

KOLORIMETRICKÉ DETEKTORY ZALOŽENÉ NA ACETYLCHOLINESTERASE A JEJICH KONSTRUKCE

^{1, 2}Miroslav POHANKA, ³Vítězslav VLČEK, ²Jana ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, ^{1, 2}Kamil KUČA, ²Jiří CABAL

¹Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie, Hradec Králové

³Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Brno

Souhrn

Kolorimetrické detektory založené na rekogniční schopnosti acetylcholinesterasy (AChE) jsou vhodným nástrojem pro rychlou a přitom vysoce senzitivní detekci nervově paralytických látek a některých pesticidů založené na inhibici AChE. V tomto přehledovém článku jsou nastíněny základní biochemické metody vhodné pro kolorimetrické stanovení aktivity AChE. Zároveň jsou popsány matrice vhodné pro konstrukci vlastních průkazníků a chemické i fyzikální metody vazby AChE na jejich povrch. Detehit a ChP-71 jsou uvedeny jako typické kolorimetrické detektory pro stanovení nervově paralytických látek.

Klíčová slova: Kolorimetrie; Nervově paralytická látka; Acetylcholinesterasa; Průkazník; Detektor.

Colorimetric Detectors Based on Acetylcholinesterase and Its Construction

Summary

Colorimetric detectors based on recognition capability of acetylcholinesterase (AChE) are a suitable tool for fast but sensitive detection of nerve agents and some pesticides based on AChE inhibition. In this review article, basic biochemical methods appropriate for colorimetric estimation of AChE enzymatic activity are presented. Moreover, the available matrices suitable for construction of dipsticks and chemical as well as physical immobilization protocols for AChE binding on matrix surface are described, too. Detehit and ChP-71 are indicated as typical colorimetric detectors for assay of nerve agents.

Key words: Colorimetry; Nerve agents; Acetylcholinesterase; Dipstick; Detector.

Úvod

Pro stanovení přítomnosti nervově paralytických látek (NPL) a některých neurotoxických organofosfátových pesticidů (OP) jsou dlouhodobě využívány enzymy acetylcholinesterasy (AChE; EC 3.1.1.7.) a butyrylcholinesterasy (BChE; EC 3.1.1.8.). Enzym acetylcholinesterasy se in natura podílí na cholinergní neurotransmisí. Jeho konkrétní úloha je hydrolýza neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a octovou kyselinu v neurosynaptické šterbině a tím ukončení působení na cholinergní receptory (9). Ve větší míře se AChE rovněž nachází na povrchu krevních buněk, kde se podílí na neuroendokrinní regulaci některých procesů. Význam butyrylcholinesterasy není tak snadno definovatelný, jako je tomu v případě acetylcholinesterasy. V minulosti se nazývala plazmatická cholinesterasa díky faktu, že AChE je na povrchu krevních buněk a po centrifugaci krve zůstává v plazmě pouze BChE. Zatímco acetylcholinesterasa je pojmenována po nativním substrátu, přirozený substrát butyrylcholinesterasy se nepoda-

řilo dosud nalézt a butyrylcholin je jen alternativní substrát. Možné vysvětlení fyziologické funkce BChE v organismu je v detoxikaci některých přírodních toxinů. Butyrylcholinesterasa se dříve využívala z důvodu snadnější izolace z krve. Má však nižší číslo přeměny substrátu a pro analytické účely se dnes využívá acetylcholinesterasa. Jak AChE, tak i BChE jsou tzv. serinové hydrolázy. V aktivním centru obsahují hydrolyticky aktivní serin, který je zároveň selektivně a ireverzibilně esterifikován nervově paralytickými látkami a organofosfátovými pesticidy, především v tzv. oxoformě (4).

Dostupné detektory založené na acetylcholinesterase

Pro sledování aktivity acetylcholinesterasy bylo v minulosti navrženo několik metod. Dvě z nich se zdají být nejperspektivnější a našly širší uplatnění. V Armádě České republiky jsou především 2 typy detekčních instrumentů založených na AChE

a sledování její aktivity Ellmanovou metodou. Prvním detektorem je Chemický průkazník (ChP) 71 (obr. 1), resp. jeho modifikace vzor 05. Obě verze ChP jsou schopny semikvantitativního hodnocení přítomnosti nervově paralytických látek (a jiných látek podle typu trubičky) v okolním prostředí za pomoci detekčních trubiček s vázanou AChE. Druhým dostupným instrumentem je průkazníkový papírek Detehit. V minulosti byly zařazeny i různé poloautomatické systémy. V současné době je používán například plně automatický signalizátor GSA. Další alternativou je použití indoxylacetátu či jeho derivátů. Výhodou této metody je ostřejší barevný přechod, nevýhodou je pak pomalejší konverze indoxylacetátu acetylcholinesterasou. Jednoduchý průkazník založený na tomto principu dodává např. Neogen Corporation (Lansing, Michigan, USA).

Pro úplnost lze zmínit, že v dnešní době jsou převážujícími zařízeními pro rychlé stanovení nervově paralytických látek přenosné hmotnostní spektrometry. Komerčně dostupným zařízením jsou např. hmotnostní spektrometry RAID-1, RAID-M, RAID-S a RAID-E od společnosti Bruker Daltonics. Tyto přístroje porovnávají spektra získaná měřením neznámých vzorků se spektry z uložených standardů. Výhodou hmotnostních spektrometrů je lepší reprodukovatelnost měření, protože jsou méně ovlivňovány skladovacími podmínkami ve srovnání s detektory obsahujícími biorekogniční makromolekuly. V neprospěch hmotnostní spektrometrie však hovoří vyšší pořizovací cena a problematické stanovení méně známých toxických derivátů, jejichž spektrum není uloženo v databázi.



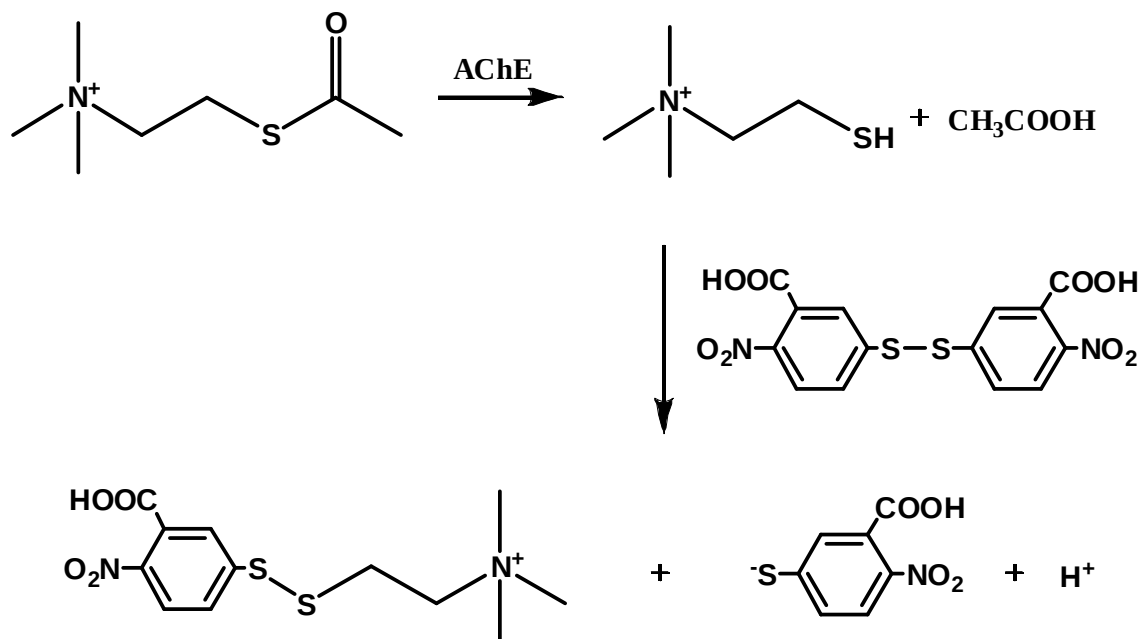
Obr. 1: Fotografie Chemického průkazníku 71. V levé části je balení trubiček pro stanovení nervově paralytických látek a dále detail vlastní trubičky.



Obr. 2: Průkazník nervově paralytických látek Detehit. Význam symbolů: a – tuba obsahující balené průkazníky a návod, b – detekční tkanina průkazníku s vázanou AChE, c – žlutý etalon, d – indikační papír

Možnosti kolorimetrického stanovení aktivity acetylcholinesterasy

Princip stanovení nervově paralytických látek jak ChP, tak i přípravkem Detehit je totožný. Jedná se o modifikovanou Ellmanovu metodu vyobrazenou v obr. 3. Tato reakce byla v minulosti zavedena především pro stanovení aktivity AChE v krvi a díky tomu byla klinicky diagnostikována intoxikace NPL či OP, následně byla tato metoda shledána vhodnou i pro rychlé stanovení přítomnosti nervově paralytických látek. Mechanismus reakce je popsán následovně: substrát acetylthiocholin (alter-

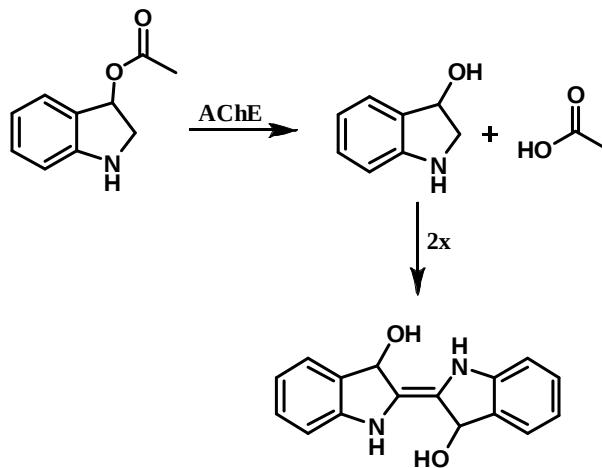


Obr. 3: Sledování aktivity acetylcholinesterasy (AChE) Ellmanovou metodou.

nativní substrát fyziologickému acetylcholinu) je hydrolyzován na octovou kyselinu a thiocholin. Thiocholin reaguje s 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoovou) kyselinou za vzniku 2-nitro-5-thiobenzoové kyseliny. Reakce se projevuje vznikem žlutého zbarvení spektrofotometricky měřitelného při 412 nm bez jakékoli další časové prodlevy nebo dalších fyzikálních zásahů. Tato reakce je blokována v přítomnosti nervově paralytické látky inhibicí AChE.

Pro sledování aktivity AChE lze použít i jiný chromogen než Ellmanovo činidlo. V literatuře jsou často zmiňovány indofenol acetát, 2,6-dichloroindofenyl acetát, β -naftyl acetát a N-methylindoxyl acetát (8). Praktického rozšíření došlo činidlo indoxyl acetát. Tato uvedená činidla na rozdíl od Ellmanova činidla poskytují modré zbarvení. V případě indoxyl acetátu dochází k hydrolýze indoxyl acetátu na indoxyl a octovou kyselinu. Indoxyl pak spontánně přechází na indigo dávající roztoku modré zbarvení. Vlastní reakce je vyobrazena jako obr. 4. Pro úplnost lze uvést možnost sledování aktivity cholinesteras pomocí pH indikačního činidla a nativního substrátu acetylcholinu. Uvolněná octová kyselina způsobuje acidifikaci média. Tuto acidifikaci lze kolorimetricky sledovat přidáním vhodného indikačního činidla. Nevýhodou sledování aktivity AChE pH indikačními činidly za účelem stanovení přítomnosti NPL a OP je možná interference kyselých výparů. Zároveň nadměrné množství NPL, respektive OP, může díky spontánní hydrolýze s ná-

slednou acidifikací vytvářet falešně pozitivní indikaci aktivní cholinesterasy. Další nevýhodou pak je nemožnost indikace aktivity AChE v silně pufrujících roztocích.



Obr. 4: Sledování aktivity AChE za použití indoxyl acetátu.

Dá se říci, že použití jak Ellmanovy metody, tak indoxyl acetátu je vhodné pro reálné stanovení aktivity cholinesteras. Každá z těchto metod má své přednosti a nevýhody. Hlavní předností Ellmanovy metody je rychlá konverze acetylthiocholinu. Stejné množství AChE způsobuje přibližně desetkrát pomalejší konverzi indoxyl acetátu ve srovnání s acetylthiocholinem. Na druhou stranu i Ellmanova metoda má značná úskalí. Především

se jedná o značnou interferenci některých látek. Falešně pozitivní reakce může být způsobena thiol obsahujícími molekulami. Například v lidské krvi přítomný glutathion reaguje také s Ellmanovým činidlem. Při vlnové délce 412 nm se rovněž uplatňuje interference hemoglobinu. V literatuře je také popsána interference léků (antidot) NPL a OP – oximů. V reakční směsi způsobují tzv. oximolýzu substrátu poskytující rovněž falešně pozitivní indikaci aktivity AChE. Obecně je předností Ellmanovy metody ve srovnání s indoxyl acetátem větší podobnost acetylthiocholinu s nativním substrátem acetylcholinem. Proto je obecně dáována přednost Ellmanově metodě před indoxyl acetátem při klinických stanoveních aktivit AChE v krvi. Výhodou použití indoxyl acetátu je vizuálně lépe pozorovatelná barevná změna s možnou jak fluorimetrickou, tak i spektrofotometrickou indikací. Pro stanovení NPL a OP byla v minulosti upřednostňována Ellmanova metoda z důvodu menší spotřeby AChE, resp. BChE. V současné době není tato výhoda rozhodující díky levným a čistým komerčně dostupným preparátům AChE. Z výše uvedených faktů vyplývá, že Ellmanova metoda i použití indoxyl acetátu má své přednosti a použití příslušných činidel musí být zváženo pro konkrétní situaci na základě experimentální optimalizace.

Nosné matrice používané v detektorech založených na acetylcholinesterase

Pro konstrukci kolorimetrických průkazníků se využívá široká škála nosných maticí a tomu odpovídá i množství různých imobilizačních technologií. Obecnými požadavky na nosnou matici jsou zejména: kompatibilita se vzorkem, tj. vzorek nesmí matici rozpouštět, extrahovat složky atd. Dalšími požadavky jsou dostatečně velká plocha pro styk se vzorkem, rychlý přístup analytu k rekogničním komponentám díky dostatečné propustnosti, hydrofilní charakter, chemická a tepelná stabilita, mechanická pevnost, odolnost vůči mikrobiálnímu rozkladu, nízká cena apod.

V zásadě lze nosné matrice rozdělit do tří velkých skupin:

- přírodní polymery (polysacharidy, proteiny),
- syntetické polymery (polystyren, polyakryláty, hydroxylalkyl methakryláty, apod.),
- anorganické nosiče (minerály, aktivní uhlí, skelná vlákna, porézní oxidy kovů).

Přírodní polymery jsou získávány z poměrně pestré škály přírodních zdrojů (dřevní vlákna, odpad z jatek či mikroorganismy), typickými zástupci této skupiny jsou celulóza, příp. papír (6), dextran nebo želatina. Určitou nevýhodou těchto látek je možnost ztráty AChE vymýváním. Ze syntetických polymerů, resp. anorganických nosičů, se nejčastěji využívají PVC (1), polykarbonáty (11), polyester (2), polyuretan (5), keramika (12), popř. skleněná vlákna či buničinnové tkaniny, do nichž se pak AChE zachycuje. Z méně běžných syntetických materiálů můžeme zmínit ve vodě rozpustný polymer AQ 55 (polyester sulfonát od fy Kodak), jehož směs s enzymem je po nakápnutí a zaschnutí na povrchu nosné matrice, možno používat i v přítomnosti organických rozpouštědel. Zajímavou „novinkou“ jsou i tzv. biocers (biologically modified ceramics, biologicky modifikovaná keramika (3), případně uhlíková matrice), založené na modifikovaných nanovlákních, nebo naopak nanopórech (13). Biocers jsou třída nanokompozitů kombinující keramické biokomponenty jako matrici. Mohou být připravovány jako sypký materiál nebo jako povlaky při zamezení kritických podmínek (vysoká teplota, organická rozpouštědla apod.), což by vedlo k denaturaci bílkovin. Detektory založené na těchto nosných maticích často vykazují pozoruhodně nízké limity detekce, nevýhodou těchto maticí je však stále vysoká cena jednotlivých reagentů.

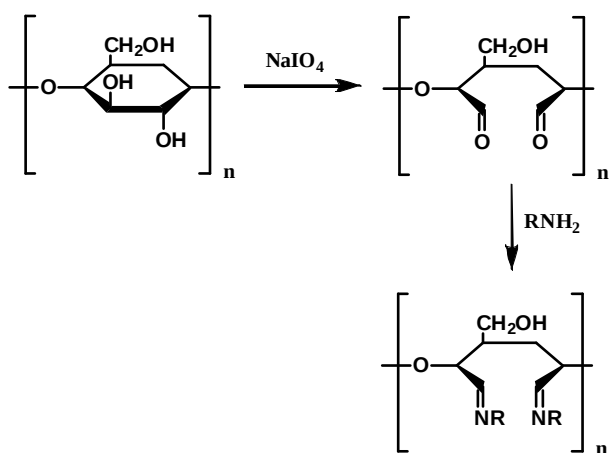
Z hlediska výrobní ceny je bezesporu nejzajímavější poslední skupina nosných maticí založených na jednoduché fyzikální sorpci, případně mechanickém zachycení pod tenkou vrstvou matrice. Lze zmínit roztokem enzymu syčený porézní vesměs anorganický nosič, jako je skelná tkanina, sol-gel a skleněná membrána. Vzhledem k předpokládanému jednorázovému použití průkazníku založeného na AChE se zde jedná o optimum poměru cena/výkon.

Zachycení acetylcholinesterasy

AChE může být imobilizována obdobným způsobem jako většina molekul biologického původu. Při zachycení jakékoli biomolekuly musí být imobilizační procedura korespondující s účelem této imobilizace. Acetylcholinesterasa imobilizovaná za účelem detekce NPL a OP nemusí být zachycena s vysokou afinitou. Tato stanovení jsou jednorázová a v případě pozitivního stanovení obvykle nelze detektor založený na AChE použít opakovaně.

Pro konstrukci komerčních detektorů jsou ideální především jednokrokové imobilizace, sorpce na povrch nosných maticí a zachycení do stabilních membrán. Z dostupné literatury lze zmínit mechanické zachycení AChE do želatinových (14) nebo celulóзовých (16) membrán. Známé jsou i složitější imobilizační procedury jako sol-gel techniky a zachycení na nanočástice a magnetické mikročástice (10). Tyto procedury jsou na jednu stranu efektivní, na druhou stranu však zvyšují náklady přípravy jednorázových detektorů.

Pro imobilizaci AChE lze využít dobře zdokumentované zachycení na aktivovanou celulózu či stabilizaci fyzikálně sorbované AChE glutaraldehydem. Při těchto imobilizačních procedurách jsou využívány aminoskupiny volně dostupné na povrchu molekuly cholinesterasy. Glutaraldehyd je homobifunkční činidlo kovalentně propojující dvě molekuly cholinesterasy nebo molekulu cholinesterasy s molekulou stabilizujícího proteinu (nejčastěji albuminu) nebo i jiného enzymu, jako je například cholinoklasa (7). Takto provázané cholinesterasy jsou značně odolné proti vymývání do roztoku. Vazba na celulózu je možná rovněž díky volným aminům. Obecný mechanismus zachycení biomolekuly je uveden v obrázku 5 adaptovaný podle Wang a kol. (15). Před vlastní imobilizací je nutné provést částečnou oxidaci celulózy roztokem jodistanu nebo jiného oxidačního činidla. Vlastní zachycení AChE je chemicky obdobné precipitaci glutaraldehydem.



Obr. 5: Oxidace celulózy jodistanem sodným a následné navázání biomolekuly. Molekula vody odstupující při kondenzační reakci není znázorněna.

Závěr

Kolorimetrické průkazníky založené na AChE jsou vhodným a často užívaným nástrojem pro rychlé, levné a vysoce citlivé stanovení přítomnosti nervově paralytických látek a některých, především organofosfátových, pesticidů. Zároveň je možné použít tyto průkazníky i pro stanovení vybraných toxinů přírodního původu. Současné metody konstrukce průkazníků umožňují připravit dostatečně pevně vázaný komplex AChE – nosná matrice. Zároveň jsou známy i biochemické metody sledování aktivity AChE pomocí chromogenních substrátů, které jsou cholinesterasou konvertovány s dostatečnou rychlostí. Tato studie popisující základní metody a možnosti konstrukce průkazníků založených na AChE uvádí přehledovou formou znalosti nutné k pochopení problematiky.

Literatura

- ANDREESCU, S. – BARTHELMEBS, L. – MARTY, JL. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 2002, vol. 464, no. 2, p. 171–180.
- ARDUINI, F. – RICCI, F. – TUTA, CS., et al. Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using a cholinesterase biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. *Anal. Chim. Acta*, 2006 vol. 580, no. 2, p. 155–162.
- BOTTCHEER, H. – SOLTSMANN, U. – MERTIG, M., et al. Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development. *J. Materials Chemistry*, 2004, vol. 14, no. 14, p. 2176–2188.
- CASIDA, JE. – QUISTAD, GB. Serine hydrolase targets of organophosphorus toxicants. *Chem. Biol. Interact.*, 2005, vol. 157, no. 158, p. 277–283.
- CHO, YA. – LEE, HS. – CHA, GS., et al. Fabrication of butyrylcholinesterase sensor using polyurethane-based ion-selective membranes. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, vol. 14, p. 435–438.
- CUI, G. – KIM, SJ. – CHOI, SH., et al. A disposable amperometric sensor screen printed on a nitrocellulose strip: a glucose biosensor employing lead oxide as an interference-removing agent. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, no. 8, p. 1925–1929.
- GUERRIERI, A. – MONACI, L. – QUINTO, M., et al. A disposable amperometric biosensor for rapid screening of anticholinesterase activity in soil extracts. *Analyst*, 2002, vol. 127, no. 1, p. 5–7.
- NO, HY. – KIM, YA. – LEE, YT., et al. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 594, no. 1, p. 37–43.

9. PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 2004, vol. 47, no. 4, p. 215–228.
10. POHANKA, M. – MUSILEK, K. – KUČA, K. Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition. *Curr. Med. Chem.*, 2009, vol. 16, no. 14, p. 1790–1798.
11. SANCHEZ, S. – PUMERA, M. – CABRUJA, E., et al. Carbon nanotube/polysulfone composite screen-printed electrochemical enzyme biosensors. *Analyst*, 2007, vol. 132, no. 2, p. 142–147.
12. SANTHA, H. – DOBAY, R. – HARSANYI, G. Amperometric uric acid biosensors fabricated of various types of uricase enzymes. *IEEE Sensors J.*, 2003 vol. 3, no. 3, p. 282–287.
13. SOTIROPOULOU, S. – CHANIOTAKIS, NA. Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Anal. Chim. Acta*, 2005, vol. 530, no. 2, p. 199–204.
14. TIMUR, S. – TELEFONCU, A. Acetylcholinesterase (AChE) electrodes based on gelatin and chitosan matrices for the pesticide detection. *Artif. Cell Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, 2004, vol. 32, no. 3, p. 427–442.
15. WANG, S. – LI, S. – YU, Y. Immobilization of cholesterol oxidase on cellulose acetate membrane for free cholesterol biosensor development. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, 2004, vol. 32, no. 3, p. 413–425.
16. ZHANG, J. – LUO, A. – LIU, P., et al. Detection of organophosphorus pesticides using potentiometric enzymatic membrane biosensor based on methylcellulose immobilization. *Anal. Sci.*, 2009, vol. 25, no. 4, p. 511–515.

Korespondence: Kpt. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Centrum pokročilých studií
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: rau@atlas.cz
pohanka@pmfhk.cz

Do redakce došlo 5. 11. 2009