

BIOSENZORY K VČASNÉ DETEKCI OTRAVNÝCH LÁTEK

ŠÁRKA BIDMANOVÁ^{a,b}, MIROSLAV
POHANKA^c, JIŘÍ CABAL^c, ZBYNĚK PROKOP^{a,b}
a JIŘÍ DAMBORSKÝ^{a,b}

^a Loschmidtovy laboratoře, Ústav experimentální biologie
a Národní centrum pro výzkum biomolekul, Přírodovědec-
ká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5/44, 625 00
Brno, ^b Enantis, s.r.o., Palackého třída 1802/129, 612 00
Brno, ^c Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obra-
ny v Brně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
miroslav.pohanka@gmail.com

Došlo 16.2.09, přepracováno 10.6.09, přijato 29.10.09.

Klíčová slova: nervově paralytické látky, zpuchýřující
otravné látky, biosenzor, acetylcholinesterasa, butyrylcho-
linesterasa, halogenalkandehalogenasa, fosfotriesterasa

Obsah

1. Úvod
2. Nervově paralytické látky
 - 2.1. Historický úvod k nervově paralytickým látkám
 - 2.2. Vlastnosti nervově paralytických látek
 - 2.3. Účinky nervově paralytických látek
 - 2.4. Současné prostředky detekce nervově paralytických látek
 - 2.5. Biosenzory pro detekci nervově paralytických látek
3. Zpuchýřující otravné látky
 - 3.1. Historický úvod ke zpuchýřujícím otravným látkám
 - 3.2. Vlastnosti zpuchýřujících otravných látek
 - 3.3. Účinky zpuchýřujících otravných látek
 - 3.4. Současné prostředky detekce zpuchýřujících otravných látek
 - 3.5. Biosenzory pro detekci zpuchýřujících otravných látek
4. Budoucnost biosenzorů v detekci otravných látek

1. Úvod

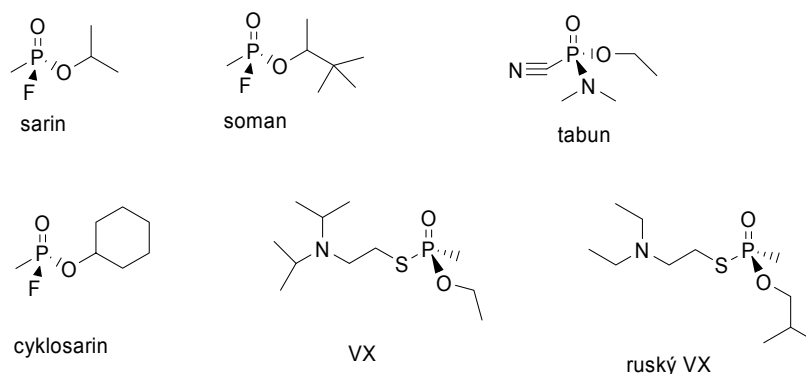
Bojové otravné látky jsou chemické sloučeniny vy-
kazující negativní účinky na živé organismy. Z hlediska ustá-
leného členění dělíme ve vojensktví používané otravné lát-
ky na nervově paralytické, zpuchýřující, všeobecně toxic-
ké (otravné), dusivé a psychoaktivní¹.

Za hlavní epizodu použití otravných látek můžeme považovat 1. světovou válku². Masivně byly tyto látky nasazeny Irákem v průběhu irácko-iránské války³. V současné době nepředstavuje hlavní riziko použití otravných látek ve válečném konfliktu, ale spíše jejich zneužití teroristickými skupinami v rámci prosazování svých cílů nebo jejich použití některými totalitními státy^{4,5}. Jako modelový příklad teroristického zneužití otravných látek může sloužit použití nervově paralytické látky sarin sektou Óm Šinrikjó v tokijském metru⁶.

Včasná detekce otravných látek je důležitým fak-
torem pro nasazení vhodných profylaktických opatření, mo-
bilizaci složek záchranného systému a evakuaci osob z ohrožené oblasti. V tomto přehledu jsou popsány mož-
nosti rychlé detekce dvou významných skupin otravných látek, nervově paralytických a zpuchýřujících. Hlavní po-
zornost je věnována oblasti biosenzorů, která svým rozvo-
jem zasahuje i do oblasti vojenství.

2. Nervově paralytické látky**2.1. Historický úvod k nervově paralytickým látkám**

Ve srovnání s yperity a některými otravnými látkami použitými v průběhu 1. světové války jsou nervově paralytické látky mnohem mladší. U jejich zrodu stál Gerhard Schrader, výzkumný pracovník německé společnosti Bayer, která byla v té době součástí koncernu IG Farben⁷. Ve snaze hledat účinné pesticidy rozpoznal v roce 1936 toxické účinky *O*-ethyl-dimethylamidokyanofosfátu (obr. 1). Tato sloučenina je dobře známa pod názvem tabun. Dva roky po tabunu byl objeven sarin, 2-(fluormethylfosforyl)oxypropan, a rok před koncem 2. světové války byl objeven soman, 2-(fluoro-methyl-fosforyl)oxy-3,3-dimethylbutan. Tato řada nervově paralytických látek byla nazývána „G“ podle země přípravy „Germany“. Poslední objevenou látkou řady G byl cyklosarin, fluor-methyl-fosforyloxycyklohexan. V 50. letech minulého století v období studené války byla zavedena „V“ řada, jejíž název je odvozen od slova „Victory“. Jsou to organofosfáty obsahující ve své struktuře aminoethanthiol⁸. Mezi dobře známé zástupce patří látka VX, *S*-(2-diizopropylaminoethyl)-*O*-ethyl methylfosfonothionát) a ruská látka VX, *N,N*-diethyl-2-(methyl-/2-methylpropoxy/fosforyl)sulfanylethanamin. Dodnes rozporuplné informace provází existenci látky typu „novichok“ vyvinuté v bývalém Sovětském svazu v 70. – 80. letech minulého století. Na rozdíl od výše zmíněných nervově paralytických látek nejsou látky typu novichok detailně známy⁹.



Obr. 1. Chemické struktury vybraných nervově paralytických látek

2.2. Vlastnosti nervově paralytických látek

Nervově paralytické látky jsou organické sloučeniny s vlastnostmi odpovídajícími funkčním skupinám přítomným v jejich struktuře. Snadno se vypařují, jejich těkavost odpovídá jiným otravným látkám. Například výparnost, tj. maximální koncentrace ve vzduchu, sarinu je $2,2 \text{ g m}^{-3}$. Známe nervově paralytické látky jsou v laboratorních podmínkách bezbarvé kapaliny. Z chemického hlediska je zajímavý rozklad nervově paralytických látek ve vodném prostředí. Fosfor v centru organofosfátu může být snadno napaden nukleofilním činidlem¹⁰. Organofosfáty se v alkalickém prostředí rychle rozkládají, proto jsou k odmořování kontaminovaných povrchů velmi často využívány roztoky hydroxidů.

2.3. Účinky nervově paralytických látek

Nervově paralytické látky stejně jako organofosforové pesticidy jsou látky inhibující dva velmi důležité enzymy v lidském těle: acetylcholinesterasu (AChE, EC 3.1.1.7), která je lokalizována v neurosynapsích a na povrchu erytrocytů, a plasmatický enzym butyrylcholinesterasu (BChE, EC 3.1.1.8)¹¹. Mechanismus inhibice je založen na esterifikaci serinu v aktivním centru enzymu. Cholinesterasa po této modifikaci již není schopna plnit svoji biologickou roli¹². Inhibice cholinesteras organofosfáty je ireverzibilní¹³.

Vizuálně se první fáze otravy organofosfáty projeví zúžením zornic. Další symptomy mohou být slinění, křeče a neuromuskulární dysfunkce¹⁴. Smrt nastává zejména z důvodu paralýzy dýchacího svalstva. Nástup symptomů otravy je velmi rychlý. Pro symptomatickou léčbu otrav organofosfáty se používá atropin¹⁵, efektivnějším přístupem je reaktivace cholinesteras za pomoci oximů¹⁶.

2.4. Současné prostředky detekce nervově paralytických látek

Hlavním nositelem technologií pro rychlou detekci otravných látek a jejich identifikaci v rámci České republiky jsou specializovaná armádní pracoviště a útvary, jednotky záchranného systému a některé forenzní laboratoře. Pro rychlý průkaz přítomnosti nervově paralytických látek se mohou použít jednoduché detekční průkazníky¹⁷. K nejjednodušším patří průkazníkové papírky a páskové detektory. Armáda České republiky je z této třídy detektorů vybavena průkazníkovými papírky PP-3 a Detehit, produkty české provenience. Průkazníkové papírky detegují odděleně látky typu G a V v kapalně formě. K detekci je využívána selektivní rozpustnost vybraných barviv v otravných látkách. Průkazník Detehit deteguje nervově paralytické látky na základě inhibice imobilizované acetylcholinesterasy kolorimetricky pomocí Ellmanova činidla. Je schopen zjišťovat nervově paralytické látky ve vzduchu, vodě, potravinách a po stěru i na pevném povrchu.

Složitějším typem detektorů jsou instrumentální chemické průkazníky CHP-71 a CHP-5. Oba průkazníky k detekci využívají detekční trubičky vhodné pro jednotlivé typy otravných látek. Trubičky dodávané v současné době pro detekci nervově paralytických látek využívají principu shodného s detektorem Detehit. Starší verze těchto trubiček využívaly pro detekční účely barevné změny acidobazického indikátoru.

Pro rychlé stanovení nervově paralytických látek ve vzduchu je možné použít i automatické signalizátory ruské provenience GSP-11, GSA-12 a historicky překonaný typ GSP-1. Signalizátory GSP-11 a GSA-12 využívají k detekci nervově paralytických látek sledování inhibice použitých cholinesteras, přičemž aktivita enzymů je sledována kolorimetricky. Přístroj GSP-1 využíval k detekci nervově paralytických látek Schonemannovu reakci, což limitovalo detekci jen na látky typu G. U všech tří typů je reakce realizována na textilní pásce po automatickém nástřihu jednotlivých reagentů. Zcela odlišným typem při-

stroje jsou miniaturizované hmotnostní spektrometry¹⁸, např. RAID-1, RAID-M, RAID-S a RAID-E (Bruker Daltonics). Naměřená data z okolního prostředí jsou porovnávána s databází uloženou v paměti přístroje a při shodě se signalizuje přítomnost otravné látky ve vzduchu. Nevýhodou těchto přístrojů může být falešně negativní detekce vzorků obsahujících látku typu „novichok“, jejíž přesná struktura není veřejně známa a není proto uložena v databázi.

2.5. Biosenzory pro nervově paralytické látky

Biosenzor je zařízení sestávající se z biorekogniční složky a fyzikálně-chemického převodníku (senzoru). Vhodnou biorekogniční složkou jsou díky své citlivosti vůči působení nervově paralytických látek acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. V rámci současného výzkumu však převládá zájem o acetylcholinesterasu jako rekogniční element^{19,20}. Ve spojení s cholinesterasami již byly popsány elektrochemické i optické biosenzory¹⁹ (tab. I). Elektrochemické biosenzory založené na cholinesterasách mohou jednoduše využívat potenciometrický princip, kdy je aktivita cholinesteras vyjádřena jako změna pH média. Acidifikace je dosaženo přidáním nativního substrátu acetylcholinu (resp. butyrylcholinu), což vede k uvolnění kyseliny octové snižující pH média²¹.

Druhou skupinou elektrochemických biosenzorů jsou amperometrické, které ve spojitosti s acetylcholinesterasou nejčastěji používají alternativní substrát acetylthiocholin. Uvolněný thiocholin může být snadno oxidován na dithiol při vloženém potenciálu přibližně 400 mV proti nejčastěji používané argenticchloridové elektrodě. Napětí je možno dále redukovat použitím modifikujících látek²². Tento přístup může být použit k diagnostice otrav organofosfáty

sledováním aktivity krevních cholinesteras²³. Amperometrický biosenzor s imobilizovanou butyrylcholinesterasou byl např. použit ke konstrukci detekčního systému pro stanovení nervově paralytických látek ve vzduchu²⁴. Bylo možno detegovat již 0,1 mg sarinu v krychlovém metru vzduchu. Biosenzor může fungovat i v rámci systému injektujícího kapalné vzorky do reakční cely²⁵. Časová odezva na přítomnost organofosfátu je velmi rychlá - může se pohybovat v řádu několika vteřin. Jinou možností je nahradit biosenzor jednoduchým senzorem a cholinesterasu injektovat do reakční cely současně s analyzovaným vzorkem²⁶. Detekce VX a ruské VX (obr. 1) za pomoci amperometrického biosenzoru prokázala funkčnost biosenzoru zkonstruovaného Joshimem a spol.²⁷. Pro konstrukci biosenzoru autoři použili grafitová nanovlákná jako vhodnou matici k imobilizaci cholinesterasy. Detekční systém založený na principu elektrochemického biosenzoru je i v prototypu zařízení BioNA v dispozici Ministerstva obrany České republiky.

Pro konstrukci biosenzorů s cholinesterasami jako rekogničními složkami je možné použít i optické převodníky. I v tomto případě je koncentrace analytu vztažena na míru inhibice cholinesteras. Aktivita cholinesteras může být převedena na fluorescenci vhodným činidlem citlivým na acidifikaci média vlivem uvolněné kyseliny octové, např. pyraninem²⁸. Metodicky odlišným přístupem je použití indoxylacetátu jako substrátu cholinesteras. Vznikající indigová modř je fotometricky velmi dobře stanovitelná²⁹.

Biosenzory pro stanovení nervově paralytických látek nemusí být založeny pouze na cholinesterasách. Některé studie zabývající se biosenzory využívají fosfotriesterasy (EC 3.1.8.1), enzymy schopné hydrolyzovat organofosfáty. Jejich hlavní výhoda oproti cholinesterasám spočívá v jiném principu sledování koncentrace analytu. Zatímco

Tabulka I

Přehled (bio)senzorů pro detekci nervově paralytických, vybraných pesticidů a zpuchýřujících otravných látek a jejich analogů

Převodník	Rekogniční element	Analyt	Limit detekce	Selektivita
Nervově paralytické látky				
Elektrochemický ²⁴	butyrylcholinesterasa	sarin	0,1 mg m ⁻³	skupinová – vysoká
Elektrochemický ²⁵	acetylcholinesterasa	paraoxon	200 pg	
Elektrochemický ²⁷	fosfotriesterasa	VX, ruský VX	0,2–0,8 μM	
Optický ³³	fosfotriesterasa	paraoxon, malathion, coumaphos, diazinon	1 – 250 ppt	nizká
Elektrochemický ⁵⁰	acetylcholinesterasa	sarin	0,2 μM	
Elektrochemický ⁵¹	acetylcholinesterasa	sarin, soman, tabun, cyklosarin, VX	0,6–15 pM	
Zpuchýřující otravné látky				
Elektrochemický ³⁸	–	thiodiglykol	–	nizká
Mechanický ³⁹	–	sirný yperit, VX	0,94 ppm	–
Optický ⁴⁰	Nostoc, Chlorella	dibutyl sulfid, yperit, tabun, tributylamin	vysoký	nizká
Piezoelektrický ⁴³	protilátky	sirný yperit	–	vysoká

u biosenzorů s imobilizovanými cholinesterasami dochází v přítomnosti organofosfátů k ireverzibilní inhibici, fosfotriestery tento analyt pouze štěpí a životnost biosenzoru tím není nutně poznamenána. Z hlediska fyzikálního principu jsou pak tyto biosenzory založeny na sledování změny pH v kombinaci s pH elektrodou (potenciometrické) nebo optickým převodníkem s vhodným pH senzitivním chromogenem. Možná je i detekce odstupujícího ligandu jako je např. *p*-nitrofenol vznikající z pesticidu paraoxonu³⁰. Současně je důležité zohlednit zásadní rozdíl mezi analýzou organofosfátů za pomoci fosfotriestery a cholinesteras. Vzorek s nízkou koncentrací organofosfátů způsobí jen velmi malou změnu sledovaného pH média při štěpení fosfotriestery, cholinestery však signál amplifikují a k jejich inhibici stačí jen velmi málo molekul organofosfátů. Při použití fosfotriestery musí být méně koncentrovaný vzorek dávkován ve velkém množství. Jako příklady aplikací biosenzorů s fosfotriestery můžeme zmínit detekci paraoxonu s fosfotriestery imobilizovanou na povrchu pH elektrody³¹. Tímto biosenzorem bylo možno detegovat paraoxon s limitem detekce 100 nM. Stejný limit detekce dosáhli pro pH elektrodu Karnati a spol.³². Velmi dobrých výsledků dosáhli za použití optických vláken White a Harmon³³. Vybrané organofosforové pesticidy bylo možno detegovat již v řádu ppt.

3. Zpuchýřující otravné látky

3.1. Historický úvod ke zpuchýřujícím otravným látkám

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny otravných látek jsou yperity. Sirný yperit připravil poprvé Despretz v r. 1822, avšak jeho zpuchýřující účinky byly rozpoznány až v r. 1860. Sirný yperit byl použit jako chemická zbraň poprvé během 1. světové války v roce 1917. Později byly zpuchýřující otravné látky několikrát použity v místních válečných konfliktech a stále patří k chemickým bojovým látkám, které by potenciálně mohly být zneužity. Důvodem je relativně snadná a levná příprava a velké množství dosud skladovaných zásob, včetně těch, které již měly být zlikvidovány na základě Úmluvy o zákazu chemických

zbraní^{34,36}.

Kromě sirného yperitu, *bis*-(2-chlorethyl)sulfidu (HD), zahrnuje skupina zpuchýřujících otravných látek seskviyperit, 1,2-*bis*-(2-chlorethylmerkapt)ethan (Q), oxolový yperit, *bis*-(2-chlorethylmerkapt)ether (T) a dusíkové yperity, ethyl-*bis*-(2-chlorethyl)amin (HN-1), methyl-*bis*-(2-chlorethyl)amin (HN-2) a *tris*-(2-chlorethyl)amin (HN-3) (obr. 2). Mezi zpuchýřující otravné látky patří též lewisit, 2-chlorvinylchlorarsin, fosgenoxim a dichloroformaldoxim^{34,36}.

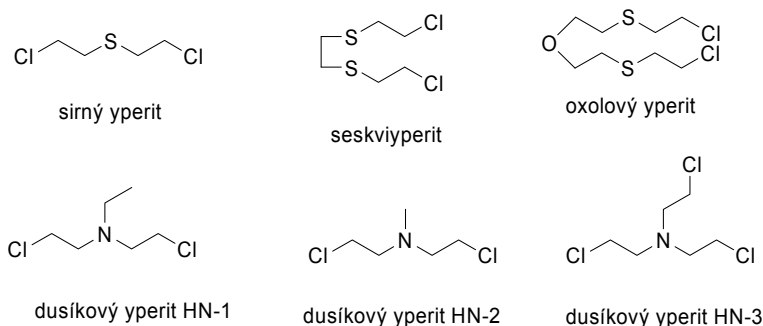
3.2. Vlastnosti zpuchýřujících otravných látek

Yperity jsou vysoce toxické chemické bojové látky. Čistý sirný yperit je bezbarvá kapalina téměř bez zápachu, technický je nažloutlý až hnědočerný s typickým zápachem po hořčici. Je velmi málo rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Dusíkové yperity jsou nažloutlé až nahnědlé kapaliny rozpustné v nepolárních rozpouštědlech^{34,37}.

3.3. Účinky zpuchýřujících otravných látek

Yperity jsou známými karcinogeny, mutageny a teratogeny. Působí jako alkylační činidla, která po průniku do buňky rychle reagují s nukleofily prostřednictvím episulfoniového iontu. V buňkách dochází k narušení proteosyntézy, k inhibici aktivity enzymů a k rozpadu buněčných membrán. Sirný yperit a dusíkový yperit HN-2 byly v minulosti využívány jako chemoterapeutika při léčbě psoriázy a mykóz³⁵.

Již krátkodobá expozice yperitem vede k poškození očí, kůže a dýchacího traktu. Nejcitlivěji reagují na yperit oči, dochází ke zhoršení vidění až ztrátě zraku. Zasažení kůže yperitem se projevuje svěděním a tvorbou erytémů, později se tvoří puchýře, jejichž hojení bývá zpravidla komplikováno sekundární infekcí. Inhalace yperitu vede ke kýchání a kašlání, vysoké dávky mohou způsobit pulmonární edém. Dlouhodobá expozice je spojena s výskytem kožních a respiračních tumorů. Yperit má v koncentracích používaných v bojových konfliktech smrtící účinky^{35,37}.



Obr. 2. Chemické struktury vybraných zpuchýřujících otravných látek

3.4. Současné prostředky detekce zpuchýřujících otravných látek

Početní zastoupení a konstrukční pestrost přístrojů pro včasnou detekci zpuchýřujících látek je menší než u nervově paralytických látek, úměrně významu a nebezpečnosti detegovaných látek. Sirný yperit lze detegovat průkazníkovým papírkem PP-3 a to rozpouštěním barviva Dye Red E. Průkazníky CHP-71 a CHP-5 jsou vybaveny taktéž trubičkami pro detekci zpuchýřujících látek (trubičky se žlutými pruhy)¹⁷. Jako detekčního principu je využíváno reakce yperitu s ethylderivátem Michlerova ketonu. Yperity a lewisity lze detegovat přístrojem RAID-1 výše uvedeným způsobem¹⁸.

3.5. (Bio)senzory pro detekci zpuchýřujících otravných látek

Potenciál využití (bio)senzorů leží především v jejich selektivitě, kontinuálnosti a finanční nenáročnosti provozu. Nabízejí tak slibnou alternativu k používaným chemickým průkazníkům a vysoce přesným, avšak nákladným zařízením pracujícím na principu mobilních hmotnostních spektrometrů. Příklady stávajících (bio)senzorů pro detekci zpuchýřujících otravných látek jsou shrnuty v tab. I. Petetin a spol.³⁸ použili senzor SnO₂ pro detekci par thiodiglykolu, strukturního analogu yperitu. Princip senzoru spočívá v interakci mezi redukcí molekuly a povrchem senzoru z SnO₂, která vede k dočasnému vzrůstu vodivosti. Tyto interakce jsou závislé na teplotě senzoru, která může dosáhnout až 600 °C. Při vysokých teplotách však dochází k rozpadu thiodiglykolu na další složky, které také vyvolávají nespecifickou odezvu senzoru. Z tohoto důvodu není zmíněný typ senzoru vhodný pro detekci teplotně nestabilních sloučenin jako je thiodiglykol. Loui a spol.³⁹ vyvinuli kompaktní soubor piezorezistivních mikroramének pro detekci plynů, včetně yperitu. Každý senzorový element souboru se skládá z polymerů alkenů nanesených na jedné straně mikroraménka. Plyné analyty rychle difundují do polymerního filmu, který reverzibilně nabobtná a změní povrchové napětí, což vede k mechanickému prohnutí mikroraménka a vzniklá výchylka pak vytváří změny v piezorezistenci. Senzor umožňuje stanovení yperitu s limitem detekce 0,94 ppm, avšak s velmi nízkou selektivitou.

Detekce yperitu za pomoci biosenzorů nebyla dosud široce studována, především kvůli nedostatku vhodných biorekogničních elementů. Optický biosenzor využívající celé buňky fotosyntetizujících organismů *Chlorella* a *Nostoc* testovali Sanders a spol.⁴⁰. Biosenzor monitoroval odezvu fotosystému II na přítomnost yperitu, dibutyl sulfidu, analogu yperitu a některých nervově paralytických látek. Tento biosenzor nebyl selektivní, ani neumožnil dostatečně citlivou detekci agens.

Vyšší selektivitu stanovení zajišťuje využití biorekogničních elementů, které specificky reagují s analytem, jako jsou selektivní enzymy, protilátky nebo molekulárně vtištěné polymery (angl. molecularly imprinted polymers,

plastické protilátky). Lieske a spol.⁴¹ připravili protilátky proti sirnému yperitu. K imunizaci využili haptenu kyseliny 4-(2-chloroethyl)benzoové navázaný na hemocyanin. Specifitu protilátek pro yperit sledovali metodou ELISA. Zároveň yperit se na protilátku navázal, thiodiglykol, produkt hydrolýzy yperitu, s protilátkou neinteragoval. Boopathi a spol.⁴² připravili a charakterizovali molekulárně vtištěné polymery pro rozpoznávání yperitu. Polymery byly připraveny tvorbou pre-polymerizačního komplexu mezi monomery kyseliny metakrylové a molekulami yperitu. Poté následovala polymerizace v přítomnosti zesilovacího činidla, což vedlo k tvorbě nanoporézních polymerů. Tyto polymery byly schopny specificky rozpoznat a navázat molekuly yperitu. Skládal a spol.⁴³ připravili a testovali polyklonální a monoklonální protilátky proti sirnému yperitu. Monoklonální protilátky byly získány s použitím nosných bílkovin hovězího sérového albuminu a tyroglobulinu. Tyto protilátky pak využili v piezoelektrickém imunosenzoru pro detekci yperitu. Tento biosenzor byl testován s vysokými koncentracemi yperitu a dosahoval krátké doby odezvy a vysoké selektivity.

Pro detekci yperitu nejsou k dispozici žádné biosenzory využívající selektivní enzymovou aktivitu, protože enzymy přeměňující yperit nebyly do nedávné doby známy. Objev konverze yperitu bakteriálními enzymy halogenalkandehalogenasami (EC 3.8.1.5)⁴⁴ otvírá novou oblast vývoje biosenzorů k účinné detekci této skupiny otravných látek. Dehalogenasy izolované ze *Sphingobium japonicum* UT26 (cit.⁴⁵), *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (cit.⁴⁶) či *Mycobacterium bovis* 5033/66 (cit.⁴⁷) katalyzují hydrolýzu sirného yperitu za vzniku thiodiglykolu, chloridového iontu a protonu. Byla též pozorována slabá aktivita halogenalkandehalogenas k dusíkovým yperitům (Prokop a spol., nepublikované výsledky). Další enzymy aktivní k yperitu mohou být výhledově získány z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968), která je schopna využívat chemický analog yperitu, 2-chlorethyl-ethylsulfid, jako jediný zdroj uhlíku a energie (štěpí vazbu C-S)⁴⁸, z basidiomycet *Coriolus versicolor* (IFO 30340) a *Tyromyces palustris* (IFO 0507), které jsou schopny degradovat bis-(2-bromoethyl)sulfid taktéž štěpením vazby C-S (cit.⁴⁹).

4. Budoucnost biosenzorů pro detekci bojových látek

Potenciál biosenzorů leží především v jejich vysoké selektivitě, kontinuální detekci analytu a finanční nenáročnosti provozu. Vysokou selektivitu stanovení může přinést použití specifických biorekogničních elementů, jako jsou enzymy a protilátky. Nové objevy přírodních katalyzátorů, enzymů, aktivních k různým otravným látkám dnes otvírají slibnou oblast vývoje biosenzorů. Účinek různých enzymů lze také snadno kombinovat bez rizika vzájemného negativního ovlivnění a umožnit tak přípravu univerzálního biosenzoru citlivého k více typům otravných látek (multienzymový biosenzor).

LITERATURA

1. *Český obranný standard 666503 – Automatické signalizátory bojových otravných látek a průmyslových škodlivin*. Ministerstvo obrany, Praha 2007.
2. Prockop L. D.: J. Neurol. Sci. 249, 50 (2006).
3. Balali-Mood M., Hefazi M.: Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol. 273, 99 (2006).
4. Patočka J., Fusek J.: Cent. Eur. J. Public Health 12, 75 (2004).
5. Salem H.: Int. J. Toxicol. 22, 465 (2003).
6. Yanagisawa N., Morita H., Nakajima T.: J. Neurol. Sci. 249, 76 (2006).
7. Reutler S.: Environ. Health Perspect. 107, 985 (1999).
8. Watson A. P.: Exotoxicol. Environ. Saf. 23, 328 (1992).
9. Antonijevic B., Stojiljkovic M. P.: Clin. Med. Res. 5, 71 (2007).
10. Montauban C., Beqos A., Bellier B.: Anal. Chem. 76, 2791 (2004).
11. Eddleston M., Buckley N. A., Eyer P., Dawson A. H.: Lancet 371, 597 (2008).
12. Taylor P., Wong L., Radic Z., Tsigelny I., Bruggemann R., Hosea N. A., Berman H. A.: Chem. Biol. Interact. 119, 3 (1999).
13. Curtil C., Masson P.: Ann. Pharm. Fr. 51, 63 (1993).
14. Hsieh B. H., Deng J. F., Ger J., Tsai W. J.: Neurotoxicology 22, 423 (2001).
15. Marrs T. C.: Pharmacol. Ther. 58, 51 (1993).
16. Lundy P. M., Raveh L., Amitai G.: Toxicol. Rev. 25, 231 (2006).
17. *Koncepcie chemické služby Hasičského záchranného sboru České republiky*. Ministerstvo vnitra, Praha 2005.
18. Chauhan S., Chauhan S., D'Cruz R., Faruqi S., Singh K. K., Varma S., Singh M., Karthik V.: Environ. Toxicol. Pharmacol. 26, 113 (2008).
19. Pohanka M., Jun D., Kalasz H., Kuca K.: Prot. Pept. Lett. 15, 795 (2008).
20. Pohanka M., Jun D., Kuca K.: Anal. Lett. 40, 2351 (2007).
21. Flores F., Artigas J., Marty J. L., Valdes F.: Anal. Bioanal. Chem. 376, 476 (2003).
22. Arduini F., Ricci F., Tuta C. S., Moscone D., Amine A., Palleschi G.: Anal. Chim. Acta 580, 155 (2006).
23. Pohanka M., Hrabínova M., Kuca K.: Sensors (Bazel) 8, 5229 (2008).
24. Arduini F., Amine A., Moscone D., Ricci F., Palleschi G.: Anal. Bioanal. Chem. 388, 1049 (2007).
25. Pohanka M., Jun D., Kuca K.: Sensors (Bazel) 8, 5303 (2008).
26. Pohanka M., Kuca K., Jun D.: Anal. Lett. 41, 2214 (2008).
27. Joshi K. A., Prouza M., Kum M., Wang J., Tang J., Haddon R., Chen W., Muschandani A.: Anal. Chem. 78, 331 (2006).
28. Vamvakaki V., Fournier D., Chaniotakis N. A.: Biosens. Bioelectron. 21, 384 (2005).
29. Villatte F., Bachman T. T., Hussein A. S., Schmid R. D.: Biotechniques 30, 81 (2001).
30. Paliwal S., Wales M., Good T., Grimsley J., Wild J., Simonian A.: Anal. Chim. Acta 596, 9 (2007).
31. Zourob M., Ong K. G., Zeng K., Mouffouk F., Grimes C. A.: Analyst 132, 338 (2007).
32. Karnati C., Du H., Ji H. F., Xu X., Lvov Y., Muchandani A., Mulchandani P., Chen W.: Biosens. Bioelectron. 22, 2636 (2007).
33. White B. J., Harmon H. J.: Biosens. Bioelectron. 20, 1977 (2005).
34. Patočka J., Bajgar J., Cabal J., Fusek J., Herink J., Kassa J., Štětina R.: *Vojenská toxikologie*. Grada Publishing, Praha 2004.
35. Saladi R. N., Smith E., Persaud A. N.: Clin. Exp. Dermatol. 31, 1 (2005).
36. Prokop Z., Opluštil F., DeFrank J., Damborský J.: Biotechnol. J. 1, 1370 (2006).
37. Kehe K., Szinicz L.: Toxicology 214, 198 (2005).
38. Petetin L., Berger F., Chambaudet A., Planade R.: Sens. Actuators, B 78, 166 (2001).
39. Loui A., Ratto T. V., Wilson T. S., McCall S. K., Mukerjee E. V., Love A. H., Hart B. R.: Analyst 133, 608 (2008).
40. Sanders C. A., Rodriguez M. Jr., Greenbaum E.: Biosens. Bioelectron. 16, 439 (2001).
41. Lieske C. N., Klopke R. S., Gross C. L., Clark J. H., Dolzine T. W., Logan T. P., Meyer H. G.: Immunol. Lett. 31, 117 (1992).
42. Boopathi M., Suryanarayana M. V. S., Nigam A. K., Pandey P., Ganesan K., Singh B., Sekhar K.: Biosens. Bioelectron. 21, 2339 (2006).
43. Skládal P., Příbyl J., Šafář B.: Anal. Lett. 40, 1347 (2007).
44. Prokop Z., Damborský J., Opluštil F., Jesenská A., Nagata Y. (Masarykova univerzita, Brno): WO 2006/128390 (A1).
45. Nagata Y., Miauchi K., Damborský J., Manová K., Ansorgová A., Takagi M.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 3707 (1997).
46. Kulakova A. N., Stafford T. M., Larkin M. J., Kulakov L. A.: Plasmid 33, 208 (1995).
47. Jesenská A., Pavlová M., Strouhal M., Chaloupková R., Těšínská I., Monincová M., Prokop Z., Bartoš M., Pavlík I., Rychlík I., Mobius P., Nagata Y., Damborský J.: Appl. Environ. Microbiol. 71, 6736 (2005).
48. Kilbane J. J., Jackowski K.: J. Chem. Tech. Biotechnol. 65, 370 (1996).
49. Itoh N., Yoshida M., Miyamoto T., Ichinose H., Wariishi H., Tanaka H.: FEBS Lett. 412, 281 (1997).
50. Pohanka M., Binder J., Kuca K.: Def. Sci. J., v tisku.
51. Pohanka M., Dobes P., Drtinová L., Kuca K.: Electroanalysis, v tisku. DOI: 10.1002/elan.200804528 (2009).

Š. Bidmanová^{a,b}, M. Pohanka^c, J. Cabal^c, Z. Prokop^{a,b}, and J. Damborský^{a,b} (^a *Loschmidt Laboratories, Institute of Experimental Biology and National Centre for Biomolecular Research, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*, ^b *Enantis Ltd., Brno*, ^c *Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Hradec Králové*):
Early Warning Biosensors for Detection of Chemical Warfare Agents

Chemical warfare agents are toxic compounds showing negative effects on living organisms. This review focuses on detection of nerve and blister agents, which are two most important classes of chemical warfare agents. Main attention is paid to the construction and use of biosensors. Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and phosphotriesterase are presented as convenient biorecognition components of biosensors for detection of nerve agents, while dehalogenases are useful for detection of mustard agents.