

IMOBILIZACE ACETYLCHOLINESTERASY A KONSTRUKCE ELEKTROCHEMICKÉHO BIOSENZORU PRO STANOVENÍ TOXICKÝCH ORGANOFOSFÁTŮ

Miroslav POHANKA^{1,2}, Oto DROBÍK³, Zuzana KŘENKOVÁ⁴, Jana ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ², Jiří CABAL², Kamil KUČA^{1,2}

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

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

³Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra farmaceutické chemie, Hradec Králové

⁴Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra biologických a biochemických věd, Pardubice

Souhrn

Biosenzory jsou analytická zařízení založená na těsném spojení tzv. biorekogničního elementu a fyzikálně chemického převodníku. V této studii byl použit síťotiskový senzor s platinovou pracovní elektrodou jako převodník a acetylcholinesterasou jako biorekogničním elementem. Acetylcholinesterasa byla imobilizována rozdílným způsobem, včetně sol-gel technologie, imobilizace na grafitová nanovlákná, precipitace glutaraldehydem a zachycení do sférických grafitových mikročástic. Pro jednotlivé imobilizační postupy byla stanovena účinnost a diskutuje se o praktickém dopadu konstrukce biosenzoru.

Klíčová slova: Biosenzor; Acetylcholinesterasa; Nervově paralytická látka; Detekce; Stanovení; Organofosfát.

Immobilization of Acetylcholinesterase and a Construction of Biochemical Biosensor for Identification of Toxic Organophosphates

Summary

Biosensors are analytical devices based on tight junction of so-called biorecognition element and a physico-chemical transducer. In this study, a screen printed sensor with platinum working electrode as the transducer and acetylcholinesterase as the biorecognition element were used. Acetylcholinesterase was immobilized in a different way including sol-gel technologies, immobilization on graphite nanofibers, precipitation with glutaraldehyde and interception into spherical graphite microparticles. Efficacy for given immobilization protocols was estimated, and practical impact of the study was discussed.

Key words: Biosensor; Acetylcholinesterase; Nerve agents; Detection; Assay; Organophosphate.

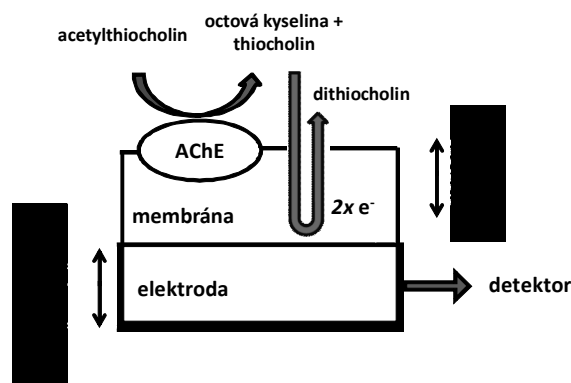
Úvod

Biosenzory jsou analytická zařízení skládající se ze tří komponent: první je prvek přírodního původu, tzv. biorekogniční element. Tím může být enzym, protilátka, organela aj. Druhou komponentou je fyzikálně-chemický převodník. Poslední komponentou je pak detektor. Příkladem může být tradiční biosenzor pro stanovení glukózy dodávaný komerčně, jako například laboratorní detektor YSI-2700D (YSI Incorporated, Yellow Springs, Ohio, USA) a osobní glukometr Smartest (Biotest Medical Corporation, Taichung, Taiwan), resp. OKmeter Link Blood Glucose Meter (OK Biotech, Hsinchu, Taiwan). Jako biorekogniční element je zde glukosa oxidasa, fyzikálně-chemický převodník pak pracovní elektroda, resp. kombinovaná elektroda. Detektorem je elektrochemický analyzátor. Důležitou podmínkou toho, aby analytické zařízení bylo po-

važováno za biosenzor, je spojení biorekogničního elementu a fyzikálně-chemického převodníku.

Pro rychlou analýzu přítomnosti toxických látek mohou být použity biosenzory s rozdílnými biorekogničními elementy. Jedním z nich je i amperometrický biosenzor založený na acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) fungující na tzv. inhibičním principu. To znamená, že v nepřítomnosti toxické látky poskytuje biosenzor plný signál. Přítomnost nervově paralytické látky, organofosfátového, resp. karbamátového pesticidu, případně jiného specifického inhibitoru, se projeví poklesem měřeného signálu. Vlastní princip fungování amperometrického biosenzoru s imobilizovanou AChE je nastíněn na obrázku 1.

Základním předpokladem úspěšné konstrukce funkčního biosenzoru je zvládnutí imobilizačního postupu. Vlastní imobilizační postup musí odpovídat nejen povaze biorekogničního elementu, ale i



Obr. 1: Schéma amperometrického biosenzoru založeného na AChE a acetylthiocholinu jako substrátu

chemické povaze povrchu fyzikálně-chemického převodníku. Jako vlastní charakteristika úspěšnosti imobilizačního postupu v případě biosenzorů obsahujících enzym jako biorekogniční element je porovnání aktivity vnesené na senzor se zdánlivou aktivitou poskytnutou biosenzorem. Při hodnocení je ale třeba zvážit fakt, že substrát může obtížně pénétrovat vzniknuvší membránou na povrchu biosenzoru a obvykle dochází i ke změně Michaelisovy konstanty pro imobilizovaný enzym. V této studii je hodnocena úspěšnost imobilizací AChE na keramický povrch sítotiskového senzoru.

Metodika

Chemikálie

AChE z elektrického úhoře (1000 U/mg proteinu), bovinní sérový albumin (BSA), acetyl thiocholin chlorid (ATChCl), diisopropyl fluorofosfát (DFP) byly získány od společnosti Sigma-Aldrich (pobočka Praha). Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS) byl použit jako základní pufr pro experimentální činnost. Organické a anorganické chemikálie užívané v experimentech byly v p. a. kvalitě. Voda byla připravena pomocí reverzní osmózy (Millipore).

Vybavení

Sítotiskový senzor (25,4×7,3×0,6 mm) s platínovou, případně grafitovou pracovní (průměr 1 mm), Ag/AgCl referenční a platínovou případně grafitovou pomocnou elektrodou byl získán od společnosti BVT (Brno). Senzor byl omyt deionizovanou vodou před vlastním měřením. Pro měření byl použit elektrochemický detektor EmStat s ovládacím softwarem PSLite 1.7.3 (PalmSens, Houten, Nizozemsko).

Imobilizace AChE

Imobilizace byla realizována na keramickou podpornou destičku sítotiskového senzoru v bezprostřední blízkosti platínové pracovní elektrody. Byly vybrány následující metody: prostá sorpce na keramický povrch, zachycení do membrány tvořené želatinou, precipitace ve formě monovrstvy homobifunkčním činidlem glutaraldehydem, zachycení metodou sol-gel, zachycení do leštěné vrstvy tvořené sférickými částicemi grafitu a zachycení na grafitová nanovlákna. Účinnost imobilizačního postupu byla porovnána s ekvivalentní aktivitou AChE v homogenní fázi se substrátem. Vstupní aktivita AChE byla nastavena na 1 U/μl a cholinesterasa byla stabilizována roztokem BSA ve výsledné koncentraci 1 μg/ml (směs dále označována jako roztok AChE).

Prostá sorpce byla založena na rozprostření 1 μl roztoku AChE s 9 μl PBS na povrch sítotiskového senzoru. Směs byla vysušena za pokojové teploty a SATP podmínek.

Precipitace glutaraldehydem je založena na kopolymeraci molekul AChE mezi sebou a BSA prostřednictvím volných aminoskupin. Na povrch senzoru je nanášeno 8 μl PBS a přidán 1 μl roztoku AChE a 1 μl 0,1% (v/v) glutaraldehydu. Po aplikaci roztoků byl senzor inkubován při 4 °C po dobu 4 hodin v uzavřené Petriho misce a následně nechán k samovolnému vysušení při pokojové teplotě.

Zachycení do želatinové membrány vycházelo z citované literatury (1). Zachycení spočívalo ve smíchání 1 μl roztoku AChE s 8 μl PBS a 1 μl 1% želatiny (Merck) na povrch senzoru. Roztok byl po promíchání mikropipetou vysušen při SATP podmínkách.

Zachycení metodou sol-gel: metoda je založena na směsné kondenzaci tetramethoxysilanu (TMOS) a methyltrimethoxysilnu (MTMOS) v přítomnosti imobilizovaného enzymu. Byl použit modifikovaný postup z citace (9, 10). Do jednorázové plastové zkumavky je postupně přidáno 10 μl TMOS, 10 μl MTMOS, 44 μl deionizované vody, 40 μl HCl (1 mM) a 4 μl polyethylenglykolu (PEG, 600 Da). TMOS, MTMOS a PEG600 byly získány od firmy Sigma-Aldrich jako koncentráty (> 98% w/v). Směs byla intenzivně promíchána a ponechána k parciální hydrolýze při 4 °C po dobu 24 hodin. Pět μl sol-gel směsi bylo smícháno se 4 μl deionizované vody a 1 μl roztoku AChE na očištěném keramickém povrchu sítotiskového senzoru a inkubováno 24 hodin při 4 °C.

Zachycení do leštěné vrstvy tvořené sférickými částicemi grafitu (uhlíková pasta): 1 μl roztoku AChE

bylo injektováno do 10mg grafitových mikročástic (sférické, průměr 5 μm , dodavatel Sigma-Aldrich). Suspenze byla vysušena a rozleštěna na keramický sítotiskový senzor a rozetřena o glazovaný keramický povrch.

Zachycení na grafitová nanovlákná: pro imobilizaci byla vybrána karbonová nanovlákná funkcionizovaná karboxylovými skupinami (Sigma-Aldrich) s deklarovanými rozměry vláken 4–5 nm krát 0,5–1,5 μm . Vlákná byla zachycena do želatinové membrány (1 mg vláken/10 μl 0,1% želatiny v deionizované vodě). Po zaschnutí byly volné karboxylové skupiny aktivovány 1 mM N-hydroxysukcinnidem (NHS). AChE byla nanášena na aktivovaný povrch v množství jako směs 1 μl zásobního roztoku a 9 μl PBS.

Použití biosenzorů

Biosenzory připravené podle výše uvedených postupů byly exponovány inhibitorem (DFP) po dobu 30 minut a následně byl přebytek inhibitoru odsát. DFP inhibované nebo kontrolní biosenzory byly ponořeny do kyvety s 1 mM ATChCl v PBS a inkubovány 2 minuty. Po této době byla stanovena hladina nahromaděného thiocholinu pomocí square wave voltametrie (SWV) případně cyklické voltametrie.

Vlastní parametry SWV jsou následující: rozsah měření 0–1,1 V, vlny: 1 Hz, amplituda 0,01 V, měřená data sbírána po 0,005 V. Pro cyklickou voltimetrii byla data sbírána rovněž po 0,005 V s rychlostí potenciálové změny 50 mV/s a rozsahem měření 0–1,1 V. Jeden vzorek byl analyzován jedním měřicím cyklem. Měření proběhlo pomocí výše popsaného zařízení EmStat s ovládacím softwarem PSLite.

Výsledky

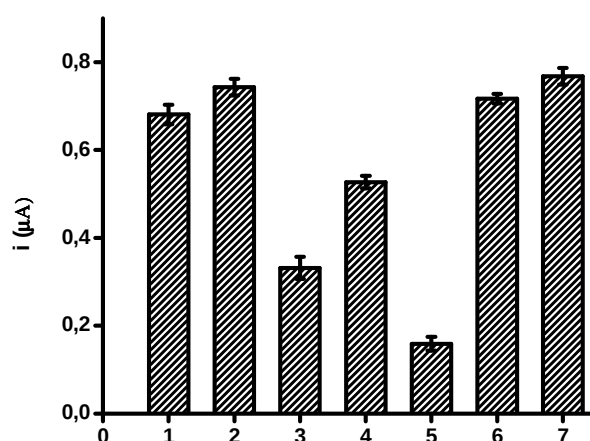
Použití vlastního biosenzoru v kombinaci s SWV vyžadovalo najít a charakterizovat píky odpovídající vznikajícímu thiocholinu. Byla provedena série měření s hydrolyzovaným ATChCl pomocí AChE a zároveň kontrolní měření v nepřítomnosti ATChCl. Přítomnost hydrolyzovaného ATChCl se projevila změnou průběhu voltamogramu a tvorbou píku s vrcholem při 641 mV. Při prvotních studiích se rovněž zvažovalo použití cyklické voltametrie. Tato technika nebyla shledána jako optimální díky hůře definované pozici píků a horší interpretaci výsledků

z důvodu proudové odezvy blanku způsobené polarizací elektrod. Proto jsme se v experimentu přiklonili k použití právě SWV.

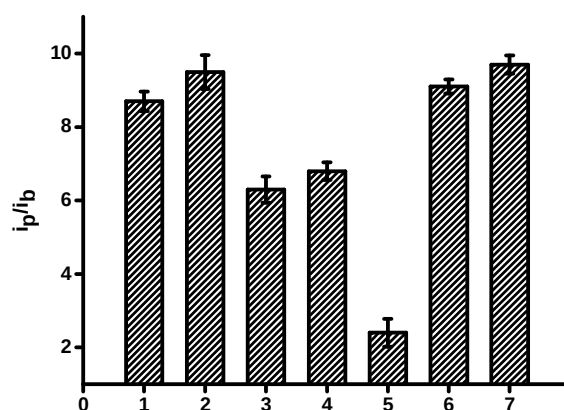
V záznamech SWV se nepravidelně objevovaly různé píky, které byly následně identifikovány jako kontaminanty reagentů (staré reagentie, použití zásobních nádob s mechanicky narušeným povrchem) a znečištěné elektrody (dotyk rukou, povrchové okem viditelné kazy od výroby aj.). Ostře ohraničené píky s malou amplitudou se pak objevovaly jako důsledek horší kvality kontaktů a vnitřních chyb v ovládacím softwaru. Po odstranění nežádoucích vlivů byl jednoznačně identifikován pík náležící oxidaci thiocholinu a interferující píky byly minimalizovány na úroveň, kdy neovlivňovaly vyhodnocování signálů. Pokud se přesto objevovaly jiné píky, pak tyto píky byly nižší ve srovnání s píkem thiocholinu. Jedinou výjimkou je nárůst detekovaného proudu při potenciálech nad 900 mV. Tento proud odpovídá elektrolýze vody a hranice 900 mV byla v rámci experimentů považována jako horní mez pro sledování voltametrické odezvy. Měření čistého ATChCl senzorem bez AChE ukázalo jen nízký pík v oblasti, kde lze očekávat oxidaci thiocholinu. Situace se však změnila, pokud byl ATChCl skladován delší dobu. Docházelo k samovolnému rozkladu na kyselinu octovou a thiocholin a následnému vzniku falešně pozitivního stanovení enzymové katalýzy. Z tohoto důvodu byl roztok ATChCl připravován čerstvý bezprostředně před vlastním měřením.

V rámci experimentů byla stanovena přesná poloha píku odpovídajícímu oxidaci thiocholinu, pološířka a nižší hodnota napětí odpovídající polovině výšky píku. Hodnoty byly stanoveny s pomocí desetinasobného opakovaného měření. Hodnota polohy píku byla 641 ± 18 mV, pološířka 95 ± 15 mV a nižší hodnota napětí odpovídající polovině výšky píku 575 ± 13 mV. Pro následující experimenty byl signál (detekovaný proud) odečítán v oblasti vrcholu píku. Pokud nebyl vrchol píku jednoznačně rozeznatelný, např. díky silné inhibici AChE, tak byl vrchol aproximován na hodnotu potenciálu 641 mV. Úspěšnost imobilizačního postupu byla vyjádřena jako velikost píku při 641 mV. Pro potlačení vlivu pozadí a interferencí byl signál přepočítán vůči kontrole (bez imobilizované AChE). Zároveň byla provedena kalibrace za použití DFP jako modelového inhibitoru a na základě porovnání rozptylu hodnot kontrolního měření a vlastní kalibrační křivky byl stanoven limit detekce ($S/N = 3$). Limit detekce pak byl zvažován jako třetí parametr poukazující na vhodnost metody. Vlastní experimentální data

jsou zobrazena v následujících obrázcích. Hodnota detekované proudy jako obrázek 2, poměr signálu vůči kontrole jako obrázek 3. Kalibrace připravených biosenzorů pomocí standardního DFP nepoukázala na signifikantní rozdíly mezi jednotlivými imobilizačními postupy. Limit detekce byl pro připravené biosenzory v rozmezí 10^{-8} – 10^{-7} mol/l bez signifikantních rozdílů (ANOVA, $P > 0,05$) mezi vlastními imobilizačními postupy a AChE v homogenní fázi.



Obr. 2: Proud odpovídající píku při 641 mV. Sloupec 1 – prostá sorpce, 2 – precipitace glutaraldehydem, 3 – zachycení technikou sol-gel, 4 – zachycení do želatiny, 5 – imobilizace do sférických grafitových mikročástic (uhlíková pasta), 6 – zachycení na grafitová nanovlákná, 7 – AChE v homogenní fázi se substrátem



Obr. 3: Poměr detekovaného proudu poskytnutého biosenzorem při 641 mV (i_p) vůči signálu pozadí bez imobilizované AChE (i_b). Popis sloupců stejný jako v předešlém obrázku.

Diskuse

SWV byla úspěšně použita pro sledování aktivity AChE. Při experimentu byla nalezena potenciálová oblast, ve které je oxidován vznikající thio-

cholin. Při použití SWV je pík typicky ostře ohraničený, dobře definovatelný a relativně málo vnímavý na interferenci např. biologických maticí (13). Literárně je SWV popsána jako vhodná pro stanovení sloučenin obsahujících thiol (16, 18). Separátní experimenty a nalezené studie využívající cyklickou voltametrii prokázaly rovněž použitelnost této techniky pro analýzu redoxně aktivních látek (11).

Nicméně voltamogramy poskytnuté cyklickou voltametrií jsou hůře použitelné z důvodu špatně definovatelných píků a kontinuálního nárůstu polarizačního proudu. Na rozdíl od SWV poskytující definovaný pík, cyklická voltametrie poskytuje píky, které při nižší koncentraci thiocholinu mají charakter spíše oxidačních vln. SWV je rovněž na rozdíl od cyklické voltametrie méně citlivá na hysterezi a interferenci makromolekul sorbujících se na elektrody. Tyto závěry se shodují s analytickými studiemi upřednostňujícími SWV z důvodů větší preciznosti a reprodukovatelnosti experimentálních dat (22).

Z hlediska interferencí se mohou u elektrochemických metod projevit antioxidanty (3). Při stanovení organofosfátů je vliv antioxidantů méně pravděpodobný, nicméně při stanovení organofosfátů v komplexních biologických maticích je třeba toto stanovení metodicky přizpůsobit možnostem voltametrie. Rovněž některé těžké kovy mohou v prostředí thiolů katalyzovat redoxní pochody ovlivňující voltametrické měření (6).

Testované imobilizační postupy měly rozdílnou efektivitu zachycení AChE. Pro porovnání metody byl zvolen experiment, ve kterém byla použita AChE v homogenní fázi se substrátem. Jako velmi vhodné metody byly nalezeny prostá sorpce, precipitace glutaraldehydem a zachycení na grafitová nanovlákná. Zachycení AChE do želatinové membrány bylo méně vhodné. Sol-gel technologie a zachycení do grafitových mikročástic nebyly příliš vhodné pro imobilizaci AChE na keramický povrch, přestože některé studie preferují sol-gel pro konstrukci biosenzorů založených na AChE (17). Rovněž použití uhlíku ve formě uhlíkové pastové elektrody již bylo popsáno jako vhodné pro konstrukci biosenzoru založeného na AChE (4), případně i jiných enzymů, jako je např. laktát dehydrogenáza použitá ke konstrukci elektrochemického biosenzoru k stanovení D-laktátu (12). Předností sol-gel techniky jsou především optické vlastnosti membrány a její dobrá kompatibilita s povrchem optických vláken (5). Vzhledem k předpokládanému jednorázovému použití biosenzoru je třeba zohlednit materiální a časovou náročnost přípravy biosenzoru. Z tohoto

důvodu není pro vlastní konstrukci biosenzoru zvažován imobilizační postup založený na grafitových nanovláčkách, přestože je literárně doložená dobrá dlouhodobá stabilita takto připravených biosenzorů (20), a imobilizace cestou aktivace karboxylových skupin pomocí N-hydroxysukcinimidu není technologicky nezvládnutelná (8). Imobilizace prostou sorpcí a precipitací glutaraldehydem je srovnatelná.

Jako optimální byla nakonec zvolena precipitace glutaraldehydem s ohledem na lepší stabilizaci biorekogniční složky před případným vymýváním při dlouhodobém uchovávání biosenzoru v tekutém prostředí. Tento typ imobilizací obvykle poskytuje dobrou stabilitu biorekogniční vrstvy s dostatečnou penetrací pro nízkomolekulární sloučeniny (21). Nicméně i prostou sorpci lze považovat za vhodnou imobilizační techniku používanou pro zachycení biorekogničních elementů (15).

Rozdílnou účinnost imobilizačních postupů lze vysvětlit multifaktoriálním efektem na prostupnost substrátu a celkovou konformaci molekuly AChE. Membrána vznikající při imobilizaci je překážka difuze substrátu (19), membrána obsahující AChE je tedy mechanickou překážkou difuze acetylthiocholinu k enzymu a následné difuze thiocholinu. Menší úspěšnost sol-gel technologie a zachycení do vrstvy sférických grafitových mikročástic může být způsobeno právě menší velikostí pórů a jejich menší četností. Konformační poškození je rovněž možným efektem snižujícím účinnost imobilizačního postupu. Sterický tlak na strukturu AChE a rozpad její kvarterní struktury byl literárně popsán jako zdroj poklesu její aktivity (2, 7, 14).

Závěr

V rámci studie byly testovány vybrané imobilizační postupy vhodné pro zachycení biorekogničních elementů konstruovaných biosenzorů a úspěšnost imobilizačních postupů byla vzájemně porovnávána. Na základě dosažených výsledků byly doporučeny imobilizační postupy vhodné pro další experimenty a analytické použití jednotlivých biosenzorů. Jako optimální imobilizační postup se jeví zachycení na keramický povrch pomocí precipitace glutaraldehydem.

Literatura

1. ALTERIIS, E., de – PARASCANDOLA, P. – PECORELLA, MA., et al. Effect of galatin – immobilization on the catalytic activity of enzymes and microbial cells. *Biotechnol. Techniq.*, 1988, vol. 2, no. 3, p. 205–210.
2. BUKOWSKA, B. – HUTNIK, K. 2,4-D and MCPA and their derivatives: effect on the activity of membrane erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro). *Pest. Biochem. Physiol.*, 2006, vol. 85, no. 3, p. 174–180.
3. CHUVAILO, ON. – DZYADEVICH, SV. – ELSKAYA, AV., et al. Carbon fibre based microbiosensors for in vivo measurements of acetylcholine and choline. *Biosens. Bioelectron.*, 2004, vol. 21, no. 1, p. 87–94.
4. CIUCU, AA. – NEGULESCU, C. – BALDWIN, RP. Detection of pesticides using an amperometric biosensor based on ferrophthalocyanine chemically modified carbon paste electrode and immobilized bienzymatic system. *Biosens. Bioelectron.*, 2003, vol. 18, no. 2, p. 303–310.
5. DOONG, RA. – TSAI, HC. Immobilization and characterization of sol-gel encapsulated acetylcholinesterase fiber-optic biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 2001, vol. 434, no. 2, p. 239–246.
6. DORČÁK, V. – ŠESTÁKOVÁ, I. Electrochemical behavior of phytochelators and related peptides at the hanging mercury drop electrode in the presence of cobalt (II) ions. *Bioelectrochemistry*, 2006, vol. 68, no. 1, p. 14–21.
7. FALASCA, C. – PERRIER, N. – MASSOULIE, J., et al. Determinants of the t peptide involved in folding, degradation, and secretion of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, no. 2, p. 878–886.
8. FROST, RG. – MONTHONY, JF. – ENGELHORN, SC., et al. Covalent immobilization of proteins to N-hydroxysuccinimide ester derivatives of agarose: Effect of protein charge on immobilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, vol. 670, no. 2, p. 164–169.
9. HARTNETT, AM. – INGERSOLL, CM. – BAKER, GA., et al. Kinetics and thermodynamics of free flavin and the flavin-based redox active site within glucose oxidase dissolved in solution or sequestered within a sol-gel derived glass. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71, no. 1, p. 1215–1224.
10. HENCH, LL. – WEST, JK. The sol-gel process. *Chem. Rev.*, 1990, vol. 90, no. 1, p. 33–79.
11. NOVAK, I. – SERUGA, M. – KOMORKSY-LOVRIC, S. Square-wave and cyclic voltammetry of epicatechin gallate on glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.*, 2009, vol. 631, no. 1, p. 71–75.
12. POHANKA, M. – ZBOŘIL, P. Amperometric biosensor for D-lactate assay. *Food Technol. Biotechnol.*, 2008, vol. 46, no. 1, p. 107–110.
13. POHANKA, M. – BANDOUCHOVA, H. – SOBOTKA, J., et al. Comparison of ferric reducing antioxidant power and square wave voltammetry for assay of low molecular weight antioxidants in blood plasma: Performance and comparison of methods. *Sensors*, 2009, vol. 9, no. 1, p. 9094–9103.
14. RENAULT, L. – ESSONO, S. – JUIN, M., et al. Structural insights into AChE inhibition by monoclonal antibodies. *Chem. Biol. Interact.*, 2005, vol. 157, no. 1, p. 397–400.
15. SEKEROGLU, G. – FADILU, S. – GOGUS, F. Immobilization and characterization of naringinase for the hydrolysis of naringin. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, vol. 224, no.1, p. 55–60.

Poděkování

Autoři děkují MO ČR za projekt OVUOFVZ200807.

16. SHAHROKHIAN, S. – BOZORGZADEH, S. Electrochemical oxidation of dopamine in the presence of sulfhydryl compounds: application to the square-wave voltammetric detection of penicillamine and cysteine. *Electrochim. Acta*, 2006, vol. 51, no. 20, p. 4271–4276.
17. SOTIROPOULOU, S. – CHANIOTAKIS, NA. Tuning the sol-gel microenvironment for acetylcholinesterase encapsulation. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 33, p. 6771–6779.
18. SUPALKOVA, V. – HUSKA, D. – DIOPAN, V., et al. Electroanalysis of plant thiols. *Sensors*, 2007, vol. 7, no. 1, p. 932–959.
19. SINER, EK. – RITZ, S. – NAUMANN, R., et al. Self-assembled tethered biomolecular lipid membranes. *Adv. Clin. Chem.*, 2009, vol. 49, no. 1, p. 159–179.
20. TANG, H. – CHEN, J. – YAO, S., et al. Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode. *Anal. Biochem.*, 2004, vol. 331, no. 1, p. 89–97.
21. TIMUR, S. – PAZARLIOGLU, N. – PILLOTON, R., et al. Detection of phenolic compounds by thick film sensors based on *Pseudomonas putida*. *Talanta*, 2003, vol. 61, no. 2, p. 87–93.
22. YAZICI, MS. – SELMAN, JR. Dissolution of partially immersed nickel during in situ oxidation in molten carbonate: cyclic, stripping and square wave voltammetry measurements. *J. Electroanal. Chem.*, 1998, vol. 457, no. 1, p. 89–97.

Korespondence: Kpt. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: miroslav.pohanka@gmail.com;
pohanka@pmfhk.cz

Do redakce došlo 11. 1. 2010

P Ř I P O M Í N Á M E

SPOLEČNOST VOJENSKÝCH LÉKAŘŮ, FARMACEUTŮ A VETERINÁRNÍCH LÉKAŘŮ ČSL JEP

pořádá

20. až 21. října 2010

na Fakultě vojenského zdravotnictví
Univerzity obrany v Hradci Králové

10. konferenci odborné

Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČLS JEP

Hlavní témata konference:

Pokroky v diagnostice a léčbě na úrovni praktického lékaře v nemocničních zařízeních
Organizace a taktika řízení a velení vojenské zdravotnické služby – aktuální problémy
Oblast vědecké činnosti a výzkumu ve vojenském zdravotnictví
Zkušenosti a poznatky ze zahraničních misí
Kasuistiky a varia

Podrobné organizační informace naleznete na <http://www.pmfhk.cz>