužit enzym, protilátka nebo i DNA [37]. Biosenzory založené na ChE jsou velmi užitečnou technikou pro analytické a klinické účely, běžně se používají v lékařské chemii, při monitoringu životního prostředí, zemědělství, potravinářství, v toxikologii i pro vojenské aplikace. V poslední době nahrazují klasické techniky především díky jednoduchosti, možnosti miniaturizace, rychlosti, minimální přípravě vzorku a použitelnosti mimo laboratoř [38].

AChE se dá u biosenzorů využít dvěma způsoby, enzym může metabolizovat analyt a jeho koncentrace se určuje měřením produktu, nebo analyt může inhibovat enzym a měří se snížená koncentrace produktu [39]. AChE je citlivá na inhibici organofosfáty, karbamátovými pesticidy, nervově paralytickými látkami, přírodními toxiny, některými léky a těžkými kovy. Proto se AChE používá jako rozpoznávající prvek pro konstrukci biosenzorů [6]. První biosenzor založený na inhibici ChE pro detekci nervově paralytických látek byl vyvinut v roce 1962. Následoval vývoj a zlepšování biosenzorů i pro další látky například díky dostupnosti čistých enzymů [39].

Kromě přírodního substrátu acetylcholinu může AChE hydrolyzovat také acetylthiocholin, propionylthiocholin, o-nitrofenylacetát, indoxylacetát, sukcinylcholin, adipoylcholin, benzoylcholin, butyrylcholin a další [3, 36]. AChE bývá nejčastěji extrahována z octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) a z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) [36].

Tabulka 2: Typy měřeného signálu (převzato z [37])

Signál	Měření/parametr
Elektrochemický	Amperometrie/proud Potenciometrie/napětí při nulovém proudu
Elektrický	Konduktometrie/vodivost
Optický	Fotometrie/luminiscence, fluorescence Refraktometrie/index lomu
Tepelný	Kalorimetrie/teplota

1.3.1 Optické biosenzory

Optické biosenzory jsou velmi využívány především díky dobré dostupnosti optických přístrojů a zavedeným protokolům pro testování. Využívá se spektrofotometrických, kolorimetrických i fluorometrických reakcí. Výhodou je viditelná reakce, kterou lze v případě potřeby kontrolovat pouhým okem. Mezi nevýhody patří interference ostatními zbarvenými látkami jako například hemoglobin. Některé hydrolytické reakce jsou viditelné přímo, u některých je nutné požit chromogenní činidlo [40].

Nejběžnější metoda pro stanovení aktivity ChE je Ellmanova metoda, která využívá acetylthiocholin jako substrát a DTNB jako činidlo. Po reakci vzniká žluté zbarvení. Nevýhodou je nestabilita DTNB. Další možností je využití indoxyl acetátu, kde lze využít i fluorometrického stanovení, jeho výhodou je vysoká stabilita [40]. Dále se využívá tvorby kyseliny octové a následné snížení pH kdy se pomocí indikátoru citlivého na pH detekuje průběh reakce [41]. Mezi indikátory citlivé na pH patří i fluorescenční činidla, takovým činidlem může být například pyranin [42]. V posledních letech se využívají kvantové tečky, které mají mnoho výhod oproti ostatním metodám, například úzká symetrická emisní spektra a simultánní buzení více fluorescenčních barev [4]. Této metody využívá například Z. Zheng a kol. pro stanovení pesticidů ve vodách a v potravinách. S použitím CdTe je možné sestavit vhodný optický biosenzor, který dosahuje lepších detekčních limitů než u ostatních metod [43].

Také biosenzory s optickým vláknem jsou v posledních letech více rozšířeny. Využívají úplný vnitřní odraz, kdy paprsky jsou vedeny středem křemenného nebo plastového optického vlákna s jen velmi malou ztrátou. Dají se použít v kombinaci s různými spektroskopickými metodami, například lze měřit absorbanci, fluorescenci a fosforescenci [44]. Dají se použít při měření, kde použití ostatních senzorů není vhodné, jsou kompaktní a lehké a jsou odolné vůči elektromagnetickému rušení a mají nižší teplotní závislost, takže jejich použití je výhodnější než u elektrochemických biosenzorů. Nevýhodou pak může být interference okolního světla a omezená dostupnost příslušenství, které je kompatibilní s optickými vlákny [45].

1.3.2 Elektrochemické biosenzory

U elektrochemických biosenzorů se využívá potenciometrie a amperometrie (voltametrie). Elektrochemické biosenzory mají řadu výhod oproti optickým, nejsou například citlivé na interference barevnými látkami. Pro měření se využívá

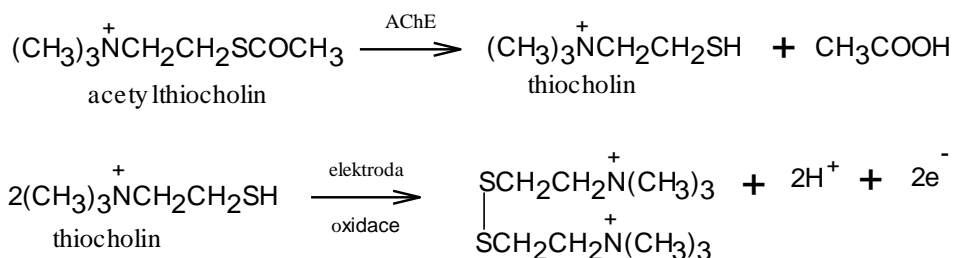
monoenzymatického způsobu měření nebo měření se dvěma enzymy. Mezi první ChE biosenzory patřilo bi-enzymatické amperometrické čidlo s cholinesterázou a cholinoxidázou, kdy byl amperometicky detekován peroxid vodíku [46].

1.3.2.1 Potenciometrické biosenzory

Tyto biosenzory s potenciometrickým principem využívají stanovení iontů, které indukují potenciál na elektrodách, využívají tedy ke stanovení aktivity měření pH. Konstrukce senzoru je jednoduchá a jako substrát se především využívá acetylcholin [4]. Po hydrolyze acetylcholinu AChE vzniká kyselina octová, díky níž dojde k okyselení roztoku. Obvykle se používá iontově selektivní elektroda nebo iont-citlivý tranzistor řízený polem (ISFET), který má schopnost detekovat koncentraci iontů v roztoku. Stanovení pomocí ISFET vyniká velmi rychlou odezvou (sekundy-minuty) a vysoce kvalitním výkonem právě pro detekci enzym-substrát reakcí [47].

1.3.2.2 Amperometrické biosenzory

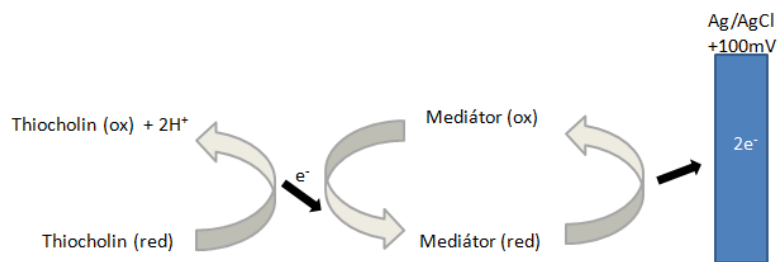
Tyto biosenzory jsou založené na měření proudu, který vzniká elektrochemickou oxidací nebo redukcí za konstantního potenciálu na pracovní elektrodě. Jsou jednodušší než potenciometrické senzory a výstupním signálem je lineární závislost signálu na koncentraci analytu. Existují dva způsoby měření [41]. První z nich je použití jednoho enzymu a to AChE. Jako substrát se používá acetylthiocholin, po jeho hydrolyze je thiocholin oxidován na dithiol (obr. 7) po vložení napětí a anodický proud je pak nepřímo úměrný inhibitoru ve vzorku. Měření se nejčastěji provádí proti argentochloridové elektrodě [42]. Výhodou tohoto způsobu měření je potřeba jen jednoho enzymu. Konstrukce je tedy jednodušší a tyto biosenzory jsou používány častěji než bienzymatické [39].



Obrázek 7: Hydrolyza acetylthiocholinu a následná oxidace thiocholinu vloženým napětím (převzato a upraveno z [42])

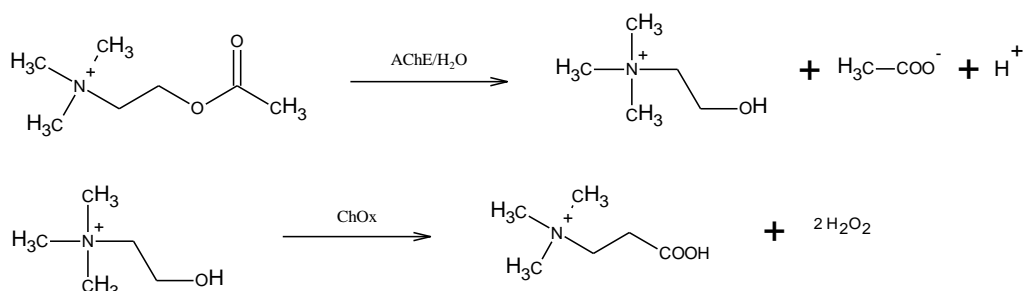
Pro snížení aplikovaného potenciálu a možné elektrochemické interference se používají redoxní mediátory, jako je například berlínská modř, hexakyanoželezitan a

další. Jejich aplikace výrazně snižuje pracovní potenciál, zvyšují citlivost a reprodukovatelnost a obvykle jsou umístěny na povrchu elektrody (obr. 8) [48].



Obrázek 8: Aplikace redoxních mediátorů (převzato a upraveno z [41])

Další způsob měření je s použitím dvou enzymů a to AChE s cholinoxidázou a s amperometrickým snímačem kyslíku nebo peroxidu vodíku. AChE nejdříve hydrolyzuje acetylcholin na cholin a kyselinu octovou, a protože cholin ani kyselina octová nejsou elektrochemicky aktivní, nemůže být detekován přímo [41]. Využívá se tedy cholinoxidázy, která oxiduje cholin na betain a peroxid vodíku (obr. 9), který už může být detekován amperometricky s použitím platinové elektrody proti Ag/AgCl elektrodě nebo můžeme sledovat pokles kyslíku měřením Clarkovou elektrodou [39].



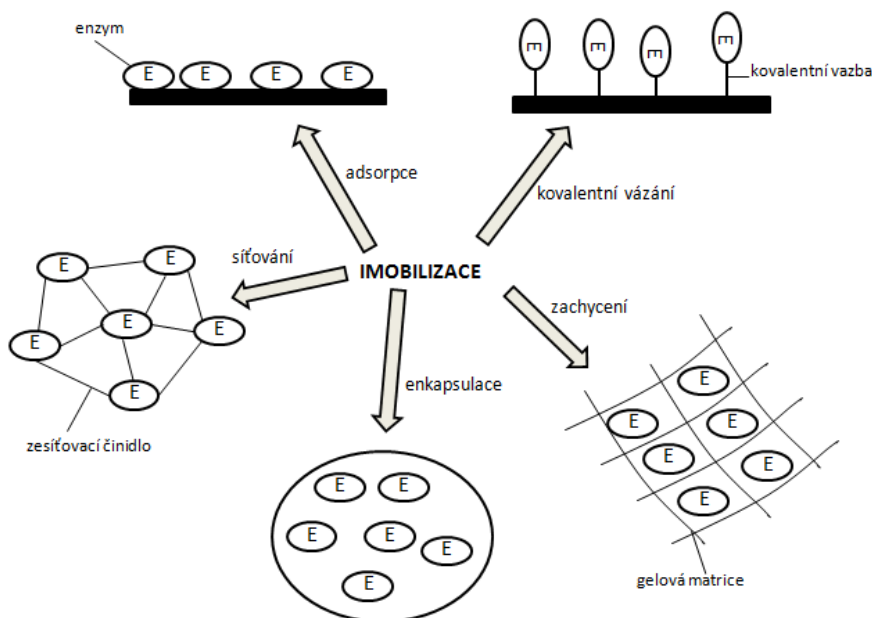
Obrázek 9: Využití AChE a ChOx při konstrukci biosenzoru (převzato a upraveno z [41])

1.3.2.3 Konduktometrický biosenzor

U konduktometrického senzoru měříme vodivost elektrolytu, která se mění se změnami koncentrace iontů. U těchto biosenzorů není třeba referenční elektroda a dají se velmi dobře miniaturizovat, což je jejich velkou výhodou. Nevýhodou pak je nižší citlivost oproti amperometrickému senzoru [49]. Senzor se skládá ze dvou elektrod, na kterých je imobilizován enzym. V průběhu reakce vznikají vodíkové ionty, to má za následek změnu ve vodivosti. Tento senzor je vhodný pro měření toxických látek jako jsou organofosforové pesticidy, těžké kovy, aflatoxiny a glykoalkaloidy [50].

1.3.3 Imobilizace

Nejdůležitějším krokem ve vývoji senzoru je pevné upevnění enzymu na povrch senzoru, které by mělo být k enzymu šetrné a nemělo by docházet k jeho vymývání. Existují různé způsoby imobilizace, například adsorpce, zachycení kovalentní chemickou vazbou a vázání pomocí různých membrán. Imobilizované enzymy mají řadu výhod oproti volnému enzymu, jako je menší spotřeba enzymu, nižší interference a skladovatelnost biosenzoru [37]. Neexistuje ale univerzální způsob imobilizace, při každém návrhu biosenzoru se musí přihlížet na faktory, jako je citlivost, stabilita a vlastnosti fyzikálně-chemického převodníku [51]. Imobilizaci provádíme především v těch případech, kdy stanovovaná látka neinhibuje enzym trvale. Při ireverzibilní inhibici není nutná dlouhodobě stabilní imobilizace z důvodu jednorázového použití senzoru [52]. Na obrázku 10 jsou znázorněny možnosti imobilizace enzymů.



Obrázek 10: Typy imobilizace (převzato a upraveno z [41])

Adsorpce

Fyzikální adsorpce je nejjednodušší a nejméně denaturující metoda imobilizace. Skládá z jednoduchého nanesení enzymu na povrch senzoru a upevnění AChE pomocí slabých vazeb (Van der Waalsovi síly a elektrostatické interakce). Jedná se o levný a jednoduchý způsob imobilizace, ale tyto senzory nemají při měření a skladování dobrou stabilitu z důvodu desorpce změnou pH, teploty a iontové síly [36]. Metoda je jednoduchá, ale je zapotřebí většího množství enzymu. Tento způsob imobilizace byl použit v práci C. Bonneta, kde byla aktivita AChE měřena amperometricky pomocí

Ag/AgCl elektrody jako referenční a grafitové jako pracovní. Obě elektrody byly ploché, aby mohla být dobře adsorbována AChE. Tento snímač byl použit pro detekci organofosforových a karbamátových insekticidů [53].

Zachycení v matici

Tento způsob imobilizace je jednoduchý a umožňuje kotvení většího množství enzymu, tepelnou a chemickou stabilitu a umožňuje také výběr velikosti a tvaru pórů v matici pro proniknutí substrátu nebo inhibitoru. Enzym je imobilizován v trojrozměrné matici jako je fotopolymer, silikagel, polysacharid a další. Tyto biosenzory se vyznačují dobrou provozní a skladovací stabilitou. Většina těchto senzorů využívá amperometrickou detekci [41]. Ale dá se využít i při konstrukci jednoduchého voltametrického biosenzoru, kde je využita imobilizace pomocí sol-gelu na povrchu uhlíkové pastové elektrody [54].

Kovalentní vazba

Vázání kovalentní vazbou je nejrozšířenější chemická metoda imobilizace. Enzym je navázán na povrchu pomocí funkčních skupin. Postup imobilizace zahrnuje aktivaci povrchu pomocí bifunkčních činidel například glutaraldehydem, následuje vazba enzymu k aktivovanému nosiči, a nakonec se odstraňuje přebytek enzymu. Činidlo se váže na nosič amino, karboxyl nebo hydroxylovou skupinou a na druhé straně s enzymem. Tato technika imobilizace zvyšuje stabilitu enzymu, ale je ho potřeba větší množství. Kovalentní vázání úzce souvisí se zesítním, protože se obvykle používá obou způsobů najednou [55].

Sítování

Tato imobilizace využívá bifunkční činidla jako je glutaraldehyd (GA), sukcinimid, glyoxal a další. Hlavní nevýhodou je možný pokles aktivity způsobený narušením konformace enzymu a chemické změny v aktivním místě během procesu zesítnění [41, 56].

1.3.4 Aplikace

Cholinesterázové biosenzory mají široké využití, nejběžnější je ale stanovení pesticidů a nervově paralytických látek.

Pesticidy se uvolňují ve velkém množství do životního prostředí a jejich enzymatická detekce je založena na inhibici ChE. Tyto biosenzory jsou užitečné

v zemědělství, potravinářství a v medicíně a využívá se jich díky rychlé detekci těchto látek [57]. Například N. Chauhan a kol. amperometricky stanovuje pesticidy v půdě a ve vzorcích potravin [58]. Pro stanovení karbamátových a organofosforových pesticidů byl v práci A. Hildebrandta použit přenosný biosenzor se sítotiskem zhotovenou elektrodou [59].

Biosenzory se využívají i pro včasnou detekci bojových chemických látek, především nervových plynů. Nervové plyny mají podobnou strukturu jako organofosforečné pesticidy, ale jsou mnohem více toxické, proto je potřeba spolehlivý a přenosný senzor, který dokáže detekovat velmi malé koncentrace těchto látek [60]. Například S. Upadhyay ve své práci stanovuje mimo pesticidy i nervové látky, konkrétně sarin. Využívá amperometrického biosenzoru s AChE a ChOx imobilizovanými pomocí glutaraldehydu na elektrodě [61]. Další využití mají senzory pro stanovení léků proti Alzheimerově nemoci [62]. Mezi další aplikace patří stanovení těžkých kovů. Jejich monitoring ve vodě a v potravinách je důležitý vzhledem k jejich vysoké toxicitě, ochraně životního prostředí a schopnosti se hromadit v živých organismech. Například v práci S. Sanllorente-Méndeze byl amperometricky stanovován arsen ve vzorcích vody. Byla použita elektroda s imobilizovanou AChE [63].

2. Cíl práce

Cílem práce bylo stanovení aktivity acetylcholinesterázy a kinetických konstant. Dále byla cílem její imobilizace a následná konstrukce biosenzoru s imobilizovanou acetylcholinesterázou pro stanovení těžkých kovů.

3. Experimentální část

3.1 Přístroje a pomůcky

- spektrofotometr Evolution 201 UV-VIS, Thermo Scientific
- spektrofotometr SpectroVis plus, Vernier software a technology
- UV box, Camag
- 3D tiskárna, Prusa I3 MK2, Prusa Research Praha, ČR

3.2 Chemikálie

- acetylcholinesteráza z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) (EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich)
- fosfátový pufr, PBS-Phosphate Buffered Saline, (pH 7,4), Sigma-Aldrich
- kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB 99%) Sigma-Aldrich
- acetylthiocholin chlorid, 99% Sigma-Aldrich
- TRIS pufr, Sigma-Aldrich
- indoxylacetát, (≥ 95 %, Sigma- Aldrich)
- chlorid kademnatý, Sigma-Aldrich
- chlorid zinečnatý, Sigma-Aldrich
- takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin hydrochlorid hydrát), Sigma-Aldrich
- fenolová červeň, Sigma-Aldrich
- acetylcholin chlorid, Sigma-Aldrich
- karbofuran, Sigma-Aldrich
- chlorid měďnatý, Sigma-Aldrich
- želatina (p.a. Penta)
- glutaraldehyd (0,1 mol/l), Sigma-Aldrich
- chitosan (z krunýřů krevet, Sigma-Aldrich)
- kyselina octová (99%), Penta
- hydroxid sodný, Penta
- 2-hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiofenon, Sigma-Aldrich
- poly(ethylenglykol)diakrylat, Sigma-Aldrich
- albumin z hovězího séra, Sigma-Aldrich
- ethanol 50%, Penta

3.3 Ellmanova metoda

- Pufir PBS byl připraven dle návodu
- Acetylcholinesteráza: AChE byla rozpuštěna v PBS pufru, aby absorbance po 1 min byla v rozmezí 0,5-0,8 (412 nm). Poté byl přidán albumin (10 mg na 10 ml pufru) na stabilizaci.
- DTNB: Na všechny experimenty byla připravena DTNB o koncentraci 1 mmol/l. Pokaždé byla připravená nová DTNB. Navážka byla rozpuštěna v PBS pufru a zkumavka byla obalena alobalem, jelikož DTNB je citlivá na světlo.

3.3.1 Stanovení enzymových konstant

Pro stanovení aktivity AChE pro jednotlivé koncentrace substrátu byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu (ATChCl) o koncentraci 150 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v PBS pufru. Z něj pak byla připravena řada koncentrací v rozmezí od 313 μ mol/l do 100 mmol/l. Následně bylo do standardních kyvet postupně pipetováno:

- 25 μ l AChE
- 475 μ l PBS pufru
- 400 μ l Ellmanova činidla (DTNB)
- Reakce byla spuštěna 100 μ l ATChCl a následně byla změřena absorbance (412 nm)
- Poté následovala 1 min inkubace (obr. 11) a opětovné změření absorbance

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, místo enzymu bylo ale přidáno 25 μ l PBS pufru.



Obrázek 11: Kyvety, ve kterých probíhá reakce pro měření aktivity Ellmanovou metodou

3.3.2 Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl₂ - spektrofotometr

Saturační křivka:

Byl připraven zásobní roztok ATChCl o koncentraci 100 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v PBS pufru. Z něj pak byla připravena koncentrační řada od 78,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 475 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, místo enzymu byl ale přidán pufr. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a následně po 2 minutách inkubace.

Inhibice CuCl₂:

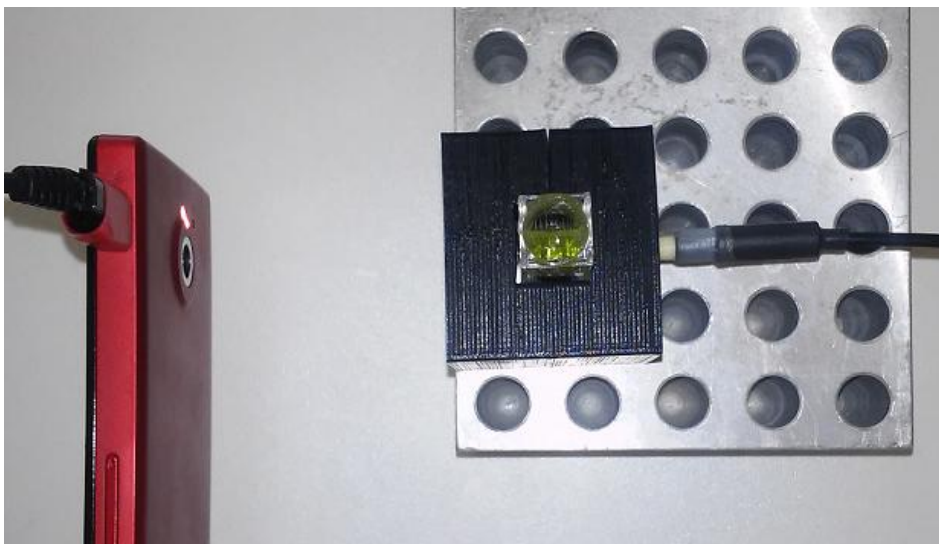
Byl připraven roztok substrátu acetylthiocholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l a z něj pak roztok pro měření o koncentraci 2,5 mmol/l. Tato koncentrace byla vybrána podle grafu saturační křivky, u této koncentrace začínalo docházet k poklesu signálu (při vyšší koncentraci by nemusela být inhibice dostatečná pro měření). Dále byl připraven roztok CuCl₂ o koncentraci 10 mmol/l a následně byla připravena koncentrační řada od 19,5 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 1,95 $\mu\text{mol/l}$ do 0,1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 350 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanovo činidlo
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok a kontrola byly připraveny stejným způsobem, místo enzymu byl ale pipetován pufr a u kontroly byl přidán místo inhibitoru pufr. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a následně po 2 min.

3.3.3 Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl₂ - optické vlákno

Pro měření byla zhotovena kyvetová šachta s otvory pro optické vlákno a pro zdroj světla metodou 3D tisku (obr. 12). Postupně bylo zhotoveno několik šachet a měřením se zjišťovala jejich vhodnost pro měření.



Obrázek 12: Kyvetová šachta (zdroj světla: 4,5 cm od kyvety)

Před měřením byl změřen signál v prázdné šachtě, stojánku s kyvetou bez enzymu a s kyvetou se substrátem o koncentraci 10 mmol/l (výsledná koncentrace 1 mmol/l) po 15 min. Byl zaznamenán záznam optické hustoty v programu Logger Pro v rozmezí vlnové délky od 380 do 899 nm.

Saturační křivka:

Byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 100 mmol/l. Z něj pak byla připravena koncentrační řada s rozmezím od 625 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetě pak byly od 62,5 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo následně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 475 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, místo enzymu byl ale přidán pufr. Optická hustota (412 nm) byla měřena ihned po přidání substrátu a poté po 10 min inkubaci.

Inhibice CuCl₂:

Byl připraven roztok CuCl₂ o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna ve vodě. Poté byla připravena řada koncentrací od 9,76 μmol/l do 1,25 mmol/l (výsledná koncentrace v kyvetách pak byla od 0,976 do 125 μmol/l). Pro měření byl použit roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 2,5 mmol/l. Do kyvet pak bylo postupně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 375 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok a kontrola byly připraveny stejným způsobem, jen u srovnávacího roztoku byl přidán místo enzymu pufr a u kontroly místo inhibitoru pufr. Optická hustota (412 nm) byla měřena ihned po přidání substrátu a následně po 3 min.

3.3.4 Imobilizace želatinou, saturační křivka a inhibice CuCl₂ - spektrofotometr

Byla připravena 1% želatina (tato koncentrace byla vybrána z důvodu dobrých výsledku v diplomové práci P. Břízové [64]). Navážka želatiny byla rozpuštěna v PBS pufru a byla přidána acetylcholinesteráza, tak že v každé kyvetě bylo výsledně 25 μl enzymu. Tento roztok s želatinou byl pipetován do kyvet po 100 μl. Kyvety byly nechány ve tmě 5 dní, aby došlo k vyschnutí. Bylo připraveno i 5 kyvet bez enzymu.

Saturační křivka:

Pro měření byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 50 mmol/l. Z tohoto roztoku pak byla připravena koncentrační řada od 7,81 μmol/l do 10 mmol/l (výsledná koncentrace v kyvetách pak byla od 7,81 μmol/l do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 500 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Na srovnávací roztok byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance (412 nm) byla měřena ihned po přidání substrátu a dále po 3 minutách inkubace.

Opakovatelnost měření:

Měření bylo prováděno stejným způsobem jako v předchozím bodě. Byl použit substrát o koncentraci 10 mmol/l. Po změření byla kyveta opatrně 2 krát promyta pufrům a byla použita k dalšímu měření.

Inhibice CuCl₂:

Pro měření byl použit roztok aceylthiocholin chloridu o koncentraci 2,5 mmol/l. Dále byl připraven roztok CuCl₂ o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna ve vodě. A byla připravena koncentrační řada od 39,1 μmol/l do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 3,91 μmol/l do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 400 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejným způsobem, místo inhibitoru byl ale přidán pufr. Jako srovnávací roztok byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a následně po 3 minutách.

3.3.5 Imobilizace želatinou (+GA), saturační křivka, CuCl₂ - spektrofotometr

Byla připravena 1% želatina. Navážka byla rozpuštěna v pufru a byl přidán enzym tak, že výsledně v každé kyvetě bylo 25 μl enzymu. Následně byl připraven 5% glutaraldehyd (100% GA zředěn destilovanou vodou). Roztok želatiny s enzymem byl pipetován do kyvet po 100 μl. Následně bylo do každé kyvety přidáno 10 μl GA a kyvety byly nechány ve tmě 8 dní vyschnout. Bylo připraveno i 5 kyvet bez enzymu.

Saturační křivka:

Pro měření byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 50 mmol/l. Z něj pak byla připravena řada koncentrací od 78,1 μmol/l do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 μmol/l do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 500 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Pro srovnávací roztok byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance (412 nm) byla měřena ihned po přidání substrátu a následně po 15 min. Před měřením musel být obsah kyvety promíchán z důvodu žloutnutí především u dna kyvety. Kyveta byla překryta parafínovou folií a obsah byl promíchán.

Opakovatelnost měření:

Měření bylo prováděno stejným způsobem, byla použita koncentrace substrátu 10 mmol/l. Po změření byl obsah kyvety vylit a 2 krát promyt pufrům. Kyveta pak byla použita pro další měření.

Inhibice CuCl₂:

Pro měření byl připraven roztok CuCl₂ o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v destilované vodě. Následně byla připravena řada koncentrací od 9,77 μmol/l do 5 mmol/l. (Výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 0,977 μmol/l do 0,5 mmol/l.) Pro měření byl použit roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 2,5 mmol/l. Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 400 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejným způsobem, jen místo inhibitoru byl přidán pufr. Pro přípravu srovnávacího roztoku byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a následně po 15 minutách.

3.3.6 Želatinová membrána, stabilizace GA - optické vlákno

Byla připravena 1% želatina. Navážka byla rozpuštěna v PBS pufru a byl přidán enzym tak, aby výsledně v každé kyvetě bylo 25 μl enzymu. Následně byl připraven 5% glutaraldehyd (100% GA zředěn destilovanou vodou). Roztok želatiny s enzymem byl pipetován do kyvet po 100 μl. Následně bylo do každé kyvety přidáno 10 μl GA a kyvety byly nechány ve tmě 8 dní vyschnout. Bylo připraveno také 5 kyvet bez enzymu.

Saturační křivka:

Byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Z něj pak byla připravena řada koncentrací od 78,1 μmol/l do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 μmol/l do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 500 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, jen byla použita kyveta bez enzymu. Optická hustota (412 nm) byla zaznamenávána vždy před vložením kyvety a po vložení kyvety po 15 min.

Inhibice CuCl_2 :

Byl připraven roztok CuCl_2 o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna ve vodě. Poté byla připravena řada koncentrací od 19,5 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l. Pro měření byl použit roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 2,5 mmol/l. Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 400 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejným způsobem, jen místo inhibitoru byl přidán pufr. Optická hustota (412 nm) pak byla zaznamenána vždy před vložením kyvety a poté po vložení kyvety po 15 min.

Opakovatelnost měření:

Pro opakované měření byla použita koncentrace acetylthiocholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Měření bylo prováděno ve 3 kyvetách. Po měření byly kyvety vylity, vymyty puftrem a použity pro další měření.

3.3.7 Chitosanová membrána, saturační křivka a inhibice CuCl_2 - spektrofotometr

Příprava chitosanové membrány:

Do kádinky byl navážen chitosan a byl rozpuštěn v kyselině octové (99%) (Na 20 mg chitosanu 1 ml kys. octové). Na 1 ml roztoku pak bylo přidáno 80 μl enzymu. Do kyvet bylo pipetováno 50 μl směsi a 30 min se to nechalo tuhnout. Poté bylo přidáno 25 μl hydroxidu sodného a nechalo se 15 min reagovat. Poté bylo přidáno 5 μl GA. Kyvety byly nechány ve tmě vysychat. 5 kyvet bylo připraveno bez enzymu.

Saturační křivka:

Pro měření byl připraven roztok acetylthiocholin chloridu o koncentraci 50 mmol/l. Z něj pak byla připravena řada koncentrací od 78,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 500 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, jen byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a pak po 15 min.

Opakovatelnost měření:

Opakování bylo prováděno ve třech kyvetách se substrátem o koncentraci 5 mmol/l. Měření bylo prováděno jako v předchozím bodě. Kyvety byly po měření vylity, vymyty a použity pro další měření.

Inhibice:

Pro měření byl připraven CuCl_2 o koncentraci 50 mmol/l. Z tohoto roztoku pak byla připravena řada koncentrací od 9,77 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 0,977 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo následně pipetováno:

- 400 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl inhibitoru
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejným způsobem, jen místo inhibitoru byl přidán pufr. Absorbance (412 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a poté po 15 min.

Dále bylo provedeno ještě doplňující měření v kyvetách:

- bez enzymu a bez substrátu
- s enzymem a bez substrátu
- bez enzymu a se substrátem
- inhibitor CuCl_2 10 mmol/l
- inhibitor karbofuran 100 μl (1 mmol/l)

- inhibitor karbofuran 25 μl (1 mmol/l, 10 min inkubace)

3.3.8 Chitosanová membrána – bez vyschnutí, - spektrofotometr

Membrána byla připravena jako v kapitole 3.3.7. Kyvety byly poté ale zakryty parafínovou folií a dány do lednice, aby nedošlo k vyschnutí membrány. Měření saturační křivky, inhibice a opakovatelnosti měření pak bylo prováděno stejným způsobem jako v kapitole 3.3.7.

3.3.9 UV polymerace - spektrofotometr

Byl připraven roztok 2-hydroxy-4-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiofenonu, který byl rozpuštěn v roztoku z poly(ethylenglykol)diakrylatu, PBS pufru s enzymem a TWEENU. Tento roztok byl pipetován do kyvet po 30 μl . A kyvety byly nechány pod UV lampou. Bylo připraveno i 5 kyvet bez enzymu.

Saturační křivka:

Byl připraven acetylthiocholin chlorid o koncentraci 10 mmol/l. Z něj pak byla připravena řada koncentrací od 78,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 500 μl PBS pufru
- 400 μl Ellmanova činidla
- 100 μl substrátu

Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, jen byla použita kyveta bez enzymu. Absorbance byla měřena okamžitě po přidání substrátu a pak po 15 a 30 min.

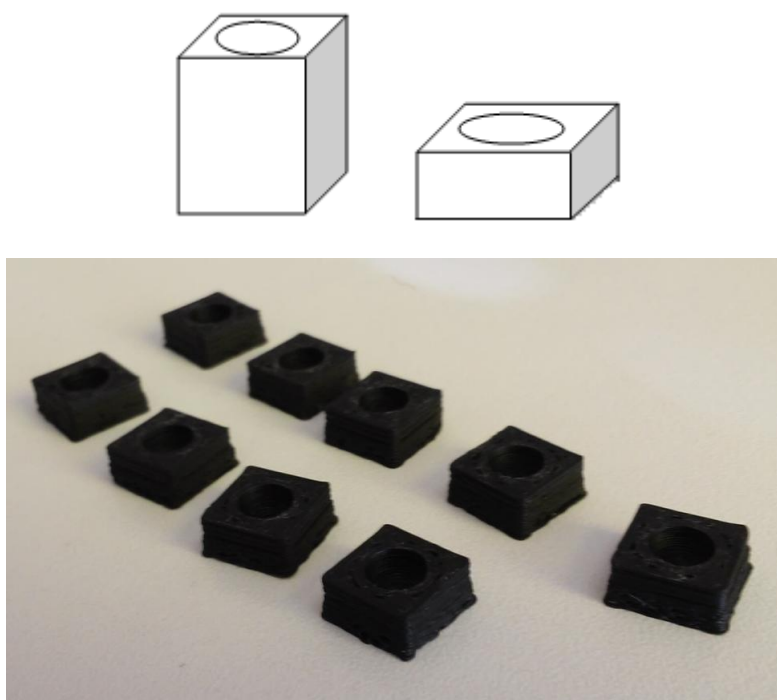
3.4 Měření fluorescence u indoxyl acetátu

Jelikož se kovy v PBS pufru srážejí, byl použit TRIS-HCl pufr (50 mmol/l). Byl připraven zásobní roztok indoxyl acetátu o koncentraci 25 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v 50% ethanolu a zkumavka byla obalená alobalem kvůli citlivosti na světlo.

- Porovnání aktivit AChE v TRIS-HCl pufru o různých hodnotách pH: byl připraven pufr o hodnotách pH 6,6; 7,0; 7,6; 8,0 a 8,4. Do jamek 96ti jamkové destičky bylo přidáno 5 μl enzymu, 175 μl pufru a 20 μl indoxyl acetátu. Následovala hodinová inkubace, po které byla destička vložena do UV boxu a vyfocena a tím zaznamenána fluorescence.
- Inhibice CdCl_2 a ZnCl_2 : byly připraveny zásobní roztoky CdCl_2 o koncentraci 1 mol/l a ZnCl_2 o koncentraci 400 mmol/l a následně byly zředěny tak, aby

výsledné koncentrace v destičce byly u CdCl_2 20, 15, 10, 5 a 1 mmol/l a u ZnCl_2 5, 4, 3, 2 a 1 mmol/l. Do jamek bylo pipetováno 5 μl enzymu, 170 μl pufru (50 mmol/l, pH 7,6), 5 μl inhibitoru a 20 μl indoxyl acetátu. Kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo inhibitoru byl pipetován pufr. Následovala hodinová inkubace, po které se destička vložila do UV boxu a byla vyfocena a vyhodnocena fluorescence.

- Nahrazení 96ti jamkové destičky černými jamkami zhotovenými 3D tiskem. Byly vytisknuty dva typy jamek. 1. typ byl vyšší a jamka měla válcový tvar. 1. typ byl nízký a jamka byla miskovitého tvaru (obr. 13).



Obrázek 13: Použité typy jamek (dole: 2. typ.)

1. typ: byl připraven zásobní roztok indoxyl acetátu o koncentraci 25 mmol/l a z něj byla připravena řada o koncentracích 20, 15, 10 a 5 mmol/l. Do prvního typu jamek bylo pipetováno 5 μl enzymu, 175 μl pufru a 20 μl indoxyl acetátu. Po inkubaci byly jamky umístěny do UV boxu a vyfoceny.
2. typ: inhibice takrinem. Byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mmol/l. Navážka takrinu byla rozpuštěna v pufru (TRIS HCl, pH 7,6). Zásobní roztok byl dvojkově naředěn. Do jamek byl pipetován celkový objem 50 μl . Bylo pipetováno 5 μl enzymu, 5 μl takrinu o koncentracích 10 mmol/l až 156 $\mu\text{mol/l}$, 20 μl indoxyl acetátu (25 mmol/l) a 20 μl pufru.

Během inkubace byly jamky přikryty parafínovou folií, aby nedocházelo k vysychání. Jamky byly umístěny do UV boxu a vyfoceny.

- Měření na spektrofotometru: Do kyvety bylo pipetováno: 25 μl enzymu, 100 μl indoxyl acetátu a 875 μl pufru. Po inkubaci byla změřena absorbance (670 nm).

3.5 Fenolová červeň

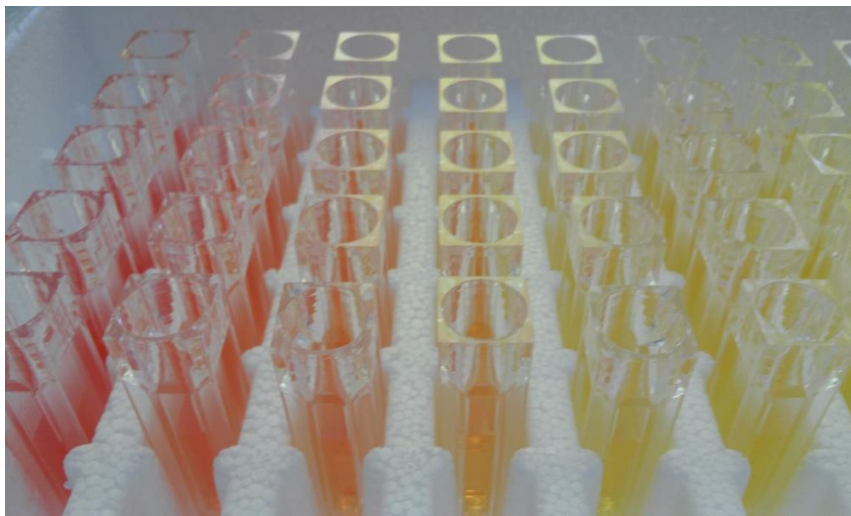
Kromě Ellmanovy metody se dá sledovat přírůstek produktu také díky vznikající kyselině octové a následnému poklesu pH. V roztoku pak dochází ke změně barvy přidané fenolové červeni (z červené do žluté). Pro všechna měření byl použit TRIS-HCl pufr o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ a pH 7,4.

3.5.1 Saturační křivka acetylcholin chloridu - spektrofotometr

Byl připraven roztok acetylcholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Navážka acetylcholin chloridu byla rozpuštěna ve vodě. Dvojkovým ředěním pak byla připravena řada koncentrací od 78,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet pak bylo pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 675 μl pufru
- 200 μl fenolové červene
- 100 μl substrátu

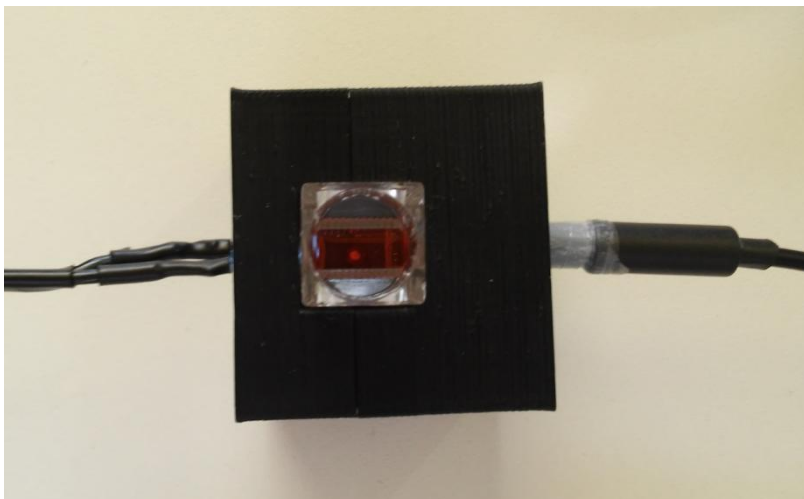
Absorbance byla měřena při 558 nm ihned po přidání substrátu a následně po 15 min (obr. 14). Srovnávací roztok byl připraven stejným způsobem, jen místo substrátu byl přidán pufr.



Obrázek 14: Kyvety, ve kterých probíhá reakce pro stanovení aktivity s fenolovou červení

3.5.2 Saturační křivka acetylcholin chloridu – optické vlákno

Měření probíhalo pomocí optického vlákna a kyvety byly vloženy do kyvetové šachty s vývodem pro optické vlákno a zdroj světla, který byl zhotoven 3D tiskárnou (obr. 15).



Obrázek 15: Kyvetová šachta (vlevo: zdroj světla, vpravo: optické vlákno)

Byl připraven roztok acetylcholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v destilované vodě. Dvojkovým ředěním byla připravena řada roztoků o koncentracích od 78,1 $\mu\text{mol/l}$ do 10 mmol/l (výsledné koncentrace v kyvetách pak byly od 7,81 $\mu\text{mol/l}$ do 1 mmol/l). Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 675 μl TRIS-HCl pufru
- 200 μl fenolové červeně
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo substrátu byl přidán pufr. Optická hustota (558 nm) pak byla zaznamenávána pomocí programu Logger Pro ihned po přidání substrátu a pak po 15 min.

3.5.3 Inhibice takrinem – optické vlákno

Pro měření byl připraven zásobní roztok acetylcholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna ve vodě. Takrin byl připraven o koncentraci 4 mmol/l. Navážka byla rozpuštěna v pufru. Z něj pak byla připravena kalibrační řada o koncentracích od 50 nmol/l do 1,6 $\mu\text{mol/l}$ (výsledné koncentrace v kyvetách byly od 1,25 do 40 nmol/l). Do kyvet bylo následně pipetováno:

- 25 μl enzymu

- 650 μl TRIS-HCl pufru
- 200 μl fenolové červeně
- 25 μl takrinu
- 100 μl substrátu

Kontrola byla připravena stejně, jen místo inhibitoru byl přidán pufr. Optická hustota byla měřena okamžitě po přidání substrátu a poté po 15 minutách.

3.5.4 Inhibice karbofuranem – optické vlákno

Pro měření byl připraven zásobní roztok karbofuranu. Jeho ředěním 2-propanolem byly připraveny koncentrace karbofuranu od 156 nmol/l do 10 $\mu\text{mol/l}$ (výsledné koncentrace v kyvetách tedy byly od 15,6 nmol/l do 1 $\mu\text{mol/l}$). Dále byl připraven roztok acetylcholin chloridu o koncentraci 10 mmol/l. Do kyvet bylo postupně pipetováno:

- 25 μl enzymu
- 650 μl TRIS-HCl pufru
- 200 μl fenolové červeně
- 25 μl karbofuranu a následovala 15ti minutová inkubace (pro navázání inhibitoru)
- 100 μl substrátu

Optická hustota (558 nm) byla měřena okamžitě po přidání substrátu a poté po 15ti minutové inkubaci. Kontrola byla připravena stejným způsobem, místo inhibitoru byl ale pipetován pufr.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Ellmanova metoda

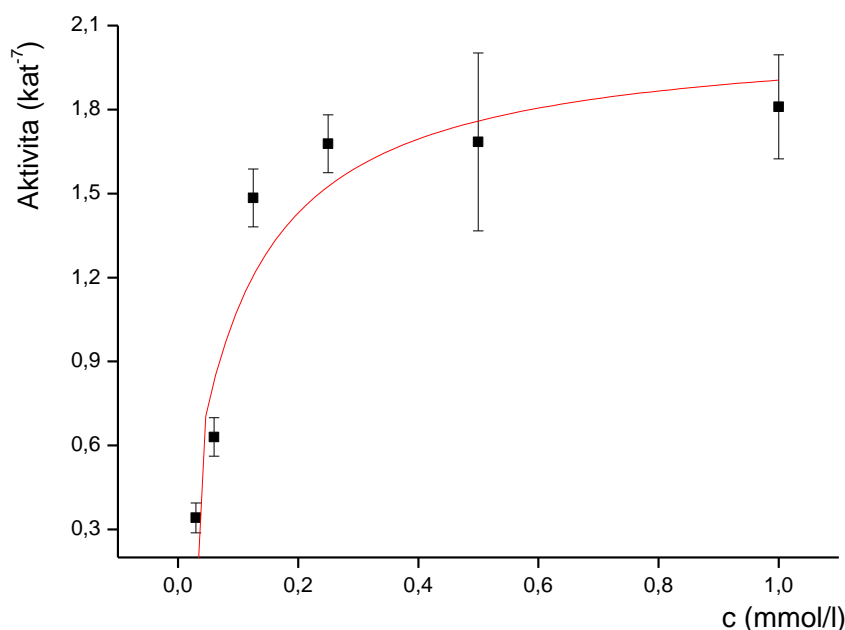
4.1.1 Stanovení enzymových konstant

Absorbance byla měřena okamžitě po přidání substrátu a dále po 1 min. Tato změna absorbance byla pro každou koncentraci změřena 4 krát. Aktivita (mol/s, kat) byla vypočítána podle vztahu 1.14.

$$a = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot t} \quad 1.14$$

Kde ΔA je změna absorbance, ε je extinkční koeficient (pro Ellmanovu metodu se rovná $14\,150 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a t je čas (s).

Hodnoty aktivit pro jednotlivé koncentrace byly zprůměrovány a zaneseny do grafu v závislosti na výsledné koncentraci substrátu (hodnota spolehlivosti $R^2=0,905$). V grafu 1 jsou vyznačeny směrodatné odchylky. Vyšší koncentrace substrátu v grafu nejsou zaneseny, protože hodnota aktivit se snižovala v důsledku inhibice nadbytkem substrátu.



Graf 1: Saturační křivka pro acetylthiocholin, ellmanova metoda

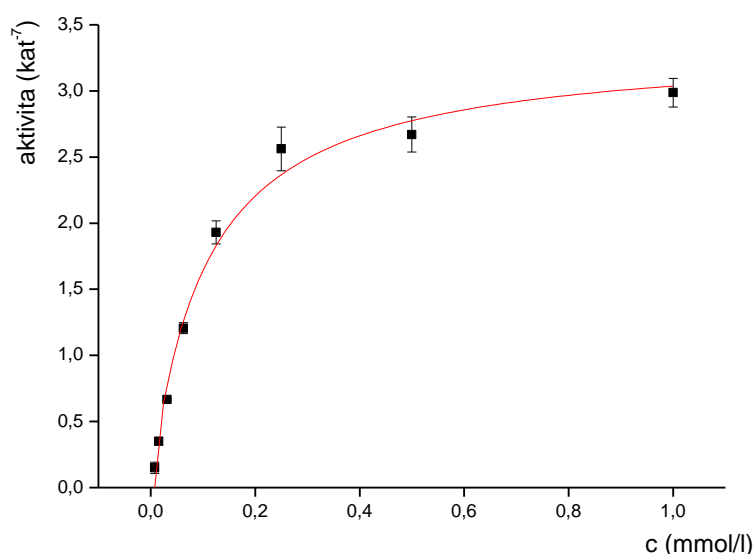
Dále byl sestaven graf závislosti $1/a$ na $1/S$ podle Lineweavera a Burka. Z grafu (hodnota spolehlivosti $R^2=0,981$) byla vypočtena Michaelisova konstanta $K_M=0,291 \text{ mmol/l}$ a maximální rychlost $V_{\max}=3,71 \cdot 10^{-7} \text{ mol/s}$.

Ellmanova metoda je široce využívána pro stanovení aktivity AChE například při studiu léčebných přípravků na Alzheimerovu nemoc. Pro tento účel jsou ve větší míře zkoumány různé látky extrahované z rostlin [65]. Potencionálním lékem na Alzheimerovu nemoc je například i linarin, který také pochází z určitých rostlin a při jeho studii se též využívá Ellmanovy metody [66]. Další využití má Ellmanova metoda i při studiu toxických látek. Například při testování nových přírodních rostlinných insekticidů je nutné znát jejich působení [67].

4.1.2 Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl_2 - spektrofotometr

Saturační křivka:

Každá koncentrace substrátu byla změřena 5 krát. Z naměřených hodnot absorbancí byly vypočítány jejich rozdíly a z nich hodnoty aktivit. Ty pak byly zaneseny do grafu v závislosti na koncentraci substrátu. V grafu 2 (hodnota spolehlivosti $R^2=0,989$) jsou vyznačeny směrodatné odchylky. V programu Origin61 byla vypočítána Michaelisova konstanta a maximální rychlost $K_M=104 \mu\text{mol/l}$, $V_{\text{max}}=3,35 \cdot 10^{-7} \text{mol/s}$.

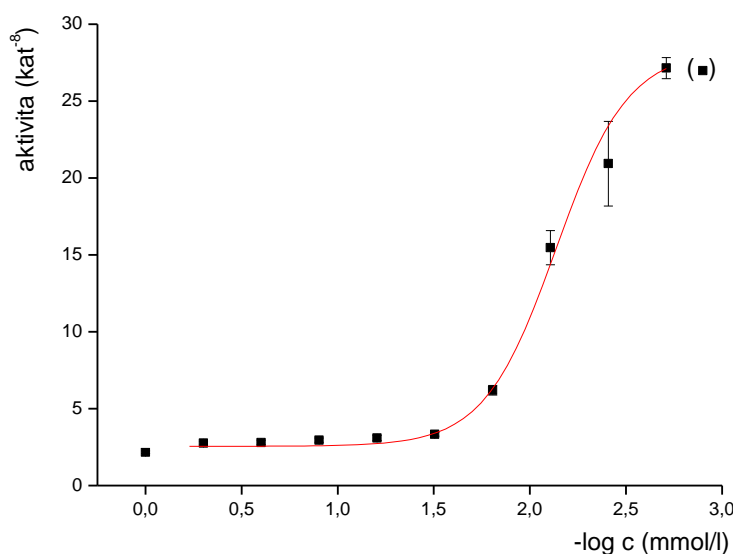


Graf 2: Saturační křivka pro acetylthiocholin pro stanovení K_M , Ellmanova metoda

Rattanakit P. použil imobilizovanou AChE v průtokovém reaktoru. Pro srovnání chování mezi volnou a imobilizovanou AChE použil Ellmanovu metodu a stanovení K_M a V_{max} . Byly použity také jednorázové kyvety, kam pipetoval $20 \mu\text{l}$ enzymu do celkového objemu 2 ml, po 10 min inkubaci pak byl přidáván ATChI. ($K_M=0,23 \text{mmol/l}$). V přítomnosti Cu^{2+} byla hodnota K_M stejná, snižovala se ale hodnota V_{max} s rostoucí koncentrací inhibitoru [38].

Inhibice CuCl₂:

Každá koncentrace byla změřena 5 krát. Z naměřených hodnot byl vypočítán rozdíl absorbancí a z nich pak aktivita pro jednotlivé koncentrace. Aktivita byla zanesena do grafu v závislosti na záporném logaritmu koncentrace koncentraci inhibitoru (graf 3). Tento graf byl použit pro výpočet střední inhibiční koncentrace (hodnota spolehlivosti $R^2=0,976$). A pomocí programu Origin61 byla vypočítána střední inhibiční koncentrace $IC_{50}= 6,96 \mu\text{mol/l}$.



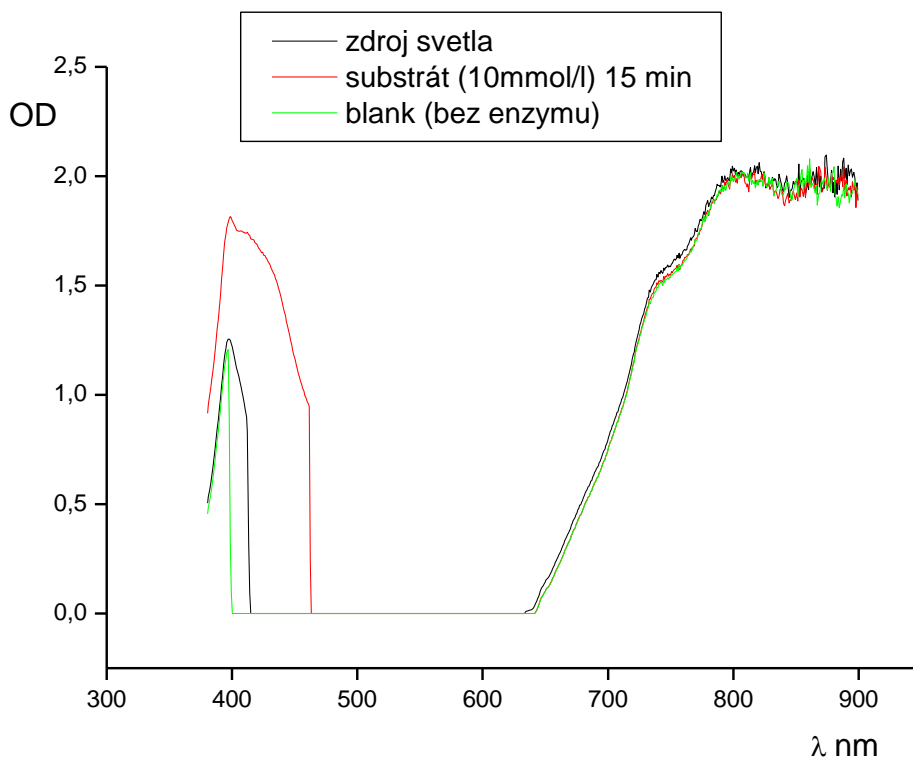
Graf 3: Závislost aktivity AChE na záporném log koncentrace inhibitoru pro výpočet IC_{50} inhibitoru (CuCl₂), Ellmanova metoda

Pro výpočet limitu detekce byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na logaritmu koncentrace o hodnotě spolehlivosti $R^2=0,99$ a rovnicí přímky $y=82,1 \cdot x+218,8$, ze které byl vypočten limit detekce $LOD=2,81 \mu\text{mol/l}$.

Ellmanova metoda je nejrozšířenější a že je dobře použitelná pro stanovení těžkých kovů (rtuť, měď a stříbro) ve vodách i ve velmi malých koncentracích popisuje Shukor M. Y. a kol. Ten pracuje s celkovým objemem $250 \mu\text{l}$ v 96ti jamkové destičce, tedy má nižší spotřebu chemikálií (enzymu bylo přidáno $10 \mu\text{l}$) a jako substrát použil acetylthiocholin jodid. Ten byl ale přidáván až po 30 min inkubace. ($IC_{50}=1,21 \text{ mg/l}$ ($=19,1 \mu\text{mol/l}$), $LOD=0,01 \text{ mg/l}$ ($0,157 \mu\text{mol/l}$)). Jako srovnávací metoda byla použita ICP-OES [68].

4.1.3 Saturační křivka ATChCl a inhibice CuCl₂ - optické vlákno

Po změření hodnot absorbance v prázdném stojanu, stojanu s kyvetou bez enzymu a kyvetou se substrátem o koncentraci 10 mmol/l byly tyto hodnoty zaznamenány do grafu závislosti optické hustoty na vlnové délce (graf 4).

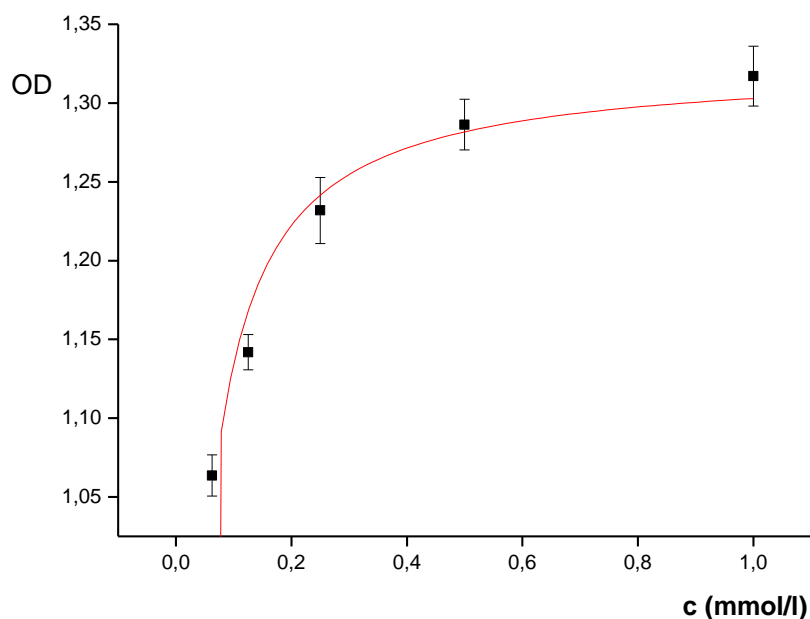


Graf 4: Závislost optické hustoty na vlnové délce, Ellmanova metoda, optické vlákno

Podle tohoto grafu je vidět, že optická hustota při 412 nm v kyvetě bez enzymu je nulová a v kyvetě se substrátem dochází k dostatečně velké změně a je při této vlnové délce vhodné měřit.

Saturační křivka:

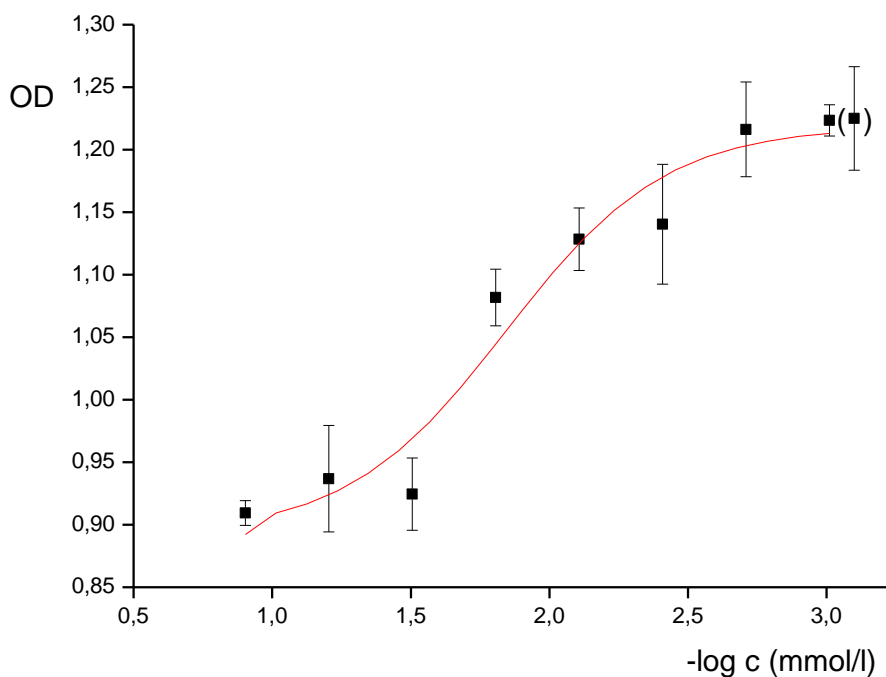
Každá koncentrace substrátu byla měřena 5 krát. Hodnoty optické hustoty měřené ihned po přidání substrátu byly nulové. Graf byl sestaven z hodnot optické hustoty v závislosti na koncentraci substrátu. V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky. Hodnota spolehlivosti $R^2=0,97$. $K_M=16,8 \mu\text{mol/l}$ a maximální optická hustota dosáhla hodnoty 1,33.



Graf 5: Saturační křivka pro ATChCl, optické vlákno

Inhibice CuCl₂:

Každá koncentrace inhibitoru byla změřená 5 krát. Hodnoty optické hustoty změřené okamžitě po přidání substrátu byly nulové. Graf byl sestaven z hodnot optické hustoty v závislosti na záporném logaritmu koncentrace inhibitoru. Z tohoto grafu byla vypočítaná střední inhibiční koncentrace $IC_{50}=14,3 \mu\text{mol/l}$ (hodnota spolehlivosti $R^2=0,972$).



Graf 6: Závislost optické hustoty na záporném log koncentrace CuCl₂ (v závorce: kontrola), optické vlákno

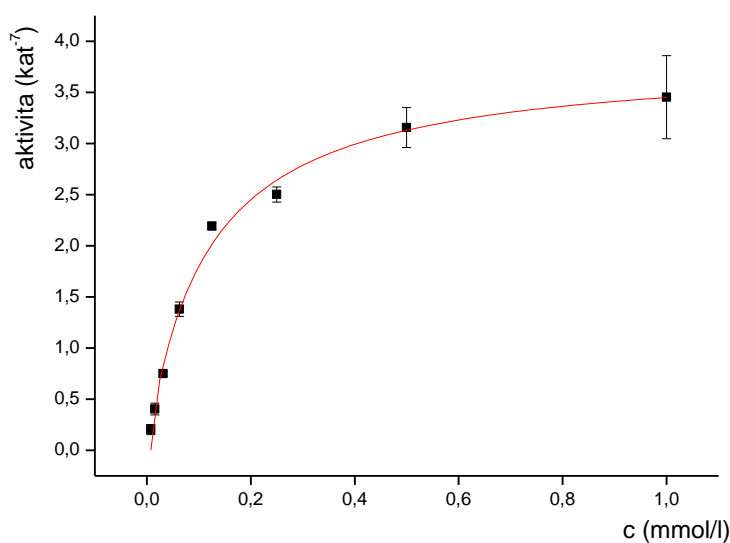
Dále byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na logaritmu koncentrace (hodnota spolehlivosti $R^2=0,963$). Z rovnice přímky $y=53,8 \cdot x+154,3$ byl vypočítán limit detekce $LOD=2,27 \mu\text{mol/l}$.

Použití optického vlákna s Ellmanovou metodou pro stanovení těžkých kovů není ještě rozšířené. Kombinace Ellmanovy metody a optického vlákna se ale používá například pro stanovení aflatoxinu B1 a ochratoxinu A [69].

4.1.4 Imobilizace želatínou, saturační křivka a inhibice CuCl_2 - spektrofotometr

Saturační křivka:

Každá koncentrace substrátu byla měřena 3 krát. Z hodnot absorbancí byl vypočten rozdíl, ze kterého pak byly vypočteny hodnoty aktivit pro jednotlivé koncentrace substrátu. Ty byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci substrátu (graf 7) (hodnota spolehlivosti $R^2=0,994$, $K_M=114 \mu\text{mol/l}$, $V_{\text{max}}=3,84 \cdot 10^{-7} \text{mol/s}$).



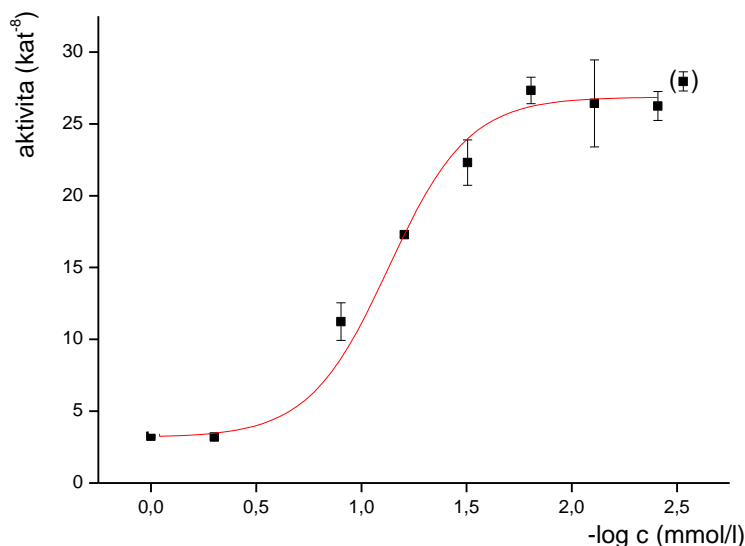
Graf 7: Saturační křivka pro ATChCl (Ellmanova metoda, imobilizace želatínou)

Opakovatelnost měření:

Ve třech kyvetách bylo prováděno opakované měření. Po prvním měření byly hodnoty absorbancí od 0,827 do 0,873. Po promytí a druhém měření už ale absorbance dosahovaly hodnot pouze kolem 0,014. Mohlo to být zapříčiněno tím, že želatina v kyvetách nebyla naprosto vyschlá a v roztoku se tak enzym zcela vymyl z membrány.

Inhibice CuCl₂:

Každá koncentrace inhibitoru byla měřena 3 krát. Byl vypočten rozdíl mezi absorbancemi a z něj byly vypočteny hodnoty aktivit. Ty byly zaneseny do grafu v závislosti na záporném logaritmu koncentrace inhibitoru (graf 8). Z tohoto grafu byla vypočtena střední inhibiční koncentrace ($IC_{50}=74,1 \mu\text{mol/l}$, hodnota spolehlivosti $R^2=0,999$).



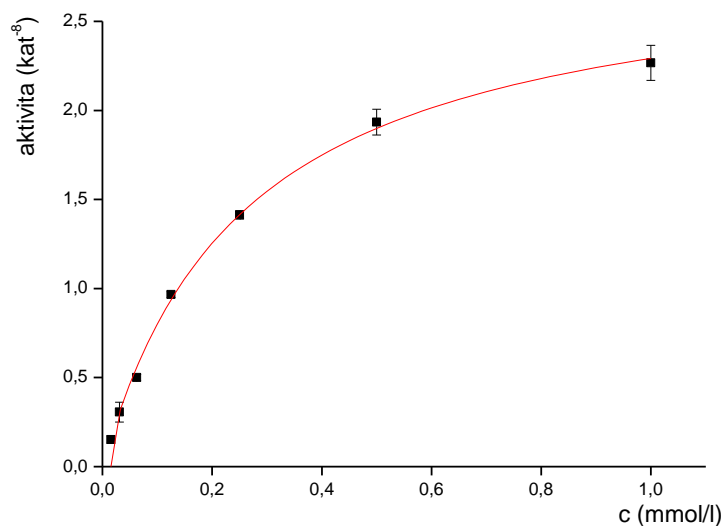
Graf 8: Závislost aktivity AChE na záporném log koncentrace CuCl₂ (v závorce kontrola), Ellmanova metoda, imobilizace želatinou

Dále byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na logaritmu koncentrace o hodnotě spolehlivosti $R^2=0,995$ a rovnicí přímky $y=63,2 \cdot x+121,7$, ze které byl vypočítán limit detekce $LOD=22,1 \mu\text{mol/l}$.

4.1.5 Imobilizace želatinou (+GA), saturační křivka, CuCl₂ - spektrofotometr

Saturační křivka:

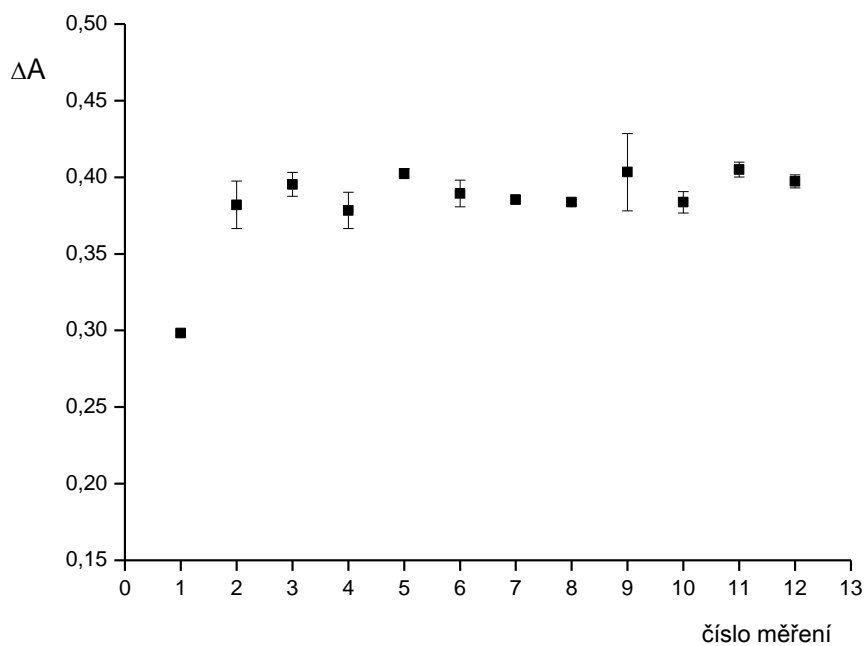
Každá koncentrace acetylthiocholin chloridu byla změřena 3 krát. Z hodnot rozdílů absorbance byl sestrojen graf závislosti aktivity na koncentraci substrátu (graf 9). V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky měření (hodnota spolehlivosti $R^2=0,998$, $K_M=261 \mu\text{mol/l}$, $V_{\text{max}}=2,89 \cdot 10^{-8} \text{ mol/s}$).



Graf 9: Saturací křivka pro ATChCl, Ellmanova metoda, imobilizace želatinou s GA

Opakovatelnost měření:

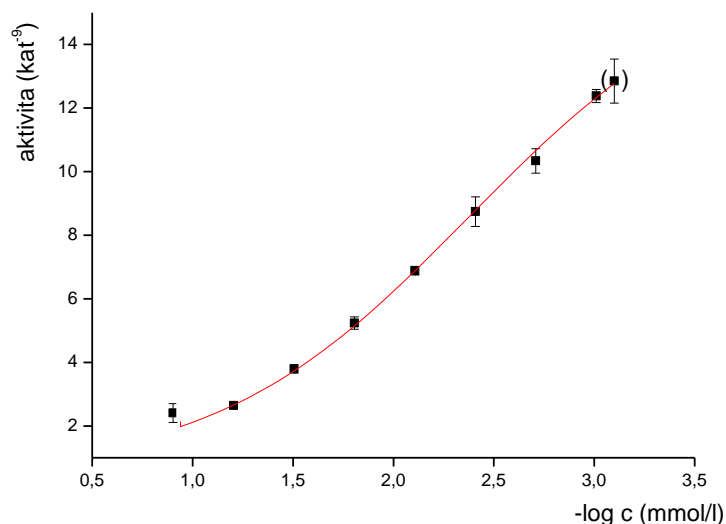
Opakované měření bylo prováděno ve 3 kyvetách. Měření bylo provedeno 12 krát. A ani po posledním měření nebyl pozorován úbytek aktivity enzymu. Byl sestrojen graf závislosti rozdílu absorbance na počtu měření (graf 10).



Graf 10: Opakovatelnost měření, Ellmanova metoda, imobilizace želatinou s GA

Inhibice CuCl₂:

Každá koncentrace inhibitoru byla měřena 3 krát. Z rozdílů absorbancí byly vypočteny hodnoty aktivit a z nich byl sestrojen graf (hodnota spolehlivosti $R^2=0,999$) v závislosti na záporném logaritmu koncentrace inhibitoru (graf 11), ze kterého byla vypočítána střední inhibiční koncentrace $IC_{50}=4,22 \mu\text{mol/l}$.



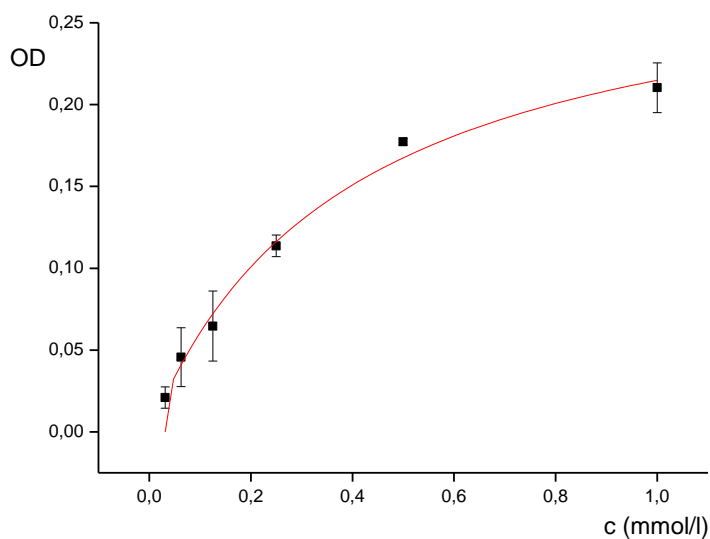
Graf 11: Závislost aktivity AChE na záporném logaritmu koncentrace CuCl_2 , Ellmanova metoda, imobilizace želatinou s GA

Dále byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na záporném logaritmu koncentrace inhibitoru a z něj byl vypočítán limit detekce (hodnota spolehlivosti $R^2=0,994$, $\text{LOD}=1,09 \mu\text{mol/l}$).

4.1.6 Želatinová membrána + GA, optické vlákno

Saturační křivka:

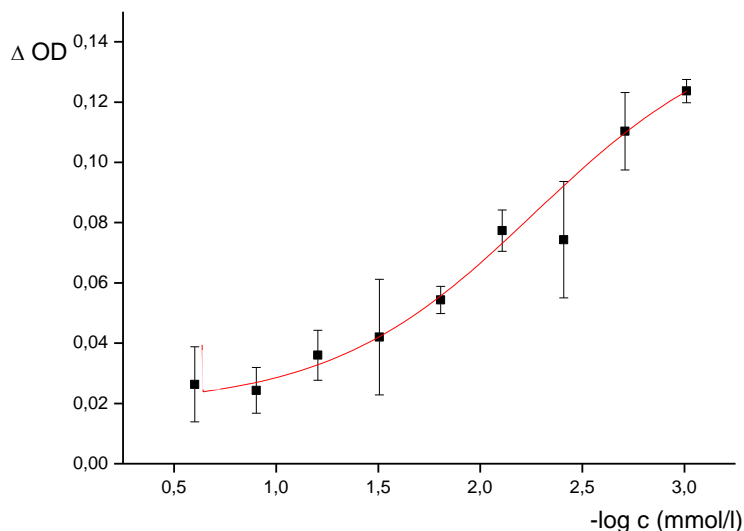
Každá koncentrace byla měřena 3 krát. Z rozdílů optických hustot byl sestrojen graf závislosti OD na koncentraci substrátu (graf 12) V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky (hodnota spolehlivosti $R^2=0,993$, $K_M=394 \mu\text{mol/l}$) a maximální hodnota optické hustoty byla 0,299.



Graf 12: Saturační křivka pro ATChCl, Ellmanova metoda, imobilizace želatinou s GA, optické vlákno

Inhibice CuCl₂:

Každá koncentrace inhibitoru byla měřena 3 krát. Z rozdílů optických hustot byl sestrojen graf závislosti na záporném logaritmu koncentrace inhibitoru (graf 13, hodnota spolehlivosti $R^2=0,994$). Byla vypočtena střední inhibiční koncentrace $IC_{50}=5,43 \mu\text{mol/l}$.



Graf 13: Závislost optické hustoty na záporném logaritmu koncentrace CuCl₂, Ellmanova metoda, imobilizace želatinou s GA, optické vlákno

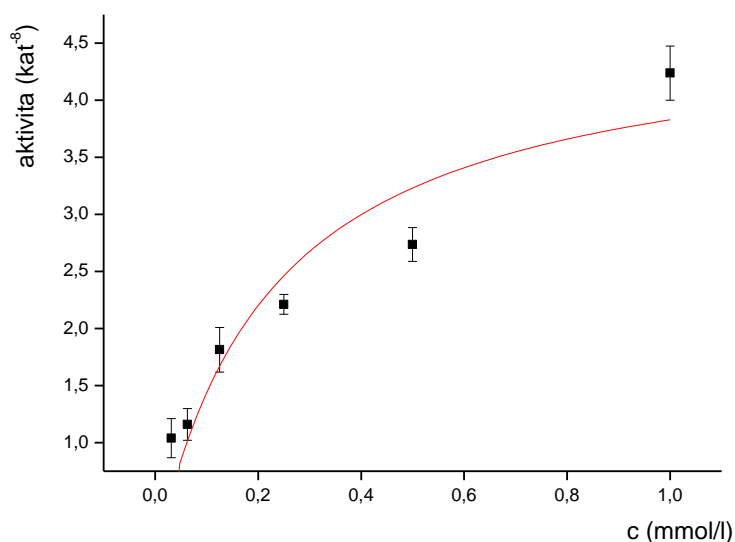
Dále byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na záporném logaritmu koncentrace CuCl₂ (hodnota spolehlivosti $R^2=0,979$, rovnice přímky $y=-48,95 \cdot x+154,3$). Z rovnice přímky byl spočítán limit detekce $LOD=1,41 \mu\text{mol/l}$.

Těžké kovy jsou nejčastěji stanovovány atomovou absorpční spektrometrií jako ve všech následujících případech. V práci se Tong-Bin Chen a kol. věnuje stanovení těžkých kovů v povrchových půdách v Číně. Stanovené hodnoty Cu se pohybují v rozmezí $379 \mu\text{mol/l}$ do $7,2 \text{ mmol/l}$ [70]. Anna Farkas ve své práci stanovuje těžké kovy v řece, stanovené hodnoty mědi se pohybovali od $0,775 \text{ mmol/l}$ [71]. V obou případech by limit detekce u všech předchozích metod byl dostačující pro stanovení koncentrace Cu. Singh A. ale stanovovala koncentrace těžkých kovů v zelenině, v půdě a v odpadních vodách použitých k zavlažování. Koncentrace mědi se pohybovali od $0,047$ do $409 \mu\text{mol/l}$ [72]. Proto by se pro stanovení takovýchto koncentrací musela vybírat vhodná metoda. Nejnižší limit detekce byl vypočítán u metody s vázáním do želatinové membrány s GA (spektrofotometr), jeho hodnota je $1,09 \mu\text{mol/l}$.

4.1.7 Chitosanová membrána, saturační křivka, inhibice CuCl_2 - spektrofotometr

Saturační křivka:

Každá koncentrace substrátu byla měřena 3 krát. Z rozdílů absorbancí byla vypočtena aktivita pro jednotlivé koncentrace, ze kterých byl sestrojen graf závislosti na koncentraci substrátu (graf 14). V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky (hodnota spolehlivosti $R^2=0,895$, $K_M=226 \mu\text{mol/s}$, $V_{\text{max}}=4,69 \cdot 10^{-8} \text{mol/s}$).



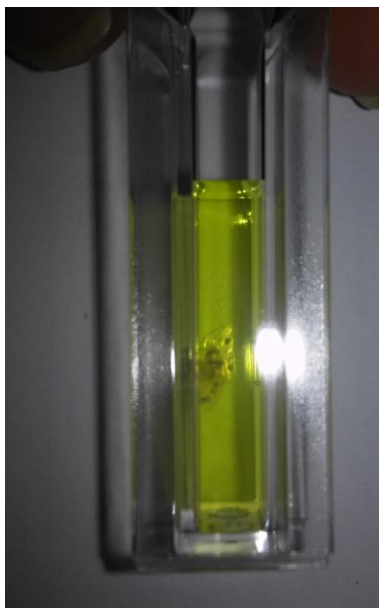
Graf 14: Saturační křivka pro ATChCl, Ellmanova metoda, imobilizace chitosanem

Inhibice CuCl_2 :

Každá koncentrace inhibitoru byla měřena 3 krát. Byla vypočtena aktivita pro jednotlivé koncentrace. Výsledky nejsou optimální, pro vyšší koncentrace inhibitoru vycházely vyšší hodnoty aktivit než pro nižší koncentrace. To by mohlo být zapříčiněno uvolňováním a rozrušováním membrány, která mohla způsobovat zákal. Mezi hodnotami byly větší rozdíly pro jednotlivé koncentrace.

Opakovatelnost měření:

Po prvním měření vycházely hodnoty absorbancí v rozmezí od 0,491 do 0,697. Při inkubaci ale docházelo ve většině případů k uvolnění membrány (obr. 16), která byla zcela uvolněna i při opatrném vylití a promytí kyvety. A druhé měření pak tedy nebylo možné.



Obrázek 16: Chitosanová membrána: její uvolňování

Dále bylo provedeno měření v kyvetách:

- bez enzymu a bez substrátu
- s enzymem a bez substrátu
- bez enzymu a se substrátem (2,5 mmol/l)
- inhibitor CuCl_2 10 mmol/l
- inhibitor karbofuran 100 μl (1 mmol/l)
- inhibitor karbofuran 25 μl (1 mmol/l, 10 min inkubace)

Ve všech případech docházelo v průběhu času k růstu absorbance. V prvních dvou případech docházelo k růstu hodnot absorbance nad 0,1 po 20-30 min. U ostatních byly hodnoty absorbancí mezi 0,3 až 0,9 už po 15 min. Nejvyšších hodnot dosahovaly kyvety s karbofuranem. Jelikož docházelo k růstu absorbance jak v kyvetách se substrátem i s inhibitory, tak tato metoda není vhodná pro měření koncentrace inhibitoru AChE.

4.1.8 Chitosanová membrána – bez vyschnutí, spektrofotometr

Každá koncentrace substrátu byla měřena 3 krát. Ke žloutnutí ale docházelo velmi pomalu. A některé hodnoty v rámci jedné koncentrace se velmi lišily. V některých případech dokonce docházelo k intenzivní změně barvy okamžitě po přidání Ellmanova činidla.

4.1.9 UV polymerace, spektrofotometr

Saturační křivka:

Každá koncentrace substrátu byla měřena 3 krát. Při měření ale docházelo k velmi pomalému žloutnutí v celém objemu. A při měření v kyvetách se substrátem (10 mmol/l) a v kyvetách bez enzymu nedocházelo k měřitelné změně absorbance ani po 30 min. Nepomohla ani inkubace s pufrům před samotným měřením. Membrána byla pravděpodobně vyschlá a nepolymerovala.

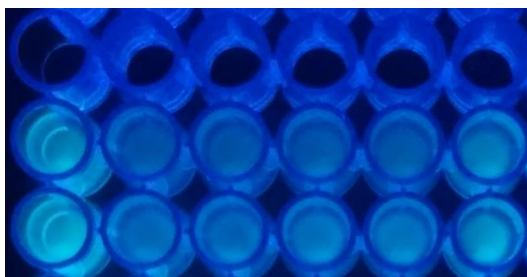
4.2 Měření fluorescence u indoxyl acetátu

- Porovnání aktivit AChE v TRIS-HCl pufru o různých hodnotách pH (obr. 17): Podle intenzit fluorescence byl vybrán pufr o pH 7,6, u něj byla fluorescence už dostatečně intenzivní.



Obrázek 17: Fluorescence s pufrům o různém pH (zleva: 6,6; 7,0; 7,6; 8,0; 8,4)

- Inhibice CdCl_2 a ZnCl_2 : při vyhodnocování z fotografie nebylo dobře viditelné, kde je nejvyšší nebo nejnižší inhibice a tak nebylo možné vyhodnocení. Všechny jamky měly podobnou fluorescenci (obr. 18). K rozlišení nenapomáhal průhledný materiál destičky, jelikož pod UV lampou byly velmi zřetelné i prázdné jamky.



Obrázek 18: Fluorescence při inhibici CdCl_2 (dole) a ZnCl_2 (vlevo kontrola bez inhibitoru, zprava rostoucí koncentrace inhibitoru, vrchní řada prázdné jamky)

- Nahrazení 96ti jamkové destičky černými jamkami zhotovenými 3D tiskem. Byly vytisknuty dva typy jamek.
 1. typ: Po vyfocení v UV boxu byly fluoreskující plochy příliš malé a opět nebyl patrný rozdíl mezi různými koncentracemi substrátu (obr. 19).



Obrázek 19: Fluorescence v tištěných jamkách (zleva rostoucí koncentrace substrátu)

2. typ: Jamky byly nižší a samotná jamka byla miskovitého tvaru, to mělo zajistit větší fluoreskující plochu, ale zároveň se snížil objem. To způsobovalo vysychání, a i když byly jamky překryty parafínovou fólií, nešlo tomu úplně zabránit. Plocha jamek fluoreskovala pak jen místy a ne celá, proto nešla inhibice takrinem vyhodnotit.
- Měření na spektrofotometru: ani po hodinové inkubaci nedošlo ke změně barvy a absorbance tak byla skoro nulová. Pro srovnání se provedlo stejné měření s butyrylcholinesterázou (BChE), aby bylo vidět žádoucí modré zbarvení (obr. 20).



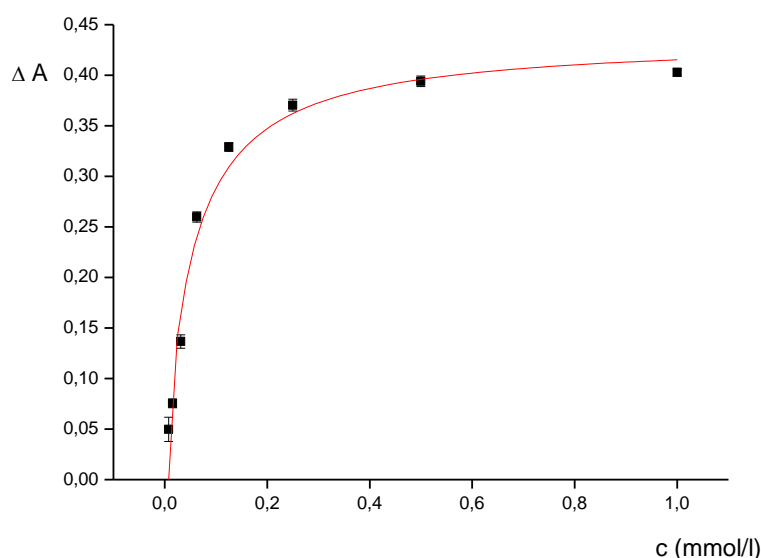
Obrázek 20: Porovnání AChE a BChE s indoxylacetátem (vlevo BChE, vpravo AChE)

Fluorescenční metody jsou ve většině případů citlivější než odpovídající kolorimetrická technika, proto když se využívá indoxylacetát jako substrát, měří se nejčastěji právě fluorescence. Indoxylacetát není přirozený substrát pro AChE a proto je reakce pomalá ve srovnání s přirozeným substrátem. V práci A.N. Diaze byl indoxylacetát imobilizován v gelu a tento biosenzor byl použit pro stanovení organických pesticidů. Byl použit fluorescenční spektrometr a byly použity standardní kyvety a ve druhém případě optické vlákno. Tato metoda byla vhodná pro měření z důvodu dobrých detekčních limitů [73].

4.3 Fenolová červeň

4.3.1 Saturační křivka acetylcholin chloridu - spektrofotometr

Každá koncentrace substrátu byla změřena 5 krát. Z hodnot absorbance (558 nm), které byly změřeny okamžitě po přidání substrátu a po 15 min byl vypočítán rozdíl absorbancí (ΔA). Z nich pak byl sestrojen graf v závislosti na koncentraci substrátu (graf 15). V grafu jsou zaneseny směrodatné odchylky (hodnota spolehlivosti $R^2=0,983$, $K_M=51,5 \mu\text{mol/l}$, maximální hodnota rozdílu absorbance byla 0,437).

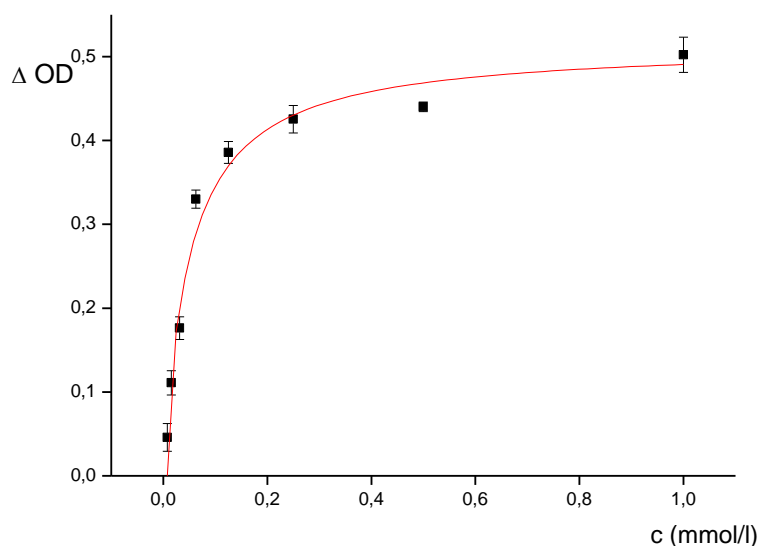


Graf 15: Saturační křivka pro acetylcholin chloridu, fenolová červeň, spektrofotometr

4.3.2 Saturační křivka acetylcholin chloridu - optické vlákno

Pro měření byly vytištěny 3D tiskárnou celkem tři kyvetové šachty a pro každou z nich bylo provedeno měření. V šachtě se kyveta nesměla hýbat a musel být vytvořen vhodný otvor pro zdroj světla. Dále musely být šachta i zdroj světla dobře ukotveny, aby se zabránilo pohybu (při pohnutí se následně změnily naměřené hodnoty).

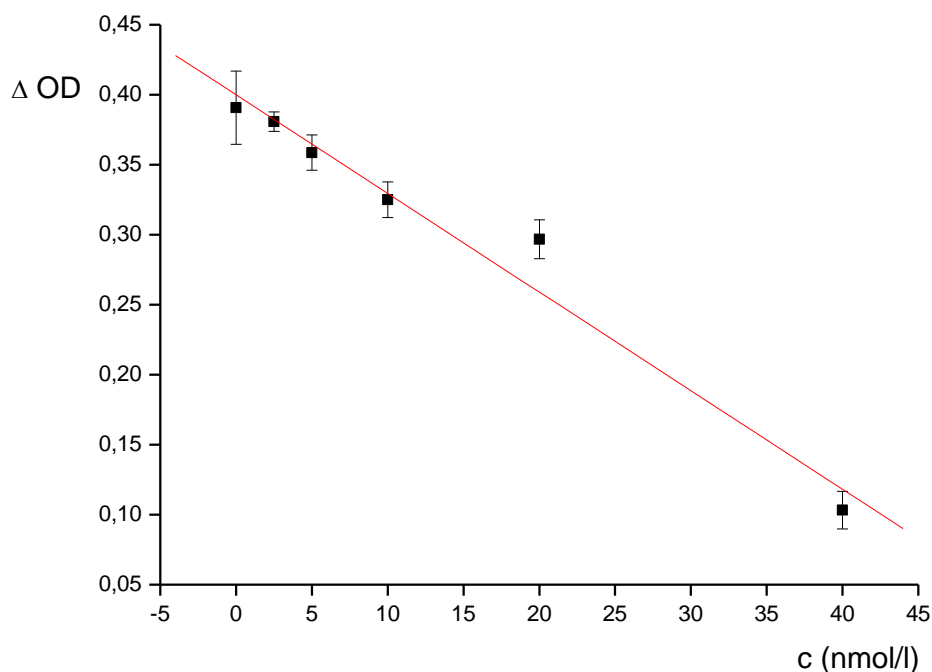
Pro každou koncentraci bylo provedeno 5 měření a hodnoty byly zprůměrovány. Z hodnot rozdílů optické hustoty, které byly měřeny hned po přidání substrátu a po 15 minutách, byl sestrojen graf závislosti na koncentraci substrátu (graf 16). V grafu jsou vyznačeny směrodatné odchylky měření (hodnota spolehlivosti $R^2=0,978$, $K_M=49,1 \mu\text{mol/l}$, maximální hodnota rozdílů optické hustoty byla 0,515).



Graf 16: Saturační křivka pro acetylcholin chlorid, fenolová červeň, optické vlákno

4.3.3 Inhibice takrinem – optické vlákno

Každá koncentrace takrinu byla změřena 5 krát. Z naměřených hodnot optické hustoty byly vypočítány rozdíly, ty byly zprůměrovány a pak byly zaneseny do grafu v závislosti na koncentraci inhibitoru (graf 17). V grafu jsou zaneseny odchylky měření (hodnota spolehlivosti $R^2=0,987$).



Graf 17: Závislost optické hustoty na koncentraci takrinu, fenolová červeň, optické vlákno

Dále byl sestaven graf závislosti procenta inhibice na koncentraci substrátu (hodnota spolehlivosti $R^2=0,971$ a rovnice přímky $y=1\ 665,5 \cdot x + 29,82$). Z rovnice

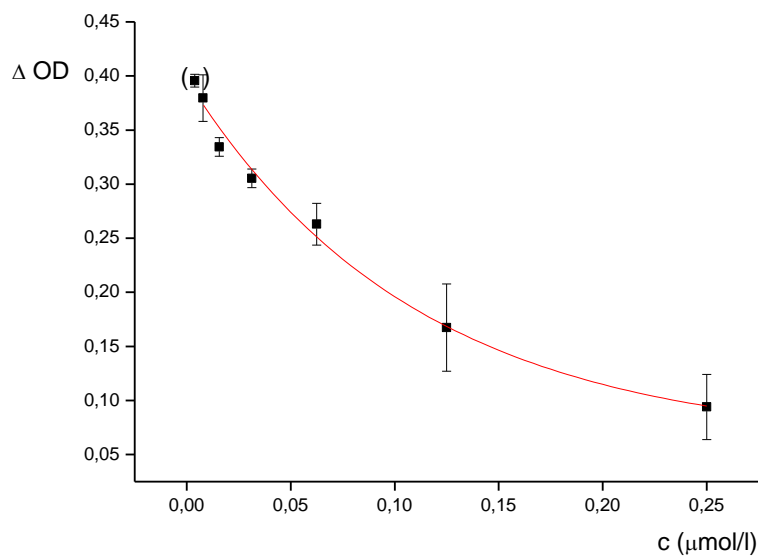
přímky byla spočítána střední inhibiční koncentrace $IC_{50}=12,1$ nmol/l. Dále byla z tohoto grafu vypočtena mez detekce $LOD=15,0$ nmol/l.

Toto i následující měření bylo provedeno z důvodu prověření vhodnosti této metody pro měření inhibice. Inhibice takrinem i karbofuranem byla změřena s dobrými limity detekce, inhibice těžkými kovy ale měřitelná nebyla. Ke změně pH a tedy ke změně barvy docházelo okamžitě po přidání $CuCl_2$.

Takrin se využívá při léčbě Alzheimerovy nemoci, inhibuje acetylcholinesterázu i butylcholinesterázu. V práci A. Alhomida byly zkoumány kinetické parametry účinku takrinu na acetylcholinesterázu. Takrin inhiboval AChE v závislosti na koncentraci, IC_{50} bylo přibližně 45 nmol/l a hodnota Michaelisovy konstanty se v přítomnosti takrinu zvyšovala [74].

4.3.4 Inhibice karbofuranem – optické vlákno

Pro každou koncentraci karbofuranu bylo provedeno 5 opakování. Z naměřených hodnot byly vypočteny rozdíly absorbancí a ty byly zaneseny do grafu v závislosti na koncentraci karbofuranu (graf 18). V grafu jsou vyznačeny odchylky měření (hodnota spolehlivosti $R^2=0,991$).



Graf 18: Závislost optické hustoty na koncentraci karbofuranu, fenolová červeň, optické vlákno (v závorce: kontrola)

Dále byl sestrojen graf závislosti procenta inhibice na záporném logaritmu koncentrace karbofuranu. Hodnoty byly proloženy logaritmickou křivkou (hodnota spolehlivosti $R^2=0,992$), rovnice přímky byla $y=-70,32 \cdot \ln(x)+64,84$. Z té pak byla

vypočítána střední inhibiční koncentrace $IC_{50}=58,21$ nmol/l. Dále ze stejné rovnice přímky byl spočítán limit detekce: $LOD=18,5$ nmol/l.

Karbofuran se vyskytuje v pesticidech a jeho stanovení je důležité v oblasti životního prostředí. S. Zhang a S. Li ve své práci AChE imobilizuje na pracovní elektrodu modifikovanou chitosanem a účinek inhibitoru pak byl sledován měřením úbytku oxidačního proudu. Tato metoda je velmi citlivá, proto limit detekce je výrazně nižší (až o 5 řádů) oproti metodě s fenolovou červení [75].

V další práci už je rozdíl v limitu detekce nižší. Karbofuran byl stanovován pomocí tištěné elektrody. Na tu byla AChE imobilizována pomocí želatiny. Limit detekce byl $0,501$ nmol/l [76].

ZÁVĚR

V mé práci jsem sestavovala biosenzor založený na acetylcholinesteráze pro stanovení těžkých kovů. Byly testovány tři způsoby stanovení a to stanovení pomocí Ellmanovi metody, fenolové červeně a indoxylacetátu. Kde to bylo možné, byla stanovena Michaelisova konstanta (K_M) a maximální rychlost (V_{max}). Čím je Michaelisova konstanta nižší pro daný substrát tím je jeho afinita k enzymu vyšší.

Metoda měření s fenolovou červení vypadala velmi slibně. Michaelisova konstanta ($K_M=49,1 \mu\text{mol/l}$) byla nižší než u většiny ostatních měření. I limity detekce pro stanovované inhibiční látky (takrin ($\text{LOD}=15,0 \text{ nmol/l}$) a karbofuran ($18,5 \text{ nmol/l}$)) byly v některých případech ($\text{LOD}=0,501 \text{ nmol/l}$) jen o něco vyšší, než při běžně používaných metodách stanovení. Při pokusu touto metodou stanovit těžké kovy (CuCl_2) ale docházelo ke změně barvy (změně pH) okamžitě po přidání inhibitoru. To bylo zapříčiněno kyselou povahou CuCl_2 (Cl^{2-} je anion od silné kyseliny). Nepomohl ani přídavek pufru.

Při měření s indoxylacetátem bylo více slibné měření fluorescence než měření na spektrofotometru, kdy ke tvorbě modrého indiga téměř nedocházelo. Fluorescence byla velmi dobře patrná, ale v použité 96ti jamkové destičce ani v 3D tiskem vytvořených jamkách nebyly dobře patrné rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi substrátu i inhibitoru.

Nejvhodnější metodou pro stanovení těžkých kovů byla Ellmanova metoda. Oproti metodě s indoxylacetátem nebyla potřeba tak dlouhá doba inkubace, která v případě Ellmanovy metody byla jen od 1 do 15 min. A oproti metodě s fenolovou červení nedocházelo k rušení vlivem změny pH. Jako nejvhodnější postup se ukázala imobilizace pomocí želatiny s GA, a to jak při měření na spektrofotometru tak s pomocí optického vlákna. Michaelisova konstanta byla sice vyšší než u měření v roztoku ($K_{M(\text{spekt.})}=261 \mu\text{mol/l}$ a $K_{M(\text{op.vl.})}=394 \mu\text{mol/l}$ oproti $K_{M(\text{spekt.})}=104 \mu\text{mol/l}$ a $K_{M(\text{op.vl.})}=16,8 \mu\text{mol/l}$), limity detekce byly ale nižší a jako další výhoda je možnost využití opakovaného měření v jedné kyvetě (až 12krát).

Další způsoby imobilizace (chitosanová membrána a UV polymerace) byly vyhodnoceny jako nevhodné. Chitosanová membrána pak především kvůli nestabilitě membrány a jejímu uvolňování.

Ellmanova metoda s imobilizací pomocí želatiny s GA je tedy nejvhodnější a její velkou výhodou by mohlo být bezproblémové použití v terénu.

Citovaná literatura

- [1] DAS U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation., *Med Sci Monit.*, 2007, 13 (12), 214-221.
- [2] MIAO Y., NONGYUE H. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition., *American Chemical Society.*, 2010, 110, 5216-5234.
- [3] POHANKA M. Cholinesterases, a Target of Pharmacology and Toxicology., *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2011, 155(3), 219-230.
- [4] POHANKA M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds., *Chemical Papers*, 2013.
- [5] DVIR H., SILMAN I., HAREL M. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function., *Chemico-Biological Interactions.*, 2010, 187, 10-22.
- [6] PUNDIR C. S., CHAUHAN N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination., *Analytical Biochemistry.*, 2012, 429, 19-31.
- [7] ROKYTA R. Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. 2015..
- [8] AMBLER Z. Neurofyziologie a elektrodiagnostika nervosvalového přenosu., *Neurol. pro praxi.*, 2010, 11(2), 81-84..
- [9] POHANKA M., HRABINOVA M., FUSEK J. Electrochemical Biosensor Based on Acetylcholinesterase and Indoxylacetate for Assay of Neurotoxic Compounds Represented by Paraoxon., *International Journal of Electrochemical science.*, 2012, 7, 50-57.
- [10] COPELAND R.A. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience., 2005.
- [11] KODÍČEK M., VALENTOVÁ O., HYNEK R. Biochemie, chemický pohled na biologický svět. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 2015.
- [12] ŠTĚPÁNKOVÁ Š., KOMERS K., Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors., *Current Enzyme Inhibition.*, 2008, 4, 160-171.

- [13] KOMERSOVÁ A., KOMERS K., ZDRAŽILOVÁ P. Kinetics of hydrolysis of acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases., *Chemico-Biological Interactions.*, 2005, 353-434..
- [14] ŽDÁROVÁ J., KUČA K., JUN D., BAJGAR J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů., *Chemické listy.*, 2010, 104, 46-50.
- [15] POHANKA M., VLČEK V., ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J. Kolorimetrické detektory založené na acetylcholinesterase a jejich konstrukce., *Vojenské zdravotnické listy.*, 2010, 1, 9-14.
- [16] PUJOL L., EVRARD D., GROENEN-SERRANO K. Electrochemical sensors and devices for heavy metals assay in water: the French groups' contribution., *Frontiers in chemistry.*, 2014, 30.
- [17] ALI H., KHAN E., ANWAR SAJAD M. Phytoremediation of heavy metals— Concepts and applications., *Chemosphere.*, 2013, 91, 869-881.
- [18] SALEM H. M., EWEIDA A., FARAG A. Heavy metals in drinking water and their environmental impact on human health., *Icehm, Cairo University.*, 2000, 542-556.
- [19] DIXIT R., MALAVIYA D., PANDIYAN K. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes., *Sustainability.*, 2015, 7, 2189-2212.
- [20] WUANA R., OKIEIMEN F. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation., *ISRN Ecology.*, 2011.
- [21] Integrovaný registr znečišťování, Ministerstvo životního prostředí České republiky, [Online]. Available: <http://www.irz.cz/>. [Citováno: 8 leden 2017].
- [22] NEUSTADT J., PIECZENIKS. Toxic-Metal Contamination: Mercury., *Integrative Medicine.*, 2007, 6 (2), 36-37.
- [23] SERESHTI H., HAREVI Y., SAMADI S. Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES., *Talanta.*, 2012, 97, 235-241.
- [24] BETTINELLI M., BEONE G.M., SPEZIA S. Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis., *Analytica Chimica Acta.*, 2000, 424, 289-296.

- [25] FIEST B., MIKULA B., PYTLAKOWSKA K. Determination of heavy metals by ICP-OES and F-AAS after preconcentration with 2,2'-bipyridyl and erythrosine., *Journal of Hazardous Materials.*, . 2008, 152, 1122-1129.
- [26] SOYLAK M., KARATEPE A.U. Column Preconcentration/Separation and Atomic Absorption Spectrometric Determinations of Some Heavy Metals in Table Salt Samples Using Amberlite XAD-1180., *Turk J Chem.*, 2003, 27, 235-242.
- [27] Integrovaný registr znečišťování, metody měření, Ministerstvo životního prostředí České republiky, [Online]. Available: <http://www.irz.cz/node/109#metody>. [Citováno: 25 únor 2017].
- [28] MIHALJEVIČ M., STRNAD L., ŠEBEK O. Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii., *Chemické listy.*, 2004, 98, 123-130.
- [29] UNTERREITMAIER E., SCHUSTER M. Fluorometric detection of heavy metals with N-methyl-N-9-(methylanthracene)-IV'-benzoylthiourea., *Analytica Chimica Acta.*, 1995, 309, 339-344.
- [30] NIU L., GUANA Y., FENG L. BODIPY-based fluorometric sensor array for the highly sensitive identification of heavy-metal ions., *Analytica Chimica Acta.*, 2013, 775, 93-99.
- [31] PANDEY K.S., SINGH P., SINGH J. Nanocarbon-based Electrochemical Detection of Heavy Metals., *Electroanalysis.*, 2016, 28, 2472-2488.
- [32] ARAGAY G., MERKOCI A. Nanomaterials application in electrochemical detection of heavy metals., *Electrochimica Acta.*, 2012, 84, 49-61.
- [33] GAUDRY A., ZEROUAL S., GUESSOUS A. Neutron activation analysis applied to the study of heavy metal marine pollution observed through bioaccumulation in macroscopic algae near El Jadida, Morocco., *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.*, 2007, 271 (1), 165-171.
- [34] SHUBINA N.A., KOLESOV G.M. Determination of Heavy Metals as Environmental Pollutants: Use of Instrumental Neutron Activation Analysis., *Journal of Analytical Chemistry.*, 2002, 57 (10), 912-919.
- [35] AL-JUNDI J. Determination of trace elements and heavy metals in the Zarka River sediments by instrumental neutron activation analysis., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2000, 170, (1-2), 180-186.

- [36] ANDREESCU S., MARTY J-L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications., *Biomolecular Engineering.*, 2006, 23, 1-15.
- [37] TURDEAN G.L. Design and Development of Biosensors for the Detection of HeavyMetal Toxicity., *International Journal of Electrochemistry.*, 2011.
- [38] RATTANAKIT P., LIAWRUANGRATH S. Performance Evaluation of Monolith Based Immobilized Acetylcholinesterase Flow-Through Reactor for Copper(II) Determination with Spectrophotometric Detection., *Journal of Chemistry.*, 2014.
- [39] ARDUINI F., AMINE A., MOSCONE D., PALLESCHI G. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection., *Microchim Acta.*, 2010, 170, 193-214.
- [40] POHANKA M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds., *Chemical Papers.*, 2013.
- [41] ŠTĚPÁNKOVÁ Š., VORČÁKOVÁ K. Cholinesterase-based biosensors., *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.*, 2016, 31, 180-193.
- [42] BIDMANOVÁ Š., POHANKA M., CABAL J. Biosenzory k včasné detekci otravných látek., *Chemické listy.*, 2010, 104, 302-308.
- [43] ZHENG Z., ZHOU Y., LI X. Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots., *Biosensors and Bioelectronics.*, 2011, 26, 3081-3085.
- [44] BOSCH M.E., SÁNCHEZ A.J.R., ROJAS F.S. Recent Development in Optical Fiber Biosensors., *Sensors.*, 2007, 7, 797-859.
- [45] MARAZUELA M. D., MORENO-BONDI M.C. Fiber-optic biosensors – an overview.2002, 372, 664-682., *Anal Bioanal Chem.*, 2002, 372, 664-682.
- [46] HOLAS O., MUSILEK K., POHANKA M. The progress in the cholinesterase quantification methods., *Expert Opin. Drug Discov.*, 2012.
- [47] HAI A., BEN-HAIMB D., KORBÁKOV N. Acetylcholinesterase–ISFET based system for the detection of acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors., *Biosensors and Bioelectronics.*, 2006, 22, 605-612.

- [48] IVANOVA A.N., YOUNUSOVA R.R., EVTUGYN G.A. Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes—Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection. 2011, 85, 216-221., *Talanta.*, 2011, 85, 216-221.
- [49] DZYADEVYCH S.V., SOLDATKIN P.A., CHOVELON J-M. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors., *Analytica Chimica Acta.*, 2002, 459, 33-41.
- [50] STEPURSKA K.V., SOLDATKIN O.O., KUCHERENKO I.S. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature., *Analytica Chimica Acta.*, 2015, 854, 161-168.
- [51] BACHAN L.S., VERMA U., VERMA N. Enzyme inhibition based biosensors., *Analytical Letters.*, 2013, 46, 225-241.
- [52] POHANKA M. Biosenzory založené na cholinesterasach., *Chemické listy.*, 2013, 107, 121-125.
- [53] BONNET C., ANDREESCU S., MARTY J-L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes., *Analytica Chimica Acta.*, 2003, 481, 209-211.
- [54] RAGHU P., SWAMY K.B.E., REDDY M.T. Sol-gel immobilized biosensor for the detection of organophosphorous pesticides: A voltammetric method., *Bioelectrochemistry.*, 2012, 83, 19-24.
- [55] SASSOLAS A., BLUM J.L., LECA-BOUVIER D.B. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors., *Biotechnology Advances.*, 2012, 30 (3), 489-511.
- [56] ALBAREDA-SIRVENT M., MERKOÇI A., ALEGRET S. Pesticide determination in tap water and juice samples using disposable amperometric biosensors made using thick-film technology., *Analytica Chimica Acta.*, 2001, 442 (1), 35-44.
- [57] RAGHU P., REDDY M.T., SWAMY K.B.E. Development of AChE biosensor for the determination of methyl parathion and monocrotophos in water and fruit samples: A cyclic voltammetric study., *Journal of Electroanalytical Chemistry.*, 2012, 665, 76-82.
- [58] CHAUHAN N., PUNDIR S.C. An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe₃O₄ nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides., *Electrochimica Acta.*, 2012, 67, 79-86.

- [59] HILDEBRANDT A., BRAGÓS R., LACORTE S. Performance of a portable biosensor for the analysis of organophosphorus and carbamate insecticides in water and food., *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 2008, 133 (1), 195-201.
- [60] ARDUINI F., AMINE A., MOSCONE D. Fast, sensitive and cost-effective detection of nerve agents in the gas phase using a portable instrument and an electrochemical biosensor., *Anal Bioanal Chem.*, 2007, 388, 1049-1057.
- [61] UPADHYAY S., RAO R.G., SHARMA K.M. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents., *Biosensors and Bioelectronics.*, 2009, 25, 832-838.
- [62] LENIGK R., LAM E., LAI A. Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease., *Biosensors and Bioelectronics.*, 2000, 15 (9-10), 541-547.
- [63] SANLLORENTE-MÉNDEZ S., DOMÍNGUEZ-RENEDO O., ARCOS-MARTÍNEZ J. Immobilization of Acetylcholinesterase on Screen-Printed Electrodes. Application to the Determination of Arsenic(III)., *Sensors.*, 2010, 10, 2119-2128.
- [64] BRÍZOVÁ P. Biosenzory a analyzátory založené na imobilizované butyrylcholinesterase., *Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.*, 2016.
- [65] HAJIMEHDIPOOR H., ARA L., MOAZZENI H. Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province, Iran., *Research Journal of Pharmacognosy.*, 2016, 3 (4), 1-7.
- [66] FENG X., WANG X., LIU Y. Linarin Inhibits the Acetylcholinesterase Activity In-vitro and Ex-vivo., *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.*, 2015, 14 (3), 949-954.
- [67] LÓPEZ M.D., PASCAUL-VILLALOBOS M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control., *Industrial Crops and Products.*, 2010, 31 (2), 284-288.
- [68] SHUKOR M.Y., THAM L.G., HALMI M. I. E. Development of an inhibitive assay using commercial *Electrophorus electricus* acetylcholinesterase for heavy metal detection., *Journal of Environmental Biology.*, 2013, 34, 967-970.

- [69] ARDUINI F., NEAGU D., PAGLIARINI V. Rapid and label-free detection of ochratoxin A and aflatoxin B1 using an optical portable instrument., *Talanta.*, 2016, 150, 440-448.
- [70] CHEN T-B., ZHENG Y-M., LEI M., Assessment of heavy metal pollution in surface soils of urban parks in Beijing, China., *Chemosphere.*, 2005, 60, 542-551.
- [71] FARKAS A., ERRATICO C., VIGANO L. Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po., *Chemosphere.*, 2007, 68, 761-768.
- [72] SINGH A., SHARMA R. K., AGRAWAL M. Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from waste water irrigated area of Varanasi, India., *Tropical Ecology.*, 2010, 51, 375-387.
- [73] DIAZ A. N., PEINADO R.M.C. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorimetric analysis., *Sensors and Actuators.*, 1997, 39, 426-431.
- [74] ALHOMIDA S.A., AL-RAJHI A.A., KAMAL A.K. Kinetic analysis of the toxicological effect of tacrine on human retinal acetylcholinesterase activity., *Toxicology.*, 2000, 147, 33-39.
- [75] ZHANG S., LI S., MA J. Detection of Carbofuran with Immobilized Acetylcholinesterase Based on Carbon Nanotubes-Chitosan Modified Electrode., *Journal of Nanomaterials.*, 2013.
- [76] POHANKA M., FUSEK J., ADAM V. Carbofuran assay using Gelatin based Biosensor with Acetylcholinesterase as a Recognition Element., *International Journal of Electrochemical Science.*, 2013, 8, 71-79.