

METODY IMOBILIZACE ENZYMŮ A JEJICH VYUŽITÍ PRO OPTICKOU (KOLORIMETRICKOU) DETEKCI INHIBITORŮ CHOLINESTERAS

JIŘÍ ZEMAN^a, DAVID VETCHÝ^a, ALEŠ FRANC^a a VLADIMÍR PITSCHMANN^b

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, ^b Oritest spol. s r.o., Nábřeží 90/4, 150 00 Praha
vetchyd@vfu.cz

Došlo 22.3.17, přepracováno 14.12.17, přijato 4.1.18.

Klíčová slova: imobilizace enzymů, detektory, cholinesterasa, inhibitory cholinesteras

Obsah

1. Úvod
2. Imobilizace enzymu na nerozpustný nosič
 - 2.1. Adsorpce na nerozpustný nosič
 - 2.2. Imobilizace pomocí kovalentní vazby
3. Vazba na ionexy
4. Zabudování do gelů a pěn
5. Metody zesílení (zesílené agregáty)
6. Jiné metody
 - 6.1. Imobilizace pomocí nanostruktur
 - 6.2. Imobilizace pomocí protilátek
7. Závěr

1. Úvod

Inhibitory cholinesteras jsou látky schopné ovlivnění vegetativního nervového systému, a to působením na cholinergní transmissi přes inhibici enzymu acetylcholinesterasy.

Důsledkem toho dochází k hromadění neurotransmiteru acetylcholinu a tím k prodloužení a zvýšení intenzity odpovědi cholinergního systému, což může vést až k smrti intoxikovaného organismu^{1,2}.

Rychlá, citlivá a levná detekce inhibitorů cholinesteras nabývá v současné době na důležitosti, a to jak v oblasti analýzy průmyslových inhibitorů cholinesteras, jako jsou např. organofosfátové či karbamátové pesticidy, tak v oblasti analýzy bojových chemických látek. Zejména pro potřebu rychlé a jednoduché detekce nervově paralytických látek (NPL), jako jsou soman, sarin, tabun (látky série G), látka VX nebo R-33 (látky série V), byly vyvíjeny detektory inhibitorů cholinesteras, mnohé z nich pak ve formě biosenzorů. Prvotní zmínky o podobných detektorech pocházejí již z konce 40. let minulého století, přičemž jejich razantnější vývoj začal až počátkem 60. let 20. století³.

Detektory inhibitorů cholinesteras jsou s výhodou založené na biochemické enzymové reakci s velmi nízkým detekčním limitem (tab. I). Mechanismus reakce je obdobný (nebo totožný) mechanismu reakce, která probíhá v organismu. Zejména jednoduché detektory (biosenzory) pro terénní nebo rutinní laboratorní analýzu jsou založeny na barevné indikaci průběhu enzymové reakce s využitím nejrůznějších chromogenních činidel typu acidobazických nebo redoxních indikátorů, případně s využitím chromogenních substrátů.

Základem přípravy biosenzoru je vhodná metoda imobilizace enzymu, kterou může být acetylcholinesterasa (AChE) nebo butyrylcholinesterasa (BuChE) zachycená na sorbent (nosič). Imobilizace enzymu spočívá v jeho fyzikálním nebo chemickém zachycení na sorbent bez toho, aby enzym ztratil svoji specifickou enzymovou aktivitu. Imobilizací dochází ke koncentrování enzymu, čímž je zajištěn dostatečný kontakt s reaktanty (NPL apod.), které jsou obsaženy v kapalně či plynně fázi procházející

Tabulka I

Vybrané detekční metody a jejich limity

Metoda	Příklad detektoru	Limit detekce [mg m ⁻³]	Instrumentální a ekonomická náročnost
Enzymová	osobní detektor / detekční trubička	0,005–0,01	nízká
IMS ^a	RAID-1	0,05	vysoká
GC/MS	GC/MS EM 640	0,01–0,5	velmi vysoká
FTIR spektrometrie	GASMET DX-4000	1,00	vysoká
Fotoionizační princip	ppbRAE	0,02	vysoká

^a IMS – Iontová mobilní spektrometrie (Ion Mobility Spectrometry)

fázi pevnou s imobilizovaným enzymem. Pevná fáze by měla být hydrofilního charakteru, nerozpustná ve vodě, mechanicky, chemicky a teplotně stálá a s velkým měrným povrchem. Dalšími požadavky na nosič jsou velikostní a tvarová uniformita částic a antimikrobiální odolnost. Výhodou imobilizovaných enzymů je možnost opakovaného či kontinuálního použití⁴.

K imobilizaci cholinesteras se používají techniky, které nacházejí uplatnění v různých oblastech biotechnologie, a způsoby imobilizace jsou podobné jako u ostatních proteas. K imobilizaci se nejčastěji využívá adsorpce nebo kovalentní vazba na nerozpustný nosič, vazba na ionexy, zabudování do gelů a pěn, zesílené agregáty, dále imobilizace pomocí nanostruktur, pomocí protilátek, případně další. Tyto způsoby imobilizace se používají při výrobě různých typů detektorů buď jednotlivě, nebo v kombinacích^{4,5}.

2. Imobilizace enzymu na nerozpustný nosič

2.1. Adsorpce na nerozpustný nosič

Adsorpce enzymu na nerozpustný nosič se řadí mezi nejstarší a nejjednodušší způsoby imobilizace. Princip této metody imobilizace je založen na interakcích mezi enzymem a sorbentem, jako jsou adheze, koheze, vodíkové můstky či Van der Waalovy síly. Vzhledem k převažujícím elektrostatickým silám je za hlavní nevýhodu považována nízká stabilita imobilizovaného enzymu a z ní vyplývající omezená doba skladování (použitelnosti)⁵. Volbou vhodného nosiče nebo matrice a úpravou podmínek imobilizace však lze připravit imobilizované enzymy vhodné i pro průmyslovou výrobu detektorů s širokým uplatněním.

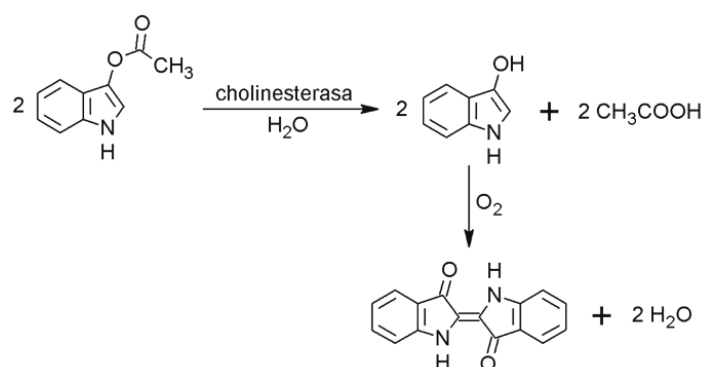
Již v 60. letech byl v USA připraven filtrační papír impregnovaný roztokem cholinesterasy. Při detekční reakci procházel kontaminovaný vzduch navlhčeným filtračním papírem nebo v případě kapalin se vzorek aplikoval na detektor ve formě kapky. Následovala aplikace chromogenního substrátu (roztok indoxyl-acetátu nebo indofenyl-

acetátu). V přítomnosti inhibitorů cholinesteras nedocházelo ke změně zbarvení filtračního papíru a ten zůstával v případě detekce indoxylacetátem či indofenylacetátem bílý. V nepřítomnosti těchto inhibitorů docházelo k hydrolyze chromogenních činidel za vzniku modrého (obr. 1) nebo v případě indofenylacetátu fialového zbarvení. Autoři patentu uvádějí, že zbarvení je rychlé, navíc jej v případě indoxylacetátu lze významně urychlit přidáním ferriferrokyanidového systému.

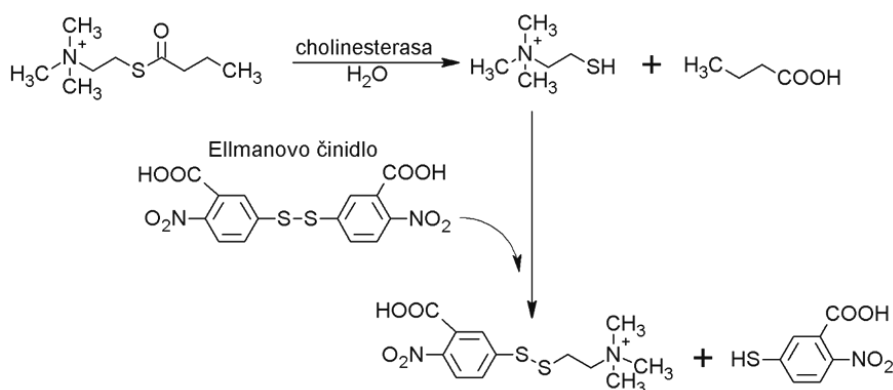
Samotná příprava detektoru byla založena na impregnaci filtračního papíru (případně silikagelu či skelných vláken) fosfátovým tlumivým roztokem o pH 7,2, poté se papír vysušil a následně impregnoval 4% roztokem cholinesterasy ve fosfátovém tlumivém roztoku (pH 7,2), který dále obsahoval želatinu, hovězí sérový albumin a jiné proteiny. Aktivita enzymu odpovídala 25 IU (1 IU = 16,67·10⁻⁹ kat) na vyražený disk o průměru 6,35 mm. Takto impregnovaný filtrační papír byl vysušen a skladován v suchém prostředí. Tímto způsobem si imobilizovaný enzym zachoval aktivitu po delší, v patentu blíže nespecifikovanou dobu i při teplotách do 65 °C (cit.⁶).

Další z patentů je zaměřený na modifikaci porézního celulosového filtračního papíru, a to vytvořením stacionární vrstvy tvořené kaseinem a vápenatými ionty, která kryje filtrační papír sloužící jako nosič pro enzym. Tato vrstva je po vysušení následně potažena další vrstvou tvořenou kaseinem, vápenatými ionty, trehalosou, Ellmanovým činidlem (kyselinou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzooovou) a cholinesterasou. Výsledný produkt je vysušen a skladován. Výhodou této modifikace jsou nízké výrobní náklady a uchování aktivity po delší dobu (80–120 % aktivity po 180 dnech skladování při 4 °C a 37 °C)⁷.

Imobilizace cholinesterasy na bělenou bavlněnou tkaninu je jednou z dalších možností. Proces imobilizace je velice jednoduchý a je založen na ponoření tkaniny do roztoku cholinesterasy ve směsi s neiontovým tenzidem a dextranem. Při detekci je na bavlněnou tkaninu s enzymem, která přišla do kontaktu se zkoumaným vzorkem, přitlačen nosič se substrátem (acetylthiocholin jodid nebo butyrylthiocholin jodid) a chromogenním Ellmanovým činidlem. Výsledné zbarvení je hodnoceno vizuálně.



Obr. 1. Hydrolytické (enzymové) štěpení indoxylacetátu za vzniku indiga (příklad použití chromogenního substrátu)



Obr. 2. Hydrolytická (enzymová) reakce s použitím substrátu a Ellmanova činidla

V případě žlutého zbarvení nejsou přítomny inhibitory cholinesteras, pokud vzorek zůstane bílý, pak jsou tyto inhibitory přítomny (obr. 2). Typ inhibitoru je možné zjistit změřením změny aktivity inhibované cholinesterasy po její reaktivaci vhodným činidlem, a to buď aldoximy, vodou, nebo ionty alkalických kovů a zemin. Takto připravený detektor je vhodný pro detekci a vzájemné rozlišení bojových chemických látek série G a V, případně organofosfátových a karbamátových insekticidů⁸.

Konstruktivně složitějším detektorem jsou detekční trubičky⁹. Známa česká detekční trubička obsahuje imobilizovanou cholinesterasu na nosiči (indikační vrstvu), srovnávací vrstvu impregnovanou substrátem a chromogenním činidlem a dvě ampulky s fosfátovým tlumivým roztokem o pH 6,0–9,0 (obr. 3). Nosičem enzymu je granulovaná celuloza o zrnitosti 0,8–1,2 mm. Referenční vrstva je tvořena žlutým drceným sklem impregnovaným acetyl/butyrylthiocholin jodidem a Ellmanovým činidlem. V případě detekce se otevřou konce trubičky a rozdrtí se ampulka s tlumivým roztokem pod indikační vrstvou tak, aby roztok smočil nosič s cholinesterasou. Poté se trubičkou prosává analyzovaný vzduch. Po inkubační době (minimálně 1 min) se rozbije druhá ampulka s tlumivým roztokem a kapalina se setřepe skrz srovnávací vrstvu do vrstvy indikační. Pokud se indikační vrstva zbarví žlutě, pak ve vzduchu nebyly obsaženy inhibitory cholinesteras. V opačném případě k zbarvení nedochází¹⁰.

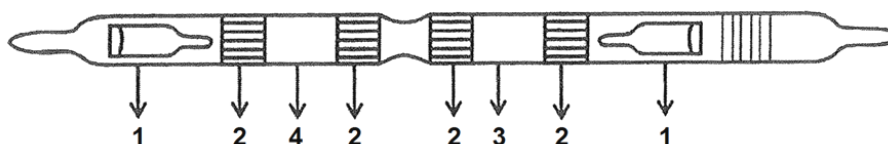
Pro přípravu detekčních trubiček určených ke zjišťování inhibitorů cholinesteras v ovzduší i ve vodě lze jako nosičů imobilizované cholinesterasy využít i kompozitní

pelety (granulát složený z uniformních sférických částic). Určit složení pelet vhodných pro imobilizaci bylo podstatou publikovaného experimentu, ve kterém bylo zjištěno, že vhodné jsou pelety bez anorganického plniva tvořené laktosou a mikrokrystalickou celulosou, dále pak pelety obsahující 50 % oxidu hlinitého a pelety s obsahem 20 % koloidního oxidu křemičitého. Takto připravené pelety byly impregnovány roztokem AChE a vysušeny. Detekce inhibitorů cholinesteras byla založena na kolorimetrické Ellmanově reakci¹¹.

Kompozitní pelety jako nosič pro imobilizovaný enzym byly použity i v dalších studiích. V první z nich byly pelety tvořené směsí mikrokrystalické celulosy, laktosy a povidonu naimpregnovány enzymem BuChE. Detekční činidlo obsahovalo butyrylthiocholin jako substrát pro enzym a redoxní indikátor *N*-(2,3-dimethyl-5-oxo-1-fenyl-3-pyrazolin-4-yl)-2-chlor-5-sulfo-4-iminobenzochinon. V nepřítomnosti inhibitorů cholinesteras docházelo k odbarvení vzniklého červeného zbarvení. V případě, že byl enzym inhibován, docházelo ke zpomalení rychlosti odbarvení (25 min v přítomnosti sarinu v koncentraci $7 \cdot 10^{-4}$ mg m⁻³, doba inkubace 10 min). Výhodou této metody je zřetelný barevný přechod červená/bílá ve srovnání s méně výrazným přechodem bílá/žlutá u Ellmanovy metody, ta však má na druhou stranu vyšší rychlost reakce¹².

2.2. Imobilizace pomocí kovalentní vazby

Tato metoda imobilizace využívá tvorby specifických vazeb mezi enzymem a nosičem. Tvorba vazeb musí pro-



Obr. 3. Detekční trubička (1 – ampulky s tlumivým roztokem, 2 – distanční těsnící tělíska, 3 – indikační vrstva, 4 – srovnávací vrstva)

bíhat za podmínek, které nesníží aktivitu enzymu nebo ji ovlivní jen minimálně, a zároveň touto reakcí nesmí být ovlivněno aktivní místo enzymu. Hlavní nevýhodou je právě možnost snížení aktivity enzymu nebo posunutí jeho aktivního místa, což vede k problematickému přístupu reagujícího substrátu. Prevenci uvedených problémů je tzv. orientovaná imobilizace¹³.

Kovalentní vazbou enzymu na anorganický nosič se zabývali v 70. letech američtí vědci. Imobilizovali enzymy typu hydrolas, oxidoreduktas a transferas na nosič nerozpustný ve vodě, který obsahoval volné hydroxylové skupiny nebo skupiny obsahující kyslík. Možnými nosiči mohou být tedy látky typu silikátů (porézní sklo, koloidní oxid křemičitý, silikagel, wollastonit a bentonit) a oxidy kovů (oxid hlinitý, hydroxyapatit, oxid nikelnatý). Tvorba vazby mezi nosičem a enzymem probíhala díky přidané, vazbu tvořící látce (např. aminopropyltriethoxysilan), která se nanesla na nosič ve formě roztoku. Po vytvoření vazby mezi silanem a nosičem se přidal enzym, který se za snížené teploty navázal na silan. Výsledný produkt se vysušil na vzduchu a byl skladován při teplotě místnosti při zachování více než 50 % původní aktivity po 128 dnech¹⁴.

Dalším patentově chráněným nosičem využívajícím kovalentní vazby je sířičitany modifikovaný celulosový papír s polyakroleinem, na němž je imobilizována cholinesterasa z koňského séra pomocí kovalentních vazeb přes aldehydové skupiny (lze využít i iontových vazeb přes aminoskupiny). Při detekci inhibitorů cholinesteras se nosič navlhl tlumivým roztokem a vystavil se kontaminovanému vzduchu nebo vodě. Následně se aplikoval roztok *N*-methylindoxyl-butyrátu, a pokud došlo ke vzniku zeleného zbarvení, inhibitory cholinesteras nebyly ve vzorku přítomny. V opačném případě si detektor ponechal žluté až oranžové zbarvení¹⁵.

Na detekci inhibitoru cholinesteras z krve, plasmy, moči a dalších tělesných tekutin pomocí kovalentně vázaného enzymu je zaměřený vynález vědců ze Singapuru. Inhibitor získali z biologických tekutin s použitím oximů, fluoridových, molybdenových, hořečnatých, kobaltnatých a nikelnatých iontů nebo měďnatých solí. Detekce probíhala na mikrotitrační destičce s imobilizovaným konjugátem cholinesterasy s avidinem nebo streptavidinem. Ke konjugaci se použil glutaraldehyd, který vytvořil kovalentní vazby s biotinem vázaným na povrchu destičky. Detekční destička může být navíc opatřena ochranným potahem z trehalosy, želatiny a azidu sodného. Detektor byl schopen měřit až 96 vzorků zároveň¹⁶.

3. Vazba na ionexy

V americkém patentu z roku 1982 byly k imobilizaci a stabilizaci cholinesterasy z elektrického úhoře (*Electrophorus electricus*) použity jako sorbent disky z papíru, který obsahoval bazické skupiny kovalentně navázané na celulosu (diethylaminoethyl- nebo epichlorhydrin-triethanolamin). Tyto disky byly impregnovány směsí cholinesterasy a tlumivého roztoku obsahujícího sloučeninu s obojetnými ionty (obsahující sekundární či terciární

amin a sulfonovou skupinu). Disky byly následně vakuově vysušeny. Další součástí detektoru byly disky z filtračního papíru impregnované indoxyl-acetátem za přítomnosti katalyzátoru hexakynoželezitanu draselného. Tyto dva typy disků byly po vysušení složeny do formy detekčního lístku a opatřeny ochranným polymerovým filmem. Při detekci bylo třeba odstranit ochranný obal a navlhlý disk obsahující enzym vystavit danému prostředí. Po odstranění oddělovací přepážky byly disky přitisknuty k sobě. Když vzniklo modré zbarvení na disku s enzymem, pak nedošlo k inhibici enzymu¹⁷.

Vyšší citlivost k inhibitorům cholinesteras, lepší smáčivost, stabilitu a menší ztrátu aktivity enzymu při imobilizaci než v případě výše uvedených detekčních disků obsahujících cholinesterasu z úhoře vykazuje detekční papírek obsahující cholinesterasu z platýse (rod *Pleuronectes*). Jako sorbent byl opět použit celulosový papír obsahující diethylaminoethylovou skupinu. Po přidání roztoku NaCl a po promytí a vysušení byly z papíru vyraženy disky, které se impregnovaly fosfátovým tlumivým roztokem obsahujícím cholinesterasu, sacharosu, dextran T10 a smáčedlo Tween 80. Disky byly vysušeny nejdříve při pokojové teplotě a následně v exsikatoru. Druhý typ disků obsahoval jako substrát 2,6-dichlorfenolindofenyl-acetát, kterým byl impregnován filtrační papír. Disky byly skladovány v polypropylenových obalech při různých teplotách a po různou dobu. Testy stability prokázaly, že použití iontoměníčového filtračního papíru ve srovnání s obyčejným filtračním papírem zvyšuje stabilitu enzymu. Pozitivní efekt na stabilitu cholinesterasy měla také přítomnost sacharosy a dextransu. Detekce probíhala podobně jako v případě disků obsahujících cholinesterasu z úhoře. Pokud byly inhibitory cholinesteras přítomny, pak měl disk obsahující enzym bílé, růžové nebo světle šedé zbarvení. V nepřítomnosti inhibitorů se vytvářelo modré nebo světle modré zbarvení¹⁸.

4. Zabudování do gelů a pěn

Další možností imobilizace cholinesteras je jejich inkorporace do gelů či pěn. Jeden z nejstarších patentů zabývajících se touto metodou uvádí přípravu gelu na bázi škrobu, agaru či karagenanu, který obsahuje přidanou cholinesterasu z koňského séra. Výsledný produkt určený k detekci vznikl lyofilizací tuhnutí gelu na filtračním papíru. Při detekci imobilizovaná cholinesterasa štěpila substrát na thiocholin, který reagoval s modrou sodnou solí 2,6-dichlorfenolindofenolu na bezbarvý produkt. V přítomnosti inhibitorů cholinesteras zůstal detektor modře zbarvený. Nevýhodou polysacharidových gelů byla však jejich nízká pevnost¹⁹.

Dalším patentově chráněným postupem je proces imobilizace enzymů na kopolymerní gely, které ve své struktuře mají karboxylové skupiny. Jako nosič pro enzym byl použit Akrilex C-100, což je slabě kyselý katex tvořený částečně hydrolyzovaným kopolymerem akrylamidu s *N,N'*-methylen-bis(akrylamidem). Ten vykazoval ve srovnávacích testech zároveň se zesítěným maleinanhydri-

dem nejlepší výsledky²⁰.

Polyuretanová pěna je jednou z dalších možností imobilizace cholinesteras. Imobilizace je založena na reakci aminoskupin argininových a lysinových zbytků enzymu s isokyanatou skupinou. Vazba na tyto skupiny nebrání přístupu substrátů či inhibitorů do aktivního centra enzymu. Porézní nosič byl připraven za použití prepolymeru, který vznikl reakcí polyether či polyester polyolu s isokyanátem v přítomnosti síťovacích činidel ve vodném prostředí postupem uvedeným v patentu²¹, a povrchově aktivní látky (Pluronic P-65). Výsledek imobilizace je ovlivněn intenzitou míchání během polymerace. Právě během míchání může dojít k denaturaci enzymu působením střížných sil, čemuž zabraňuje přidavek povrchově aktivní látky. Takto imobilizovaný enzym je chráněn před různými denaturačními vlivy a vysokými teplotami²².

Následné dva americké patenty se zabývaly variacemi při přípravě polyuretanové pěny. Tyto změny v přípravě nosiče měly za následek zvýšení aktivity imobilizovaného enzymu. V případě jednoho z patentů probíhala příprava reakcí polyuretanového prepolymeru ve vodném roztoku, který obsahoval směs enzymu, neiontového tenzidu a tlumivého roztoku. Přítomnost neiontového tenzidu (např. Pluronic F-68, Tween 20) pozitivně ovlivňovala aktivitu enzymu. V případě tohoto nosiče je možná i koimobilizace více enzymů zároveň²³. Druhý patent se týká zařízení schopného kontinuálně detegovat přítomnost inhibitorů enzymu ve vodě či vzduchu. Detekce je založena na změně pH v důsledku aktivity enzymu (uvolnění příslušné kyseliny rozkladem substrátu), a tím změně zbarvení acidobazického indikátoru bromkresolové violeti z fialové na žlutou. V přítomnosti inhibitorů cholinesteras dochází buď ke změně zbarvení kapaliny vytékající z detektoru (v případě detekce z vody), nebo přímo k zbarvení polymeru (detekce ze vzduchu) ze žluté zpět na fialovou²⁴.

5. Metody zesítnění (zesítněné agregáty)

Metoda zesítnění je založena na vzájemném propojování molekul enzymu za vzniku nerozpustných částic nebo jejich navázání na molekuly jiných, inertních bílkovin. Tato technika může být kombinována s jinými imobilizačními technikami. Imobilizaci cholinesteras pomocí zesítnění bílkovin se zabývaly např. ruské studie. Jednou ze zkoumaných možností bylo zesítnění bílkoviny pomocí glutaraldehydu. Proces imobilizace probíhal rovnoměrným nanesením tlumivého roztoku s cholinesterasou z koňského séra zároveň s glutaraldehydem jako síťujícím činidlem pomocí dvoukanalového reaktoru opatřeného diskovým míchadlem na pohybující se pás vláknitého materiálu. Výhodou tohoto detekčního zařízení je vyšší citlivost (nižší detekční limit), snížený výskyt analytických chyb a v neposlední řadě nižší cena²⁵.

Jinou možností využívající zesítněných agregátů byl patentově chráněný optický biosenzor určený k detekci ireverzibilních inhibitorů cholinesteras, organofosfátů.

Biosenzor obsahoval jako aktivní prvek silně fluoreskující komplex cholinesterasy s luminogenem imobilizovaným v *N*-isopropylakrylamidovém gelu řídkce zesíťovaném *N,N'*-metylen-bis(akrylamidem), který se připravoval fotopolymerací na neutrálním substrátu. Jako luminogen byl použit thioflavin T, jehož intenzita fluorescence byla více než tisícinásobně vyšší v přítomnosti AChE. Štěpení substrátu (thiocholinu) enzymem vedlo k postupnému zhášení fluorescence. Přítomnost inhibitoru se projevila zpomalením snižování intenzity fluorescence, které bylo přímo úměrné koncentraci přítomného inhibitoru²⁶.

6. Jiné metody

6.1. Imobilizace pomocí nanostruktur

Jednou z nejnovějších metod imobilizace cholinesteras je jejich vazba na nanostruktury, jako jsou např. uhlíkové nanotrubičky. Nanotrubičky jsou nejprve karboxylovány a dispergovány ve vodném roztoku povrchově aktivní látky za pomoci ultrazvuku. Papíru podobná membrána z uhlíkových nanotrubiček vzniká mikrofiltrací roztoku a může s využitím karbodiimidu jako konjugačního činidla sloužit jako nosič pro enzym – organofosfátovou hydrolasu, která se na membránu váže kovalentní vazbou. Takto připravený nosič neslouží jako detektor inhibitorů cholinesteras, ale jako zařízení schopné detoxikace prostředí kontaminovaného organofosfáty²⁷.

6.2. Imobilizace pomocí protilátek

Imobilizace cholinesteras na protilátky je poměrně novou a málo prozkoumanou metodou. Využívá se velmi silné interakce mezi enzymem a imunosorbentem, který tvoří nosič s navázanou protilátkou.

V patentu japonských autorů, týkajícím se metody rozlišení cirhózy jater a hepatitidy, je uvedena metoda imobilizace cholinesterasy na fragment myši protilátky proti lidské sérové cholinesterase adsorbované na polystyrenovou mikrotitrační destičku. Aktivita cholinesterasy v séru klesá při cirhóze, hepatitidě nebo otravě organofosfáty. Vlastní stanovení aktivity bylo založeno na afinitě lektinu z houby *Aleuria aurantia* k cholinesterase, která je v případě cirhózy a hepatitidy rozdílná²⁸. V analogickém patentu byl lektin z *Aleuria aurantia* nahrazen dostupnějším lektinem z čočky (rod *Lens*)²⁹.

7. Závěr

Imobilizace enzymu na nosič je zásadním krokem v přípravě detektorů inhibitorů cholinesteras. Imobilizovaný enzym by si měl ideálně zachovat co nejvyšší stupeň aktivity po dlouhou dobu, a to i při proměnlivých podmínkách skladování. Detekční set by měl poskytnout zřetelné viditelné důkaz přítomnosti nebo nepřítomnosti inhibitorů cholinesteras, což bývá nejčastěji provedeno kolorimetrickou Ellmanovou reakcí. Intenzita barevného přechodu

v průběhu Ellmanovy reakce je závislá na množství a aktivitě imobilizované cholinesterasy. Jednotlivé metody (způsoby) imobilizace enzymů mají své přednosti i nedostatky. Imobilizovaný enzym má v závislosti na použité technice různé vlastnosti a různou použitelnost. Výběr metod imobilizace, včetně vhodného nosiče, je v podstatě závislý na předpokládaném způsobu využití imobilizovaného enzymu. Z hlediska detekce inhibitorů cholinesteras mohou být užitečné všechny známé metody imobilizace enzymu, pokud zajišťují jeho očekávanou aktivitu a stabilitu. Enzymová reakce je základem různých typů technických prostředků detekce a stanovení inhibitorů cholinesteras od složitých a ekonomicky náročných analyzátorů až po jednoduché a levné prostředky typu průkazníkůvých papírků nebo detekčních trubiček. Je logické, že při přípravě jednoduchých prostředků budou mít přednost jednoduché, dostupné a levné materiály s dobrou vazebnou kapacitou (např. celuloza) a odpovídající metody imobilizace enzymu. Nejčastěji se používají dvě základní metody imobilizace – s nekovalentní vazbou a s chemickou vazbou (kovalentní, iontovou). Chemická vazba je sice pevnější, ale zpravidla na úkor hydrolytické aktivity enzymu, navíc klade vyšší nároky na čistotu enzymu.

Práce vznikla za podpory projektu IGA VFU Brno č. 301/2016/FaF.

LITERATURA

- Vale A., Marrs T. C., Rice P.: *Medicine* 44, 106 (2016).
- Bajgar J.: *Adv. Clin. Chem.* 38, 151 (2004).
- Miao Y., He N., Zhu J.: *Chem. Rev.* 110, 5216 (2010).
- Pohanka M., Vlček V., Žďárová-Karasová J., Kuča K., Cabal J., Fusek J.: *Advances in Military Technology* 7, 83 (2012).
- Hoskovcova M., Koblíha Z., v knize: *Environmental Biosensors* (Somerset V., ed.), kap. 4, InTech, Rijeka 2011.
- Gelman C., Kramer D. N. (Gelman C., Kramer D. N.): US 3049411 A.
- Ohara R. (Ind. Tech. Res. Inst.): US 2008160556 A1.
- Tušarová I., Halánek E. (Oritest s.r.o.): CZ 288576 B6.
- Pitschmann V., Halánek E., Koblíha Z., Tušarová I.: *Chem. Listy* 105, 334 (2011).
- Tušarová I., Halánek E., Orel J. (Oritest s.r.o.): CZ 9301179 A3.
- Vetřhý D., Leřtinová H., Tušarová I.: *Ceska Slov. Farm.* 61, 234 (2012).
- Pitschmann V., Matějovský L., Vetřhý D., Koblíha Z.: *Anal. Lett.* 49, 2418 (2016).
- <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/covalent.htm>, staženo 18. 5. 2016.
- Messing R. A., Weetall H. H. (Corning Glass Works): US 3519538 A.
- Schmitt E., Capozza R. (American Cyanamid Co.): US 3809616 A.
- Loke W. K., Tan Y. T., Seow J. (DSO National Laboratories): WO 2008066495 A1.
- Goodson L. H., Goodman A. (Midwest Research Inst.): US 4324858 A.
- Dahlgren E. (Dahlgren E., Bergek S., Martensson K.): EP 0176585 B1.
- Aldrich F. L., Usdin V. R., Vasta B. M. (Melpar Inc): US 3223593A.
- Boross L., Szajani B., Kovacs K. N. S. (Reanal Finomvegyszergyar): WO 8300345 A1.
- Wood L. L., Frisch K. C. (Grace W. R. & Co.): US 4137200 A.
- Gordon R. K., Doctor B. P., Saxena A., Feaster S. R., Maxwell D., Ross M., Lenz D., Lejeune K., Russell A. (US Army): US 6406876 B1.
- Lejeune K. E., Russell A. J. (Agentase LLC): US 6759220 B1.
- Lejeune K. E., Mysliwczyk R. J., Holzapfel P. L., Erbedinger M. (Agentase LLC): US 7422892 B2.
- Gajnullina E. T., Iskalin V. I., Ponsov M. A., Rybal'chenko I. V., Taranchenko V. F., Janovskij J. G. (Institut prikladnoj Mekhaniki ran): RU 2182929 C2.
- Antokhin A. M., Andreev O. I., Gajnullina E. T., Ryzhikov S. B., Taranchenko V. F., Kaurov N. E. (Antokhin A. M., Andreev O. I., Gajnullina E. T., Ryzhikov S. B., Taranchenko V. F., Kaurov N. E.): RU 2386120 C2.
- Mechrez G., Krepker M. A., Harel Y., Lellouche J. P., Segal E.: *J. Mater. Chem. B* 2, 915 (2014).
- Kondo M., Yasukawa K., Hada T. (Tosoh Corporation): EP 0738890 A1.
- Kondo M., Yasukawa K. (Tosoh Corporation): JPH 10221344 A.

J. Zeman^a, D. Vetřhý^a, A. Franc^a, and V. Pitschmann^b (^a *Department of Pharmaceutics, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno;* ^b *Oritest Ltd., Prague*): **Methods of Enzymes Immobilization and Their Use for Optical (Colorimetric) Detection of Cholinesterase Inhibitors**

The enzyme immobilization is a very important process providing an attachment of the enzyme to a certain type of the carrier. This allows to maintain the enzyme activity during the storage and it also simplifies the detection procedure. When designing a new detector based on the enzymatic reaction, the proper immobilization method must be chosen depending on the advantages and disadvantages of the available methods of immobilization. Examples of immobilization method for colorimetric detection include, e.g., adsorption to the insoluble carrier, covalent bonding, attachment to ion exchangers, incorporation into gels and foams, immobilization in the form of cross-linked aggregates or nanostructures or with the utilization of antibodies.

Keywords: enzyme immobilization, detectors, cholinesterase, cholinesterase inhibitors