



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**MOLEKULOVĚ IMPRINTOVANÉ POLYMERY JAKO  
REKOGNIČNÍ ELEMENTY PRO STANOVENÍ MARKERŮ  
ONEMOCNĚNÍ**

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS AS RECOGNITION ELEMENTS FOR THE DETERMINATION OF  
DISEASE MARKERS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Bc. Milada Vodová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Jaroslava Bezděková, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1477/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Milada Vodová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jaroslava Bezděková, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Molekulově imprintované polymery jako rekogniční elementy pro stanovení markerů onemocnění

### Zadání diplomové práce:

1. Základní rešerše o dané problematice
2. Příprava a optimalizace částic molekulově imprintovaného polymeru selektivního pro zvolený marker
3. Ověření selektivity připraveného materiálu a izolace markeru z reálného vzorku
4. Vyhodnocení vlastností připravených imprintovaných materiálů

### Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Milada Vodová  
student(ka)

-----  
Ing. Jaroslava Bezděková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na přípravu a optimalizaci molekulově imprintovaných polymerů (MIP) selektivních pro chymotrypsinogen A a využití těchto MIP jako rekogniční entity v senzoru. MIP byly připraveny pomocí suspenzní polymerizace za využití směsi funkčních monomerů na bázi metakrylátu. U připravených MIP byla provedena optimalizace (například vazebné vlastnosti, selektivita a izolace chymotrypsinogenu z komplexní matrice lidského dechu) byly provedeny za pomoci kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí ( $\lambda = 532$  nm). Na závěr byla demonstrována kombinace MIP s křemennými mikrováhami jako slibný sensor umožňující detekci bílkovin z kondenzátu lidského dechu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Molekulově imprintované polymery, kyselina metakrylátová, funkční monomery, křemenné mikrováhy, chymotrypsinogen

## **ABSTRACT**

The diploma thesis is focused on the preparation and optimization of molecularly imprinted polymers (MIP) selective for chymotrypsinogen A as well as on the use of these MIP as recognition entities in the sensor. MIP was prepared by suspension polymerization using a mixture of functional methacrylate-based monomers. Prepared MIP was optimized (e.g. binding properties, selectivity and isolation of chymotrypsinogen from a complex matrix of human breath) by capillary electrophoresis with fluorescence detection ( $\lambda = 532$  nm). Finally, the combination of MIP with quartz microbalances was demonstrated as a promising sensor for the detection of proteins from human breath condensate.

## **KEYWORDS**

Molecularly imprinted polymers, methacrylic acid, functional monomers, quartz crystal microbalance, chymotrypsinogen

VODOVÁ, Milada. Molekulově imprintované polymery jako rekogniční elementy pro stanovení markerů onemocnění. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131676>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jaroslava Bezděkové.

## PROHLAŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Jaroslavě Bezděkové, Ph.D. za umožnění vypracovat tuto diplomovou práci pod jejím vedením a za čas, který mi věnovala, za její trpělivost, pomoc při přípravě měření, za spoustu skvělých nápadů a nejvíce za pomoc a rady ohledně diplomové práce. Ráda bych chtěla poděkovat za skvělé nápady a rady při vypracování závěrečné práce doc. Mgr. Markétě Vaculovičové, Ph.D. Děkuji i celému kolektivu z Výzkumné skupiny bioanalýzy a genového inženýrství na Mendelově univerzitě v Brně za příjemné jednání během celkového měření na pracovišti.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
3.1	Analýza anorganických sloučenin v dechu .....	12
3.2	Analýzy těkavých látek v dechu .....	12
3.3	Analýza menších netěkavých molekul v dechu .....	14
3.4	Analýza proteinů v dechu .....	14
3.5	Kondenzát dechu .....	15
3.6	Předkoncentrační úprava vzorku .....	15
3.7	Metody detekce .....	15
3.7.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	16
3.7.2	Plynová chromatografie (GC) .....	16
3.7.3	Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	16
3.7.4	Blízká infračervená spektroskopie (NIR) .....	17
3.7.5	Biosensory .....	19
3.7.6	Křemenné mikrováhy (QCM) .....	22
3.8	Molekulově imprintované polymery (MIP) .....	23
3.8.1	Základní přístupy v molekulovém imprintingu .....	24
3.8.2	Typy polymerizace .....	25
3.8.3	Polymerní směs .....	26
3.8.4	Funkční monomer .....	27
3.8.5	Zesíťovací činidlo .....	27
3.8.6	Templát .....	28
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
4.1	Chemikálie .....	31
4.2	Přístrojové vybavení .....	31
4.3	Metody .....	31
4.3.1	Popis experimentu .....	31
4.3.2	Syntéza MIP částic .....	31
4.3.3	Ověření selektivity a senzitivity připravených MIP .....	33
4.3.4	Příprava značených proteinů .....	34

4.3.5	Charakterizace MIP částic .....	34
4.3.6	Příprava QCM čipu s navázanými MIP .....	34
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>37</b>
5.1	Složení polymerizační směsi.....	37
5.2	Optimalizace odstranění templátu.....	37
5.3	Ověřování vazebných vlastností .....	41
5.4	Ověření vazebné selektivity .....	46
5.5	Analýza kondenzátu dechu .....	47
5.6	Analýza na QCM čipu .....	48
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>52</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK.....</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>55</b>

# 1 ÚVOD

Diplomová práce je zaměřena na vytvoření senzoru využívajícího molekulově imprintované polymery (MIP) jako rekogniční element při detekci markerů onemocnění z kondenzátu dechu. Diagnostika z dechu (či jeho kondenzátu) si získává poslední dobou stále větší popularitu, protože představuje jednoduchý, bezbolestný a časově nenáročný odběr. Dechová analýza by tak v budoucnu mohla nahradit krevní testy či biopsii.

K detekci látek z kondenzátu dechu se v současné době používá nejčastěji plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, infračervená spektroskopie atd. Tyto metody jsou však finančně nákladné, nemobilní, vyžadují vyškolený personál a neumožňují detekci v reálném čase. Sensor navržený v diplomové práci by v budoucnu mohl potenciálně umožnit detekovat proteiny z kondenzátu lidského dechu, a tak pomoci včas identifikovat onemocnění a zahájit efektivní léčbu.

Jako rekogniční element senzoru byly zvoleny místo běžně používaných protilátek syntetické receptory – MIP. MIP umožňují vytvářet specifická vazebná místa selektivní pro otiskovanou molekulu v polymerní vrstvě. Tyto syntetické receptory mají v porovnání s přírodními protilátkami mnohem lepší stabilitu (odolávají vysokým teplotám, tlakům, působení rozpouštědel, působením kyselých či bazických podmínek, vlivu enzymů apod.), jejich výroba není finančně nákladná a je možné je použít opakovaně. Spojení MIP s křemennými mikrovahami (QCM), představuje jednoduše sestavitelný, přenosný, citlivý, jednoduchý na obsluhu a cenově dostupný sensor. Tato technika by mohla nalézt uplatnění zejména v lékařství a usnadnit tak složitou diagnózu pomocí komplexních a invazivních odběrů.

V diplomové práci byl vybrán jako modelový protein chymotrypsinogen A. Po optimalizaci kroků přípravy MIP by neměl být problém převést metodu na jiný protein, který se reálně vyskytuje v dechu a poskytne informaci o zdravotním stavu pacienta. Cena těchto proteinů je však výrazně vyšší než cena chymotrypsinogenu, proto je výhodnější optimalizovat metodu s cenově dostupnějším modelovým proteinem. Veškeré optimalizace před převedením na senzor (QCM čipu) byly provedeny pomocí kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí. Na závěr byla demonstrována kombinace MIP s křemennými mikrovahami jako slibný sensor umožňující detekci bílkovin z kondenzátu lidského dechu.

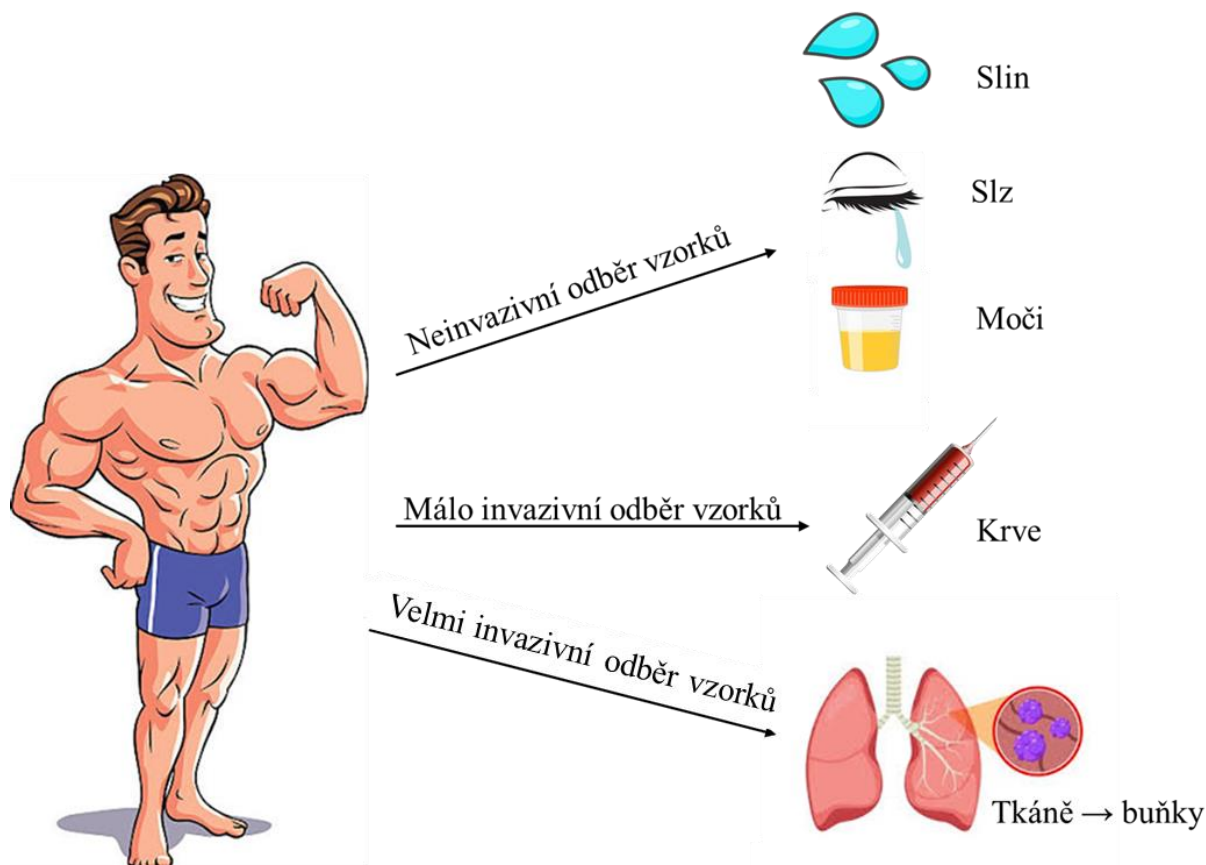


## **2 CÍLE PRÁCE**

1. Základní rešerše o dané problematice
2. Příprava a optimalizace částic molekulově imprintovaného polymeru selektivního pro zvolený marker
3. Ověření selektivity připraveného materiálu a izolace markeru z reálného vzorku
4. Vyhodnocení vlastností připravených imprintovaných materiálů

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

Rychlá identifikace různých onemocnění umožňuje brzké zahájení léčby a zvyšuje naději na zotavení pacienta. Z tohoto důvodu je snaha vyvíjet spolehlivá, levná a citlivá zařízení, která jsou schopná snadné a rychlé identifikace markeru daného onemocnění. Vývoj nových sensorů má velký význam zejména v oblasti biotechnologie, medicíny a farmacie [1, 2]. V současné době se pro stanovení markerů onemocnění využívá hlavně lidských tělních tekutin jako jsou krev, moč, sperma, pot, sliny atd. Odebírání těchto tekutin můžeme rozdělit na invazivní a neinvazivní viz obrázek 1 [3, 4]. V dnešní době je snaha získávat biologické vzorky pacientů, pokud možno, co nejméně invazivní cestou. Proto v nedávných letech získala velkou pozornost detekce onemocnění z dechu nebo jeho kondenzátu. Odběr dechu je jednoduchý, rychlý a neinvazivní. Navíc je v dechu obsaženo velké množství látek (těkavé složky, plyny, netěkavé molekuly nebo proteiny), které nám mohou poskytnout důležité informace o zdravotním stavu pacienta [3, 5]. V nedávné době byla vypracována i databáze (<https://hbdb.cmdm.tw/>), která má za úkol shromažďovat informace o látkách obsažených v dechu a jejich roli v detekci onemocnění, což svědčí o rostoucím potenciálu stanovení onemocnění z dechu.



Obrázek 1: Typy odběru vzorku: Neinvazivní (krev, moč, slzy), málo invazivní (krev), velmi invazivní odběr vzorků (tkáň → buňky) [3]

Na celém světě jsou plicní onemocnění jedny z nejčastějších zdravotních problémů zahrnující například chronické záněty [6]. V současné době jsou k odběru vzorku pro diagnózu

plicních onemocnění nejpoužívanější a nejuznávanější biopsie plic, bronchoalveolární laváž nebo odebrání pleurální tekutiny. Jejich odběr je invazivní, náročný a při odběru musí být použity sedativa. Z tohoto důvodu je analýza vydechovaného dechu slibnou alternativou. Jedná se o neinvazivní lékařský diagnostický postup, který nám poskytuje velké množství informací o zdravotním stavu pacienta. Je vhodný i pro děti a starší osoby. Odběr vzorku je jednoduchý, časově nenáročný, cenově dostupný a detekovatelný v reálném čase například oproti krevním testům, které jsou invazivní a nepříjemné pro pacienta. Dechová analýza by tímto v budoucnu mohla nahradit krevní testy, popřípadě biopsii plic, bronchoalveolární laváž atd. [3, 5].

Množství a složení látek ve vydechovaném dechu se mění v závislosti na zdravotním stavu pacienta, například sladká acetonová vůně v dechu může naznačovat nekontrolovaný diabetes, rybí zatuchlý pach v dechu souvisí s onemocněním jater jako je steatóza jater, či zápach podobný moči bývá spojován se selháním ledvin [7, 8]. Vysoké koncentrace hexanalů a heptanalů jsou spojovány s rakovinou plic. Z dechu může být detekována také tuberkulóza, schizofrenie, cystická fibróza atd. Některé změny v profilu vydechovaného dechu byly pozorovány i u těhotných žen postižených preeklampsií. Z dechu je možné diagnostikovat i určité onemocnění, sledovat jednotlivé metabolické procesy v těle, popřípadě účinnost léčby [7, 9, 10].

Analýza dechu může být provedena přímým odběrem (on-line analýzou) nebo může být provedena pomocí vzorkovacích nádob/lapačů (off-line analýza). Obě tyto analýzy mají své výhody i nevýhody, které jsou znázorněny v tabulce 1.

*Tabulka 1: Shrnutí výhod a nevýhod využitých při off-line a on-line analýze*

	<b>Výhody</b>	<b>Nevýhody</b>	<b>Reference</b>
<b>Off-line analýza</b>	Snadná přeprava, skladovatelnost před samotnou analýzou, vzorky se nejčastěji uchovávají ve sběrných nádobách, polymerních vacích, hliníkových sáčcích, skleněných lahvičkách atd.	Vysoký obsah vody ve vzorcích, odběrová nádoba by měla být inertní, odolná, snadná manipulace, může dojít ke kontaminaci vzorku	[11]
<b>On-line analýza</b>	Jednoznačná identifikace vzorku, přesná kvantifikace přímo ve vydechovaném dechu v reálném čase, při kterém nedochází k zanesení exogenních nečistot při odběru vzorku	Vysoký obsah vody ve vzorcích, vysoké náklady na analytické nástroje a vyžaduje zkušené pracovníky	[12, 13]

S analýzou vydechovaného dechu úzce souvisí i tzv. vzorkování dechu. Vydechovaný dech nemá stejné složení ve všech částech výdechu, proto lze dech podle koncentrací některých látek (jako je například CO<sub>2</sub>) rozdělit do 3 základních fází:

- Při **první fázi** je vydechován vzduch z dýchacích cest, který se nedostal do plic – nízká koncentrace CO<sub>2</sub>.
- V **druhé fázi** se vzduch smíchá se vzduchem pacientových plic – rostoucí koncentrace CO<sub>2</sub>.
- Pro diagnostické účely má největší význam **třetí fáze** (tzv. alveolární). V této fázi je vydechován vzduch z plic – koncentrace CO<sub>2</sub> je v této fázi víceméně konstantní. Dech v této fázi obsahuje vysoké koncentrace endogenních těkavých organických látek (VOC) a minimální množství kontaminujících látek.

Vizualizaci jednotlivých fází dechu lze monitorovat také pomocí zařízení nazývaném kapnometr. Dále také existují zařízení, která umožňují manuální nebo automatické odstranění první a druhé fáze [14, 15]. Nejednodušší typ odběru vydechovaného dechu je však tzv. smíšený odběr, který zahrnuje všechny tři fáze. Velkou výhodou tohoto odběru je jeho jednoduchost, na druhou stranu neposkytuje nejlepší kvalitu vzorku, protože dochází k větší kontaminaci látek vyskytujících se v prostředí úst a nosu [14].

Vydechovaný dech se skládá převážně z anorganických sloučenin (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, vodních par atd.), těkavých organických látek (aceton, ethanol, atd.), menších netěkavých molekul (adenosin trifosfát, 8-isoprostan, 3- nitrotyrosin, peroxid vodíku) a bílkovin (pepsin, cytokiny atd.) [6, 12, 14, 16-18]. Přínos analýzy těchto jednotlivých složek bude diskutován v následujících podkapitolách.

### 3.1 Analýza anorganických sloučenin v dechu

Vydechovaný dech obsahuje především molekuly H<sub>2</sub>O a CO<sub>2</sub>. Většina těkavých látek je rozpustná ve vodě. Analýza anorganických molekul může posloužit k monitorování zánětu plic a poskytnout informace o patofyziologii zánětlivých onemocnění. Příkladem je několik mediátorů jako je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, CO, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, CS<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> [6, 19-21]. Vydechovaný oxid dusnatý (NO) je v současné době používaný biomarker při diagnostice astmatu. Oxid dusnatý je enzymaticky produkován v lidských dýchacích cestách u zdravých jedinců. Koncentrace oxidu dusnatého se zvyšuje během zánětu dýchacích cest, jako je astma nebo bronchiectázii [22]. Dalším příkladem může být zvýšená koncentrace amoniaku při onemocnění ledvin, jater a peptických vředů [17, 20, 23]. Nejčastěji se analýza anorganických molekul provádí pomocí kapilární elektroforézy, hmotnostní spektrometrie, infračervené spektroskopie, kapalinové a plynové chromatografie, [17, 21, 22].

### 3.2 Analýzy těkavých látek v dechu

V současné době získala analýza těkavých organických sloučenin (VOC) přítomných při výdechu obrovský zájem, který souvisí pravděpodobně s pokrokem analytických technik a nanotechnologií. Tato metoda slouží pro detekci onemocnění, terapeutické monitorování a monitorování metabolického stavu VOC přítomných ve vydechovaném dechu. VOC

se nenachází pouze ve vydechovaném vzduchu, ale také je lze stanovit z moči a z hlenů, ale nejsnadnější odběr je z vydechovaného vzduchu, který má značnou výhodu oproti ostatním klinickým vzorkům a to nižší počet interferujících látek s komplikovanější matricí a sběr lze opakovat tak často jak je potřeba aniž by se měnily tekutiny přítomné na povrchu plic [5, 18].

VOC můžeme rozdělit na tři typy:

- **Endogenní VOC, které** pocházejí buď z vnitřních metabolických dějů. Tyto VOC mají potenciál poskytnout informace o fyziologickém stavu jedince. Některé endogenní VOC v dechu byly navrženy jako užitečné preklinické biomarkery různých onemocnění (rakovina plic, rakovina prsu či jaterní cirhóza).
- **Mikrobiální VOC** vznikají při metabolismu mikroorganismů uvnitř lidského těla (např. mikroorganismy obývající ústa, plíce, střeva) a mohou pomoci při identifikaci patogenů.
- **Exogenní VOC** pocházejí z vnějších prostředí (např. přeplněné budovy, dopravní prostředky). V tomto případě monitorování dechu umožňuje detekovat rizika spojená s expozicí prostředí [14, 24].

Vydechovaný vzduch tvoří nejčastěji směs dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého, inertních plynů, vodních par a těkavých organických sloučenin [25]. Nejjednodušší uhlovodík nacházející se ve vydechovaném dechu je **methan** pocházející z rozkladu nestrávených zbytků v tlustém střevě, **izopren** je vylučován při syntéze cholesterolu [26], **ethan** a **pentan** je produkován při peroxidaci mastných kyselin nebo u pacientů trpících několika chronickými onemocněními plic, jako astma a cystická fibróza [7], **aceton** vzniká při metabolizaci sacharidů a tuků u diabetiků při ketoacidóze [27]. **Metabolický ethanol** je součástí anaerobní glykolýzy (v nižších koncentracích než po požití alkoholických nápojů), existují také silné indikace, že endogenně produkován ethanol, je spojen s nadměrným množением bakterií ve střevě [28]. Doposud však jen několik sloučenin detekovaných v dechu prokázaly svou hodnotu jako biomarkery. V tabulce 2 jsou srovnány enviromentální koncentrace (koncentrace okolního vzduchu) a alveolární koncentrace (koncentrace vydechovaného dechu při 3. fázi) [14].

Tabulka 2: Rozsah enviromentální a alveolární koncentrace [9]

Látky	Enviromentální koncentrace		Alveolární koncentrace	
	Průměr (ppb)	Rozsah (ppb)	Průměr (ppb)	Rozsah (ppb)
<b>Methanol</b>	654	267-1 789	537	259-3 021
<b>Acetonitril</b>	196	34-1 820	269	43-1 840
<b>Ethanol</b>	924	71-6 244	532	47-8 668
<b>Methyl ethyl keton</b>	55	12-352	102	20-622
<b>Aceton</b>	217	52-2 432	721	116-10 179
<b>Izopren</b>	20,8	5-262	160	17-428
<b>n-Propanol</b>	79	16-2 093	98	31-619
<b>Benzen</b>	6,1	0,1-21	11,7	0,9-85,7
<b>Toluen</b>	5,2	0,1-22,1	5,8	0,6-25,9
<b>n-Heptan</b>	19,5	4,6-679,5	18,7	4,1-500,1
<b>SO<sub>2</sub></b>	10,3	4,3-25,7	5,9	3,1-16,7
<b>NH<sub>3</sub></b>	77	17-302	118	14-737

### 3.3 Analýza menších netěkavých molekul v dechu

V současné době se zvyšuje zájem o analýzu netěkavých molekul v dechu. Netěkavé látky v dechu jsou například organické molekuly (močovina, organické kyseliny, aminokyseliny a jejich deriváty), peptidy, povrchově aktivní látky a makromolekuly (DNA) [6, 29]. Tyto látky mohou umožnit včasnou identifikaci zánětu, oxidačního stresu či rakoviny plic [30, 31].

### 3.4 Analýza proteinů v dechu

V dnešní době se zvyšuje zájem o výzkum proteinů v kondenzátu vydechaného dechu, který kondenzuje při nízkých teplotách [32]. Prokázány byly změny v profilu proteinů vylučovaných při výdechu z plic mezi zdravými a nemocnými jedinci, lze je také použít k včasné detekci a monitorování některých z patologických onemocnění plic a k účinnosti léčby [6, 33]. Například pomocí analýzy proteinů je možné rozlišit mezi sebou kuřáka a nekuřáka, protože dech kuřáka obsahuje vyšší koncentraci proteinů jako je cytokeratin a kalgranulin B [33]. Navíc vědecké studie odhalily potenciální biomarkery proteinů pro astma, chronickou obstrukci plic a rakovinu plic [16].

Dalším, obdobně sledovaným proteinem obsaženým v kondenzátu dechu je pepsin. Pepsin je biomolekula s molekulovou hmotností cca 34 500 Da [34], která se přirozeně vyskytuje v žaludku, a umožňuje trávení bílkovin. [35]. Za posledních deset bylo s pepsinem spojováno mnoho onemocnění jako jsou například Laryngofaryngeální reflux, gastroezofageální reflux, otitis media s výpotkem, laryngomalacia, vokální řasa leukoplakie, rinitida, sinusitida, atrezie jícnu atd. [36]. Analýza proteinů se provádí nejčastěji pomocí hmotnostní spektrometrie s povrchově zesílenou laserovou desorpčí/ionizací, dvourozměrnou elektroforézou a tandemovými technikami jako je kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

### 3.5 Kondenzát dechu

Kondenzace vydechaného vzduchu je alternativní metodou odběru vzorku [37]. Jedná se o biologickou tekutinu, která se skládá z vody, těkavých a netěkavých látek [38]. Těkavé nebo částečně těkavé látky mají při tělesné teplotě znatelný tlak par a z tohoto důvodu je lze vydechat jako plyn. Netěkavé látky (soli, bílkoviny) se vylučují v kondenzátu dechu hlavně v malých kapičkách a dále se ředí vodními parami. V kondenzačním systému závisí tlak par těkavých sloučenin na teplotě kondenzace. Pro detekci bílkovin a netěkavých složek se většinou používá kondenzát dechu, který slouží k hodnocení zánětlivých onemocnění dýchacích cest jako je astma, chronická obstrukce plic, rakoviny plic nebo syndrom akutní respirační tísně [39].

### 3.6 Předkoncentrační úprava vzorku

Před samotnou analýzou je nutné zvýšit koncentraci zkoumaného vzorku, popřípadě danou látku ze vzorku přímo separovat. Pro docílení lepší detekce je typické předkoncentrování vzorku a následné detekce pomocí citlivých analytických zařízení jako je plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Pro zakoncentrování vzorku se používá nejběžněji [12, 14]:

- **Termální desorpční trubice** je založena na jednorázovém použití sorbentu, na který se navazují požadované látky. Výhodou je například vysoká citlivost, naopak nevýhodou tepelné desorpční trubice je zdlouhavá absorpce a analýza vzorku [14].
- Mikroextrakce na pevné fázi (**SPME**) je metoda umožňující zakoncentrování dechu pomocí absorpčních mechanismů na vhodném křemenném vlákne, které je potaženo polymerními materiály, jako je například polydimethylsiloxan a polyakrylát [40, 41]. Velkou výhodou je vysoká rychlost, opětovná použitelnost vlákna a minimální použití různých rozpouštědel. Nevýhodou je nižší citlivost, která je do značné míry závislá na typu vlákna a na použitém polymerním materiálu [14].
- Jehlový lapač (**NTD**), který má podobu duté jehly, potažené absorpčním materiálem, který absorbuje určité VOC. Tato metoda kombinuje žádané vlastnosti termálních desorpčních trubic a SPME [14].

### 3.7 Metody detekce

Metabolické produkty jsou ve vydechaném vzduchu zastoupeny poměrně v nízkých koncentracích na stopové úrovni v jednotkách ppm, ppb a nižší. Z těchto důvodů se většinou stanovují pomocí moderních a velmi citlivých fyzikálně-chemických metod jako je plynová

chromatografie (GC), kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie (MS), tandemové techniky (GC/MS), infračervená spektroskopie a biosenzory [7, 12, 42, 43]. Jednotlivé výhody a nevýhody vybraných metod detekce jsou přehledně shrnuty v tabulce 3.

### **3.7.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Jednou z metod pro stanovení vydechovaného kondenzátu dechu je HPLC. Jedná se o velmi účinnou separační techniku. Slouží zejména ke stanovení průměrné molekulové hmotnosti, posouzení heterogenity v případě kopolymerů nebo k separaci enantiomerů [44, 45]. Její výhodou je flexibilita, selektivní analýza, rozsáhlá oblast použitelnosti, reprodukovatelnost a rychlost analýzy. Na druhou stranu má i několik nevýhod jako je složitý mechanismus separace, náročnost instrumentace, limitace ve výběru detektoru, stabilita náplně kolony, použití velkého množství rozpouštědel apod. [45-47].

Příkladem využití metody nano HPLC–MS je studie vypracovaná prof. Kononikhina a kolektivu, kteří detekovali přibližně 119 proteinů a 164 metabolitů od intubovaných novorozenců. Tato studie vedla k navržení řady proteinů a metabolitů, které mohou působit jako potenciální biomarkery respiračních onemocnění [48].

### **3.7.2 Plynová chromatografie (GC)**

V posledním zhruba deseti letech je velká pozornost zaměřena na použití GC v kombinaci s různými druhy detektorů k detekci VOC v dechu za účelem odhalení nemocí a monitorování zdraví. Jedná se o separační techniku založenou na distribuci vzorku mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází, aby vzorek mohl být analyzován pomocí GC, měl by být stabilní a těkavý, pokud je analyt méně těkavý je možné těkavost zvýšit pomocí derivatizace (cílem je zvýšit těkavost, termostabilitu a analytickou odezvu). Další nevýhodou je časová náročnost analýzy [49]. Naopak velkou výhodou je flexibilita, selektivita analýzy a citlivost detekce [50].

Příkladem využití této metody je studie prof. Sancheze a kolektiv, kteří detekovali přibližně 25 složek lidského dechu, včetně důležitých biomarkerů, jako je aceton, ethanol, izopren, methanol, pentan, za použití párů kolon (polární kolona stacionární fáze trifluoropropylmethylpolysiloxan nebo poly (ethylenglykol) a nepolární kolona stacionární fáze dimethylpolysiloxan) v kombinaci se sorpčním lapačem se čtyřmi postelemi a plamenovým ionizačním detektorem [5].

### **3.7.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)**

Jedná se o analytickou metodu pro detekci respiračních biomarkerů. Touto technikou se dá určit elementární složení analyzované molekuly a chemické struktury molekul, jako jsou například peptidy nebo jiné chemické sloučeniny [51, 52]. Velká výhoda této techniky spočívá ve vysokém detekčním limitu, rychlosti, rozmanitosti, rozlišení a přesnosti. Také má několik nevýhod týkající se vyšších pořizovacích nákladů, nemožnosti měření v reálném čase a časová náročnost [50, 53].

Analýza vzorků byla prováděna pomocí protonového přenosu reakční MS, kterou použili ve své studii Moser a kolektiv. Ti do své studie zařadili do své studie zařadili 344 testovacích



osob jejichž dech byl vydechnut do vzorkovacího vaku. Například byl ve vzorcích některých testovacích osob stanoven izopren, benzen, acetonitril, toluen, methanol atd. [54].

Velký potenciál mají tandemové metody MS/MS, kdy jsou za sebou zapojeny dva hmotnostní analyzátory a mezi nimi je vložena kolizní cela. Například MS/MS použili ve své studii Fernández-Peralbo a kolektiv, kteří předběžně identifikovali 49 sloučenin, které zahrnovaly aminokyseliny, mastné kyseliny, mastné amidy, mastné aldehydy, oxoaniontové sloučeniny atd., příprava vzorků byla založena na srážení bílkovin, extrakci na pevné fázi hydrofilními a lipofilními sorbenty nebo lyofilizaci [55].

MS je možno kombinovat s dalšími metodami jako je GC. Příkladem je studie prof. Durán-Aceveda a kol., kteří vyvinuly postup k analýze dechu umožňující rozlišení mezi zdravými jedinci a pacienty s rakovinou žaludku [5]. Dalším příkladem použití GC–MS pro detekci markerů onemocnění markerů pomocí GC–MS může být Phillips a kolektiv, kteří detekovali rakovinu plic pomocí významných VOC jako byly například butan, 3-methyltridekan, 7-methyltridekan, heptan, methylhexan [31].

#### **3.7.4 Blízká infračervená spektroskopie (NIR)**

Další metoda využívající se pro detekci respiračních biomarkerů je blízká červená spektroskopie. Velkými výhodami je rychlost analýzy, neinvazivnost, nedestruktivnost, vysoká penetrace snímacího svazku záření, schopnost identifikace biologických molekul v plynných nebo kapalných směsích a je vhodná pro přímé použití [56-58]. Nevýhodou této metody je odběr vzorku, nemožnost analýzy mimo pracoviště, finanční a časová náročnost [43].

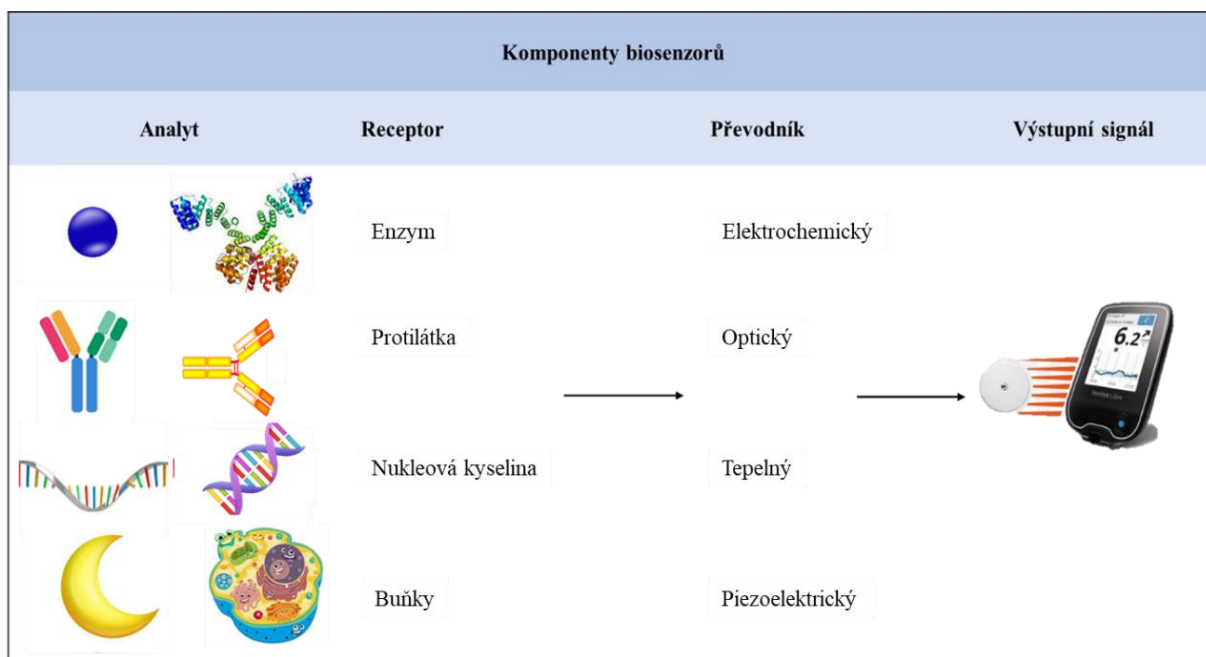
Lou a kolektiv využili NIR ve studii, kterou provedli pro přenosné monitorování oxidu uhličitého ve vydechovaného dechu. Měření v reálném čase byla prováděna pro detekci expirogramů oxidu uhličitého od zdravých subjektů v klidu a během cvičení, kde byly získány rozdílné koncentrace oxidu uhličitého v mrtvém prostoru plic a alveolárních plynech a vydechovaný oxid uhličitý se výrazně zvýšil se zvyšující s fyzickou aktivitou [59].

Tabulka 3: Shrnutí výhod a nevýhod vybraných metod pro detekci VOC

	Výhody	Nevýhody	Reference
<b>GC</b>	Rozsáhla kapacita vzorku, flexibilita, selektivita analýzy, citlivější detekce	Vzorek musí být teplotně stabilní a těkavý, časová náročnost	[49, 50]
<b>HPLC</b>	Rozsáhla oblast použitelnosti, flexibilita, selektivita analýzy, stanovení průměrné molekulové hmotnosti, reprodukovatelnost, stabilita, rychlost	Složité mechanismus separace, náročná instrumentace, limitace ve výběru detektoru, stabilita náplně kolony, instrumentace ohřevu	[44-47]
<b>MS</b>	vysoký detekční limit, rychlost rozmanitost, rozlišení, přesnost	Finanční náročnost, nemožnost měření v reálném čase, časová náročnost	[50, 53]
<b>GC-MS</b>	Vysoká citlivost, robustní metoda, přesnost, snadné spojení GC-MS, rychlá identifikace separovaných látek	Rozdíl výstupního tlaku z kolony, finanční náročnost, nemožnost měření <i>in situ</i> , nemožnost měření v reálném čase, potřeba vysoce kvalifikované analytiky, časová náročnost	[7, 12, 43, 50, 60, 61]
<b>QCM</b>	Dlouhodobá stabilita, vysoká citlivost měření, vhodné pro měření v komplexním a opticky neprůhledném roztoku, cenová dostupnost, přenositelnost, rychlost provedení,	Nízké rozlišení, značné množství dat potřebných pro dobrou přesnost, nelze sledovat změny při velmi vysoké frekvenci	[50, 62-65]
<b>NIR</b>	Rychlost analýzy, neinvazivní měření, nedestruktivnost, schopnost identifikace biologických molekul v plynných nebo kapalných směsích, vhodnost pro přímé použití	Odběr vzorku, analýza mimo pracoviště, citlivost na vibrace, finanční a časová náročnost	[43, 56-58, 66]

### 3.7.5 Biosensory

Současné metody pro detekci vydechovaného dechu jsou nákladné a nemobilní. Jejich alternativou by v budoucnu mohly být biosensory. Biosensory jsou analytická zařízení složená z biologického rozpoznávacího prvku (receptor) a vhodného převodníku spojeného se systémem pro zpracování dat [67, 68]. Princip biosenzoru je znázorněn na obrázku 2.



Obrázek 2: Princip biosenzoru je založen na výběru vhodného analytu, receptoru a převodníku signálu

Biologickým rozpoznávacím prvkem mohou být enzymy, mikroorganismy, buňky, tkáně popřípadě jiné bioligandy [67]. Většina biologických materiálů je však finančně nákladná a jejich životnost na povrchu senzoru může být omezena, z tohoto důvodu byly jako rozpoznávací entita v této diplomové práci navrženy molekulově imprintované polymery (MIP) jako syntetická alternativa k biologickým receptorům. MIP mají v porovnání s biologickými rozpoznávacími entitami několik výhod (dlouhá životnost, robustnost, snadná příprava apod.) [67, 69]. V tabulce 4 a 5 jsou porovnány tři vybrané rekogniční elementy, konkrétně se jedná o protilátky (jako zástupci přírodních rozpoznávacích entit), dále aptamery (zaštiťují přechod mezi přírodními a syntetickými rozpoznávacími entitami, protože jsou složeny z v přírodě se vyskytujících nukleových kyselin, ale jsou syntetizovány uměle) a nakonec MIP (jako zástupci uměle syntetizovaných rozpoznávacích entit).

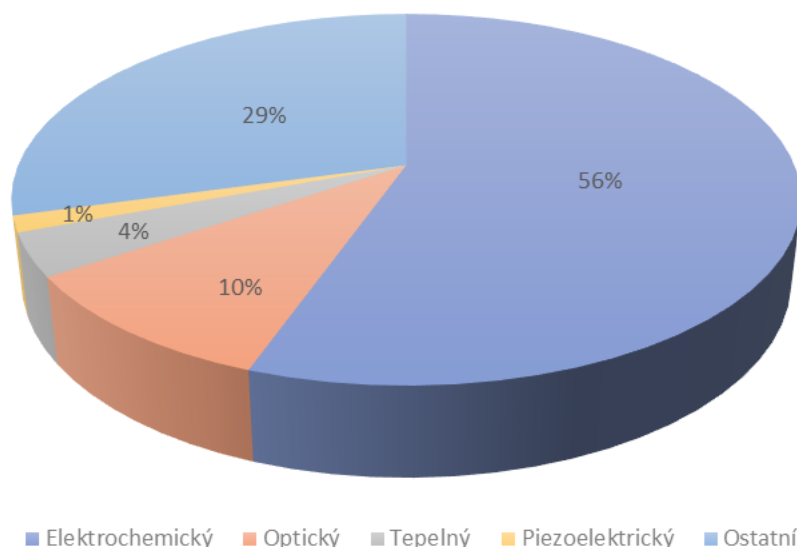
Tabulka 4: Porovnání protilátek, MIP a aptamerů [70, 71]

<b>Produkce a vývoj</b>			
<b>Charakteristika</b>	<b>Protilátky</b>	<b>MIP</b>	<b>Aptamery</b>
<b>Vytvoření</b>	Imunitní odpověď u zvířecího hostitele	Výpočetní modelování	SELEX
<b>Výroba</b>	Buněčné systémy savců	Chemická syntéza	Chemická syntéza
<b>Variabilita šarží</b>	Velmi vysoká	Nízká (v případě automatizovaného reaktoru)	Nízká
<b>Doba potřebná k vytvoření (včetně vývoje, výroby, validace)</b>	>6-8 měsíců	2–3 týdny (obvykle jeden den na výrobu)	2–4 měsíce (několik dní na výrobu)
<b>Náklady na vývoj nových subjektů</b>	15 000 – 25 000 \$	4 000 – 13 000 \$ (závislá na ceně templátu)	6 000 – 10 000 \$
<b>Produkční cena</b>	Velmi vysoká	Nízká	Střední
<b>Jednoduchost funkcionalizace</b>	Nízká	Velmi vysoká	Velmi vysoká
<b>Dostupnost monomerů</b>	Omezeno počtem aminokyselin	>4 000 variací funkčního monomeru	Limitován počtem nukleových bází

Tabulka 5: Porovnání vlastností protilátek, MIP a aptomerů [70, 71]

Vlastnosti			
Charakteristika	Protilátky	MIP	Aptamery
Velikost (nm)	10–20	10–300 (hydrodynamické)	2–8
Afinita	$10^{-12}$ – $10^{-9}$ M	$10^{-12}$ – $10^{-9}$ M	$10^{-12}$ – $10^{-9}$ M
Imunogenicita	Vysoká	Neznámá	Nízká
Tepelná stabilita	Nízká	Velmi vysoká	Vysoká
Stabilita v organických rozpouštědél	Nízká	Velmi vysoká	Nízká
pH stabilita	Nízká	Velmi vysoká	Nízká
Enzymová stabilita	Nízká	Velmi vysoká	Nízká

Sensory založené na MIP jako receptoru mohou být kombinovány s celou řadou převodníků. Nejčastěji se používají elektrochemické, optické, gravimetrické nebo termické převodníky. Zastoupení jednotlivých převodníků v kombinaci s MIP je znázorněné na obrázku 3. Pro porovnání zastoupení jednotlivých převodníků v kombinaci s MIP byl pomocí databáze Web of Science vypracován koláčový graf znázorněný na obrázku 3. Z těchto dat je patrné, že MIP jsou nejčastěji kombinovány s elektrochemickou detekcí, (zhruba kolem 56 % sensorů). Obliba elektrochemických detektorů souvisí s jejich vysokou citlivostí, provozní jednoduchostí a možností vícenásobného měření v krátkém čase [72]. V předkládané diplomové práci jsou jako převodník sensoru zvoleny křemenné mikrováhy (QCM) propojené s počítačem s vhodným softwarem pro vizualizaci výsledků. Velkou výhodou těchto sensorů je schopnost detekce v reálném čase, cenová dostupnost, spotřeba malého množství vzorku a mobilita. Přestože je v současné době málo studií zaměřených na kombinaci MIP a QCM, zájem o tuto oblast postupně roste a jsem pevně přesvědčena o velkém potenciálu takovýchto sensorů.

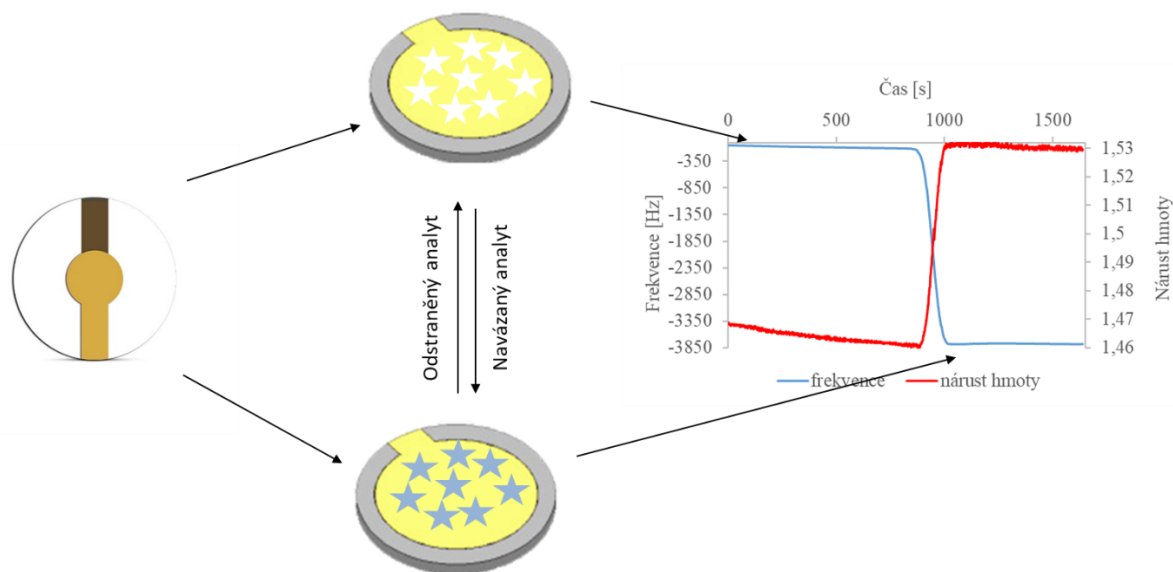


Obrázek 3: Zástupci jednotlivých převodníků v kombinaci s MIP za období 2017 až květen 2021

### 3.7.6 Křemenné mikrováhy (QCM)

Metoda QCM je založena na principu nepřímého piezoelektrického jevu [73, 74]. Piezoelektrický jev je schopnost krystalu generovat elektrické napětí při jeho deformování. Podmínkou pro piezoelektrický jev je použití takového krystalu, v jehož krystalické mřížce jsou současně kladné a záporné ionty (nejznámějším piezoelektrickým krystalem je monokrystal křemene a křišťálu) [75]. Takovýto krystal musí být vybroušen tak, že na jedné ploše jsou soustředěny pouze kladné náboje a na druhé ploše jsou soustředěny záporné náboje. Pokud bude takto vybroušený krystal natahován nebo stlačován kolmo k optické a elektrické ose, bude docházet k deformaci krystalové mřížky a ke generování elektrického napětí [76]. Obrácený jev (kdy se krystal deformuje v důsledku působení vnějšího elektrického pole) se nazývá nepřímý piezoelektrický jev.

V případě QCM se na povrchu křemenného čipu nachází dvě elektrody, do kterých je přiváděno střídavé elektrické napětí. Střídavé elektrické napětí vyvolává mechanické kmity s velmi stabilní rezonanční frekvencí. Frekvence závisí na typu výbrusu, tvaru a změně hmotnosti materiálu na elektrodách. Ze změny frekvence jde určit změna hmotnosti vztažená na jednotku plochy (Obrázek 4) [67, 77, 78].

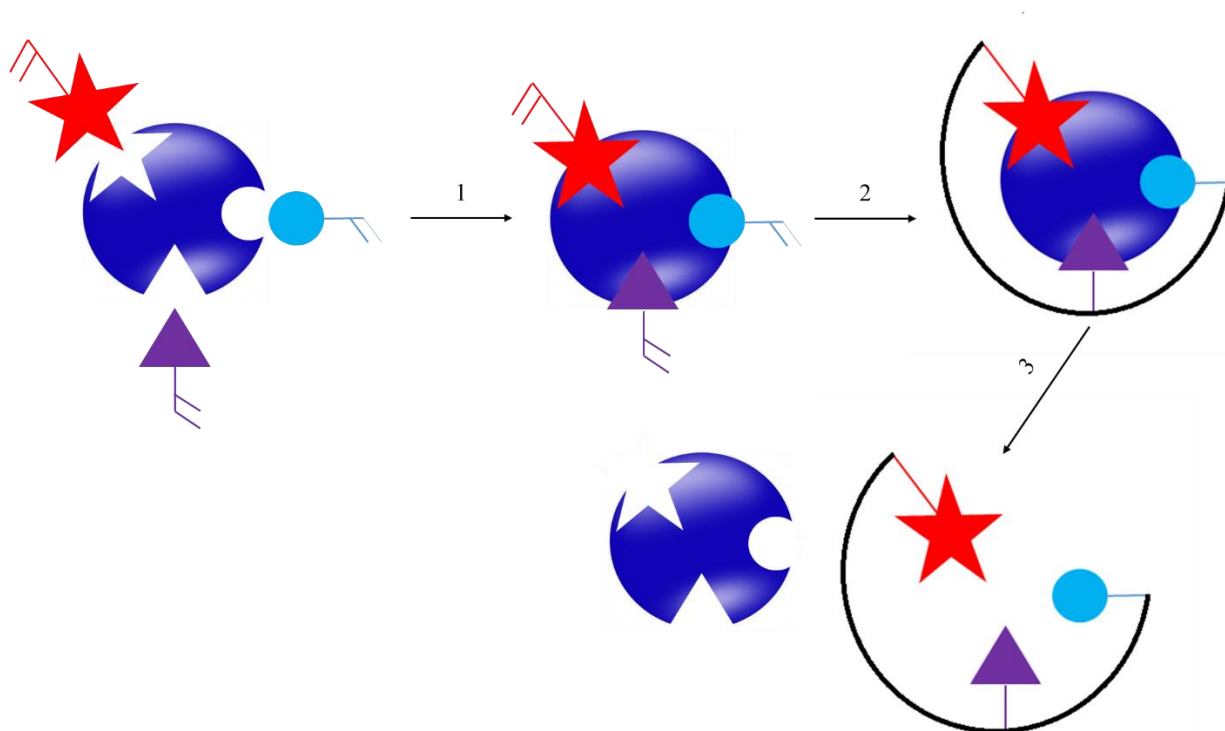


Obrázek 4: Navazování a odstraňování analytu a následná detekce pomocí QCM

Metoda QCM má řadu výhod např. vysoká citlivost měření (až 0,1 ng). Je vhodná pro měření v komplexním a opticky neprůhledném roztoku, můžeme sledovat vliv okolního prostředí na bobtnání a degradaci polymerní vrstvy, navíc je analýza jednotlivých vzorků cenově dostupná [63, 64]. QCM lze využít pro širokou škálu biologických a chemických entit s rozsahem molekulové hmotnosti od 200 Da až po celé buňky. Existuje mnoho studií o QCM v souvislosti s detekcí plynů a kapalin sloužících k monitorování prostředí, bezpečnosti a ochraně zdraví nebo analýze onemocnění. Nejčastěji se však používá k detekci peptidů, proteinů, oligonukleotidů, virů, buněk a těkavých organických sloučenin [67, 74, 79, 80].

### 3.8 Molekulově imprintované polymery (MIP)

Jedná se o techniku, při které dochází k tvorbě specifických vazebných míst komplementárních s otiskovanou molekulou (templátem) v zesíťovaných polymerech. Výsledným produktem molekulového imprintingu jsou tzv. molekulově imprintované polymery (MIP). Po ukončení polymerizace se odstraní otiskovaná molekula za použití bazických, kyselých podmínek nebo detergentů či rozpouštědel, přičemž dochází ke vzniku kavit selektivních pro otiskovanou molekulu. Selektivita kavit je zajištěna jejich tvarem, velikostí a polohou cílových funkčních skupin [81, 82]. Celé schéma přípravy je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5: Schéma znázorňující proces pro přípravu MIP: 1) interakce templátu s funkčním monomerem, 2) polymerizace, 3) odstranění templátu za vzniku kavity selektivní pro danou otiskovanou molekulu [83]

MIP mají díky svým rozpoznávacím vlastnostem široké uplatnění v celé řadě biochemických aplikací např. mohou sloužit pro různé separace, katalýzu, cílené uvolňování léčiv, dále mohou být využívány jako rozpoznávací prvky v chemických senzorech či chromatografických analyzátoch [81, 84].

V porovnání s běžně používanými biologickými makromolekulami (protilátky, enzymy, receptory atd.) mají celou řadu výhodných vlastností jako jsou vysoká chemická stabilita, vysoká afinita k cílovým molekulám, mechanická pevnost, možnost tvorby komplementárních vazebných míst pro různé typy menších molekul či větších struktur, produkce ve velkém měřítku a opakovatelné použití.

### 3.8.1 Základní přístupy v molekulovém imprintingu

V závislosti na typu vazebných interakcí mezi molekulou templátu a funkčním monomerem, můžeme molekulový imprinting rozdělit na tři různé přístupy [85, 86]:

#### 1. Kovalentní imprinting

Při tomto přístupu vznikají reverzibilní kovalentní vazby mezi templátem a funkčním monomerem. Po ukončení polymerizačního kroku dochází k vymytí templátu z polymerní vrstvy. Musí být zvoleny takové podmínky, při kterých dochází k rozštěpení kovalentní vazby a uvolnění templátu z polymerní vrstvy. Stejně jako templát se i analyt váže prostřednictvím kovalentních vazeb [87]. Velkou výhodou tohoto přístupu je stabilita a vysoká selektivita připravovaných



materiálů. Nevýhodou tohoto přístupu je pomalejší absorpční kinetika a náročnější příprava [88].

## 2. Nekovalentní imprinting

Nejpoužívanější technikou pro přípravu MIP je nekovalentní imprinting. Při tomto přístupu dochází mezi templátem a funkčním monomerem k nekovalentním vazebným interakcím jako jsou například vodíkové vazby, iontové interakce, interakce dipól-dipól, interakce  $\pi$ - $\pi$  vazeb, hydrofilní interakce či Van der Waalsovy síly [82, 89]. Při opětovném navázání otiskované molekuly dochází ke vzniku nekovalentních vazebných interakcí s vytvořeným polymerním materiálem [83]. Výhoda tohoto přístupu spočívá v jednoduchosti, velkém výběru komerčně dostupných funkčních monomerů a rychlosti vazebné kinetiky [90].

## 3. Semikovalentní imprinting

Tento přístup umožňuje kombinaci výhod kovalentního a nekovalentního imprintingu. Semikovalentní imprinting má dobrou stabilitu, selektivitu a rychlou vazebnou kinetiku. Bohužel je jeho příprava náročná na syntetické dovednosti [91, 92]. Při tvorbě MIPs se uplatňují kovalentní vazby a nekovalentní vazby se uplatňují při opětovném navazování otištěné molekuly [83, 91].

### 3.8.2 Typy polymerizace

V současné době existuje několik rozdílných přístupů při polymerizaci MIP. Volba vhodného přístupu se odvíjí od budoucí aplikace MIP, kdy mezi nejběžnější přístupy patří:

#### 1. Hromadná polymerizace v uzavřených prostorech

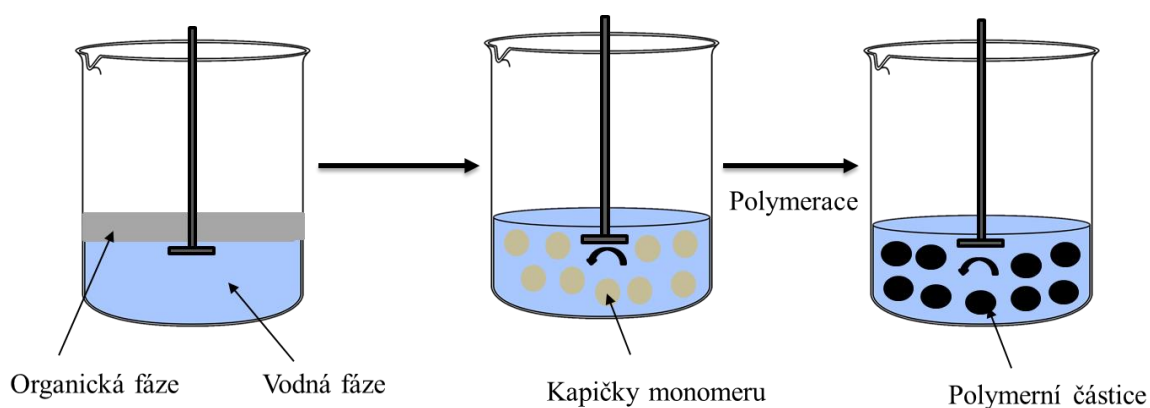
Je typ polymerizace uskutečňující se v miniaturizovaných reaktorech s přesně definovaným tvarem. Například tímto způsobem lze připravit kapilární kolony plněné pro vybraný MIP [93]. Tento přístup má však i řadu nevýhod, jako je vysoce exotermní reakce, kterou je obtížné kontrolovat, vytvořená struktura pórů je obecně heterogenní a má široké rozložení velikosti. To způsobuje zpomalení kinetiky v důsledku vnitřní difuze molekul směrem k rozpoznávacím místům. Skrze tyto nevýhody byla navržena metoda povrchového molekulového imprintingu [94]. U toho přístupu dochází k eliminaci vnitřní difuze, kdy vznikají kavity umožňující selektivní rozpoznávání otištěné molekuly v malé vrstvě přichycené na vhodně zvoleném nosiči.

#### 2. Příprava MIP na definovaných strukturách

Dochází k vytvoření tenké vrstvy imprintovaného polymeru na předem definované struktuře (sklíčko, destička apod.), a také je možno zvolit jako nosič imprintované vrstvy částice s definovanou velikostí (křemičité částice, magnetické částice, kvantové tečky apod.). Pomocí tohoto přístupu lze vytvořit velmi homogenní skupiny MIP [83].

### 3. Příprava nanočástic MIP a mikrosfér

Tento přístup umožňuje vytvořit MIP částice. Mezi tento typ polymerizace se řadí např. suspenzní polymerizace. Při přípravě suspenzní polymerizace jsou kapičky monomeru dispergovány ve vodě. Působí tak jako samostatné mikroreaktory znázorněné na obrázku 6. Polymerizace je zahájena organickým iniciátorem a probíhá jako miniaturní objemová polymerizace, jakmile se monomer začne přeměňovat na polymer, kapičky se začnou transformovat na lepkavé viskózní částice, které se tak postupně stávají sférickými pevnými polymerními částicemi. Vzniklé částice mají velikost ve stovkách nanometrů. Velkou výhodou je výroba polymerů z reaktivních monomerů radikální polymerace [95].



Obrázek 6: Schématické znázornění suspenzní polymerizace. Kapičky monomeru fungují jako samostatné mikroreaktory [95]

#### 3.8.3 Polymerní směs

V molekulovém imprintingu hraje důležitou roli výběr vhodného **funkčního monomeru** (FM), který interaguje s molekulami templátu. Většina monomerů má pouze jednu dvojnou vazbu, a tudíž jsou schopny tvořit pouze lineární řetězce. Proto je nutné do směsi přidat **zesíťovací činidlo**. Zesíťovací činidlo má dvě dvojně vazby, které umožňuje propojení lineárních řetězců FM v trojrozměrnou síť. Aby proběhla polymerní reakce, musí být zahájena přidávkem **iniciátoru**. Iniciátory jsou látky, které se lehce rozpadají na volné radikály (působením např. teploty, UV zářením apod.), dobře reagují s FM a vyvolávají řetězovou polymerní reakci [88].

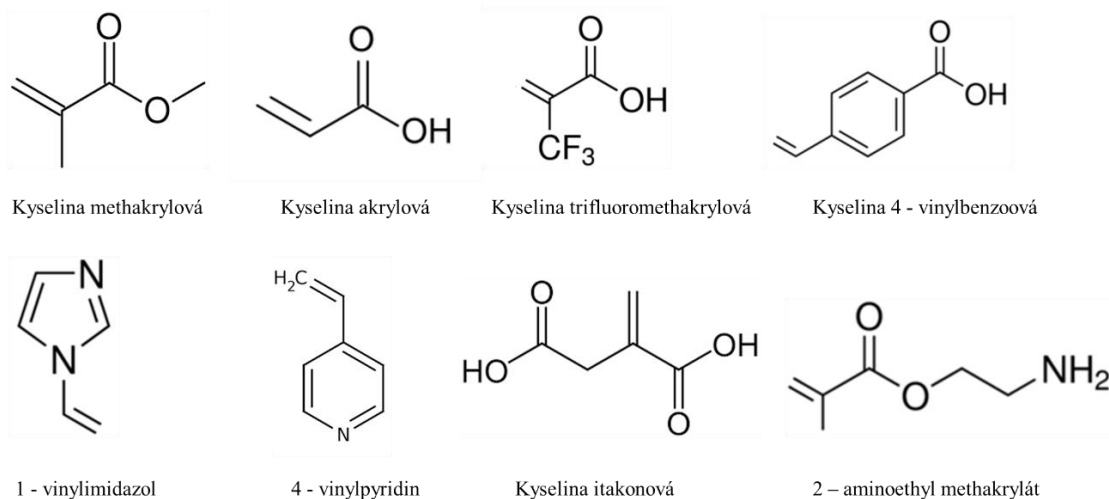
Celý mechanismus polymerizace volných radikálů probíhá ve třech stupních:

- Při prvním stupni dochází k **iniciaci**, která zahrnuje vytvoření aktivního centra s volnými radikály. Iniclace probíhá nejčastěji ve dvou krocích. V prvním kroku dochází ke vzniku volných radikálů z rozkladu iniciátoru. Ve druhém kroku dochází k přenesení volného radikálu na molekulu FM.
- Ve druhém stupni nazývaném **propagace**, dochází k růstu polymerního řetězce.
- V posledním kroku dochází k **terminaci**, což je proces ukončení propagace zablokováním aktivního centra. Pro ukončení reakce se nejčastěji používají dva

mechanismy, a to kombinace a disproportionace. Při kombinaci dochází ke spojení dvou růstových řetězců za vzniku jediné polymerní molekuly. Při disproportionaci dochází k přenosu jednoho atomu vodíku z jednoho rostoucího řetězce polymeru na jiný. Tak dochází k vytvoření různých koncových skupin bez vzájemného propojení [96].

### 3.8.4 Funkční monomer

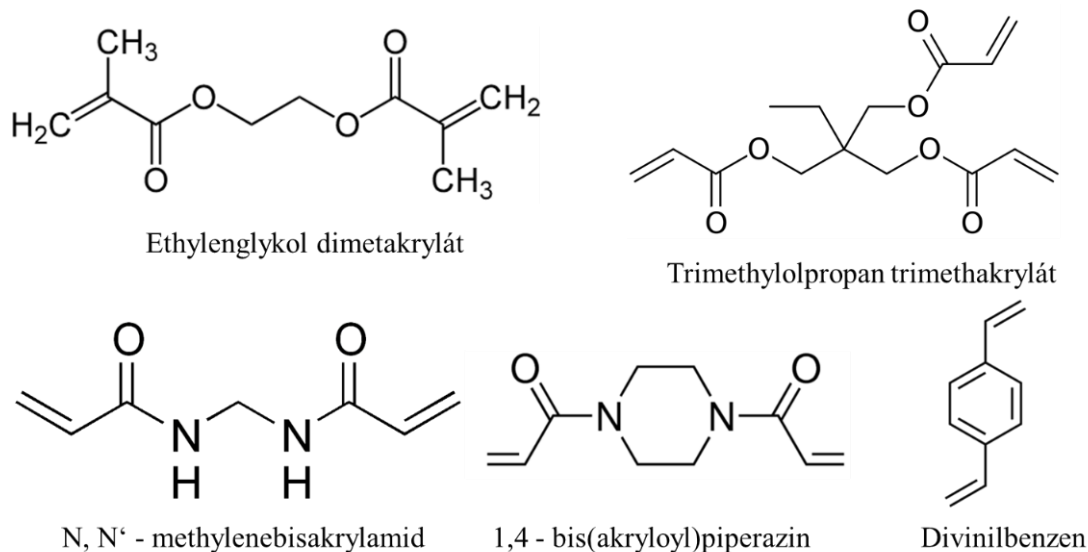
Na obrázku 7 jsou znázorněny běžně používané FM jako je například akrylamid, kyselina metakrylová, kyselina 2-(trifluormetyl)-akrylová a další [88]. Jedním z nejpoužívanějších FM je kyselina metakrylová [97]. Kyselina metakrylová může působit buď jako donor nebo jako akceptor vodíkové vazby. Tento FM může také působit jako iont karboxylové skupiny za vzniku stabilního komplexu s různými templáty. Vznik C-C vazby způsobuje metylenová skupina připojená k vinylovému uhlíku. Takto tvořené molekuly obsahují pouze lineární řetězce, pro vytvoření polymerní sítě je nezbytné přidat zesíťovací činidlo jako je např. ethylenglykol. Obecně může přítomnost přebytečného množství FM vést k tvorbě nespecifických vazebných míst [98].



Obrázek 7: Strukturální vzorec vybraných FM [83]

### 3.8.5 Zesíťovací činidlo

Požívá se ke stabilizaci imprintovaných vazebných míst a polymerní matrice a ke schopnosti zachovat rozpoznání cílových molekul. Molekulové struktury nejběžnějších zesíťovacích činidel používaných k přípravě MIP pro malé organické molekuly jsou znázorněna na obrázku 8. Při použití templátu pro větší molekuly (např. proteiny, buňky), je nutné často použít více distančních jednotek, jako je například poly-(ethylenglykol)-dimethakrylát [83]. Při nízké hustotě zesíťování polymerního materiálu může docházet k tvorbě měkkých gelových MIP, což zabezpečuje rychlou difuzi potřebnou k navázání templátu [99].



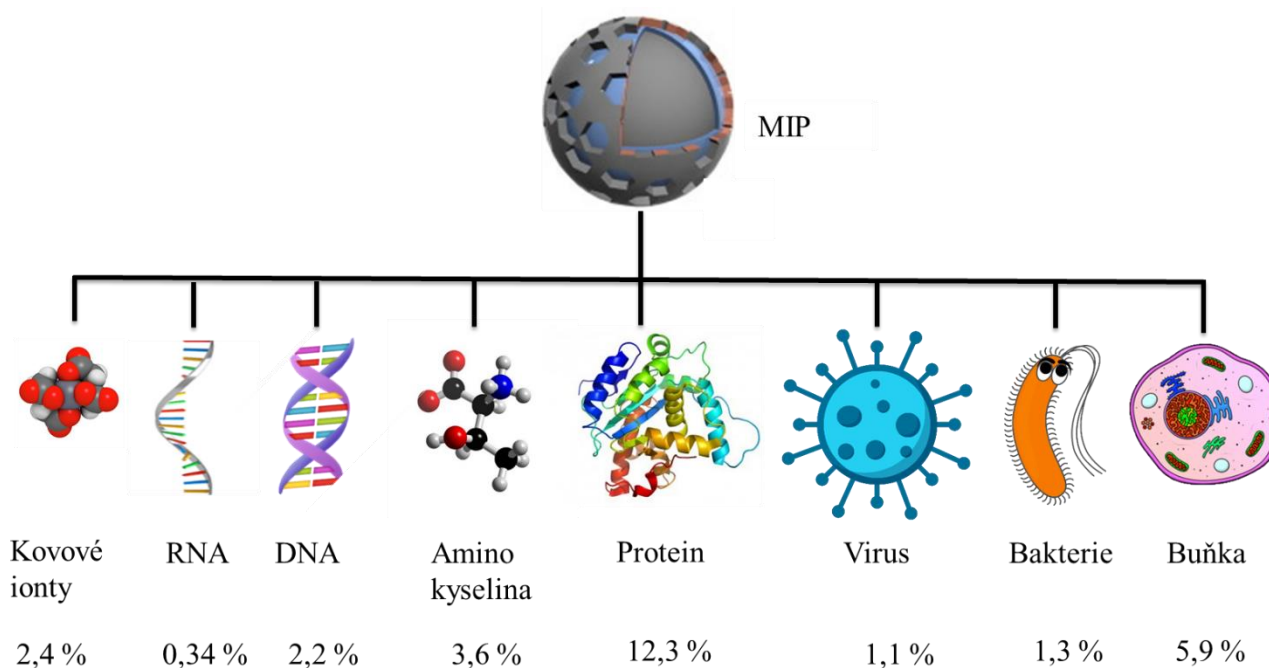
Obrázek 8: Zesíťovací činidla využívaná při tvorbě nekovalentního imprintingu [83]

### 3.8.6 Templát

Ideální templát by měl za podmínek polymerace splňovat tři základní požadavky:

- Prvním požadavkem je, že nesmí obsahovat funkční skupiny podílející se na polymerizaci nebo bránit jí.
- Druhým požadavkem je vynikající chemická stabilita.
- Poslední požadavek je, že templát musí obsahovat funkční skupinu umožňující interakci s FM [100, 101].

V současnosti lze imprintovat širokou škálu templátů a to od iontů, přes malé molekuly až po velké struktury. Nejčastěji se používají jako templát sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností jako jsou cukry, steroidy, deriváty aminokyseliny, léčiva, pesticidy [102], protože příprava MIP selektivních pro makromolekuly jako jsou například proteiny, viry, bakterie je daleko komplikovanější než v případě použití malých molekul [102]. Na obrázku 9 je znázorněno procentuální zastoupení otiskovaných templátů od kovových iontů přes proteiny až po buňky za časové období 2016–2020 (data byly čerpány z databáze Web of Science). Příprava MIP pro makromolekuly komplikují nejméně dva faktory (sterický a termodynamický). V důsledku sterického faktoru nemohou templáty proniknout dovnitř ani ven z polymerní sítě. Druhým faktorem je termodynamický zapříčiňující nestabilitu použitých templátů, při kterých dochází k vytvoření špatně definovaných rozpoznávacích míst v polymerním materiálu [103, 104].



Obrázek 9: Otiskované templáty a jejich procentuální zastoupení za časové období 2016-2020

Diplomová práce je zaměřena na stanovení látek obsažených v dechu. V současné době existuje několik vědeckých prací zaměřených na detekci markerů onemocnění z (kondenzátu) dechu pomocí molekulově imprintovaných polymerů jako rozpoznávacích entit. Přehled těchto prací je zaznamenán v tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled vybraných prací zaměřujících se na detekci markerů onemocnění z kondenzátu dechu pomocí MIP

Marker	Onemocnění	Typ sensoru	Rok publikace	Ref.
Hexanal, nonanal a benzaldehyd	Oxidační stres a rakovina plic	Piezoelektrický sensor	2017	[105]
Butyl-hydroxytoulén	Alzheimerova choroba	Electrochemický sensor	2018	[106]
Hexanal	Oxidační stres a rakovina plic	Chemiresistivní sensor	2019	[107]
Styren, dekan, izopren, benzen, 1-hexan a propylbenzen	Rakovinu plic	Akustický sensor	2020	[108]
Kyselina hexanová, kyselina heptanová a kyselina oktanová	Rakovina plic	Optický sensor	2020	[109]
Dusitanový ion	Zánětlivá onemocnění	Electrochemický sensor	2020	[110]

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

Kyselina metakrylová (MAA)  $\geq 99\%$ , N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)  $\geq 99\%$ , amonium persulfát (APS)  $\geq 98\%$ , hydroxid sodný  $\geq 98\%$ , dodekahydrát tetraboritan sodný  $\geq 99,5\%$ , fosfátový pufr tablety (PBS) neuvedeno výrobcem, 2-etansulfonová kyselina (MES)  $\geq 99\%$ , N-hydroxysukcinimid (NHS)  $\geq 98\%$ , dimethylsulfoxid (DMSO)  $\geq 99,9\%$ , fluoresceinu isothiokyanátu (FITC)  $\geq 99\%$ , N-Isopropylakrylamid (NIPAm)  $\geq 99\%$ , N-tert-butylakrylamid (TBAm)  $\geq 97\%$ , N-(3-Aminopropyl) methakrylamid hydrochlorid (APMA)  $\geq 98\%$ , N, N'-Methylenbis(akrylamid) (BIS)  $\geq 99\%$ , chymotrypsinogen  $\geq 99\%$ , tris(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS)  $\geq 99,8\%$ , poly(ethylenglykol)2-merkaptioethylether octová neuvedeno výrobce a poly(ethylenglykol)methylether thiol neuvedeno výrobcem byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA). EDC  $\geq 99\%$  byl zakoupen od firmy Thermo Scientific (USA).

### 4.2 Přístrojové vybavení

- QCM (KEVA, Brno, Česká republika)
- Agilent Technologies 7100 Capillary Electrophoresis (Německo)
- Zetasizer Nano Malvern (Velká Británie)
- Termoblok (Thermal shake lite) (USA)
- Centrifuga 5424 R eppendorf (Německo)
- Vortex (Grant-bio PV1) (Velká Británie)
- Sonikátor (Grant Ultrasonic bath XUBA 1) (Velká Británie)

### 4.3 Metody

#### 4.3.1 Popis experimentu

Diplomová práce je zaměřena na vývoj senzoru, který bude schopen neinvazivně detekovat proteiny, jako markery různých onemocnění z kondenzátu dechu za použití syntetického receptoru – MIP. Veškeré optimalizace přípravy MIP byly provedeny na vybraném modelovém proteinu – chymotrypsinogenu A, který je finančně dostupný, a má podobnou molekulovou hmotnost a izoelektrický bod jako pepsin, který je markerem gastroezofageálního refluxu v dechu.

#### 4.3.2 Syntéza MIP částic

1. Syntéza MIP se skládá z několika kroků (viz obrázek 11): V prvním kroku je připravena polymerizační směs, která se skládá z několika monomerů: 70 mol% NIPAm, 18 mol% TBAm, 5 mol% MAA a 5 mol% NAPMA (v případě změny povrchového náboje částic, byly poměry monomerů upraveny na 10 mol% MAA nebo 10 mol% NAPMA) a zesíťovacího činidla (2 mol% BIS) rozpuštěných v MilliQ vodě. Následně je polymerizační směs probublána 5 minut plynným dusíkem, aby bylo zajištěno odstranění veškerého kyslíku, který inhibuje polymerizační reakci.

2. Ve druhém kroku dochází ke smísení polymerizační směsi s templátem (250  $\mu$ l neznačeného nebo fluorescenčně značeného chymotrypsinogenu (Chym–FITC) o koncentraci 2 mg/ml. Polymerizační proces je zahájen přidávkem redoxního iniciátoru APS (2 mg) a molekuly TEMED (2  $\mu$ l) sloužící jako jeho aktivátor. Schéma této redoxní iniciace je znázorněno na obrázku 10.

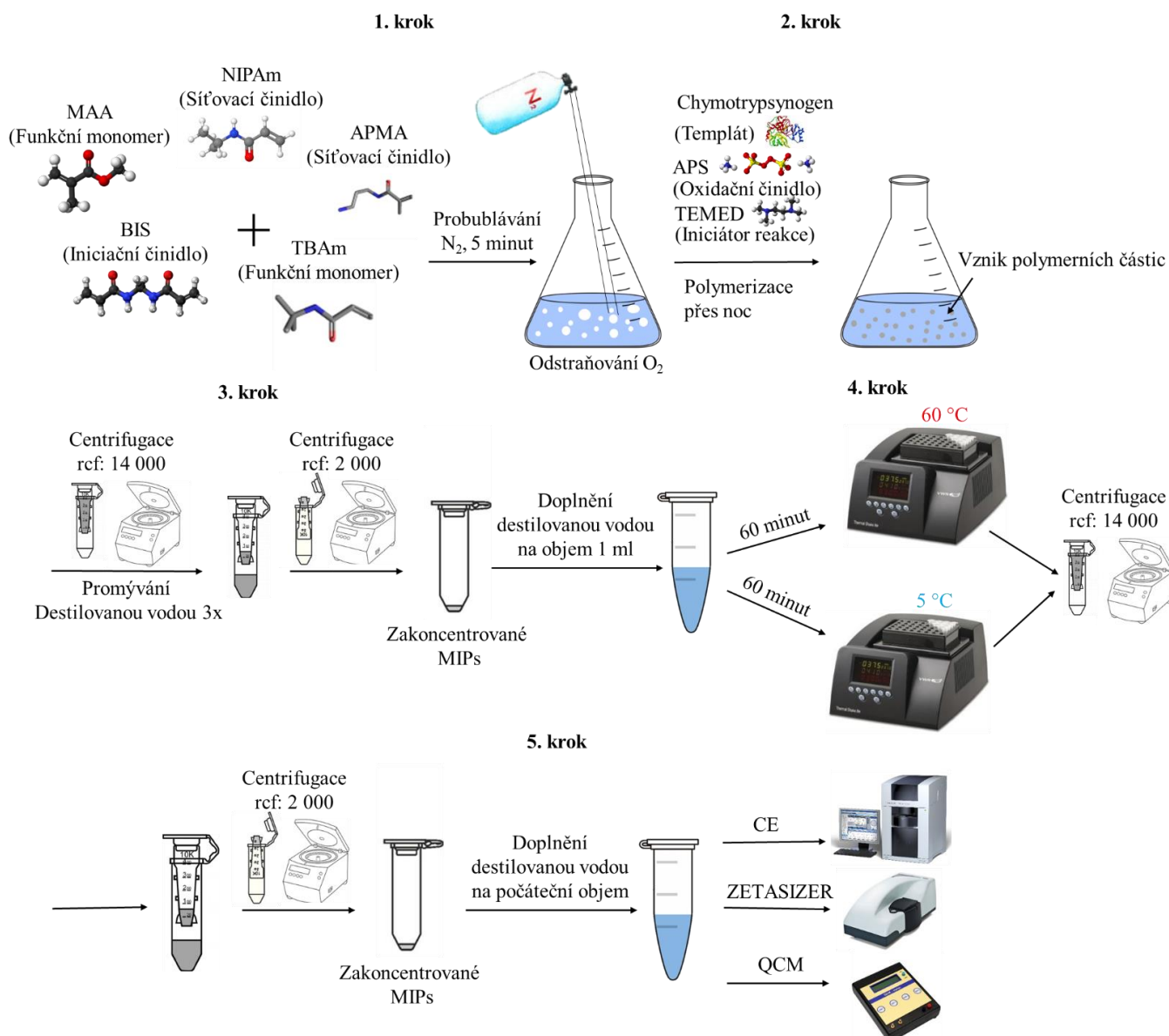


Obrázek 10: Schéma redoxní iniciace [111]

3. Polymerizační krok probíhá přibližně 18 hodin při laboratorní teplotě a je ukončen probubláním kyslíkem po dobu 5 min. Polymerizační krok vede k tvorbě malých částic o velikosti  $\sim$  110 nm. Připravené polymerní částice byly promyty třikrát vodou za použití ultra odstředivých filtru amicon s velikostí pórů 3 kDa (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, Sigma Aldrich, USA), což umožní vymytí zbytku nezapolymerizovaných monomerů, ale neumožní odstranění proteinu.
4. V dalším kroku dochází změnou teploty k odstranění templátu z MIP částic pomocí ultra odstředivých filtru amicon s velikostí pórů 50 kDa (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, Sigma Aldrich, USA). Jelikož je velikost molekuly proteinu 25 kDa, mělo by docházet k odstranění veškerého nezapolymerizovaného proteinu. Teplota potřebná pro uvolnění templátu ze struktury polymerní částice byla optimalizována (60  $^{\circ}$ C, 5  $^{\circ}$ C). Po odstraněném templátu vznikají kavity, které jsou schopny selektivně rozpoznávat imprintovaný protein a sloužit tak jako syntetická protilátka.

Paralelně s přípravou MIP částic byly syntetizovány také neimprintované polymerní částice (NIP), které jsou syntetizovány za shodných podmínek jako MIP, ale bez přítomnosti templátové makromolekuly (proteinu). NIP slouží k jako kontrola neselektivních interakcí mezi molekulou analytu a povrchem polymeru.





Obrázek 11: Schéma procesu přípravy MIP a následného využití

### 4.3.3 Ověření selektivity a senzitivity připravených MIP

Pro optimalizaci vymývání templátu a pro ověření selektivity a senzitivity MIP byla využita **kapilární elektroforéza 7100** (Agilent Technologies, Německo) s absorpční (UV/Vis) a s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (LIF). Jelikož bylo obtížné od sebe odseparovat studovaný protein a MIP, byl protein značen fluorescenčním barvivem. U označeného proteinu bylo snazší vyhodnotit vymývání templátu i opětovné navazování analytu. Experimenty probíhaly v kapiláře z taveného oxidu křemičitého s vnitřním průměrem 75 μm, celkovou délkou 64,5 cm a účinnou délkou 56 cm. Jako základní elektrolyt byl použit 20 mM borátový pufr o pH 10. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky (50 mbar, 2 s). Vložené napětí bylo 20 kV. Před každou analýzou byla kapilára promývána po dobu 200 sekund 1 M NaOH a 300 sekund roztokem základního elektrolytu.

#### **4.3.4 Příprava značených proteinů**

Pro fluorescenční značení proteinů (Chym–FITC) byl použit fluorescein isothiokyanát (FITC). Proces značení byl následující: 900 µl proteinu (chymotrypsinogen, hovězí séroví albumin nebo lysozym) o koncentraci 2 mg/ml v 0,1M karbonátovém pufru o pH 9 bylo smícháno s 100 µl FITC o koncentraci 2 mg/ml v DMSO. Takto připravená směs byla inkubována po dobu 18 hodin (7 °C, 300 rpm). Označený protein byl stočen přes ultra odstředivý filtr amicon s velikostí pórů 3 kDa při otáčkách 14 000 ref po dobu 5 minut a následně osmkrát promyt 10mM fosfátovým pufrem (PBS) o pH 7,4. Navázání FITC na protein bylo ověřeno na CE–LIF.

#### **4.3.5 Charakterizace MIP částic**

Velikost polymerních částic a jejich polydisperzita byla měřena dynamickým rozptylem světla (DLS) pomocí přístroje Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Velká Británie). Pro DLS měření byly polymerní částice ředěny v destilované vodě desetkrát. Pozorována byla také termosenzitivita připravených částic. Nižší kritická teplota roztoku (LCST) byla stanovena ve skleněné kyvetě (šířka 1 cm) skenováním teploty polymerních částic a sledováním změny jejich velikosti pomocí DLS. Polymerní částice byly automaticky zahřívány z 5 na 60 °C (s krokem 5 °C), s časovou prodlevou 5 minut mezi každou teplotou před provedením měření. Dále byl stanoven zetapotenciál připravených částic suspendovaných v MilliQ vodě při teplotě 25 °C.

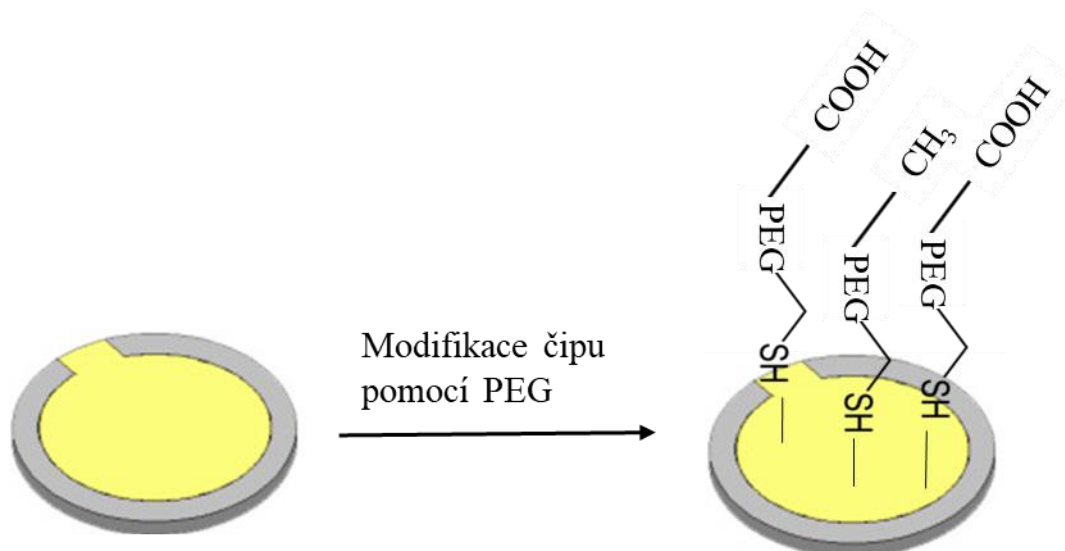
Výtěžnost MIP byla stanovena následujícím způsobem: MIP částice byly zakoncentrovány pomocí 50K ultra odstředivých filtru amicon a převedeny do zvážených eppendorf zkumavek. Zbytek vody byl z částic odpařen při teplotě 40 °C. Vysušené částice byly zváženy a byla dopočítána jejich výtěžnost. Výsledná výtěžnost byla stanovena jako průměr 4 měření.

#### **4.3.6 Příprava QCM čipu s navázanými MIP**

Kapilární elektroforéza je bezesporu rychlou a levnou metodou, která vyžaduje pouze malé množství sledovaného vzorku. Proto byla tato metoda použita na základní optimalizace MIP částic. Pro stanovení množství proteinu z dechu však tato metoda není použitelná, protože k detekci bylo nezbytné zkoumaný protein fluorescenčně označit. Cílem této práce je vytvořit přenosný, robustní, citlivý a cenově dostupný sensor, který umožní detekci zvoleného markeru z dechu nebo jeho kondenzátu v reálném čase. Proto byla tato část práce věnována propojení QCM detektoru a MIP částic jako rozpoznávacího elementu.

##### **4.3.6.1 Modifikace čipu**

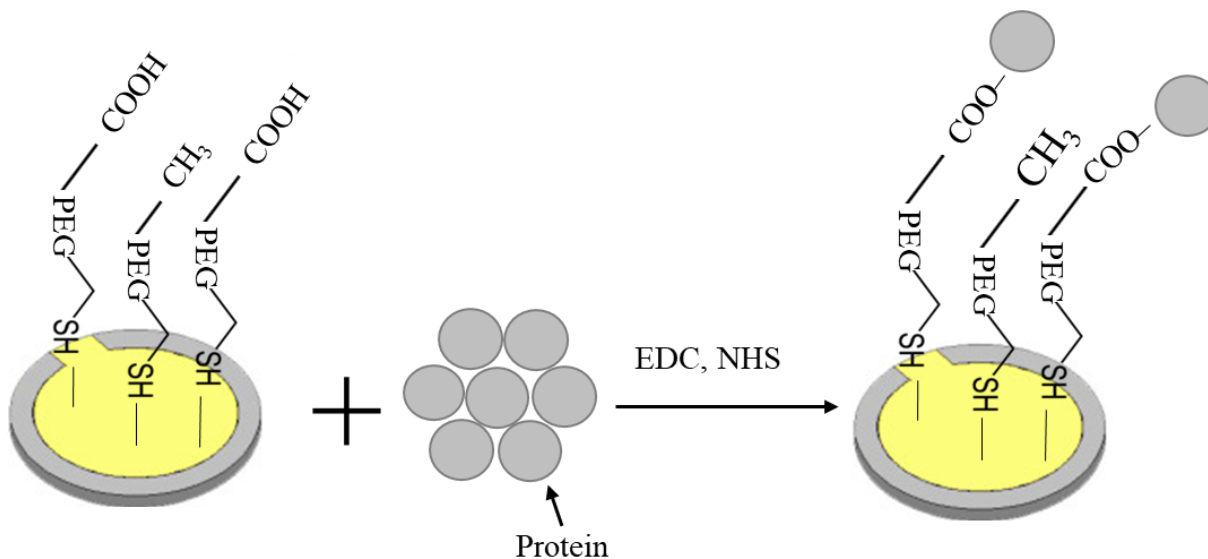
Modifikace čipu je znázorněna na obrázku 12. Čip byl očištěn 70 % ethanolem, destilovanou vodou a vysušen plynným dusíkem. Modifikace zlaté vrstvičky čipu byla provedena pomocí kyseliny poly(ethylenglykol)2-merkptoethylether octové a poly(ethylenglykol)methylether thiolu rozpuštěných v destilované vodě v poměru 1:9. Inkubace čipu probíhala přes noc (přibližně 20 hodin). Následně byl čip opláchnut 70 % ethanolem, destilovanou vodou a osušen plynným dusíkem. Takto modifikovaný čip byl vhodný pro navazování proteinu.



Obrázek 12: Navazování PEG na zlatou vrstvičku čipu

#### 4.3.6.2 Navazování proteinu na povrch QCM čipu

Navazování proteinu probíhalo v několika krocích. Nejprve byla cely s čipem naplněna MilliQ vodou. Následně byla injektovaná směs 10 mg EDC a 50 mg NHS rozpuštěného v 0,5 ml MilliQ vody (dávkováno 10 min při průtoku 50  $\mu$ l/min). V dalším kroku dochází k dávkování chymotrypsinogenu o koncentraci 0,6 mg/ml v MilliQ (dávkováno 10 min při průtoku 50  $\mu$ l/min). Po naplnění cely proteinem byla vypnuta pumpa a čip byl v QCM cele inkubován po dobu 45 min. Celý proces je znázorněn na obrázku 13.

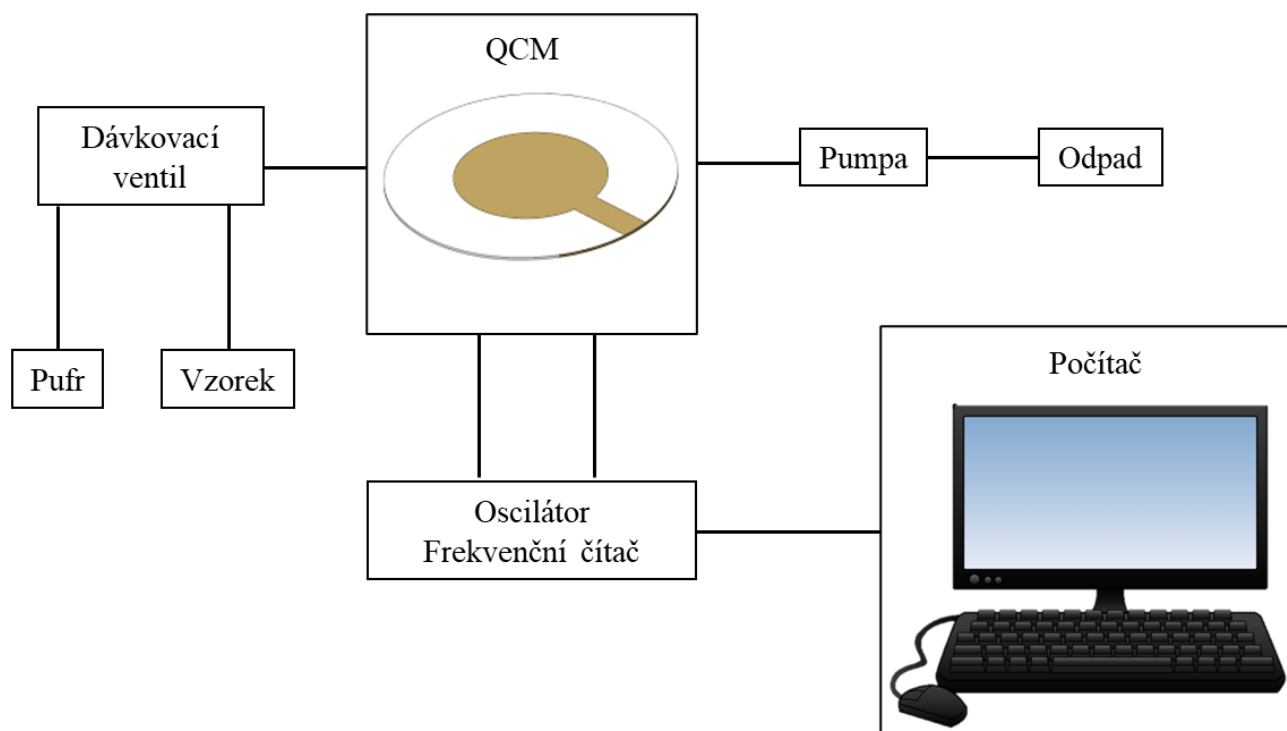


Obrázek 13: Navazování proteinu na aktivovaný čip

#### 4.3.6.3 Měření na QCM

Měření na QCM bylo prováděna pomocí analyzátoru QCM (KEVA, Brno, Česká republika), který slouží jako oscilátor i jako čítač kmitočtu. Piezoelektrické krystaly s imobilizovaným proteinem byly umístěny do průtokové cely (navržené a zkonstruované Karlem Lacinou). Transport kapalin zajišťovalo čerpadlo milliGAT (Global FIA, Fox Island, WA, USA)

a selekční ventil (LabSmith, Livermore, CA, USA). Schéma experimentálního nastavení je znázorněno na obrázku 14. Celý systém byl řízen pomocí interně vyvinutého softwaru LabTools, který umožňoval plně automatizovaný provoz. Křemenné krystaly (10 MHz, AT-cut, elektrody Cr + Au) byly zakoupeny od společnosti Krystaly Hradec Králové (CZ).



Obrázek 14: Schéma experimentálního nastavení [112]

QCM cela byla naplněna hnacím pufřem (10mM PBS pH 7,4) při průtoku  $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ . Po ustanovení rovnováhy byl injektován vzorek (různé koncentrace MIP částic – 40x, 80x a 100x ředěny) po dobu 15 minut. Před dávkováním byly MIP 10 minut sonikovány a 10 min vortexovány, aby se předešlo tvorbě agregátů. Následně byl opět dávkován pufř po dobu dalších 15 minut. Regenerace čipu byla provedena dávkováním teplého pufřu  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20 min.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Složení polymerizační směsi

Klíčovým krokem při návrhu MIP je volba složení polymerační směsi. V současné době existuje celá řada různých funkčních monomerů, které lze pro syntézu MIP použít. Pro imprinting proteinů je vhodné, aby polymerace probíhala bez přítomnosti organických rozpouštědel a zahřívání, které může způsobit denaturaci biomakromolekul. Proto byly zvoleny mírné podmínky polymerace srážením za použití akrylamidů ve vodném prostředí. Výchozí složení polymerační směsi bylo: NIPAm jako hlavní řetězec monomeru v kombinaci s MAA, APMA a TBAm jako negativně nabitá, pozitivně nabitá a hydrofobní funkční skupina a BIS jako síťovací činidlo. Tato kompozice se osvědčila v imprintingu proteinů a peptidů [113]. V případě potřeby změny povrchového náboje MIP částice byly poměry jednotlivých složek polymerní směsi měněny. NIPAm byl vybrán jako hlavní monomer kvůli své schopnosti měnit svoji velikost v závislosti na teplotě, což umožňuje efektivní odstranění templátu bez nutnosti použití rozpouštědel, detergentů apod., které velmi často způsobují problémy opětovném navazování analytu. Výťažnost MIP připraveným srážením ve vodných podmínkách byla stanovena na  $14,7 \pm 0,9$  mg.

### 5.2 Optimalizace odstranění templátu

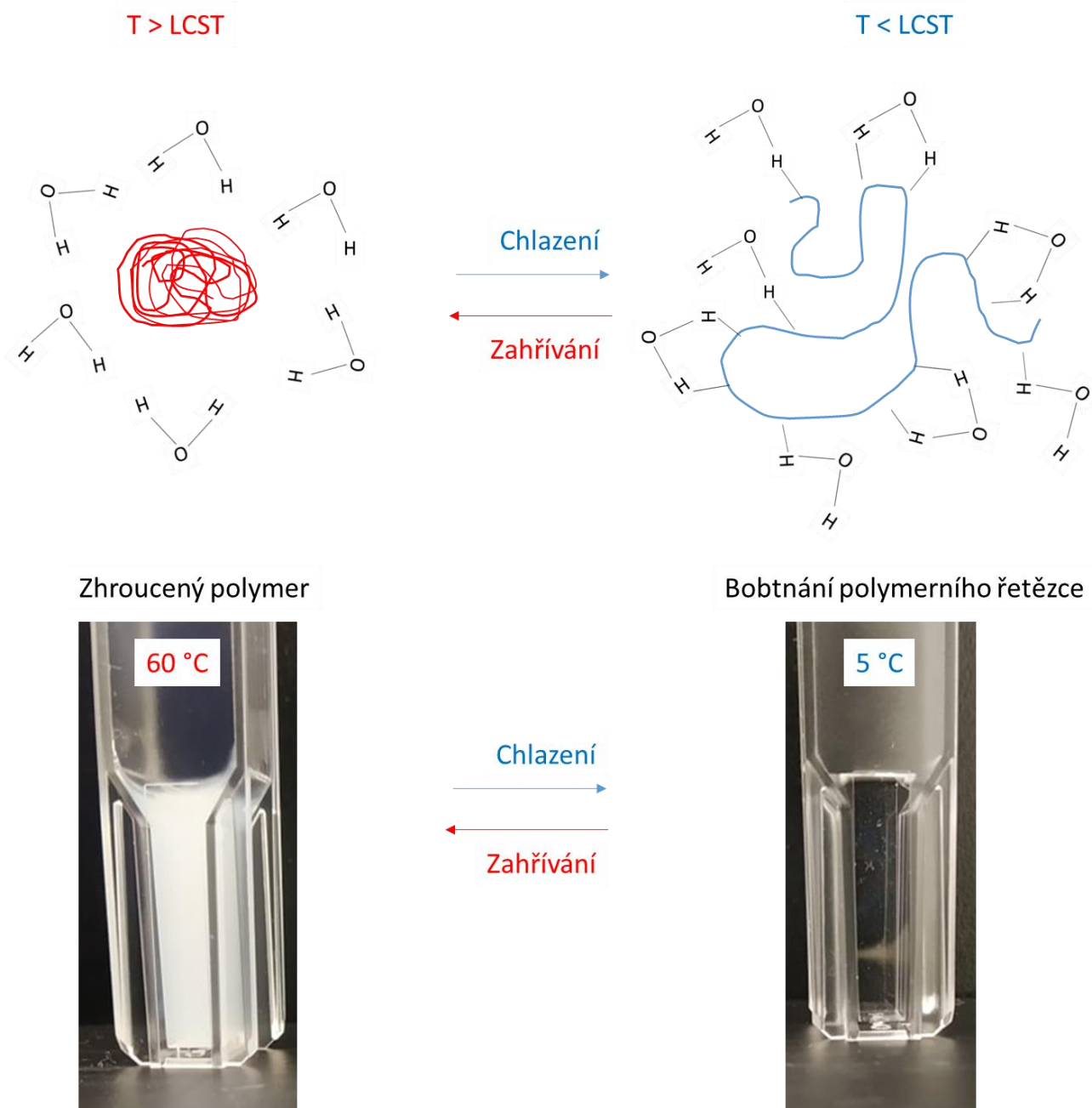
Velmi důležitým krokem při přípravě MIP je odstranění templátu z polymerní vrstvy částic, které vede k tvorbě kavit selektivních pro otiskovanou molekulu [114]. Běžně bývá templát z polymerní vrstvy odstraňován působením kyselých nebo bazických podmínek, rozpouštědel nebo detergentu. Používání těchto promývacích kroků však může vést ke kolapsu kavit, či změně rozpoznávacích vlastností v důsledku bobtnání apod. [115].

Jak bylo zmíněno výše v této práci byl jako základ polymerních částic zvolen termosensitivní NIPAm, který je schopen při nízkých teplotách zvětšovat svoji velikost a při vysokých teplotách svoji velikost naopak zmenšovat. Náhlá změna z hydrofilního na hydrofobní chování je založena na vodíkových vazbách, které jsou přítomny mezi polymerem a molekulami okolní vody. Při nízkých teplotách jsou polymerní řetězce solubilizované a hydratované, ale nad LCST je vodíková vazba oslabena, protože kinetická energie molekul je větší než energie vodíkové vazby mezi vodou a molekulami. Hydrofobní interakce mezi hydrofobním základním řetězcem a isopropylovými skupinami se tak stávají dominantní a způsobují změnu v polymerní konformaci z lineárních a flexibilních řetězců PNIPAM ke globulím v důsledku agregace hydrofobních skupin (viz obrázek 15) [116, 117].



Obrázek 15: Závislost změny velikosti polymerních částic na teplotě [117]

Nízká kritická teplota roztoku (LCST) je definována jako teplota minima binodálního fázového diagramu. LCST je entropicky řízeno molekulami vody, které zvyšují entropii systému dehydratací polymerního řetězce. Přechod LCST představuje fázový přechod prvního řádu. Pro charakterizaci teploty fázového přechodu LCST je používáno několik technik jako je rozptyl světla, kalorimetrie, NMR spektroskop a turbidimetrie [116].

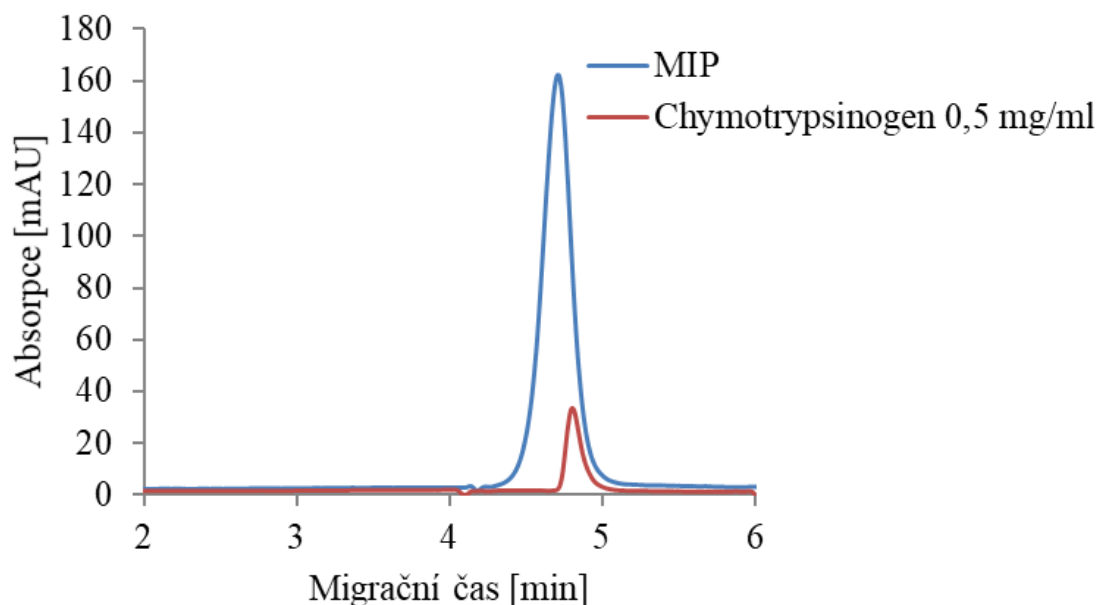


Obrázek 16: Vliv teploty na polydisperzní systém

Na základě termosensitivních vlastností polyNIPAm byl jako vymývací krok použita změna teploty. Ověřeny a porovnány byly dvě teorie, které by měly vést k uvolnění proteinů z polymerní struktury (Obrázek 16):

- A) Zchlazení pod LCST, při kterém dojde k rozvolnění polymerní matrice, která nebude tak pevně držet protein v kavitě, což povede k jeho uvolnění z MIP.
- B) Zahřátí nad LCST, při kterém dojde ke zmenšení velikosti MIP a tím i ke zmenšení kavit, což povede k uvolnění proteinu z MIP.

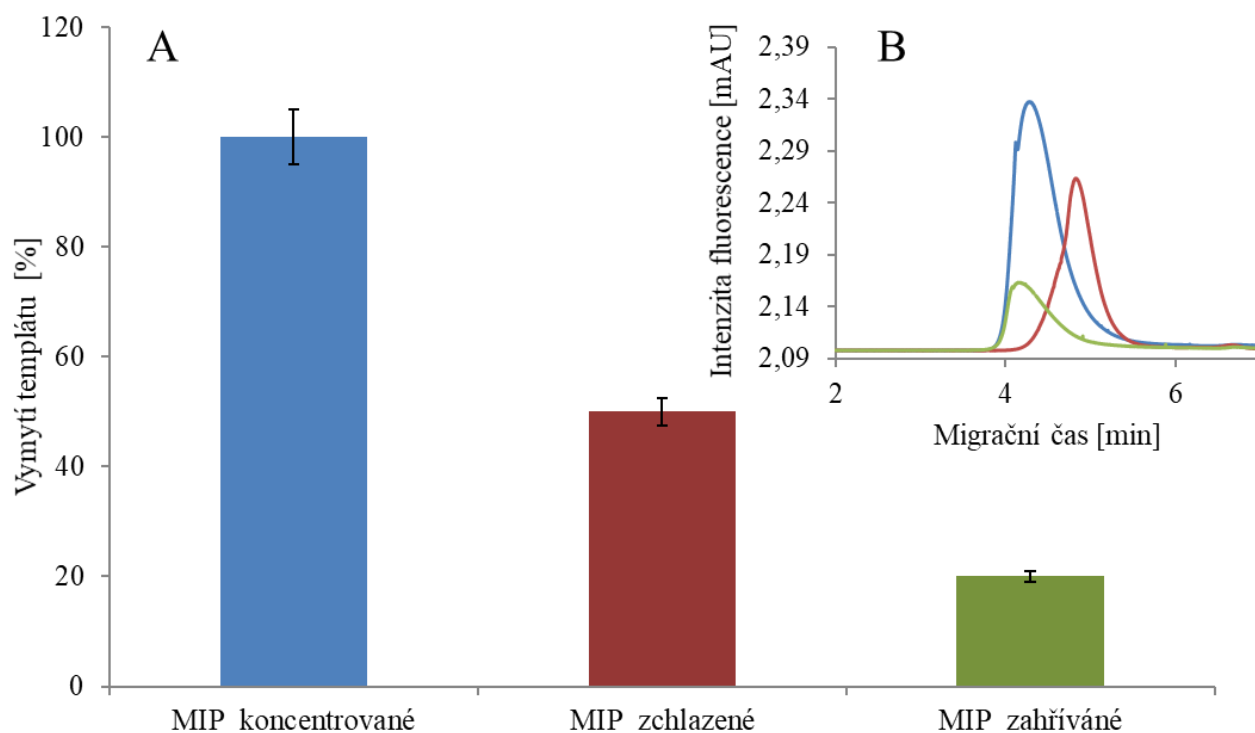
Pro optimalizaci vymývání templátu byla použita kapilární elektroforéza. Problém však byl v separaci MIP částic a proteinů. Navzdory optimalizaci separační metody (různé pufovací roztoky o různé iontové síle a různém pH, různé hodnoty dávkování a napětí) nebylo v rámci této práce dosaženo uspokojivého rozdělení MIP a proteinů (viz obrázek 17). Nemožnost separace byla pravděpodobně způsobena velmi podobnou pohyblivostí obou složek v elektrickém poli (podobnou mobilitou) za studovaných podmínek separace. Dalším problémem bylo i to, že při UV-VIS detekci bylo možné stanovit pouze vysoké koncentrace chymotrypsinogenu (LOD – 0,1 mg/ml). Proto byl sledovaný protein obarven fluorescenční barvou a jeho vymývání a navazování bylo pozorováno jako pokles či nárůst fluorescence.



Obrázek 17: Porovnání elektroferogramů MIP a chymotrypsinogenu o koncentraci 0,5 mg/ml, Separace probíhala v 20 mM borátový pufr o pH 10. Dávkován byl vzorek hydrodynamicky 50 mbar po dobu 2 s a při vloženém napětí 20 kV.

Pro odstranění templátu byl proveden experiment založený na změně teploty (zchlazení na 5 °C a zahřátí na 60 °C). Získaná data jsou znázorněna na obrázku 18. Z obrázku 18 A je patrné, že vhodnější způsobem pro odstranění templátu je zahřívání, které umožnilo vymytí kolem 80 % proteinu z polymerní vrstvy částic. Odstranění templátu chladem umožnilo vymýt pouze 50 % templátu. Při zahřívání dochází v důsledku dehydratace částice k jejich zmenšení, které pravděpodobně vede také k deformaci vytvořených kavit (Obrázek 18 B). Takto deformované kavity nejsou kompatibilní s imprintovaným proteinem, což má za následek vypuzení proteinu z vazebného místa. Při zchlazení naopak dochází k nabobtnání polymerní částice v důsledku nadměrné hydratace. I v tomto případě dochází k deformaci kavit a uvolnění

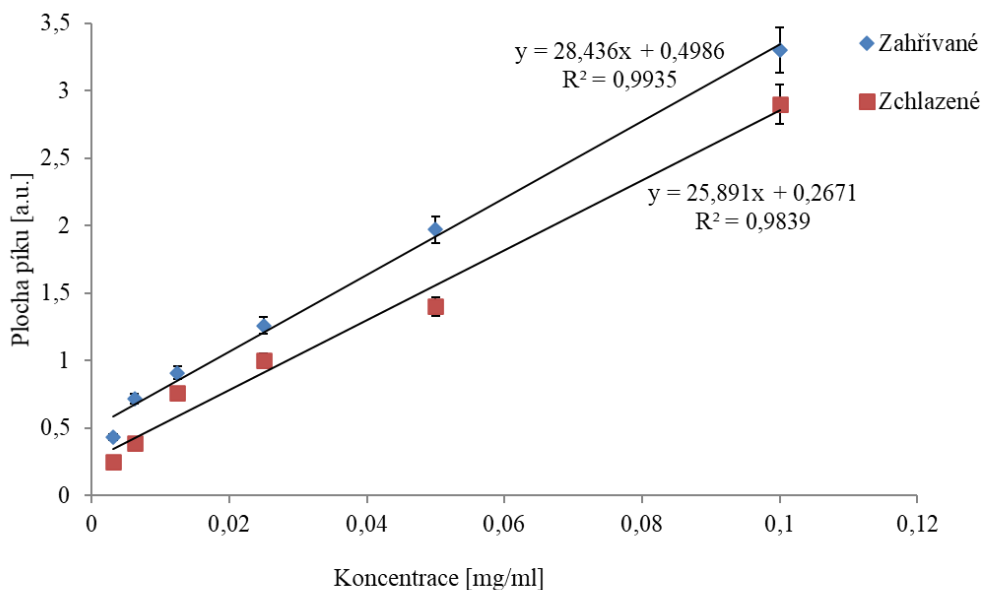
proteinu. Protein však pravděpodobně může zůstat zachycen v rozvolněném polymerním řetězci, což má za následek nižší efektivitu vymývání templátu.



Obrázek 18: A) Optimalizace vymytí chymotrypsinogenu z MIP částic; B) Elektroferogramy vymývacích kroků: Modrý pik představuje koncentrované částice, které nebyly žádným způsobem promyty (slouží ke kvantifikaci odstranění templátu); Červený pik představuje částice vymyté chladem; Zelený pik představuje částice promyté zahříváním.

U promytých MIP byly následně studovány a porovnávány vazebné vlastnosti. K promytým MIP byl přidán Chym-FITC v rozmezí koncentrací od 0,125 do 0,1 mg/ml. Na obrázku 19 jsou mezi sebou porovnány vazebné vlastnosti pro MIP, které byly vymyty zahříváním a zchlazením. Z naměřených dat je také patrné, že MIP promyté teplem vázaly daleko větší množství proteinu než MIP promyté zchlazením. Rozdíly ve vazebných schopnostech těchto MIP byly pravděpodobně způsobeny rozdílnou vazebnou kapacitou. U MIP vymytým zahříváním bylo odstraněno větší množství templátu, a proto bylo možné navázat větší množství Chym-FITC. V dalších experimentech tedy bylo pracováno pouze s částicemi vymytými pomocí zahřívání.

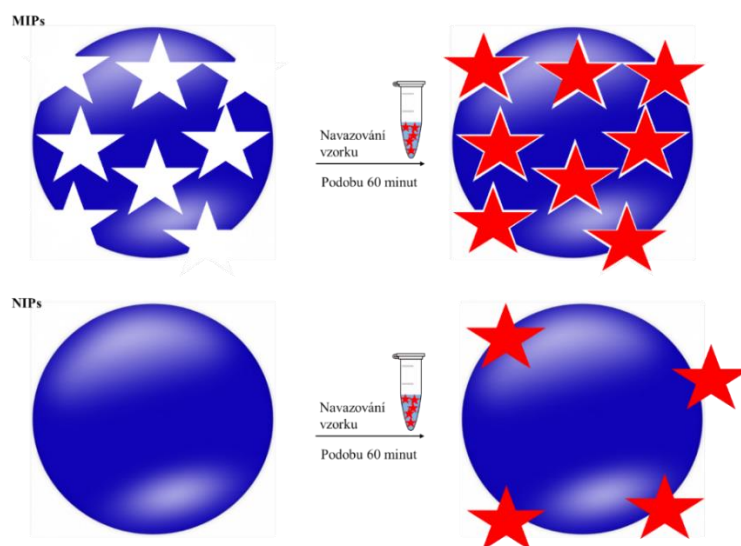




Obrázek 19: Kalibrační řada Chym-FITC navázaného na MIP vymytým zahřátím a zchlazením

### 5.3 Ověřování vazebných vlastností

V této části práce byla zkoumána role povrchového náboje MIP částic na rozpoznávací a selektivní vlastnosti [118]. Proteiny mají za daného pH oblasti s kladným a oblasti se záporným nábojem. Opačně nabitý povrch MIP částice by mohl zvýšit vazebné vlastnosti, ale také může vést k tvorbě neselektivních interakcí (vazba mimo oblast kavit). Proto byly syntetizovány také neimprintované polymery (NIP), které byly připraveny za stejných podmínek jako MIP, ale bez přítomnosti templátové molekuly. NIP slouží jako kontrola neselektivní interakce (viz obrázek 20).



Obrázek 20: Model pro ověření vazebných vlastností pomocí MIP/NIP. U MIP jsou hvězdičkami znázorněny kavity pro otiskovanou molekulu a po přidání vzorku, je patrné, že do kavit zapadají molekuly selektivní pro otiskovanou molekulu, na rozdíl od NIP, kde není žádná otiskovaná molekula a molekuly ze vzorku se tak vážou neselektivně

Byly tedy syntetizovány tři typy MIP/NIP částic: neutrálně nabitě (5 mol% MAA – záporný náboj, 5 mol% NAPMA – kladný náboj), kladně nabitě (5 mol% MAA, 10 mol% NAPMA) a záporně nabitě (10 mol% MAA, 5 mol% NAPMA). Následně byla proměřena velikost částic, jejich zetapotenciál a byl stanoven LCST. Jeden z důležitých parametrů MIP a NIP je velikost, která ovlivňuje chemické a fyzikální vlastnosti. Velikost byla stanovena za použití metody dynamického rozptylu světla, která je založena na měření fluktuace intenzity rozptýleného záření laserového paprsku. U připravených MIP a NIP byl změřen povrchový náboj, který také nese informaci o stabilitě a náchylnosti k agregaci. Obecně se za stabilní považuje suspenze s hodnotou zeta-potenciálu  $\pm 30$  mV. Průměrné naměřené hodnoty jsou zaznamenány v tabulce 7. Z naměřených dat vyplývá, že přídavek 10 mol % MAA a 10 mol % NAPMA měl vliv na výsledný zeta-potenciál. Neutrální MIP měly zetapotenciál  $7,20 \pm 1,13$ , po přidavku funkčního monomeru NAPMA, který je nositelem kladného náboje se zetapotenciál zvýšil na hodnotu  $12,90 \pm 1,37$  a u přidavku funkčního monomeru MAA, který je nositelem záporného náboje se zetapotenciál snížil na hodnotu  $4,26 \pm 0,55$ . Ke změně zetapotenciálu docházelo i u NIP, kdy neutrální částice nabývaly hodnotu  $6,41 \pm 1,24$ , po přidavku funkčního monomeru NAPMA se hodnota zvýšila stejně jako u MIP, a to na hodnotu  $10,28 \pm 1,81$  a po přidání funkčního monomeru MAA se snížil na hodnotu  $3,55 \pm 0,27$ . Rozdíl mezi zetapotenciálem MIP a NIP může být způsoben přítomností nevytvořeného chymotrypsinogenu ve struktuře MIP. Chymotrypsinogen má izoelektrický bod při pH 8,9, ve vodě, která má pH mezi 6-7, má tedy mírně kladný náboj a zvyšuje tak zetapotenciál MIP.

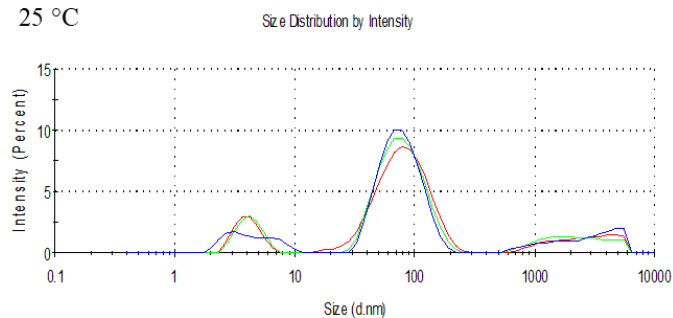
Také byla změřena velikost částic při rozdílných teplotách, kdy byla pro ukázkou vybrána teplota při 25 °C (Tabulka 7), která byla pro částice rozdílná. Největší byly MIP s přidavkem NAPMA, ale samy o sobě jsou tyto částice za laboratorní teploty polydisperzní a tepelný přechod měly zhruba kolem 30-35 °C. V literatuře bylo již dříve diskutováno o změně LCST pNIPAM v kombinaci s dalšími funkčními monomery. Např. přítomnost TBAm vede k snížení LCST pNIPAM [119]. Proto je pravděpodobné, že i přídavek MAA a NAPMA mohli tento přechod mírně ovlivnit. Na rozdíl od MIP, NIP měly velikost velmi podobnou. Rozdíl mezi velikostmi MIP a NIP může být rovněž způsoben přítomností templátu. MIP ve své struktuře zachycují protein, což pravděpodobně vede k nárůstu jejich velikosti. Jednotlivé přechody polydisperzního systému jsou znázorněny na obrázku 21 a vypsány v tabulce 7. Z naměřených dat je patrné, že přechod polydisperzního systému u MIP s přidavkem 10 mol% NAPMA byl mezi 25 až 35 °C. Ostatní připravené částice měly polydisperzní přechod vždy kolem 20 až 25 °C. Při nízkých teplotách se částice hydratují a rozvolní, a mají tak spíše strukturu gelu, z tohoto důvodu se domnívám, že DLS částice zaznamená jako velmi polydisperzní. Při zahřívání dojde k jejich dehydrataci a k tvorbě stabilních částic. Dále bylo pozorováno, že při zahřívání dochází k zakalení roztoku částic – znázorněné na obrázku 16.

Tabulka 7: Průměrná naměřená data zeta-potenciálu, LCST, velikosti a polydisperzity MIP a NIP

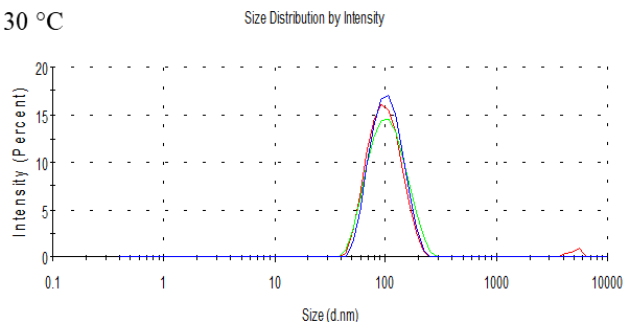
	Zeta potenciál (mV)	LCST (°C)	Velikost(nm) *nad LCST	Polydisperzita *nad LCST
<b>MIP</b>	7,20 ± 1,13	20–25	107,20 ± 1,82	0,17 ± 0,01
<b>MIP s přídavkem MAA</b>	4,26 ± 0,55	20–25	77,88 ± 0,80	0,16 ± 0,01
<b>MIP s přídavkem NAPMA</b>	12,90 ± 1,37	25–35	110,1 ± 0,82	0,29 ± 0,03

	Zeta potenciál (mV)	LCST (°C)	Velikost (nm) *nad LCST	Polydisperzita *nad LCST
<b>NIP</b>	6,41 ± 1,24	20–25	52,91 ± 0,56	0,29 ± 0,02
<b>NIP s přídavkem MAA</b>	3,55 ± 0,27	20–25	51,79 ± 4,90	0,13 ± 0,02
<b>NIP s přídavkem NAPMA</b>	10,28 ± 1,81	25–30	65,17 ± 1,094	0,22 ± 0,03

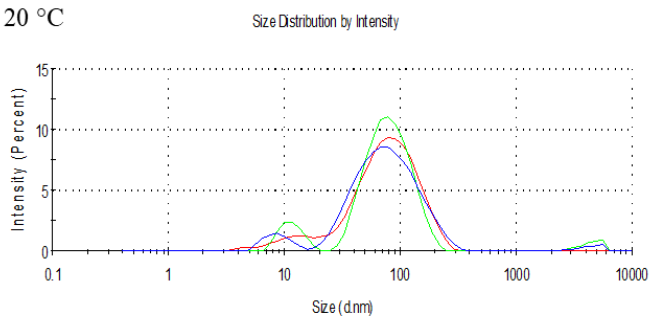
NIP + 10 mol % NAPMA  
25 °C



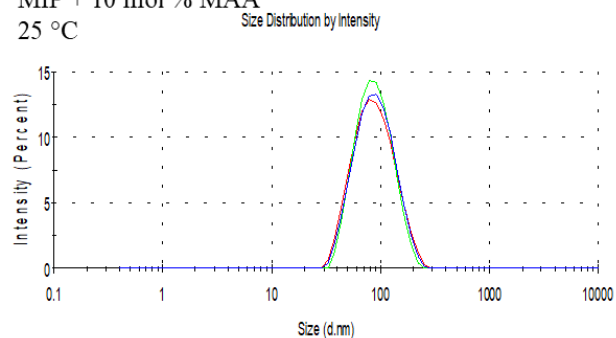
NIP + 10 mol % NAPMA  
30 °C

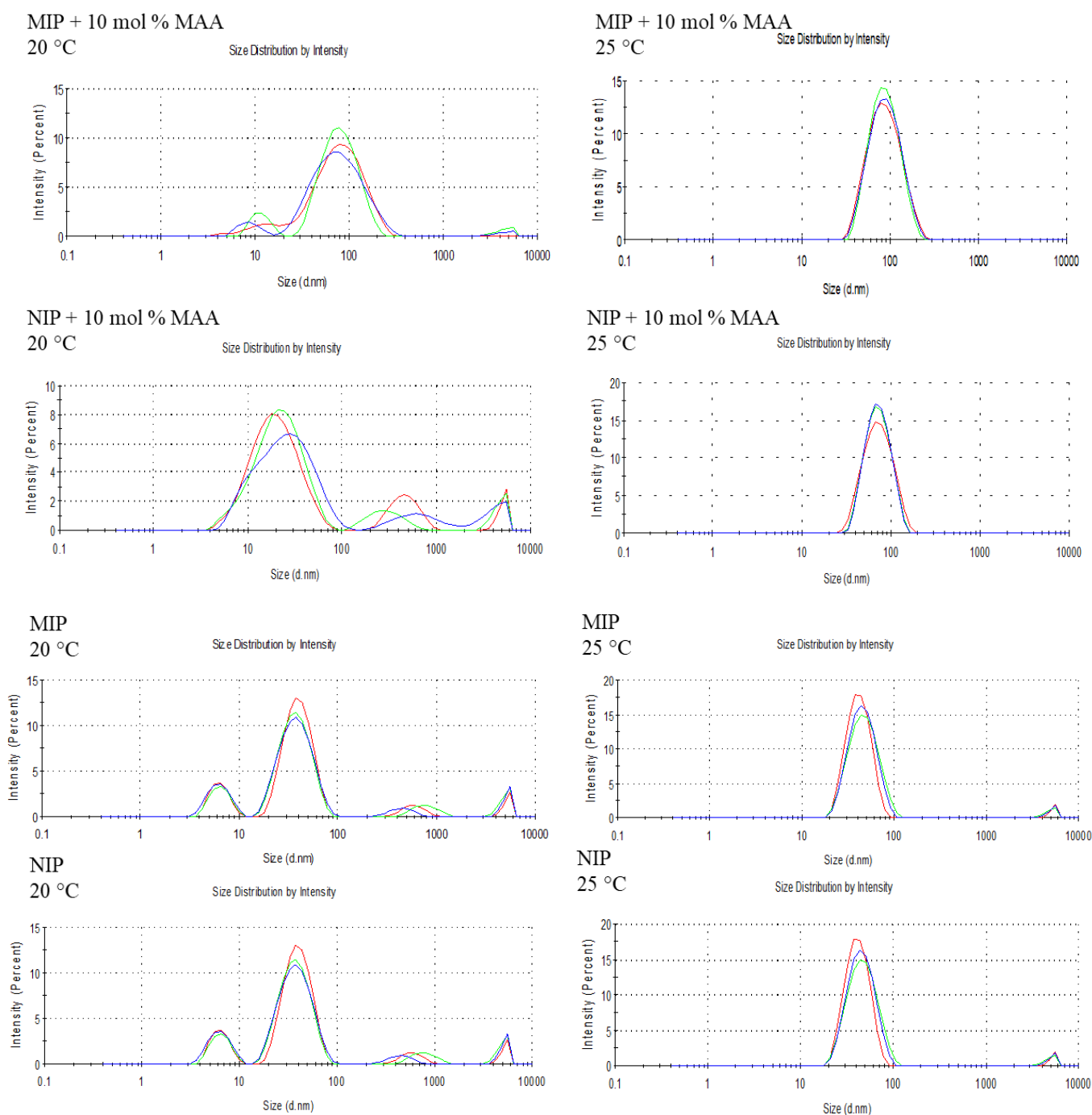


MIP + 10 mol % MAA  
20 °C



MIP + 10 mol % MAA  
25 °C

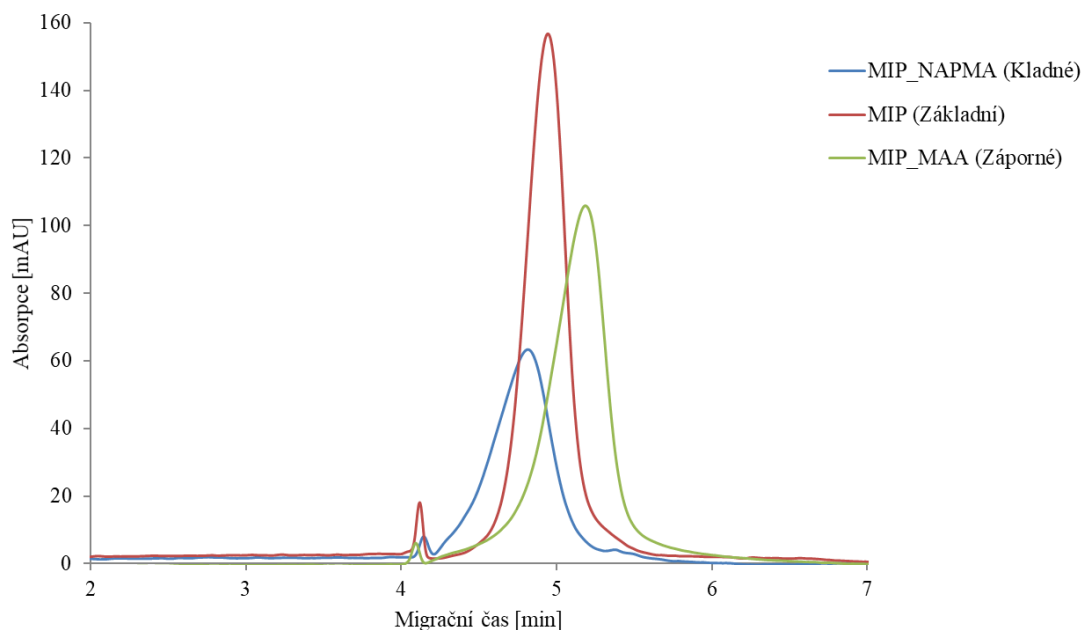




Obrázek 21: Teplotní přechody pro jednotlivé MIP a NIP

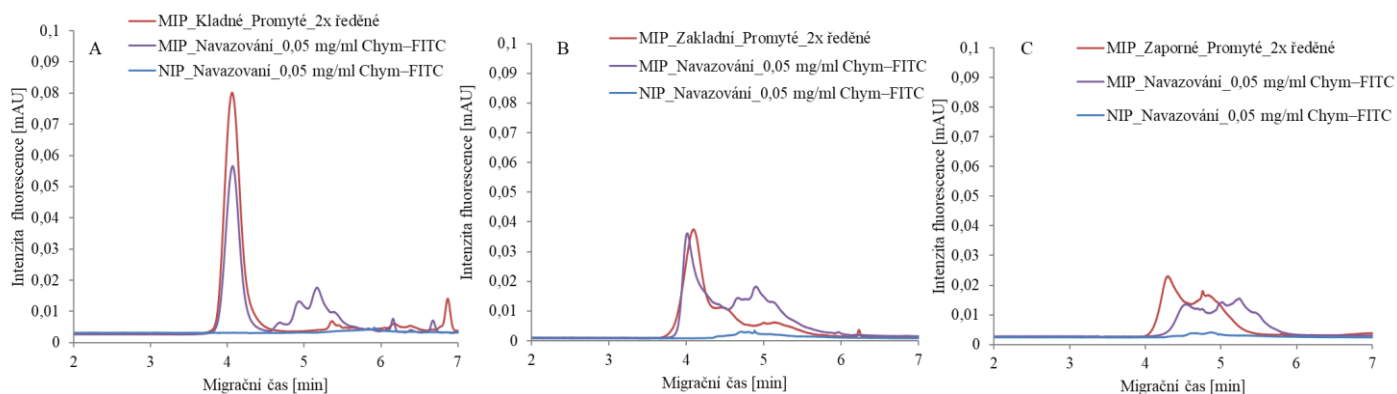
Na obrázku 22 jsou ukázány elektroferogramy základních (neutrálních) MIP, které jsou porovnány s MIP s přídavkem MAA (záporné) a NAPMA (kladné), kdy jsou patrné rozdíly v migračních časech, způsobené odlišným nábojem částic. MIP s přídavkem NAPMA měly kladný náboj, proto měly kratší migrační čas narozdíl od MIP s přídavkem MAA, které měly zápornější náboj, a tudíž delší migrační čas. Z tohoto důvodu můžeme říct, že přídavek MAA či NAPMA má malý vliv na separaci částic. Bohužel ani přes přídavek MAA a NAPMA nebylo

možno docílit rozdílných migračních časů mezi MIP a chymotrypsinogenem. Z tohoto důvodu byly připravené MIP s Chym-FITC jako templátem.



Obrázek 22: Separace MIP s přidavkem MAA a NAPMA porovnaných se separací základních MIP

Na obrázku 23 byla ověřena schopnost různě nabitých MIP vázat chymotrypsinogen. Z naměřených dat je vidět, že všechny typy připravených MIP byly schopny vázat chymotrypsinogen. Nejlepšímu vymývání, navazování největšího množství analytu a k nejmenší neselektivní interakci však docházelo v případě neutrálně nabitých částic. Proto byly tyto částice použity v dalších experimentech. Zároveň nám tento experiment poskytl informaci o tom, že záleží na povrchovém náboji MIP, a že tento náboj může mít vliv na vazbu mezi analytem a vazebnou kavitou.



Obrázek 23: Srovnání Elektroferogramů A) Kladných MIP (přidavek NAPMA), B) Neutrálních MIP (základních) a C) Záporných MIP (přidavek MAA) a jejich navázání MIP a NIP na Chym-FITC o výsledné koncentraci 0,05 mg/ml.

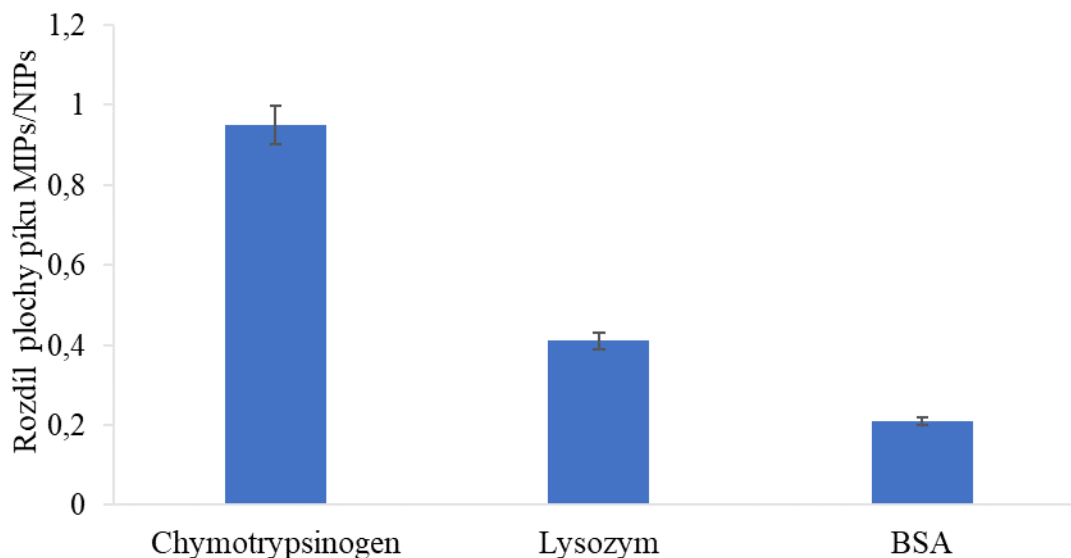
#### 5.4 Ověření vazebné selektivity

Nejvhodnější MIP pro ověření vazebné selektivity se jeví ty připravené za optimálních podmínek bez přidavku NAPMA a MAA, které byly stabilní za laboratorní teploty a dobře vázaly Chym-FITC ze vzorku. Jako kompetitory byly vybrány proteiny hovězí sérový albumin (BSA-FITC) a vaječný lysozym (Lysozym-FITC). Porovnání velikosti a izoelektrického bodu jednotlivých proteinů je uvedeno v tabulce 8. Právě rozdílná velikost a hodnota izoelektrického bodu proteinů může mít vliv na výslednou selektivitu, kdy malé molekuly (vaječný lysozym-FITC) mohou zapadnout do kavit, a naopak velké molekuly (BSA-FITC) by do kavit zapadnout neměly. Výsledný izoelektrický bod měl vliv i na separaci, kdy Chym-FITC a lysozym-FITC mají podobný izoelektrický bod a jejich migrační časy byly velmi podobné a to mezi 3–5 minutou a na rozdíl od BSA-FITC, kde izoelektrický bod je nižší než Chym-FITC a migrační čas byl až kolem 5–6 minuty.

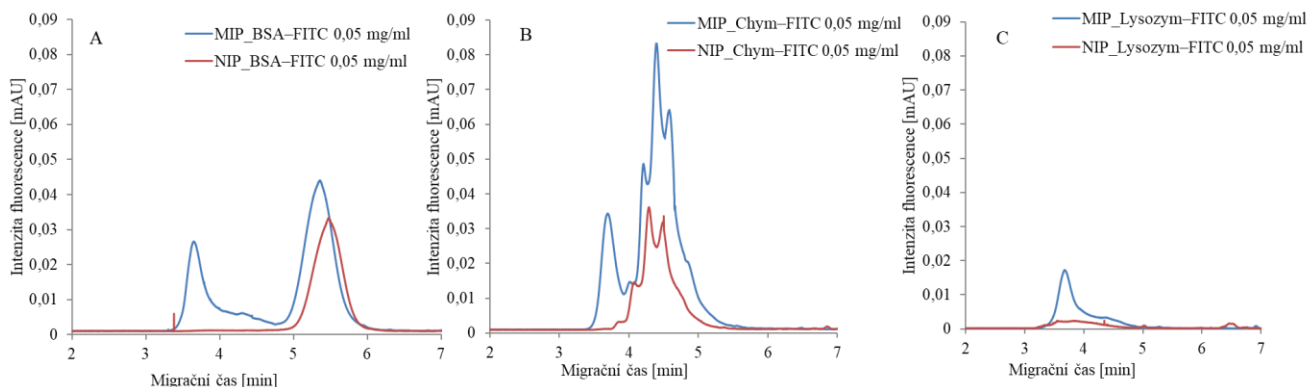
Tabulka 8: Porovnání jednotlivých velikostí a izoelektrického bodu

Protein	Velikost (kDa)	Izoelektrický bod
Chymotrypsinogen	25	8,76–8,90
Lysozym	15	11
BSA	66	4,5–5,0

Porovnání vazby jednotlivých proteinů na MIP a NIP je zaznamenáno na obrázku 24. Jednotlivé elektroferogramy jsou znázorněny na obrázku 25. Z obrázku 25 A, je patrné, že BSA je větší než otiskovaný protein, a tak by teoreticky neměl zapadnout do vytvořených kavit. Na druhou stranu docházelo v případě BSA k vysoké neselektivní vazbě, což mohlo být způsobeno záporným nábojem BSA, který interaguje se slabě kladně nabitým povrchem MIP. Také bylo zjištěno, že část nenavázané BSA-FITC při promývání pomocí ultra odstředivých filtru amicon 100K neprošlo přes filtr a zůstalo v analyzovaném vzorku. Jedná se asi o 25 % z naměřeného signálu, který výsledná data zkresluje. Nejlépe s MIP interagoval protein chymotrypsinogen (viz obrázek 25 A), což potvrzuje selektivitu připravených MIP. Také je patrné, že v případě lysozym-FITC docházelo k vazbě na MIP. Lysozym je menší než otiskovaný protein a mohl tak zapadnout do imprintovaných kavit. Jeho neselektivní interakce v oblastech mimo kavitu však byla nízká (viz obrázek 25 C).



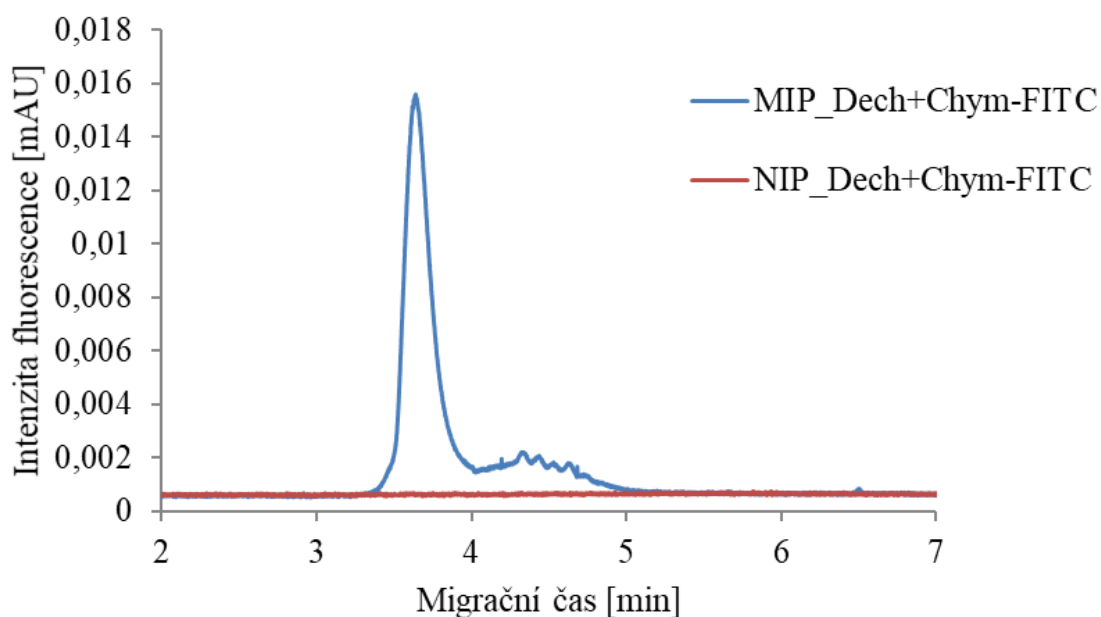
Obrázek 24: Ověření vazebné selektivity



Obrázek 25: Elektroferogramy po aplikaci A) BSA-FITC B) Chym-FITC a C) Lysozym-FITC na MIP a NIP a selektivních pro Chym-FITC

## 5.5 Analýza kondenzátu dechu

Reálný vzorek dechu obsahuje spoustu dalších příměsí jako jsou například malé netěkavé molekuly (močovina, organické kyseliny, aminokyseliny), proteiny (pepsin) atd., které mohou mít vliv na výslednou analýzu. Proto bylo dalším cílem práce provést ověření, zda jsou MIP částice schopny izolovat zvolený protein i z reálného vzorku. Jako reálný vzorek byl použit kondenzát lidského dechu, který byl získán zchlazením dechu uzavřeného v balonku tekutým dusíkem. Kondenzát dechu byl použit se souhlasem dobrovolníka. Následně byl ke vzorku zkapalněného dechu přidán Chym-FITC na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml. Poté byly k vzorku dechu s Chym-FITC přidány MIP/NIP částice. Naměřená data jsou zaznamenána na obrázku 26. Z výsledných dat je zřejmé, že MIP jsou schopny izolovat Chym-FITC z reálného vzorku – kondenzovaného dechu.

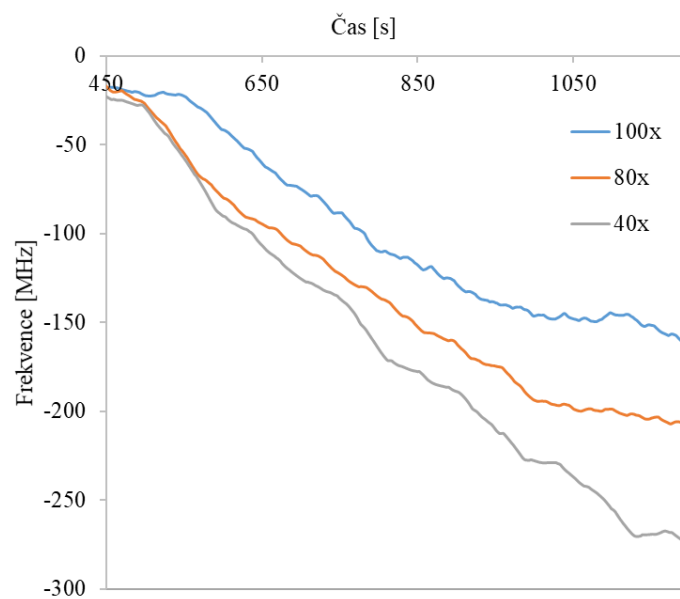


Obrázek 26: Elektroferogramy po aplikaci fluorescenčně značeného chymotrypsinogenu na MIP a NIP a ověření nesespecifických interakcí

## 5.6 Analýza na QCM čipu

Závěrečná část práce byla věnována propojení MIP a QCM. Pro tento experiment byl na povrch čipu kovalentně navázán studovaný protein (chymotrypsinogen). Následně byly do systému dávkovány MIP o koncentraci (0,37; 0,18 a 0,15 mg/ml). MIP mají větší molekulovou hmotnost než chymotrypsinogen, proto byl očekáván výraznější pokles frekvence, což nám pro první experiment umožní snáze ověřit, zda lze vytvořit sensor založený na kombinaci QCM a MIP. Pokles frekvence byl způsoben interakcí mezi MIP a proteiny ukotvenými na povrch zlaté vrstvy krystalu. Naměřená data jsou uvedena na obrázku 27. Z obrázku 27 lze vidět, že s rostoucí koncentrací MIP docházelo k výraznějšímu poklesu frekvence. Změna frekvence je tak přímo úměrná hmotnosti navázaných částic. Aby byla docílena regenerace čipu a opětovnému navazování, byl do cely dávkován teplý pufru o teplotě kolem 60 °C po dobu 20 min.





Obrázek 27: Pozorování interakce mezi MIP a proteinem (chymotrypsinogen) pomocí QCM v reálném čase

## 6 ZÁVĚR

Vypracovaná diplomová práce byla zaměřena na tvorbu senzoru využívajícího syntetické receptory – MIP pro detekci proteinů z kondenzátu dechu, jako markerů různých onemocnění. Analýza dechu byla zvolena jako relativně nový způsob neinvazivního, bezbolestného a snadného odběru klinických vzorků. Jako modelový protein byl v práci použit chymotrypsinogen A. V budoucnu by optimalizovaná metoda mohla být použita pro tvorbu MIP selektivních například pro Keratin II-2-protein sloužící k identifikaci pacientů s rakovinou nebo kolagen  $\alpha$ , který odráží degradaci buněk pojivové tkáně.

První část experimentální práce byla zaměřena na přípravu a optimalizaci molekulově imprintovaných polymerů selektivních pro chymotrypsinogen zahrnující optimalizaci promytí, ověření vazebných vlastností a selektivity. Z na měřených dat vyplývá, že vyvinuté MIP vykazují rychlou adsorpci, vysokou absorpční kapacitu a jsou selektivní pro chymotrypsinogen.

Vyvinutá metoda pro stanovení proteinu z komplexního kondenzátu dechu je velmi jednoduchou, ekologickou, rychlou a selektivní metodou v porovnání se současnými metodami pro stanovení vydechovaného kondenzátu dechu. Velkou výhodou budoucího senzoru je, že se jedná o jednoduchý a neinvazivní odběr vzorku, pro analýzu postačí malé množství odebraného vzorku bez nutnosti předpřípravy, detekce je prováděna v reálném čase, je rychlá a finančně nenákladná. Tento přístup má v budoucnu velký potenciál a další studium této problematiky bude zaměřeno na optimalizaci navázání MIP na povrch čipu, stanovení limitu detekce zvoleného proteinu pomocí QCM a zavedení postupu detekce pro různé proteiny z kondenzátu dechu.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Molekulově imprintovaný polymer	MIP
Molekulově neimprintovaný polymer	NIP
Hmotnostní spektrometrie	MS
Plynová chromatografie	GC
Křemenná krystalová mikrobilance	QCM
Kyselina methakrylátová	MMA
N-Isopropylakrylamid	NIPAm
N, N, N', N'-tetramethyl-ethylendiamin	TEMED
Amonium persulfát	APS
Hydroxid sodný	NaOH
Ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid	EDC
N-Hydroxysukcinimid	NHS
Mikroextrakce na pevné fázi	SPME
Jehlový lapač	NTD
Funkční monomer	FM
N-tert-butylakrylamid	TBAm
N, N'- Metylenbis(akrylamid)	BIS
N-(3-Aminopropyl) methakrylamid hydrochlorid	APMA

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typy odběru vzorku: Neinvazivní (krev, moč, slzy), málo invazivní (krev), velmi invazivní odběr vzorků (tkáň → buňky) [3].....	10
Obrázek 2: Princip biosenzoru je založen na výběru vhodného analytu, receptoru a převodníku signálu .....	19
Obrázek 3: Zástupci jednotlivých převodníků v kombinaci s MIP za období 2017 až květen 2021 .....	22
Obrázek 4: Navazování a odstraňování analytu a následná detekce pomocí QCM.....	23
Obrázek 5: Schéma znázorňující proces pro přípravu MIPs: 1) interakce templátu s funkčním monomerním, 2) polymerizace, 3) odstranění templátu za vzniku kavity selektivní pro danou otiskovanou molekulu [83].....	24
Obrázek 6: Schématické znázornění suspenzní polymerace. Kapičky monomeru fungují jako samostatné mikroreaktory [95].....	26
Obrázek 7: Strukturní vzorec vybraných FM [83] .....	27
Obrázek 8: Zesíťovací činidla využívaná při tvorbě nekovalentního imprintingu [83].....	28
Obrázek 9: Otiskované templáty a jejich procentuální zastoupení za časové období 2016-2020 .....	29
Obrázek 10: Schéma redoxní iniciace [111] .....	32
Obrázek 11: Schéma procesu přípravy MIP a následného využití.....	33
Obrázek 12: Navazování PEG na zlatou vrstvičku čipu .....	35
Obrázek 13: Navazování proteinu na aktivovaný čip .....	35
Obrázek 14: Schéma experimentálního nastavení [112].....	36
Obrázek 15: Závislost změny velikosti polymerních částic na teplotě[117] .....	37
Obrázek 16: Vliv teploty na polydisperzní systém .....	38
Obrázek 17: Porovnání elektroferogramů MIP a chymotrypsinogenu o koncentraci 0,5 mg/ml, Separace probíhala v 20 mM borátový pufr o pH 10. Dávkován byl vzorek hydrodynamicky 50 mbar po dobu 2 s a při vloženém napětí 20 kV.....	39
Obrázek 18: A) Optimalizace vymytí chymotrypsinogenu z MIP částic; B) Elektroferogramy vymývacích kroků: Modrý pík představuje koncentrované částice, které nebyly žádným způsobem promyty (slouží ke kvantifikaci odstranění templátu); Červený pík představuje částice vymyté chladem; Zelený pík představuje částice promyté zahříváním. ....	40
Obrázek 19: Kalibrační řada Chym–FITC navázaného na MIP vymytým zahřátím a zchlazením .....	41
Obrázek 20: Model pro ověření vazebných vlastností pomocí MIP/NIP. U MIP jsou hvězdičkami znázorněné kavity pro otiskovanou molekulu a po přidání vzorku, je patrné, že do kavit zapadají molekuly selektivní pro otiskovanou molekulu, na rozdíl od NIPs, kde není žádná otiskovaná molekula a molekuly ze vzorku se tak váží neselektivně .....	41
Obrázek 21: Teplotní přechody pro jednotlivé MIP a NIP .....	44
Obrázek 22: Separace MIP s přísadkou MAA a NAPMA porovnaných se separací základních MIP .....	45

Obrázek 23: Srovnání Elektroferogramů A) Kladných MIP (přídavek NAPMA), B) Neutrálních MIP (základních) a C) Záporných MIP (přídavek MAA) a jejich navázání MIP a NIP na Chym–FITC o výsledné koncentraci 0,05 mg/ml. ....	45
Obrázek 24: Ověření vazebné selektivity.....	47
Obrázek 25: Elektroferogramy po aplikaci A) BSA–FITC B) Chym–FITC a C) Lysozym–FITC na MIP a NIP a selektivních pro Chym–FITC .....	47
Obrázek 26: Elektroferogramy po aplikaci fluorescenčně značeného chymotrypsynogenu na MIP a NIP a ověření nespecifických interakcích .....	48
Obrázek 27: Pozorování interakce mezi MIP a proteinem (chymotrypsinogen) pomocí QCM v reálném čase .....	49

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Shrnutí výhod a nevýhod využitých při off-line a on-line analýze .....	11
Tabulka 2: Rozsah enviromentální a alveolární koncentrace [9] .....	14
Tabulka 3: Shrnutí výhod a nevýhod vybraných metod pro detekci VOC .....	18
Tabulka 4: Porovnání protilátek, MIP a aptamerů [70, 71].....	20
Tabulka 5: Porovnání vlastností protilátek, MIP a aptomerů [70, 71] .....	21
Tabulka 6: Přehled vybraných prací zaměřujících se na detekci markerů onemocnění z kondenzátu dechu pomocí MIP .....	30
Tabulka 7: Průměrná naměřená data zeta-potenciálu, LCST, velikosti a polydisperzity MIP a NIP .....	43
Tabulka 8: Porovnání jednotlivých velikostí a izoelektrického bodu .....	46

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Mehrotra, P. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 2016/05/01/ 2016, 6(2), 153-159.
- [2] Apetrei, C., M. L. Rodriguez-Mendez, M. Badea And C. Cristea Editorial: Electrochemical Sensors and Biosensors in Medical and Pharmaceutical Bioanalysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020-May-29 2020, 8(533).
- [3] Núñez-Naveira, L., L. A. Mariñas-Pardo and C. Montero-Martínez Mass Spectrometry Analysis of the Exhaled Breath Condensate and Proposal of Dermcidin and S100A9 as Possible Markers for Lung Cancer Prognosis. *Lung*, 2019/08/01 2019, 197(4), 523-531.
- [4] Janik, P., M. A. Janik and Z. Wróbel Micro-condensation sensor for monitoring respiratory rate and breath strength. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2012/10/01/ 2012, 185, 160-167.
- [5] Das, S. and M. Pal Review—Non-Invasive Monitoring of Human Health by Exhaled Breath Analysis: A Comprehensive Review. *Journal of The Electrochemical Society*, 2020/02/03 2020, 167(3), 037562.
- [6] Kubáň, P. and F. Foret Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta*, 2013/12/17/ 2013, 805, 1-18.
- [7] Boots, A. W., J. Van Berkel, J. W. Dallinga, A. Smolinska, et al. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease. *Journal of Breath Research*, Jun 2012, 6(2).
- [8] Fink, T., A. Wolf, F. Maurer, F. W. Albrecht, et al. Volatile Organic Compounds during Inflammation and Sepsis in Rats A Potential Breath Test Using Ion-mobility Spectrometry. *Anesthesiology*, Jan 2015, 122(1), 117-126.
- [9] Princivalle, A., L. Monasta, G. Butturini, C. Bassi, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma can be detected by analysis of volatile organic compounds (VOCs) in alveolar air. *BMC cancer*, 2018, 18(1), 529-529.
- [10] Moretti, M., M. Phillips, A. Abouzeid, R. N. Cataneo, et al. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, May 2004, 190(5), 1184-90.
- [11] beauchamp, j., j. herbig, r. gutmann and a. hansel On the use of Tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis. *J Breath Res*, Dec 2008, 2(4), 046001.
- [12] Amann, A., P. Španěl and D. Smith Breath analysis: the approach towards clinical applications. *Mini Rev Med Chem*, Feb 2007, 7(2), 115-29.
- [13] Ruzsányi, V. and M. Péter Kalapos Breath acetone as a potential marker in clinical practice. *J Breath Res*, Jun 1 2017, 11(2), 024002.
- [14] Lawal, O., W. M. Ahmed, T. M. E. Nijsen, R. Goodacre, et al. Exhaled breath analysis: a review of ‘breath-taking’ methods for off-line analysis. *Metabolomics*, 2017/08/19 2017, 13(10), 110.
- [15] Miekisch, W., S. Kischkel, A. Sawacki, T. Liebau, et al. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *J Breath Res*, Jun 2008, 2(2), 026007.
- [16] Lacombe, M., C. Marie-Desvergne, F. Combes, A. Kraut, et al. Proteomic characterization of human exhaled breath condensate. *Journal of Breath Research*, 2018/02/20 2018, 12(2), 021001.
- [17] Rezaei, H., E. Rahimpour, M. Khoubnasabjafari, V. Jouyban-Gharamaleki, et al. A colorimetric nanoprobe based on dynamic aggregation of SDS-capped silver nanoparticles for tobramycin determination in exhaled breath condensate. *Microchimica Acta*, 2020/02/22 2020, 187(3), 186.

- [18] Rahimpour, E., M. Khoubnasabjafari, V. Jouyban-Gharamaleki And A. Jouyban Non-volatile compounds in exhaled breath condensate: review of methodological aspects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018/10/01 2018, 410(25), 6411-6440.
- [19] Karyakin, A. A., S. V. Nikulina, D. V. Vokhmyanina, E. E. Karyakina, et al. Non-invasive monitoring of diabetes through analysis of the exhaled breath condensate (aerosol). *Electrochemistry Communications*, 2017/10/01/ 2017, 83, 81-84.
- [20] Španěl, P., S. Davies and D. Smith Quantification of breath isoprene using the selected ion flow tube mass spectrometric analytical method. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999/09/15 1999, 13(17), 1733-1738.
- [21] Manne, J., O. Sukhorukov, W. Jäger and J. Tulip Pulsed quantum cascade laser-based cavity ring-down spectroscopy for ammonia detection in breath. *Applied Optics*, 2006/12/20 2006, 45(36), 9230-9237.
- [22] Greguš, M., F. Foret, D. Kindlová, E. Pokojová, et al. Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Breath Research*, 2015/05/06 2015, 9(2), 027107.
- [23] Gao, L., X. Yang, Y. Shu, X. Chen, et al. Ionic liquid-based slab optical waveguide sensor for the detection of ammonia in human breath. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2018/02/15/ 2018, 512, 819-825.
- [24] Sun, X., J. He and X. Yang Human breath as a source of VOCs in the built environment, Part I: A method for sampling and detection species. *Building and Environment*, 2017/11/15/ 2017, 125, 565-573.
- [25] Miekisch, W., J. K. Schubert And G. F. E. Noeldge-Schomburg Diagnostic potential of breath analysis - focus on volatile organic compounds. *Clinica Chimica Acta*, Sep 2004, 347(1-2), 25-39.
- [26] Mazzone, P. J. Analysis of volatile organic compounds in the exhaled breath for the diagnosis of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, Jul 2008, 3(7), 774-780.
- [27] Tassopoulos, C. N., D. Barnett and T. R. Fraser Breath-acetone and blood-sugar measurements in diabetes. *Lancet*, Jun 28 1969, 1(7609), 1282-6.
- [28] Sajjad, A., M. Mottershead, W. K. Syn, R. Jones, et al. Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentration in non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*, Aug 15 2005, 22(4), 291-9.
- [29] Davis, M. D., A. Montpetit and J. Hunt Exhaled breath condensate: an overview. *Immunology and allergy clinics of North America*, 2012, 32(3), 363-375.
- [30] Kharitonov, S. A. And P. J. Barnes Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers*, 2002/01/01 2002, 7(1), 1-32.
- [31] Dent, A. G., T. G. Sutedja And P. V. Zimmerman Exhaled breath analysis for lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 2013, 5 Suppl 5(Suppl 5), S540-S550.
- [32] Kurova, V. S., E. C. Anaev, A. S. Kononikhin, K. Y. Fedorchenko, et al. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2009// 2009, 47.
- [33] Bloemen, K., J. Hooyberghs, K. Desager, E. Witters, et al. Non-invasive biomarker sampling and analysis of the exhaled breath proteome. *Proteomics – Clinical Applications*, 2009/04/01 2009, 3(4), 498-504.
- [34] Rick, W. Pepsin, Pepsinogen, Uropepsinogen. In H.-U. Bergmeyer ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, 1965, p. 819-823.
- [35] Zhu, H., C. A. Hart, D. Sales And N. B. Roberts Bacterial killing in gastric juice--effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, Sep 2006, 55(Pt 9), 1265-1270.



- [36] Stanforth, K. J., M. D. W. , P. I. C. , I. A. B. , et al. Pepsin properties, structure, and its accurate measurement: anarrative review. *Annals of Esophagus*, 2021, 9.
- [37] Lee, A. L., B. M. Button, L. Denehy, S. Roberts, et al. Exhaled Breath Condensate Pepsin: Potential Noninvasive Test for Gastroesophageal Reflux in COPD and Bronchiectasis. *Respiratory Care*, 2015, 60(2), 244.
- [38] Mutlu, G. M., K. W. Garey, R. A. Robbins, L. H. Danziger, et al. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med*, Sep 1 2001, 164(5), 731-7.
- [39] Goldoni, M., A. Caglieri, R. Andreoli, D. Poli, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulmonary Medicine*, 2005/09/01 2005, 5(1), 10.
- [40] Grote, C. And J. Pawliszyn Solid-phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem*, Feb 15 1997, 69(4), 587-96.
- [41] Vas, G. And K. Vékey Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom*, Mar 2004, 39(3), 233-54.
- [42] Taranenko, N. A., V. B. Dorogova, N. M. Meshchakova And L. I. Panfilova [Use of gas and liquid chromatography methods in studying the metabolism of organic compounds (review)]. *Gig Sanit*, Mar-Apr 2001, (2), 75-6.
- [43] Matsuguchi, M. And T. Uno Molecular imprinting strategy for solvent molecules and its application for QCM-based VOC vapor sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006/01/17/ 2006, 113(1), 94-99.
- [44] Záruba, K. *Analytická chemie I. díl.* . edited by V. PRAHA. Edtion ed. Praha: Dostupné z: [https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid\\_isbn-978-80-7080-950-1](https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-950-1), 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [45] Bullock, J. Application of capillary electrophoresis to the analysis of the oligomeric distribution of polydisperse polymers. *Journal of Chromatography*, Aug 1993, 645(1), 169-177.
- [46] Dousa Michal. *High Performance liquid chromatography* 2001.
- [47] Vanhoenacker, G. A. S., P. High temperature and temperature programmed HPLC: possibilities and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008.
- [48] Kononikhin, A. S., N. L. Starodubtseva, V. V. Chagovets, A. Y. Ryndin, et al. Exhaled breath condensate analysis from intubated newborns by nano-HPLC coupled to high resolution MS. *Journal of Chromatography B*, 2017/03/15/ 2017, 1047, 97-105.
- [49] Volka, K. *Analytická chemie II.* Edtion ed.: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,, 1995. ISBN 80-7080-227-8.
- [50] Vashist, S. K. And P. Vashist Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors. *Journal of Sensors*, 2011/09/19 2011, 2011, 571405.
- [51] Nachrichten Aus Der Chemie - NACHR CHEM [online]. 2004 52].
- [52] Jonas, L. Hmotnostní spektroskopie 1985, (1), 111.
- [53] De Hoffmann, E. And V. Stroobant *Mass Spectrometry: Principles and Applications.* Edtion ed.: Wiley, 2013. ISBN 9781118681947.
- [54] Moser, B., F. Bodrogi, G. Eibl, M. Lechner, et al. Mass spectrometric profile of exhaled breath—field study by PTR-MS. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2005/02/01/ 2005, 145(2), 295-300.
- [55] Fernández-Peralbo, M. A., M. Calderón Santiago, F. Priego-Capote and M. D. Luque De Castro Study of exhaled breath condensate sample preparation for metabolomics analysis by LC–MS/MS in high resolution mode. *Talanta*, 2015/11/01/ 2015, 144, 1360-1369.

- [56] Pasquini, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003, 14, 198-219.
- [57] Holze, R. Fundamentals and applications of near infrared spectroscopy in spectroelectrochemistry. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2004/11/01 2004, 8(12), 982-997.
- [58] Maiti, K. S., M. Lewton, E. Fill And A. Apolonski Sensitive spectroscopic breath analysis by water condensation. *Journal of Breath Research*, 2018/07/30 2018, 12(4), 046003.
- [59] Lou, C., C. Jing, X. Wang, Y. Chen, et al. Near-infrared tunable diode laser absorption spectroscopy-based determination of carbon dioxide in human exhaled breath. *Biomedical Optics Express*, 2019/11/01 2019, 10(11), 5486-5496.
- [60] Davis, M. D., S. J. Fowler And A. J. Montpetit Exhaled breath testing – A tool for the clinician and researcher. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2019/02/01/ 2019, 29, 37-41.
- [61] Zhou, X., Z. Xue, X. Chen, C. Huang, et al. Nanomaterial-based gas sensors used for breath diagnosis. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(16), 3231-3248.
- [62] Zhang, J., X. Zhang, X. Wei, Y. Xue, et al. Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review. *Analytica Chimica Acta*, 2021/06/15/ 2021, 1164, 338321.
- [63] Maglio, O., S. Costanzo, R. Cercola, G. Zambrano, et al. A Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Stem Cell Selection and Extraction. *Sensors*, Dec 2017, 17(12), 14.
- [64] Marx, K. A. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*, Sep-Oct 2003, 4(5), 1099-1120.
- [65] Resa, P., P. Castro, J. Rodríguez-López and L. Elvira Broadband spike excitation method for in-liquid QCM sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012/05/20/ 2012, 166-167, 275-280.
- [66] Dixit, Y., M. P. Casado-Gavalda, R. Cama-Moncunill, X. Cama-Moncunill, et al. Developments and Challenges in Online NIR Spectroscopy for Meat Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017/11/01 2017, 16(6), 1172-1187.
- [67] Uludağ, Y., S. A. Piletsky, A. P. Turner and M. A. Cooper Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes. *Febs j*, Nov 2007, 274(21), 5471-80.
- [68] Myszka, D. G., M. D. Jonsen And B. J. Graves Equilibrium analysis of high affinity interactions using Biacore. *Anal Biochem*, Dec 15 1998, 265(2), 326-30.
- [69] Jha, S. K., C. Liu And K. Hayashi Molecular imprinted polyacrylic acids based QCM sensor array for recognition of organic acids in body odor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014/12/01/ 2014, 204, 74-87.
- [70] Canfarotta, F., A. Cecchini And S. Piletsky. Chapter 1 Nano-sized Molecularly Imprinted Polymers as Artificial Antibodies. In *Molecularly Imprinted Polymers for Analytical Chemistry Applications*. The Royal Society of Chemistry, 2018, p. 1-27.
- [71] Bezdekova et al. *From natural to artificial biorecognition elements. From antibodies to molecularly imprinted*. Edtion ed.: Singapore, 2021.
- [72] Singh, V. V. Recent Advances in Electrochemical Sensors for Detecting Weapons of Mass Destruction. A Review. *Electroanalysis*, 2016/05/01 2016, 28(5), 920-935.
- [73] Huang, X. H., Q. S. Bai, J. G. Hu And D. Hou A Practical Model of Quartz Crystal Microbalance in Actual Applications. *Sensors*, Aug 2017, 17(8), 9.

- [74] Lane, T. J., C. Y. H. Cheng, M. C. Dixon, A. Oom, et al. Quartz resonator-based approach to ultrasonic rheology of a mixed-phase micellar system. *Analytical Chemistry*, Oct 2008, 80(20), 7840-7845.
- [75] Muralt, P. Stress Coupled Phenomena: Piezoelectric Effect 2001, 8894-8897.
- [76] Tichý, J. *Fundamentals of Piezoelectric Sensorics: Mechanical, Dielectric, and Thermodynamical Properties of Piezoelectric Materials*. Edition ed., 2010. ISBN 978-354-0684-275.
- [77] Fuchiwaki, Y., Y. Yabe, Y. Adachi, M. Tanaka, et al. Inkjet monitoring technique with quartz crystal microbalance (QCM) sensor for highly reproducible antibody immobilization. *Sensors and Actuators a-Physical*, Nov 2014, 219, 1-5.
- [78] Montmeat, P., F. Veignal, C. Methivier, C. M. Pradier, et al. Study of calixarenes thin films as chemical sensors for the detection of explosives. *Applied Surface Science*, 2014/02/15/ 2014, 292, 137-141.
- [79] Temel, F., E. Ozcelik, A. G. Ture And M. Tabakci Sensing abilities of functionalized calix[4]arene coated QCM sensors towards volatile organic compounds in aqueous media. *Applied Surface Science*, 2017/08/01/ 2017, 412, 238-251.
- [80] Harbeck, M., D. D. Erbahar, I. Gürol, E. Musluoğlu, et al. Phthalocyanines as sensitive coatings for QCM sensors: Comparison of gas and liquid sensing properties. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011/07/05/ 2011, 155(1), 298-303.
- [81] Feng, Y. G., Q. Liu, L. F. Ye, Q. Z. Wu, et al. Ordered macroporous quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, characterization, and separation performance. *Journal of Separation Science*, Feb 2017, 40(4), 971-978.
- [82] Kyzas, G. Z. and D. N. Bikiaris Molecular Imprinting for High-Added Value Metals: An Overview of Recent Environmental Applications. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2014/04/07 2014, 2014, 932637.
- [83] Mattiasson, B. and L. Ye. Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology Preface. In B. Mattiasson and L. Ye eds. *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*. Cham: Springer Int Publishing Ag, 2015, vol. 150, p. V-VI.
- [84] Tang, X., J.-P. Raskin, D. Lahem, A. Krumpmann, et al. A Formaldehyde Sensor Based on Molecularly-Imprinted Polymer on a TiO<sub>2</sub> Nanotube Array. *Sensors*, 2017, 17(4), 675.
- [85] Shiomi, T., M. Matsui, F. Mizukami and K. Sakaguchi A method for the molecular imprinting of hemoglobin on silica surfaces using silanes. *Biomaterials*, Sep 2005, 26(27), 5564-71.
- [86] Piletsky, S. A., H. Matuschewski, U. Schedler, A. Wilpert, et al. Surface Functionalization of Porous Polypropylene Membranes with Molecularly Imprinted Polymers by Photograft Copolymerization in Water. *Macromolecules*, 2000/04/01 2000, 33(8), 3092-3098.
- [87] Wulff, G. And A. Sarhan Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1972, 11(4), 341-&.
- [88] Lanza, F., A. J. Hall, B. Sellergren, A. Bereczki, et al. Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Analytica Chimica Acta*, May 2001, 435(1), 91-106.
- [89] Sellergren, B. *Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*. Edition ed., 2000. ISBN 9780080536804.

- [90] Ye, L., O. Ramstrom and K. Mosbach Molecularly imprinted polymeric adsorbents for byproduct removal. *Analytical Chemistry*, Jul 1998, 70(14), 2789-2795.
- [91] Whitcombe, M. J., M. E. Rodriguez, P. Villar And E. N. Vulfson A New method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting - synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, Jul 1995, 117(27), 7105-7111.
- [92] Lisichkin, G. V. and Y. A. Krutyakov Molecularly imprinted materials: Synthesis, properties, applications. *Uspekhi Khimii*, 2006, 75(10), 998-1017.
- [93] Svec, F. and J. M. J. Frechet Molded rigid monolithic porous polymers: An inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Jan 1999, 38(1), 34-48.
- [94] Kumbar, S., Laurencin, C. and Deng, M. *Natural and Synthetic Biomedical Polymer*. Elsevier Science, 2014.
- [95] Zhu, S. and A. Hamielec. 4.32 - Polymerization Kinetic Modeling and Macromolecular Reaction Engineering. In K. Matyjaszewski And M. Möller eds. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Amsterdam: Elsevier, 2012, p. 779-831.
- [96] Robert J. Young, P. A. L. *Introduction to Polymers*. Edition ed., 2011. ISBN 9780849339295
- [97] Matsui, J., O. Doblhoffdier And T. Takeuchi 2-(trifluoromethyl)acrylic acid: A novel functional monomer in non-covalent molecular imprinting. *Analytica Chimica Acta*, May 1997, 343(1-2), 1-4.
- [98] Kim, H. and G. Guiochon Thermodynamic functions and intraparticle mass transfer kinetics of structural analogues of a template on molecularly imprinted polymers in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005/12/02/ 2005, 1097(1), 84-97.
- [99] Takeuchi, T. And T. Hishiya Molecular imprinting of proteins emerging as a tool for protein recognition. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008, 6(14), 2459-2467.
- [100] Chen, L. X., S. F. Xu and J. H. Li Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(5), 2922-2942.
- [101] Sreenivasan, K. Synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers for nucleic acid bases using aniline as a monomer. *Reactive & Functional Polymers*, Oct 2007, 67(10), 859-864.
- [102] Rachkov, A. And N. Minoura Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, Jan 2001, 1544(1-2), 255-266.
- [103] Flam, F. Molecular Imprints Make A Mark. *Science*, Mar 1994, 263(5151), 1221-1222.
- [104] Hjerten, S., J. L. Liao, K. Nakazato, Y. Wang, et al. Gels mimicking antibodies in their selective recognition of proteins. *Chromatographia*, Mar 1997, 44(5-6), 227-234.
- [105] Liu, C. J., B. Wyszynski, R. Yatabe, K. Hayashi, et al. Molecularly Imprinted Sol-Gel-Based QCM Sensor Arrays for the Detection and Recognition of Volatile Aldehydes. *Sensors*, Feb 2017, 17(2), 15.
- [106] Emam, S., A. Adedoyin, X. Geng, M. Zaeimbashi, et al. A Molecularly Imprinted Electrochemical Gas Sensor to Sense Butylated Hydroxytoluene in Air. *Journal of Sensors*, 2018/05/09 2018, 2018, 3437149.
- [107] Janfaza, S., M. Banan Nojavani, M. Nikkhah, T. Alizadeh, et al. A selective chemiresistive sensor for the cancer-related volatile organic compound hexanal by using molecularly imprinted polymers and multiwalled carbon nanotubes. *Microchimica Acta*, 2019/02/01 2019, 186(3), 137.

- [108] Lukman Hekiem, N. L., A. A. Md Ralib, M. A. B. Mat Hattar, F. B. Ahmad, et al. Advanced vapour sensing materials: Existing and latent to acoustic wave sensors for VOCs detection as the potential exhaled breath biomarkers for lung cancer. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2021/10/01/ 2021, 329, 112792.
- [109] Chen, B., H. Guo, C. J. Liu, L. Shang, et al. Molecularly imprinted sol-gel/Au@Ag core-shell nano-urchin localized surface plasmon resonance sensor designed in reflection mode for detection of organic acid vapors. *Biosensors & Bioelectronics*, Dec 2020, 169, 7.
- [110] Diouf, A., N. El Bari and B. Bouchikhi A novel electrochemical sensor based on ion imprinted polymer and gold nanomaterials for nitrite ion analysis in exhaled breath condensate. *Talanta*, 2020/03/01/ 2020, 209, 120577.
- [111] Feng, X., X. Guo And K. Qiu Study of the Initiation Mechanism of the Vinyl Polymerization with the System Persulfate/N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine. *Die Makromolekulare Chemie*, 03/12 2003, 189, 77-83.
- [112] Farka, Z., D. Kovář And P. Skládál Rapid Detection of Microorganisms Based on Active and Passive Modes of QCM. *Sensors*, 2015, 15(1).
- [113] Bedwell, T. S., N. Anjum, Y. Ma, J. Czulak, et al. New protocol for optimisation of polymer composition for imprinting of peptides and proteins. *RSC Advances*, 2019, 9(48), 27849-27855.
- [114] Batlokwa, B. S., J. Mokgadi, T. Nyokong and N. Torto Optimal Template Removal from Molecularly Imprinted Polymers by Pressurized Hot Water Extraction. *Chromatographia*, Mar 2011, 73(5-6), 589-593.
- [115] Ansell, R. J. Characterization of the Binding Properties of Molecularly Imprinted Polymers. In B. Mattiasson and L. Ye eds. *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*. 2015, vol. 150, p. 51-93.
- [116] Zhang, Q., C. Weber, U. S. Schubert and R. Hoogenboom Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions. *Materials Horizons*, 2017, 4(2), 109-116.
- [117] Ye, Y., Y. Shangguan, Y. Song and Q. Zheng Influence of charge density on rheological properties and dehydration dynamics of weakly charged poly(N-isopropylacrylamide) during phase transition. *Polymer*, 2014/05/13/ 2014, 55(10), 2445-2454.
- [118] Janiak, D. S., O. B. Ayyub and P. Kofinas Effects of Charge Density on the Recognition Properties of Molecularly Imprinted Polymeric Hydrogels. *Macromolecules*, 2009/03/10 2009, 42(5), 1703-1709.
- [119] Debord, J. D. and L. A. Lyon Synthesis and Characterization of pH-Responsive Copolymer Microgels with Tunable Volume Phase Transition Temperatures. *Langmuir*, 2003/09/01 2003, 19(18), 7662-7664.