

BIOSENZORY ZALOŽENÉ NA CHOLINESTERASCH

MIROSLAV POHANKA

Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
miroslav.pohanka@gmail.com

Došlo 23.2.12, přijato 5.4.12.

Klíčová slova: biosensor, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, nervově paralytická látka, sarin, VX, imobilizace, Alzheimerova choroba

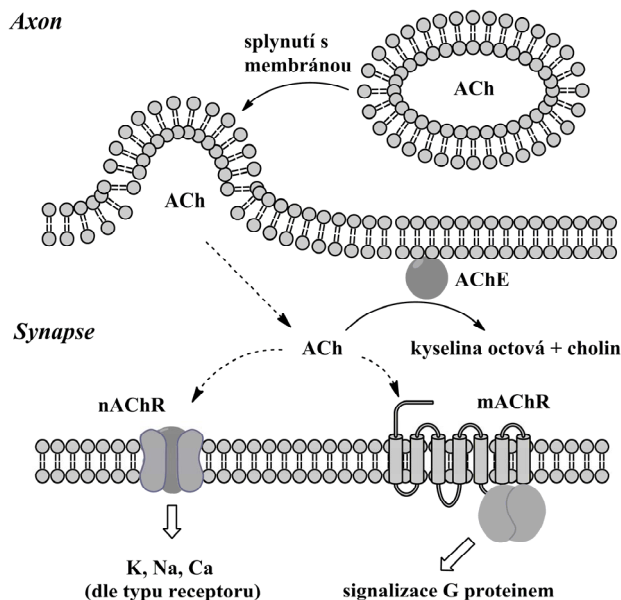
Obsah

1. Úvod
2. Inhibitory cholinesteras
3. Metody stanovení enzymové aktivity
4. Imobilizace cholinesteras
5. Aplikace biosenzorů
6. Závěr

1. Úvod

V odborné literatuře jsou dobře popsány biosenzory obsahující některou ze dvou známých cholinesteras: acetylcholinesterasu (AChE, EC 3.1.1.7, též krevní cholinesterasa) nebo butyrylcholinesterasu (BChE, EC 3.1.1.8, též plazmatická cholinesterasa). Cholinesterasy jsou značně senzitivní na působení široké skupiny neurotoxických látek reprezentovaných například nervově paralytickými látkami využívanými ve vojenství, organofosforovými pesticidy v tzv. oxo formě, organofosforovými pesticidy v tzv. thio formě po předchozí oxidaci, karbamátovými pesticidy a celou skupinou léčiv různorodé chemické povahy, mezi něž patří např. fyzostigmin, neostigmin, rivastigmin, galantamin, huperzin, donepezil a jiné¹.

AChE v organismu katalyzuje hydrolýzu neuromediátoru acetylcholinu na kyselinu octovou a cholin. Význam AChE je patrný z obr. 1 znázorňující princip cholinergní neurotransmise a celkový osud neuromediátoru acetylcholinu. Na rozdíl od AChE, BChE nemá známý fyziologický substrát a její význam v organismu je předmětem výzkumu na různých pracovištích. Fakt, že cholinesterasy mohou být inhibovány neurotoxickými látkami, byl v minulosti využíván k diagnostice otrav, kde se cholinesterasy ukázaly jako vysoce senzitivní a dostatečně specifické markery. Vedle výše zmíněného diagnostického významu jsou cholinesterasy považovány za ideální rozpoznávací prvek přírodního původu (tzv. rekogniční element). Kombinací



Obr. 1. Význam acetylcholinu (ACh) v neurotransmisi a znázornění jeho interakce s acetylcholinovými receptory (AChR) muskarinového (m) a nikotinového (n) typu

s fyzikální senzoricou částí lze připravit funkční biosenzor². Cílem tohoto referátu je shrnout současné možnosti využití cholinesteras ke konstrukci biosenzorů a jejich využitelnost pro analýzu široké skupiny neurotoxických látek.

2. Inhibitory cholinesteras

Inhibitory cholinesteras jsou široká skupina chemických látek vázajících se do některé z důležitých částí enzymu. Zatímco ireverzibilní a pseudoireverzibilní inhibitory se vážou do tzv. estratické části aktivního centra, reverzibilní inhibitory pak mají afinitu k alfa anionickému místu, aromatickému hrdlu, nebo beta anionickému místu na povrchu enzymu³. Mezi AChE a BChE je zásadní rozdíl ve struktuře aromatického hrdla a anionických míst, které předurčují selektivitu enzymů pro některé inhibitory¹. Například širší hrdlo BChE umožňuje vstup látky tetraiso-propyl pyrofosforamidu a inhibici aktivního centra⁴. Rozdílnou senzitivitu k AChE a BChE mají i látky využívané pro léčbu Alzheimerovy choroby. Nekompetitivní inhibitory AChE donepezil, huperzin (A a B), takrin a kompetitivní galantamin vykazují nulovou nebo sníženou (takrin) afinitu k BChE, zatímco vůči AChE působí jako silné inhibitory^{5,6}. Do periferního anionického místa AChE se vážou

i aflatoxiny a díky tomu působí jako silné a selektivní inhibitory tohoto enzymu¹.

Aromatické hrdlo a beta anionické místo AChE obsahuje větší množství aromatických aminokyselin. Zejména se jedná o Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 a Tyr 334 u beta anionického místa⁷. Aromatické hrdlo AChE pak obsahuje 14 reziduí aromatických aminokyselin na místo 8 reziduí u BChE⁸. Právě z důvodu vyššího zastoupení aromatických aminokyselin dochází k interakci kation – π mezi selektivním inhibitorem AChE a enzymem. Za zmínku stojí, že zatímco BChE má vyšší číslo přeměny pro štěpení většiny aryl acylamidů, esterů a thioesterů, AChE lépe konvertuje acetylcholin a acetylthiocholin. Acetyl- β -methyl-thiocholin a acetyl- β -methyl-cholin jsou právě díky struktuře periferního anionického místa a aromatického hrdla konvertovány pouze AChE^{1,9,10}.

Organofosforové a karbamátové inhibitory cholinesteras jsou látky vázající se esterovou vazbou na serin v estratické části aktivního centra. Jedná se o dvě skupiny látek: organofosforové a karbamátové inhibitory cholinesteras. Příkladem organofosforových inhibitorů mohou být vojensky využívané nervově paralytické látky typu G (sarin, tabun, soman, cyklosarin), typu V (například VX: S-[2-(diisopropylamino)ethyl]-O-ethyl-methylfosfonothioát), v EU nepovolený pesticid dichlorvos (2,2-dichlorethyl-dimethylfosfát), metabolický produkt pesticidu dimethoatu (O,O-dimethyl-S-methylkarbamoylmethyl fosfordithioát) – omethoát a látka fosetyl (aluminium tris-O-ethylfosfonát). Organofosforové inhibitory inhibují jak AChE, tak i BChE. Výjimkou je látka tetraisopropyl pyrofosforamid inhibující pouze BChE. Karbamátové inhibitory jsou např. farmakologicky využívané rivastigmin, neostigmin, pyridostigmin, současné pesticidy (desmedipham, propamocarb, fenoxycarb, methocarb, phenmedipham, pririmicarb, propamocarb) a dobře známý, avšak v České republice zakázaný karbofuran¹¹. Jak karbamátové, tak i organofosforové inhibitory podstupují shodný typ reakce, esterifikaci hydroxylové skupiny serinového rezidua v aktivním centru cholinesteras a tím znemožnění jejich funkce¹². Na rozdíl od ireverzibilních organofosforových inhibitorů jsou karbamáty tzv. pseudoireverzibilními inhibitory. Po vazbě na hydroxyl serinu dochází

k spontánní hydrolyze karbamoylového rezidua a spontánnímu návratu aktivity enzymu¹³. Inhibitory cholinesteras jsou v přehledné formě shrnuty jako tabulka I.

3. Metody stanovení enzymové aktivity

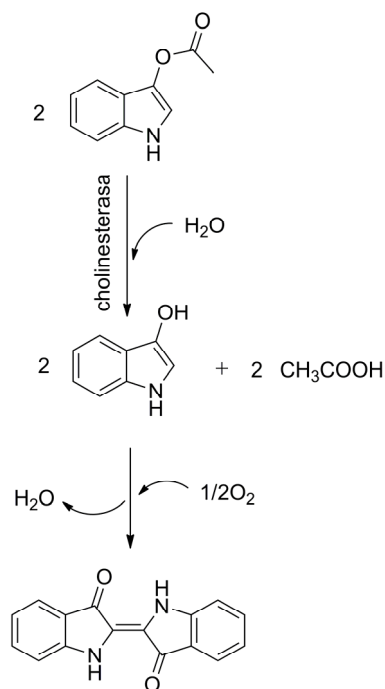
Cholinesterasy vykazují aryl acylamidoasovou, esterovou a thioesterovou aktivitu. V minulosti byla zavedena řada metod vhodných pro stanovení aktivity cholinesteras a tím nepřímo pro stanovení přítomnosti inhibitorů cholinesteras pokud jsou cholinesterasy použity jako rekozníční element. Aryl acylamidasová aktivita cholinesteras je kupříkladu využita při stanovení založeném na *o*-nitroacetanilidu jako chromogenním substrátu poskytujícím po hydrolyze barevný *o*-nitroanilin¹⁴. Pro odhad aktivity cholinesteras v biologických vzorcích byla v minulosti zavedena tzv. Ellmanova metoda¹⁵. Tato metoda je založena na hydrolyze acetylthiocholinu v případě BChE resp. máselnou kyselinu a thiocholin. Thiocholin již spontánně reaguje s kyselinou 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou za vzniku žluté kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové.

Převažující trendy v konstrukci biosenzorů jsou však zaměřené na využití buď fluorogenních, nebo voltametricky aktivních substrátů cholinesteras^{16,17}. Fluorogenní substráty mohou být vhodně použity ke konstrukci optických biosenzorů s přístrojovou nebo vizuální detekcí přítomnosti inhibitorů cholinesteras. Například No a spol.¹⁸ využili indoxyl acetát a indofenyl acetát pro konstrukci biosenzoru obsahujícího imobilizovanou AChE. Takto připravený biosenzor byl vhodný jak pro vizuální, tak instrumentální analýzu přítomnosti neurotoxických látek reprezentovaných chlorpyrifosem, karbofuranem a parathionem. Jiný biosenzor využívající indoxylacetát byl použit pro vizuální stanovení paraoxonu a neostigminu¹⁹. Existuje i komerčně dostupný biosenzor Agri-Screen Ticket (Neogen Corporation, Lansing, Michigan, USA) založený na indoxylacetátu a imobilizované AChE. Mechanismus hydrolyzy indoxylacetátu cholinesterasou a následná oxidace na modré indigo je patrná z obr. 2.

Tabulka I

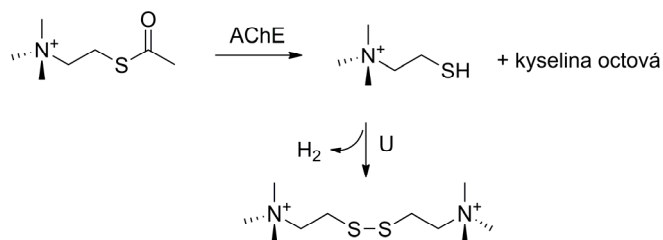
Přehled inhibitorů cholinesteras dle cit.^{1,5-12}

Látka	Inhibice AChE	Inhibice BChE	Mechanismus
Organofosforové inhibitory (např. nervově paralytické látky, pesticid dichlorvos)	ano	ano	esterifikace serinového rezidua v aktivním centru enzymu, ireverzibilní inhibice
iso-OMPA (organofosforový derivát)	ne	ano	
Karbamátové inhibitory (např. léčivo rivastigmin, pesticid karbofuran)	ano	ano	esterifikace serinového rezidua v aktivním centru enzymu, pseudoireverzibilní inhibice
Aflatoxiny, donepezil, galantamin, huperzin	ano	ne	interakce s anionickými místy
Takrin	ano	nízká	



Obr. 2. Princip hydrolyzy indoxylacetátu cholinesterasou a následná spontánní oxidace na indigo

Pro konstrukci elektrochemických biosenzorů je vhodné využití thioesterové aktivity cholinesteras. Vznikající thiocholin může být snadno oxidován vloženým napětím za vzniku „tail-to-tail“ dimeru thiocholingu (obr. 3). Oxidace thiocholingu umožňuje využít některý z voltametrických principů sledování enzymové reakce²⁰. Biosenzor využívající chronoamperometrické stanovení vznikajícího thiocholingu se ukázal vhodný např. pro stanovení nervově paralytických látek sarin, soman, cyklosarin, tabun a VX v laboratorních podmínkách²¹. Použití acetylthiocholingu jako voltametricky aktivního substrátu je doporučeno i pro komerčně dostupný biosenzor AC1.AChE (BVT Technologies, Brno). Thiocholin je reaktivní sloučenina a lze ji využít k dalším spontánním reakcím, jakými jsou chemická reakce s povrchem zlaté elektrody použité pro stanovení SPR – rezonanci povrchových plazmonů²² či redukce kyseliny tetrachlorzlatité



Obr. 3. Hydrolyza acetylthiocholingu pomocí AChE a následující oxidace thiocholingu vloženým napětím (U)

s následným stanovením vznikajícího zlata²³. Mechanismem reakce jednodušší, ale na preciznost imobilizačního postupu náročnější, jsou biosenzory indikující změnu pH. Např. biosenzory využívající iontově selektivní polemy řízené tranzistory, v literatuře označované zkratkou IS-FET, jako převodníky mohou registrovat acidifikaci média, k níž dochází z důvodu uvolňování kyseliny octové z acetylthiocholingu nebo acetylthiocholingu^{24,25}.

4. Imobilizace cholinesteras

Cholinesterasy jsou globulární proteiny s relativně dobrou stabilitou. Zachycení cholinesteras na povrch fyzikálně-chemického převodníku může být provedeno více způsoby. Literárně jsou dobře popsány prosté sorpce, mechanické zachycení do membrán a kovalentní imobilizace. Při volbě imobilizačního postupu je třeba zohlednit i náročnost a nákladnost. Na rozdíl od většiny biosenzorů obsahujících enzym jsou cholinesterasy v rámci pozitivního stanovení některých inhibitorů (organofosforové) trvale inhibovány a biosenzor tak vlastně funguje jako jednorázový průkazník. Není proto nezbytně nutné zajistit dlouhodobou stabilitu spočívající v opakovaném stanovení analytu. V tomto úhlu pohledu jsou biosenzory obsahující cholinesterasu nepodobné např. biosenzorům s vázanou glukosaoxidasou, u kterých je naopak očekáváno, že bude možné použít opakovaně a setkání se substrátem neovlivní následující měření¹⁶.

Nejdražší komponentou při konstrukci biosenzorů obsahujících cholinesterasu je právě imobilizovaný enzym. Ostatní komponenty biosenzoru obvykle tvoří méně než polovinu materiálních nákladů. Proto je nutné zvolit imobilizační postup takový, aby byl dostatečně šetrný k imobilizovanému enzymu a zároveň nedocházelo k snadnému vymytí enzymu např. při ponoření do analyzovaného roztoku. Nenáročné postupy mohou být paradoxně vhodnější ke konstrukci biosenzoru, než využití trendových metod. Komplexní porovnání jednoduché sorpce, precipitace glutaraldehydem, zachycení do želatinové membrány, zachycení na grafitové mikročástice a imobilizace metodou sol-gel vedla ke konstatování, že nejšetrnější a nejvhodnější pro konstrukci biosenzoru je precipitace glutaraldehydem. Druhým vhodným postupem pak byla prostá sorpce na platinovou elektrodu²⁶. Příklady imobilizačních postupů jsou shrnuty v tab. II.

Tabulka II

Zvolené imobilizační postupy AChE a dosažené limity detekce

Imobilizační postup	Analyzovaná látka	Limit detekce	Lit.
Prostá sorpce na Pt elektrodu	diisopropylfluorofosfát	35 nmol l ⁻¹	26
Precipitace glutaraldehydem na Pt elektrodu		29 nmol l ⁻¹	
Sol-gel zachycení na uhlíkovou pastovou elektrodu	parathion methyl	0,08 ppb	27
Afinitní zachycení histidinovou kotvou na niklové nanočástice	paraoxon ethyl	1 pmol l ⁻¹	28
Vazba na zlaté nanočástice	malathion, chlorpyrifos	1 nmol l ⁻¹	29

Trendem v konstrukci biosenzorů je rovněž dosáhnout co nejnižšího limitu detekce a ten je značně odvislý od zvolené metody zachycení cholinesteras, charakteru fyzikálně-chemického převodníku a dalších faktorů. Komplexní práce věnované porovnání významu imobilizačního postupu bohužel nejsou časté a většina autorů ve svých pracích optimalizuje a popisuje jeden konkrétní postup. Zároveň však mění i jiné parametry konstrukce biosenzoru a především materiál povrchu fyzikálně-chemického převodníku. Můžeme usuzovat, že imobilizační postupy jako je sol-gel zachycení na uhlíkovou pastovou elektrodu²⁷, afinitní zachycení histidinovou kotvou značené AChE na niklové nanočástice²⁸ a navázání na zlaté nanočástice²⁹ přinášejí jisté výhody.

5. Aplikace biosenzorů

Ve většině případů jsou biosenzory založené na cholinesterasách testovány pro toxické formy pesticidů. Je to dáno tím, že se jedná o dobře dostupné toxické látky a k manipulaci s nimi není třeba mít speciální povolení nebo laboratorní vybavení, jak je to nutné pro práci s nervově paralytickými látkami. Oproti tomu většina organofosforových pesticidů, které jsou ve světě v současnosti používány, neinhibuje cholinesterasy přímo, ale až po metabolické aktivaci. Ze závěrů experimentu však vyplývá, že neexistuje optimálně připravený biosenzor a limity detekcí se několikanásobně liší pro jednotlivé analyzované látky^{30,31}. Lze očekávat, že biosenzory optimalizované a experimentálně ověřené pro modelové pesticidy nemusí být dostatečně citlivé pro použití v analýze nervově paralytických látek a léčiv. Hraje zde roli monovrstva s imobilizovaným enzymem představující mechanickou bariéru prostupu analytu. Vlastní inhibitory cholinesteras mají navíc rozdílný partiční/distribuční koeficient. Např. partiční koeficient (viz cit.³²) pro nervově paralytickou látku sarin je 0,30, pro cyklosarin 1,04 a pro soman 1,82. Jejich schopnost pronikat monovrstvou s enzymem a dostat se tak k aktivnímu centru enzymu se značně liší.

Předpokládaný význam biosenzorů s navázanou cholinesterasou spočívá především v rychlé a levné analýze nervově paralytických látek, snadnému průkazu přítomnosti pesticidů v životním prostředí a analýze léků, jejichž

účinná látka působí jako inhibitor cholinesteras. Nervově paralytické látky lze detegovat za využití biosenzorů s cholinesterasami s nízkým limitem detekce díky silné afinitě těchto inhibitorů k enzymu. White a Harmon³³ dokázali prokázat sarin v roztoku s limitem detekce 100 ppt resp. 250 pg látky ve vzduchu za pomoci optického biosenzoru obsahujícího AChE. V jiné práci²⁰ založené na použití elektrochemického biosenzoru s AChE zachycenou na Pt elektrodu byl prokázán sarin ve vodném roztoku s limitem detekce 588 pmol l⁻¹. Avšak soman bylo možné analyzovat s limitem detekce přibližně dvacetinásobně vyšším: 10,7 nmol l⁻¹.

Z pesticidů je jako standardu věnována mimořádná pozornost látce dichlorvos. Jedná se o přímý inhibitor cholinesteras bez nutnosti metabolické aktivace a lze jej tedy snadno stanovit biosenzorem založeným na cholinesterase. I když v mnohých zemích, včetně České republiky, se od něj ustoupilo z důvodů vysoké toxicity vůči nečlověkým organismům, stále patří k pesticidům intenzivně využívaným po celém světě³⁴. Řada nově popsaných biosenzorů je tak testována právě na látce dichlorvos. Jako příklady lze uvést průtočný elektrochemický biosenzor prokazující dichlorvos již od koncentrací 0,8 mmol l⁻¹ ve vodných roztocích³⁵. Sun a spol.³⁶ modifikovali skleněnou uhlíkovou elektrodu uhlíkovými nanovláknami a na ně chemicky vázali AChE. Připravený elektrochemický biosenzor prokázal dichlorvos s limitem detekce 3 μg l⁻¹. I když je značný zájem věnován látce dichlorvos, i ostatní sloučeniny jsou využívány jako standardy a funkčnost biosenzorů je na jejich stanovení ověřována. Takovou látkou je třeba paraoxon stanovený s limitem detekce 8,7 pmol l⁻¹ pomocí průtočného senzorickeho systému³⁷, chlorfenvinfos stanovený s limitem detekce 115 nmol l⁻¹ elektrochemickým biosenzorem obsahujícím AChE imobilizovanou na uhlíkové nanovlákně³⁸ a karbaryl elektrochemickým biosenzorem s grafitovým nanokompozitem s limitem detekce 0,7 ng ml⁻¹ (cit.³⁹). Oblast, kde biosenzory s AChE doposud nenašly rozsáhlejší využití, je testování léčiv, jak tomu bylo např. nastíněno v rámci experimentu, v němž byly stanovovány rozdíly mezi takrinem a jeho 7-methoxy derivátem na AChE imobilizované na povrch síťotiskového senzoru⁴⁰.

6. Závěr

Biosenzory založené na cholinesterasach jsou jednoduchá analytická zařízení vhodná k rychlému průkazu přítomnosti neurotoxických látek. Ačkoliv byla v minulosti připravena řada slibných analytických zařízení tohoto typu, výsledky nejsou dostatečně uspokojivé a probíhá další vylepšování a výzkum v oblasti jejich přípravy a použití.

LITERATURA

- Pohanka M.: *Biomed. Pap. Olomouc* 155, 219 (2011).
- Andreescu S., Marty J. L.: *Biomol. Eng.* 23, 1 (2006).
- Weiner L., Shnyrov V. L., Konstantinovkij L., Roth E., Ashani Y., Silman I.: *Biochemistry* 48, 563 (2009).
- Adler M., Filbert M.G.: *FEBS Lett.* 267, 107 (1990).
- Pohanka M.: *J. Appl. Biomed.* 9, 185 (2011).
- Bonner L. T., Peskind E. R.: *Med. Clin. North Am.* 86, 657 (2002).
- Johnson G., Moore S. W.: *Curr. Pharm. Des.* 12, 217 (2006).
- Saxena A., Redman A. M., Jiang X., Lockridge O., Doctor B. P.: *Biochemistry* 36, 14642 (1997).
- Plageman L. R., Puletti G. M., Skau K. A.: *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 227, 480 (2002).
- Zhukovskii Y. G.: *J. Evol. Biochem. Physiol.* 39, 281 (2003).
- Vlček V., Pohanka M.: *Chem. Listy* 105, 908 (2011).
- Marrs T. C.: *Pharmac. Ther.* 58, 51 (1993).
- Darvesh S., Darvesh K. V., McDonald R. S., Mataija D., Walsh R., Mothana S., Lockridge O., Martin E.: *J. Med. Chem.* 51, 4200 (2008).
- Masson P., Froment M. T., Gillon E., Nachon F., Darvesh S., Schopfer L. M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 1139 (2007).
- Ellman G. L., Courtney D. K., Andreas V., Featherstone R. M.: *Biochem. Pharmacol.* 7, 88 (1961).
- Pohanka M., Skládal P.: *J. Appl. Biomed.* 6, 57 (2008).
- Pohanka M., Musilek K., Kuča K.: *Curr. Med. Chem.* 16, 1790 (2009).
- No H. Y., Kim Y. A., Lee Y. T., Lee H. S.: *Anal. Chim. Acta* 594, 37 (2007).
- Pohanka M.: *Anal. Lett.* 45, 367 (2012).
- Pohanka M., Dobeš P., Drtinová L., Kuča K.: *Electroanalysis* 21, 1177 (2009).
- Zhang W., Ding J., Qin Y., Liu D., Du D.: *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10, 5685 (2010).
- Liao S., Qiao Y., Han W., Xie Z., Wu Z., Shen G., Yu R.: *Anal. Chem.* 84, 45 (2012).
- Raghu P., Swamy B. E., Reddy T. M., Chandrashekar B. N., Reddaiah K.: *Bioelectrochemistry* 84, 19 (2012).
- Hai A., Ben-Haim D., Korbakov N., Cohen A., Shapir J., Oren R., Spira M. E., Yitchaik S.: *Biosens. Bioelectron.* 22, 605 (2006).
- Flores F., Artigas J., Marty J. L., Valdes F.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 476 (2003).
- Pohanka M., Drobík O., Křenková Z., Žďárová-Karasová J., Pikula J., Cabal J., Kuča K.: *Anal. Lett.* 44, 1254 (2011).
- Raghu P., Swamy B. E. K., Reddy T. M., Chandrashekar B. N., Reddaiah K.: *Bioelectrochemistry* 83, 19 (2012).
- Ganesana M., Istamboulie G., Marty J. L., Noguer T., Andreescu S.: *Biosens. Bioelectron.* 30, 43 (2011).
- Chauhan N., Narang J., Pundir C. S.: *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 923 (2011).
- Di Tuoro D., Portaccio M., Lepore M., Arduini F., Moscone D., Bencivenga U., Mita D. G.: *New Biotechnol.* 29, 132 (2011).
- Chauhan N., Narang J., Pundir C. S.: *Biosens. Bioelectron.* 29, 82 (2011).
- Czerwinski S. E., Skvorak J. P., Maxwell D. M., Lenz D. M., Baskin S. I.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 20, 241 (2006).
- White B. J., Harmon H. J.: *Sens. Lett.* 3, 36 (2005).
- Binumkumar B. K., Gill K. D.: *Indian J. Exp. Biol.* 48, 697 (2010).
- Melo E. I., Franco D. L., Afonso A. S., Rezende H. C., Brito-Madurro A. G., Madurro J. M., Coelho N. M. M.: *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 1217 (2011).
- Sun X., Wang X. Y., Zhao W. P.: *Sens. Lett.* 8, 247 (2010).
- Marinov I., Ivanov Y., Vassileva N., Godjevargova T.: *Sens. Actuators, B* 160, 1098 (2011).
- Oliveira A., Mascaro L. H.: *Int. J. Anal. Chem.* 2011, 974216.
- Wang K., Liu Q., Dai L., Yan J., Ju C., Qiu B., Wu X.: *Anal. Chim. Acta* 695, 84 (2011).
- Pohanka M., Kuča K., Kassa J.: *Neuroendocrinol. Lett.* 29, 755 (2008).

M. Pohanka (*Faculty of Military Health Service, University of Defense, Hradec Kralove*): **Biosensors Based on Cholinesterases**

The cholinesterase biosensors are analytical devices suitable for assay of cholinesterase inhibitors in the course of suppression of the biorecognition element activity. Both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are used for their assay. The biosensors can be used for assay of organophosphorus and carbamate pesticides, nerve agents, drugs in Alzheimer's disease and myasthenia treatment. The review summarizes the knowledge of cholinesterases, their immobilization and inhibitors as well as shows examples of their activities.