MASARYKOVA
UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Dvoukanálový enzymový biosensor pro metabolity ve slinách

Diplomová práce

Martin Pihar

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.

Ústav biochemie

Brno 2019

Bibliografický záznam

Autor:	Bc. Martin Pihar Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Dvoukanálový enzymový biosensor pro metabolity ve slinách
Studijní program:	Biochemie
Studijní obor:	Analytická biochemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
Akademický rok:	2018/2019
Počet stran:	66
Klíčová slova:	glukosaoxidasa; laktátoxidasa; glukosa; laktát; 3D tisk; analýza slin; stereolitografie; fused deposition modelling; aditivní výroba

Bibliographic Entry

Author:	Bc. Martin Pihar Faculty of Science, Masaryk University Department of biochemistry
Title of Thesis:	Dual-channel enzyme biosensor for salivary metabolites
Degree programme:	Biochemistry
Field of Study:	Analytical biochemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
Academic Year:	2018/2019
Number of Pages:	66
Keywords:	glucose oxidase; lactate oxidase; glucose; lactate; 3D printing; salivary diagnostics; stereolitography; fused deposition modelling; additive manufacturing

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá neinvazivním stanovením glukosy a laktátu ve slinách. Za tímto účelem byly sestrojeny dvoukanálové biosensory s imobilizovanými enzymy glukosaoxidasou a laktátoxidasou. Při měření byla použita metoda amperometrie. Pro snadné nanášení vzorku byla dvěma různými metodami 3D tisku vytvořena průtočná cela.

Teoretická část se zabývá charakteristikou biosensorů, použitými enzymy, metodami 3D tisku a poznatky o analýze slin.

V praktické části je popsána výroba průtočné cely, imobilizace enzymů a tvorba kalibračních závislostí. Na závěr je popsáno měření s reálnými vzorky, při kterém se projevily nedostatky v postupu práce s biologickými materiálem. Stanovené koncentrace glukosy a laktátu byly ve většině případů nižší než hodnoty zmiňované v odborné literatuře.

Abstract

This thesis deals with non-invasive determination of glucose and lactate in saliva. For this purpose dual-channel biosensors with immobilized enzymes glucose oxidase and lactate oxidase were constructed. Chronoamperometry was used as measuring method. In order to easily add samples, two different methods of 3D printing were used to create a flow-through cell.

Theoretical part is focused on biosensors characteristics, used enzymes, 3D printing methods and salivary diagnostics

The experimental part describes production of the flow-through cell, enzyme immobilization and obtaining the calibration curves. Finally experiments with real saliva samples were carried out. During these experiments imperfections in biological samples handling became evident. Most of the determined concentrations of glucose and lactate in saliva were lower compared to literature.

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2018/2019

Ústav:	Ústav biochemie
Student:	Bc. Martin Pihar
Program:	Biochemie
Obor:	Analytická biochemie

Ředitel *Ústavu biochemie* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Dvoukanálový enzymový biosensor pro metabolity ve slinách
Název práce anglicky:	Dual-channel enzyme biosensor for salivary metobolites

Oficiální zadání:
Analýza slin umožňuje velmi jednoduchá a nezatěžující stanovení některých metabolitů, jejichž koncentrace koreluje s hladinou v krvi (např. glukosa, laktát). Cílem práce bude na sítotiskovém duálním sensoru imobilizovat glukosaoxidasu a laktátoxidasu. Bude vyvinut mikrofluidní systém pro snadné nanesení vzorku a jeho spontánní (kapilarita) či nucený (mikropumpa) tok přes měřicí zóny. V průběhu toku by se ještě změřil vhodný parametr charakterizující možnou variabilitu vzorku slin, např. vodivost. Systém biosensoru by měl být opakovaně použitelný, část pro aplikaci vzorku pak výměnná. Praktické využití je cíleno zejména do oblasti sportu pro posouzení výkonnosti v průběhu tréninku. Literatura (další zdroje dle rešerše): Liu, J. Os-complex-based amperometric bienzyme biosensor for continuous determination of lactate in saliva. ANALYTICAL METHODS 7 6158-6164 2015. Malon, RSP. Cotton fabric-based electrochemical device for lactate measurement in saliva. ANALYST 139 3009-3016 2014. Kim, J. Non-invasive mouthguard biosensor for continuous salivary monitoring of metabolites. ANALYST 139 1632-1636 2014. Schabmueller, CGJ. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS 21 1770-1776 2006. Mitsubayashi, K; Arakawa, T. Cavitas Sensors: Contact Lens Type Sensors & Mouthguard Sensors. ELECTROANALYSIS 28 1170-1187 2016. Soni, A; Jha, SK. A paper strip based non-invasive glucose biosensor for salivary analysis. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS 67 763-768 2015.

Jazyk závěrečné práce:	čeština
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.
Datum zadání práce:	7. 10. 2017
V Brně dne:	5. 5. 2019

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Bc. Martin Pihar student	doc. RNDr. Petr Skládal, CSc. vedoucí práce	doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc. zástupce ředitele Ústavu biochemie pro pedagogické záležitosti

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval doc. RNDr. Petru Skládalovi CSc. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytl při tvorbě této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno, 9. května 2019 .....

Jméno Příjmení

1. Úvod 10
2. Teoretická část 11
2.1 Biosensory 11
2.1.1 Definice biosensoru 11
2.1.2 Klasifikace biosensorů 11
2.1.3 Charakteristické vlastnosti biosensorů 12
2.1.4 Imobilizace biomolekul 13
2.1.5 Elektrochemické biosensory 15
2.1.6 Sítotiskové sensory 16
2.1.7 Komerčně produkované biosensory 17
2.2 Enzymy 20
2.2.1 Glukosaoxidasa (GOx; EC 1.1.3.4) 20
2.2.2 Laktátoxidasa (LOx; EC 1.1.3.2) 21
2.2.3 Kombinace GOx a LOx v biosensorech 22
2.3 3D tisk 23
2.3.1 Obecný popis 23
2.3.2 Techniky 3D tisku 24
2.3.3 3D tisk a biosensory 28
2.4 Analýza slin 30
2.4.1 Charakteristika 30
2.4.2 Využití 30
2.4.3 Glukosa ve slinách 32
2.4.4 Laktát ve slinách 33
3. Cíle práce 34
4. Praktická část 35
4.1 Chemikálie a materiál 35
4.2 Přístroje a vybavení 35
4.3 Software 35
4.4. Metody 36
4.4.1 Příprava sensorů 36
4.4.2 Imobilizace enzymů 36
4.4.3 Výroba průtočné cely 37
4.4.4 Úprava kabelu k potenciostatu PalmSens 38
4.4.5 Postup měření a vyhodnocení 39
4.5 Výsledky a diskuse 40

4.5.1 Průtočná cela 40
4.5.2 Měření s potenciostatem PalmSens 41
4.5.3 Měření s potenciostatem ImmunoSMART. 43
4.6 Závěr 55
Bibliografie 56

Seznam zkratek

ABS – Akrylonitrilbutadienstyren

AZGP1 – Alpha-2-glycoprotein, zinc binding

CA 15-3 – Cancer antigen 15-3

DIW – Direct ink writing

DLW – Direct laser writing

DMD – Digital Mirror device

FDM – Fused deposition modeling

GOx – Glukosaoxidasa

Her2/neu – Human epidermal growth factor receptor

LOx – Laktátoxidasa

MJM – Multi jet modelling

PC – Polykarbonát

PLA – Kyselina polymléčná

PVA – Polyvinyalkohol

SBQ – Styrylpyridiniové zbytky

SLA – Stereolitografie

SLS – Selective laser sintering

1. Úvod

Analýza metabolitů, jejichž koncentrace může být znakem různých patologických stavů je stěžejní pro současnou medicínu. Díky moderním analytickým metodám je možné získat rozmanité informace o metabolismu pacienta a přizpůsobit jeho léčbu tak, aby byla co nejúčinnější.

Jedním z odvětví, které se zabývá analýzou široké škály metabolitů v tělních tekutinách jsou elektrochemické biosensory. Ty se vyznačují výbornou citlivostí, vysokou selektivitou, nízkou pořizovací cenou, jednoduchostí obsluhy a možnosti miniaturizace. Právě tyto vlastnosti umožnily vznik glukometrů, které jsou dnes běžně používány diabetiky po celém světě.

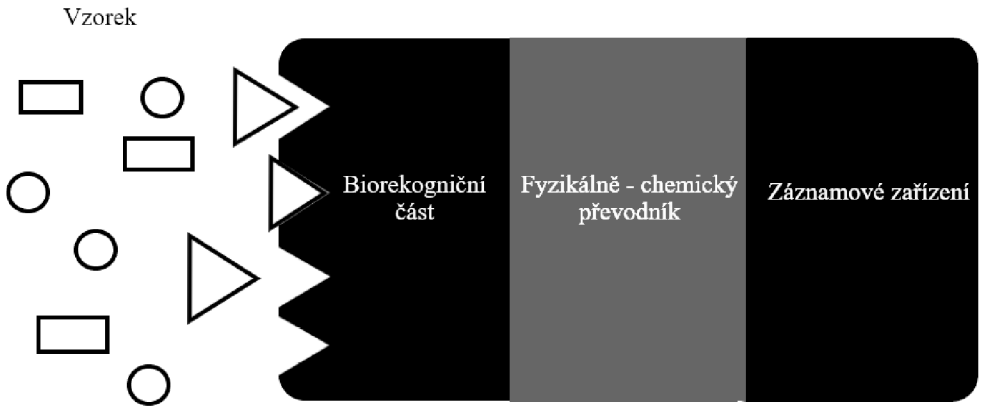
V posledních letech se upírá mnoho pozornosti k neinvazivní analýze slin, potu, slz, nebo moči, které by v některých případech mohly zastoupit stanovení metabolitů z krve. Vznik zařízení podobného glukometru, které by sloužilo k neinvazivní analýze metabolitů, by znamenal velké ulehčení jak pro pacienty, tak pro zdravotnická zařízení. Ke tvorbě takového zařízení, případně i jeho elektronických komponent, by mohl posloužit 3D tisk, který si postupně získává své místo mezi konvenčními metodami výroby.

2. Teoretická část

2.1 Biosensory

2.1.1 Definice biosensoru

Biosensor může být definován jako analytické zařízení složené z biologického rekogničního prvku, který je v přímém kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. [1] Biorekogniční prvek zajišťuje selektivitu systému, zatímco fyzikálně chemický převodník transformuje chemický signál na signál elektronický. Tento signál je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Schéma biosensoru je zobrazeno na Obrázek 1.



Obrázek 1 – Obecné schéma biosensoru

Biosensory si získaly popularitu především díky své selektivitě, nízké pořizovací ceně, citlivosti a jednoduchosti obsluhy.

Důležitý pojem spojený s biosensory je „point of care“ analýza, tj. stanovení koncentrace analytu přímo na místě odběru vzorku, např.: u lůžka pacienta, v ordinaci lékaře apod.

2.1.2 Klasifikace biosensorů

Jeden z obvykle používaných druhů klasifikace biosensorů, tj. podle biorekogničního prvku zobrazuje tabulka č.1.

Tabulka 1 - rozdělení biosensorů podle biorekogničního prvku

Typ biosensoru	Použitý biorekogniční prvek
Biokatalytický	enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus
Bioafinitní	lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor

Dalším způsobem dělení je podle typu fyzikálně-chemického převodníku. Takto můžeme biosensory dělit na elektrochemické, optické, kalorimetrické, piezoelektrické a akustické. [2]

2.1.3 Charakteristické vlastnosti biosensorů

Každý biosensor má několik základních charakteristik, jejichž optimalizace se podepíše na konečné funkčnosti biosensoru. Mezi tyto charakteristiky patří [3]:

Selektivita

Selektivita udává schopnost biologického rekogničního prvku reagovat na konkrétní analyt ve vzorku, který obsahuje mnoho složek. Typickým příkladem selektivity je interakce antigenu s protilátkou nebo enzymu se substrátem. Volba vhodného selektivního biorekogničního prvku je klíčová pro správnou funkci biosensoru.

Opakovatelnost

Je schopnost biosensoru poskytovat totožnou odezvu signálu při stejných podmínkách měření. Je dána precizností a přesností fyzikálně – chemického převodníku. Preciznost je těsnost shody mezi hodnotami poskytnutými opakovaným měřením. Přesnost je dána těsností shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a její skutečnou hodnotou.

Stabilita

Je míra citlivosti na rušení v okolí biosensoru. Toto rušení může způsobit odchylky v měřeném signálu a ovlivnit preciznost a přesnost měření. Je stěžejní v případech, kdy jsou vyžadovány dlouhé inkubační doby biosensoru nebo při dlouhodobém kontinuálním měření. Také může být ovlivněna okolní teplotou a afinitou biorekogničního elementu k analytu. V neposlední řadě hraje roli také degradace biologického rekogničního prvku v průběhu času.

Citlivost

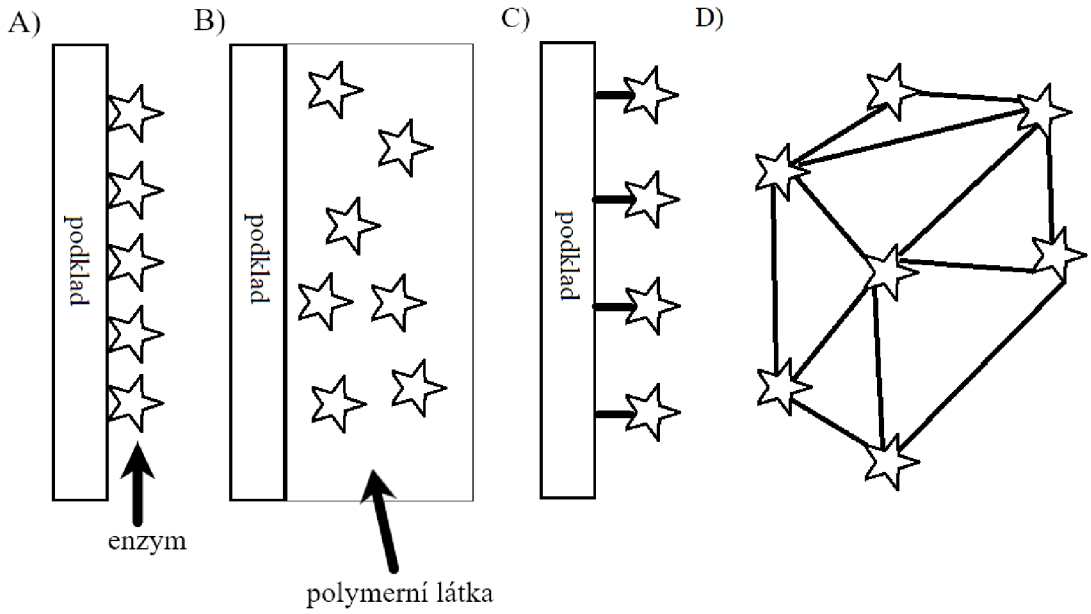
Je změna měřeného signálu po přídavku analytu. Nejnižší detekovatelné množství je definováno limitem detekce (LOD), který je nejčastěji popisován jako trojnásobek směrodatné odchylky šumu. [4] V mnoha případech může být požadovaná citlivost $10^{-9} – 10^{-15}$ g.ml^{-1} analytu ve vzorku.

Lineární rozsah

Je vlastnost, která popisuje přímou úměrnost (vyjádřenou kalibrační přímkou) mezi naměřenými hodnotami a různými koncentracemi analytu. Tuto přímku lze potom vyjádřit jako $y = a*x+b$, kde x vyjadřuje koncentraci analytu, a citlivost biosensoru a y měřený signál. Ideálně by byla lineární v celém rozsahu, v reálných situacích ale bývá nelineární v oblasti saturace. [2] Rozlišení biosensoru je definováno jako nejnižší koncentrace analytu potřebná pro změnu výstupního signálu, obvykle se vychází z trojnásobku úrovně šumu signálu pozadí.

2.1.4 Imobilizace biomolekul

Termínem imobilizace se rozumí přichycení biomolekul k fyzikálně - chemickému převodníku. Tyto metody můžeme podle jejich principu rozdělit na fyzikální (kdy se uplatňují vodíkové můstky, hydrofobní interakce, Van der Waalsovy síly, afinitní interakce a iontové interakce) a chemické, při kterých dochází k formování kovalentních vazeb. [5] Obvyklé metody graficky znázorňuje obrázek 2. Při výběru metody je třeba vzít v úvahu účel využití biosensoru a zvolit vhodný kompromis mezi stabilitou, enzymovou aktivitou a náročností přípravy. [6] Mezi obvyklé metody imobilizace enzymů patří:



Obrázek 2 – grafické znázornění různých metod imobilizace biomolekul; A) adsorpce, B) zachycení, C) kovalentní vazba. D) zesíťování [7, 8], upraveno

Adsorpce

Je základní metodou imobilizace, kdy jsou enzymy přichyceny na povrch pomocí slabých nevazebných interakcí. Tato metoda je reverzibilní a je oblíbená zejména proto, že po vymytí enzymu je možné ji provést znovu. Obvykle spočívá v ponoření podkladového materiálu do roztoku obsahujícího enzym a následné inkubaci. Druhou možností je nanesení kapky roztoku enzymu na povrch, vysušení a opláchnutí neadsorbovaného materiálu. Nevýhodou je rychlé vyplachování imobilizovaných látek kvůli slabým vazebným interakcím a také citlivost na změny pH, iontové síly a teploty. [5]

Zachycení (entrapment)

Jde o ireverzibilní metodu, kdy jsou enzymy zachyceny ve struktuře inertního gelu nebo polymeru, případně v polymerní membráně. Mezi používané nosiče patří např.: polyakrylamid, želatina, kolagen, polyuretan a polyvinylalkohol. Výhodou je pomalé vymývání enzymu a dobrá mechanická stabilita. Použití této metody mohou omezovat problémy s difúzí analytu do aktivního místa způsobené příliš malými póry gelu. [5]

Zesíťování (cross-linking)

Zesíťování je ireverzibilní metoda imobilizace, při které vznikají vazby mezi enzymem a molekulami bifunkčního nebo multifunkčního činidla. Oblíbeným činidlem je glutaraldehyd. Chemicky dochází ke vzniku vazeb mezi aminoskupinou proteinu a aldehydovou skupinou glutaraldehydu. [2, 5] Výhodou je, že imobilizovaná směs obsahuje méně balastních sloučenin oproti jiným metodám. [5]

Kovalentní navázání

Je často používaná ireverzibilní metoda imobilizace. K vazbě obvykle dochází přes postranní řetězec lysinu, cysteinu, kys. asparagové a kys. glutamové. Aktivita navázaného enzymu je kromě velikosti a tvaru podkladu ovlivněna také podmínkami při imobilizaci. Předností této metody je silná vazba enzymu k podkladu. [5]

2.1.5 Elektrochemické biosensory

Pro konstrukci katalytických biosensorů jsou nejčastěji používány elektrochemické převodníky. Jsou oblíbené zejména pro svou vysokou citlivost, nízkou pořizovací cenu a jednoduchou konstrukci. Pro vytvoření fungujícího elektrochemického systému jsou potřeba minimálně dvě elektrody – pracovní a referentní.

Při volbě pracovní elektrody je na výběr z mnoha materiálů, od ušlechtilých kovů, skelného uhlíku nebo grafitu až po kompozitní směsi, vodivé polymery a organické vodivé soli. Před samotným měřením, případně imobilizací biomolekul je důležité připravit povrch elektrod. Proto se provádí broušení brusnými prášky nebo brusným papírem, odmaštění v organickém rozpouštědle, opláchnutí deionizovanou vodou, případně také ozvučení ultrazvukem. Někdy se zoxidovaná vrstva kovů na povrchu elektrod odstraňuje také pomocí kyselin nebo anodizací. [2]

Proti referentním elektrodám s definovaným potenciálem se nastavuje potenciál elektrody pracovní. Mezi obvyklé typy referentních elektrod patří normální vodíková elektroda, merkurosulfátová elektroda, kalomelové a argentchloridové elektrody. [2]

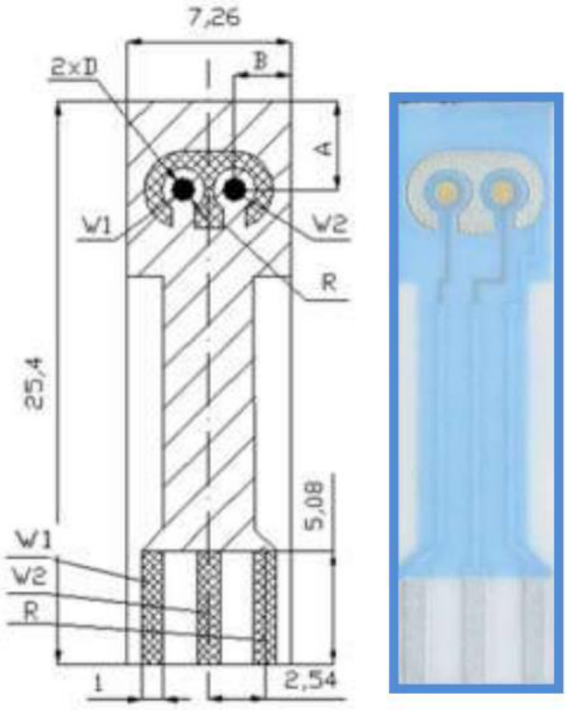
Pomocné elektrody musí být z dobrého vodiče, který je elektrochemicky neaktivní a zároveň musí zaujímat dostatečnou plochu, aby nebyly limitovány

pochody na pracovní elektrodě. Mezi obvyklé materiály patří platinový nebo nerezový drátek, případně uhlíková tyčinka. [2]

Mezi nejčastěji používané elektrochemické analytické metody v oblasti biosensorů patří potenciometrie, amperometrie, konduktometrie a voltametrie.

2.1.6 Sítotiskové sensory

Sítotisk je metoda původně vynalezená pro potisk textilu. V průběhu času však vstoupila i do oboru elektrotechniky, kde se používá pro výrobu desek plošných spojů a sítotiskových sensorů. [2, 9]



Obrázek 3 – V levé části se nachází schéma sítotiskového sensoru. W1 a W2 značí dvě pracovní elektrody a R referentní elektrodu (v horní části) a jim příslušející kontakty (dole). V pravé části je zobrazena reálná podoba sensoru. Rozměry jsou uvedeny v milimetrech. [10]

Proces spočívá v nanášení past tvořených práškovým materiálem a organickým rozpouštědlem přes šablonu na podkladovou vrstvu. Ke stolku se pevně přichytí podkladová vrstva, na kterou se shora přiloží tisková šablona. Na šablonu se nanese pasta, která se protlačuje pružnou stěrkou na podkladovou vrstvu. Následuje vytvrzení pasty sušením nebo vypálením. [2] Jako podklad se používá například keramika nebo plastová folie. Pro elektrody se používají pasty z platiny, zlata, stříbra a chloridu

stříbrného. Obrázek 3 zobrazuje sítotiskové sensory od české společnosti BVT Technologies, a. s.

Tato metoda se prosadila v elektrotechnické výrobě především díky potřebě miniaturizace, s čímž souvisí také nižší spotřeba materiálů a příznivější cena. [9] Díky nenáročnosti postupu je možná masová výroba elektronických součástek.

2.1.7 Komerčně produkované biosensory

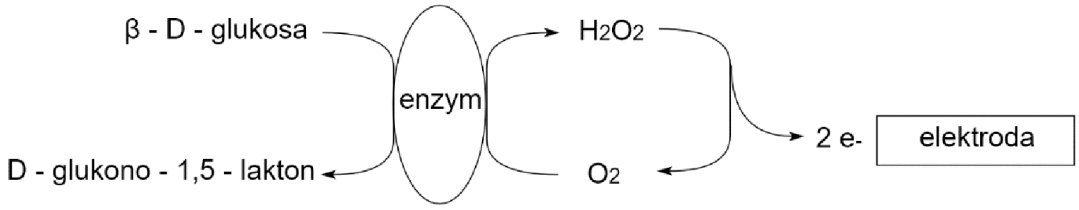
Některé biosensory se díky možnosti miniaturizace, vysoké selektivitě a příznivé ceně dokázaly prosadit i v podobě komerčně vyráběných zařízení. Hlavní odvětví, kde našly komerční biosensory své místo, jsou lékařství, kontrola kvality potravin, analýza životního prostředí a vojenství. Celkový trh s biosensory v roce 2015 dosáhl hodnoty 12 miliard amerických dolarů. [11]

Lékařství

Stanovení krevní glukosy

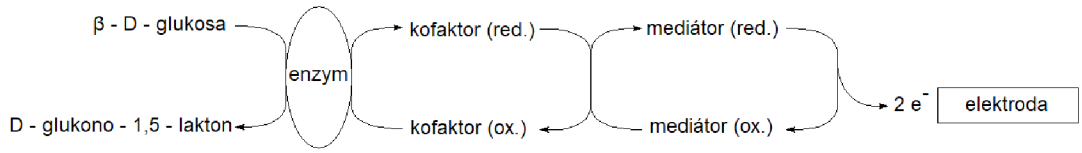
Monitorování hladiny glukosy v krvi je důležité zejména pro osoby trpící onemocněním diabetes mellitus. Při tomto onemocnění dochází k deficienci insulinu, nebo snížené citlivosti receptorů pro insulin, což má za následek zvýšenou hladinu glukosy v krvi. V roce 2014 trpělo tímto onemocněním 422 milionů lidí. [12] Významným milníkem v léčbě diabetu byl první komerční stolní glukometr uvedený na trh společností Yellow Springs Instruments v roce 1975. [13, 14] V současné době jsou glukometry dostupné ve formě ručního zařízení. V těchto přístrojích obvykle v roli biorekogniční části vystupují enzymy glukosaoxidasa nebo glukosadehydrogenasa. Glukosové biosensory můžeme rozdělit do třech generací podle principu jejich funkce. [15]

První generace glukosových biosensorů funguje na principu detekce peroxidu vodíku, který je produkován enzymovou reakcí jako vedlejší produkt. [16] Schéma funkce tohoto biosensoru zobrazuje obrázek 4.



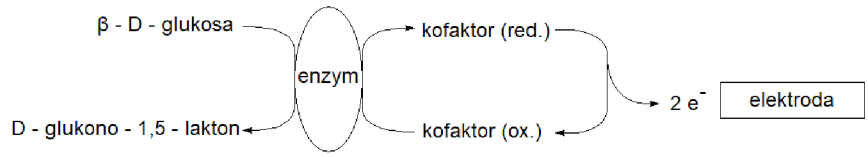
Obrázek 4 – Schéma funkce glukosového biosensoru první generace [17], upraveno

Glukosové biosensory první generace byly překonány druhou generací, která využívá redoxního mediátoru. Tento mediátor slouží k přenosu elektronů z enzymu k pracovní elektrodě. Peroxid vodíku je zde nahrazen redukovanou formou mediátoru, který je pracovní elektrodou regenerován zpět na oxidovanou formu, při čemž vzniká měřitelný elektrický proud. Jako mediátor se používá např.: ferrocen, ferrikyanid, benzochinon, methylenová modř a další. Na tomto principu funguje většina současných komerčně vyráběných detektorů glukosy na jedno použití. [15] Schéma funkce biosensoru druhé generace je na obrázku 5.



Obrázek 5 – Schéma funkce glukosového biosensoru druhé generace [17], upraveno

Třetí generace glukosových biosensorů (obr. 6) je založena na přímém přenosu elektronů mezi enzymem a pracovní elektrodou modifikovanou organickým vodivým materiálem. Hlavním přínosem je absence toxických mediátorů, což umožňuje kontinuální *in-vivo* monitorování krevní glukosy. [14, 15]



Obrázek 6 – Schéma funkce glukosového biosensoru třetí generace [17], upraveno

Současný trh nabízí řádově desítky různých komerčních zařízení pro stanovení krevní glukosy založených na biosensorech. [11]

Detekce lidského choriového gonadotropinu

Lidský choriový gonadotropin (hCG) je hormon produkovaný buňkami placenty v průběhu těhotenství. Pro rychlé a jednoduché zjištění těhotenství pomocí tzv. těhotenského testu je použit právě tento hormon. Test funguje na principu podélného toku reagencií proužkem porézní membrány (LFIA). Zařízení se skládá z podložky pro nanášení vzorku, konjugační zóny, nitrocelulózové membrány a podložky pro nasávání vzorku. [18] Nepostradatelnou součástí jsou testovací a kontrolní linie umístěné na membráně, které obsahují barevně značené primární protilátky proti hCG. Po nanesení je vzorek moči unášen kapilárními silami k detekčním liniím. Zbarvení obou linií značí pozitivní výsledek testu. Při negativním výsledku je zbarvena pouze kontrolní linie. [18] Test je citlivý až do nanomolárních koncentrací hCG. [11]

Z dalších komerčních biosensorů používaných v lékařství můžeme zmínit biosensory pro detekci *Escherichia coli, Helicobacter pylori,* HIV, malárie, tuberkulózy nebo chřipkového viru. [11] Tyto však nejsou natolik rozšířené jako první dvě zmiňované kategorie.

Analýza potravin

Neustále se zvyšující nároky na kontrolu kvality a bezpečnosti potravin umožnily biosensorům najít své místo v tomto odvětví. Používají se jak k detekci nežádoucích látek (patogeny, toxiny, alergeny), tak ke stanovení obsahu látek žádoucích (sacharidy, aminokyseliny, vitaminy, alkoholy aj.). I přes množství vědeckých publikací v tomto oboru je zatím počet zařízení uvedených na trh nízký. [19, 20]

Analýza životního prostředí

Neustálý rozvoj průmyslu a dopravy s sebou přináší i úskalí v podobě rostoucího znečištění životního prostředí. Mezi nejobvyklejší toxické látky v prostředí patří syntetické látky, pesticidy a těžké kovy. [21] Podobně jako v oboru analýzy potravin je dostupné poměrně velké množství literatury, ale počet vyráběných komerčních zařízení je podstatně nižší. Většina z komerčně vyráběných zařízení slouží pro stanovení biochemické spotřeby kyslíku. [11]

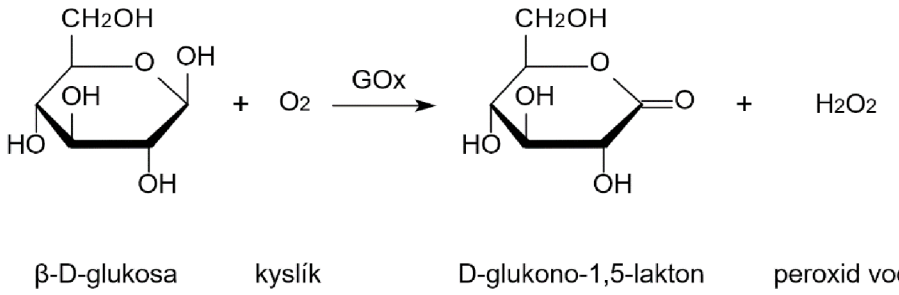
Vojenství

Některé bakterie, viry a toxiny mohou být zneužity jako biologické zbraně. Rozvoj v oblasti biosensorů umožnil některé z těchto agens detekovat a kvantifikovat v reálném čase. Tyto sensory jsou často založeny na principu imunochromatografie, kdy dochází ke sledování interakcí antigenu a protilátky a následné detekci mikroorganismu.

2.2 Enzymy

2.2.1 Glukosaoxidasa (GOx; EC 1.1.3.4)

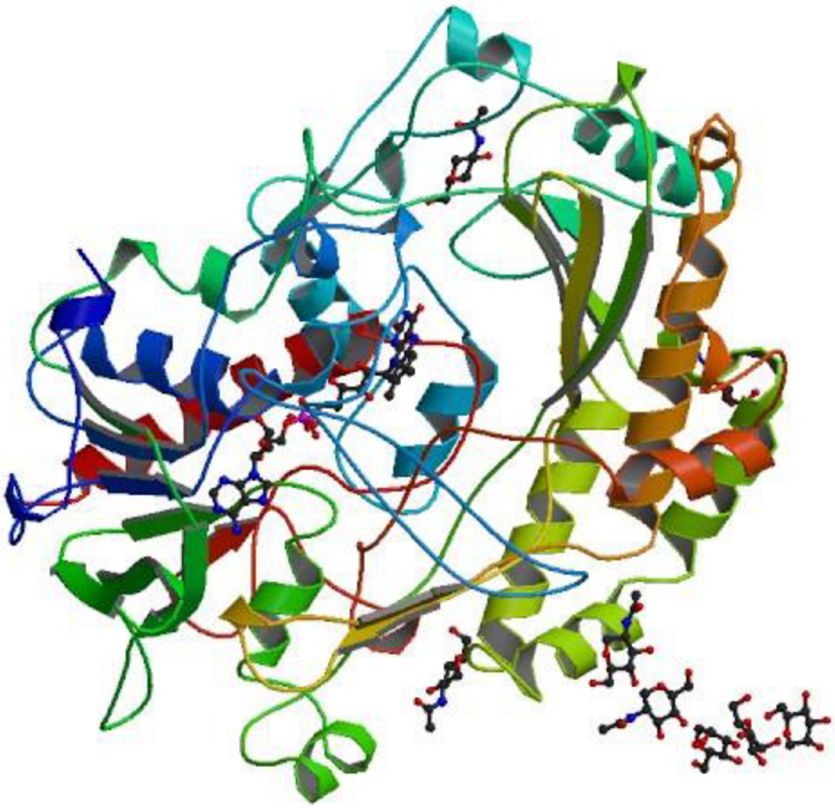
Systematickým názvem β-D-glukosa: kyslík 1-oxidoreduktasa je enzym ze třídy oxidoreduktas, který katalyzuje oxidaci β-D-glukosy molekulárním kyslíkem na δ-glukonolakton a peroxid vodíku. [22] Tuto reakci ilustruje obrázek 7.



Obrázek 7 – oxidace β-D-glukosy na D-glukono-1,5-lakton za katalýzy glukosaoxidasy

Strukturně se jedná o homodimer o molekulové hmotnosti 160 kDa s jedním nekovalentně vázaným FAD, který slouží jako kofaktor. [23] Molekula glukosy je v aktivním centru tohoto glykoproteinu vázána dvanácti vodíkovými můstky, a také hydrofobními interakcemi k nejbližším aromatickým jádrům a k molekule FAD. [23]

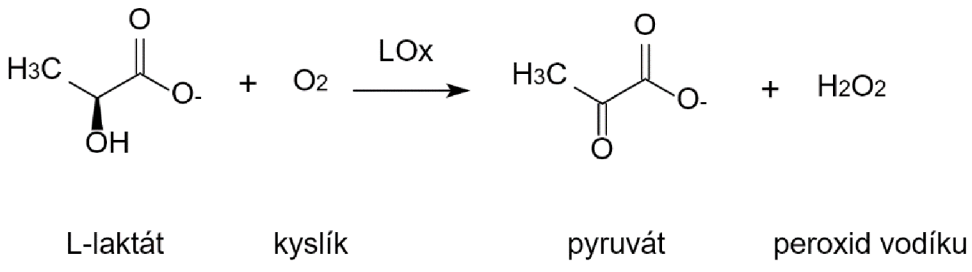
Má široké uplatnění v klinické chemii, farmaceutickém průmyslu, chemickém průmyslu a potravinářství. [24] Také je velmi oblíbený na poli biosensorů z důvodu své vysoké selektivity k β-D-glukose, a taktéž díky své dlouhodobé stabilitě. Obvykle se izoluje z organismu *Aspergillus niger*. Strukturu tohoto enzymu můžeme vidět na obrázku 8.



Obrázek 8 – 3D struktura glukosaoxidasy izolované z *Aspergillus niger* [23]

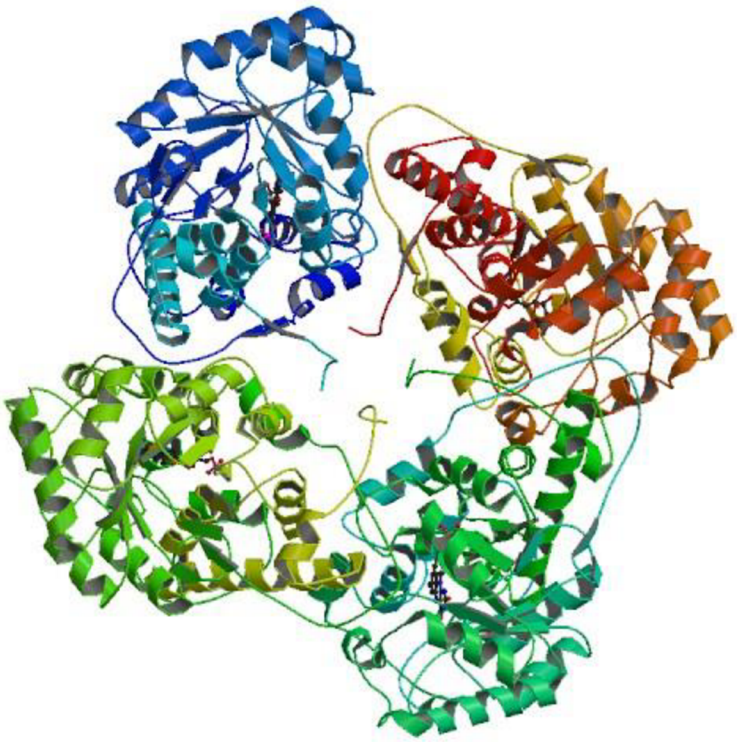
2.2.2 Laktátoxidasa (LOx; EC 1.1.3.2)

Systematicky L-laktát: kyslík 2-oxidoreduktasa je enzym patřící mezi oxidoreduktasy s FMN jako kofaktorem. Tento enzym o molekulové hmotnosti 164 kDa [25] katalyzuje přeměnu L-laktátu za přítomnosti kyslíku na pyruvát a peroxid vodíku. Schéma reakce je na obrázku 9. Nejčastěji se získává z bakterie *Aerococcus viridans*. Vyznačuje se velmi vysokou specifitou pro L-laktát. [26]



Obrázek 9 – přeměna L-laktátu na pyruvát katalyzovaná laktátoxidasou

Strukturně jde od tetramer, kde každý z monomerů má téměř identickou strukturu.[27] Trojrozměrnou strukturu tohoto enzymu zobrazuje obrázek 10.



Obrázek 10 – 3D struktura laktátoxidasy z *Aerococcus viridans* [27]

2.2.3 Kombinace GOx a LOx v biosensorech

Z důvodu propojenosti metabolismu glukosy a laktátu se jeví jako vhodné sledovat tyto analyty zároveň. Existuje množství prací zabývajících se studiem glukosy a laktátu pomocí duálních biosensorů. Většina z těchto prací ale používá enzymy fungující na rozdílném principu. Tím chtějí autoři zamezit tomu, aby produkt vznikající na jedné elektrodě tvořil falešný signál na elektrodě druhé. [28, 29] I přes to existují práce kombinující glukosaoxidasu a laktátoxidasu při elektrochemickém stanovení.

Yamazaki a kol. [30] vytvořili miniaturizovaný čip o rozměrech 5 krát 5 mm, na kterém se nacházely čtyři pracovní elektrody, jedna referentní a jedna pomocná elektroda. Velikost jedné pracovní elektrody byla 710 μm čtverečních. Na jednu z pracovních elektrod byla imobilizována glukosaoxidasa a na druhou laktátoxidasa, obě s přídavkem poly – L – lysin hydrobromidu. Další dvě pracovní elektrody zůstaly volné. Poly – L – lysin hydrobromid sloužil k odfiltrování interferujících látek, jako je

kyselina askorbová nebo kyselina močová, a také pro zpomalení difúze reaktantů a produktů v okolí elektrody, díky čemuž vznikající peroxid vodíku ovlivňoval signál na druhé elektrodě jen minimálně. Pro měření byl zvolen konstantní potenciál 700 mV. Sensor se podařilo zkalibrovat a má potenciál pro klinické využití.

Podobný přístup zvolili Perdomo a kol. [29], kteří vytvořili miniaturní křemíkový čip pro elektrochemické stanovení glukosy a laktátu pomocí glukosaoxidasy a laktátoxidasy. Enzymy byly imobilizovány metodou zachycení v polyvinylalkoholu (PVA) v kombinaci se styrylpyridiniovými zbytky (SbQ) a tato směs byla následně zesíťována UV zářením. Čip byl dodatečně vybaven inertní membránou tvořenou PVA-SbQ, která měla za úkol zpomalení difúze v okolí elektrod a zamezení vypařování vody z enzymové vrstvy. Měření probíhalo v průtočném systému metodou amperometrie při potenciálu 600 mV. Měřicí systém se vyznačoval minimem falešných signálů a vysokou dlouhodobou stabilitou. Při stanovení glukosy a laktátu z lidského séra byly výsledky srovnatelné s konvenční metodou.

Edagawa a kol. [31] vytvořili amperometrický duální jehlovitý biosensor s glukosaoxidasou a laktátoxidasou. Na platinovou elektrodu byl nanesen acetát celulosy a γ–polyglutamová kyselina, které sloužily jako semipermeabilní membrána, druhou vrstvu tvořila glukosaoxidasa nebo laktátoxidasa a vnější vrstva byla složena z polyuretanu a polydimethylsiloxanu. Měření při potenciálu 600 mV vyloučilo možnost přítomnosti interferujících látek nebo jiných falešných signálů. Výsledná koncentrace glukosy a laktátu v plazmě byla téměř totožná s koncentrací zjištěnou jinou metodou.

2.3 3D tisk

2.3.1 Obecný popis

Princip 3D tisku spočívá ve tvorbě objektu podle navrženého modelu vrstvu po vrstvě až do úplného dokončení – jedná se tedy o aditivní metodu. Pro snadnější představu lze tento proces přirovnat ke stavbě cihlové zdi, která také probíhá od návrhu, přes uspořádání jednotlivých vrstev až po samotnou stavbu. [32]

První robotickou 3D tiskárnu vytvořil Charles W. Hull v roce 1984. Od té doby se 3D tisk dokázal prosadit mimo jiné i v odvětví biomedicíny, například pro tvorbu

diagnostických zařízení [33], konstrukcí implantátů [34], a pro tkáňové inženýrství. [35] Obzvláště v posledních letech se tiskárny stávají dostupnějšími pro běžné uživatele a tak 3D tisk přestává být výsadou průmyslových společností a akademických institucí.

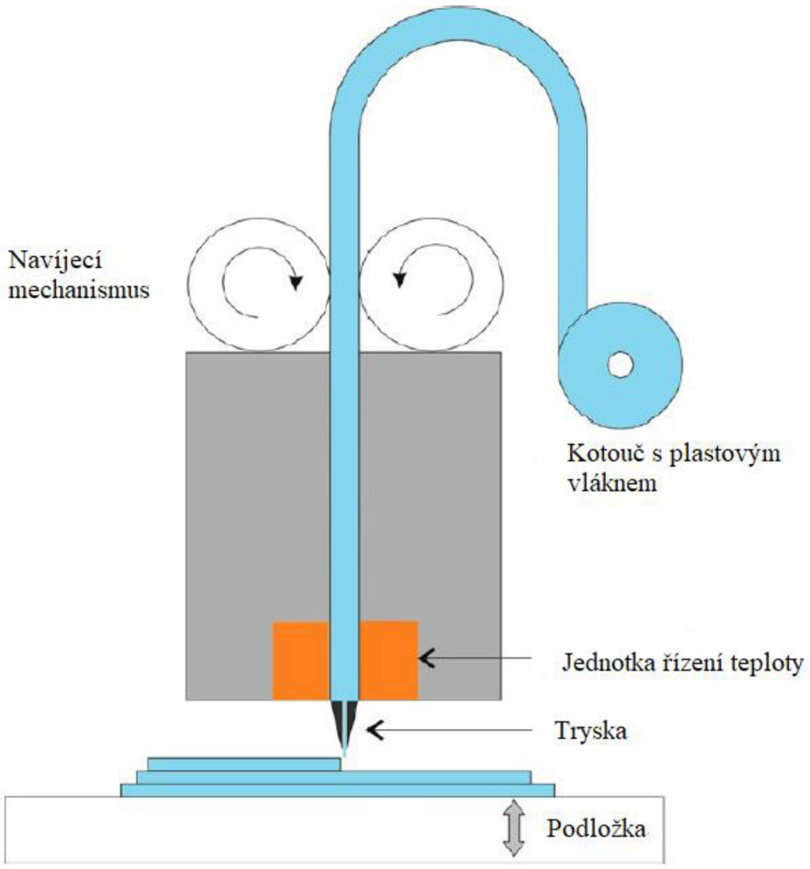
2.3.2 Techniky 3D tisku

Fused deposition modelling (FDM)

U této techniky dochází k vytlačování termoplastického polymerního materiálu z trysky na podložku. [36] Tryska je zahřívána na teplotu tání daného materiálu, podložka je naopak udržována na nižší teplotě a dochází zde k tuhnutí. Jako materiál se používá kyselina polymléčná (PLA), akrylonitrilbutadienstyren (ABS), polykarbonát (PC) nebo směs PC-ABS. [36, 37] Jsou dostupné tiskárny i se třemi tiskovými hlavami, což umožňuje tisk modelu tvořeného více materiály. [36] Základní polymer může být smíchán s vodivými materiály (pyrolytický grafit, grafen, uhlíkové nanotrubice, nanočástice kovů) pro tvorbu elektrod a elektrických obvodů. [36] Tato metoda je levná a rychlá, ale na druhou stranu zaostává za ostatními metodami například v rozlišení a v povrchové kvalitě vytvořeného modelu. [36, 38] Metoda je graficky znázorněna na obrázku 11.

Direct ink writing (DIW)

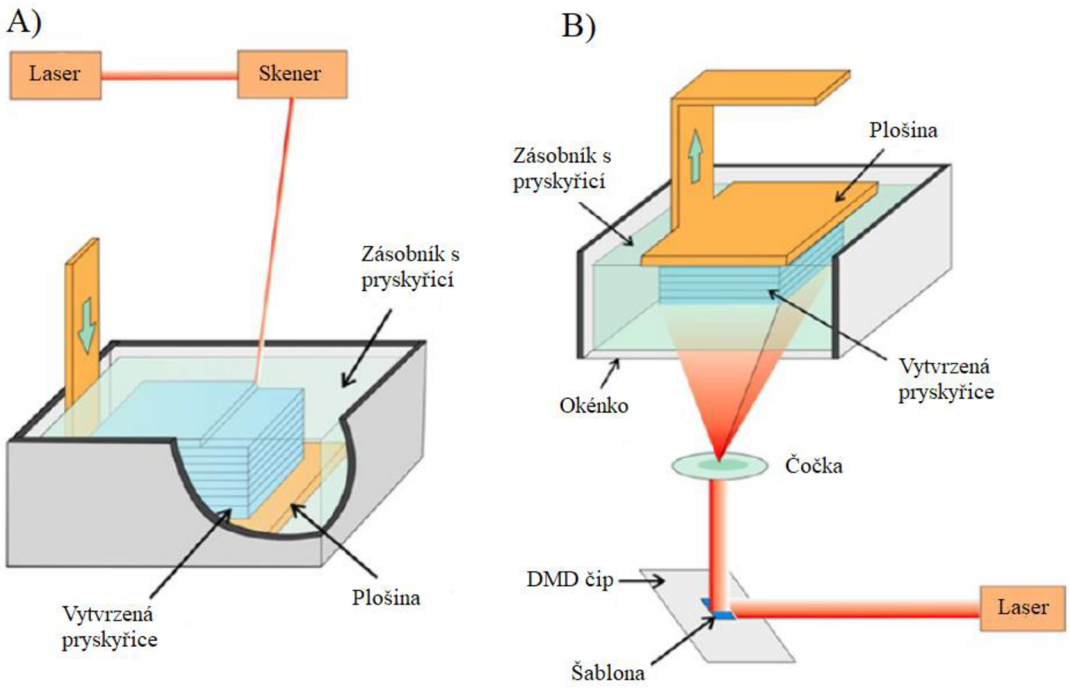
Tato technika je podobná FDM, ale termoplastický materiál je zde nahrazen pastou, která je opět vytlačována tryskou a formuje vrstvu po vrstvě tisknutý objekt. [39] Podle typu použité pasty následují dvě varianty dalšího postupu. V případě past s nízkou viskozitou následuje tuhnutí pomocí chemických a fotochemických procesů nebo tvorbou nekovalentních vazeb. Druhou možností je použití past tvořených nenewtonovskými hydrogely (např.: alginát sodný, želatina), které jsou následně vystaveny zvýšenému tlaku. [38] Lze použít k výrobě terapeutik [40], buněčných konstruktů [41], rozložitelných biomateriálů [42], nebo komplexních buněčných struktur. [43]



Obrázek 11 - Grafické znázornění metody 3D tisku Fused deposition modelling (FDM), při které je termoplastický polymerní materiál zahříván na svou teplotu tání a tvarován. Následně samovolným ochlazováním tuhne zpět na pevnou látku. [44], upraveno

Stereolitografie (SLA)

U stereolitografie se používají fotosenzitivní pryskyřice, které po expozici světlem polymerují na tuhou látku. Z počátku se používalo pouze UV záření, ale v současné době jsou dostupné i tiskárny používající viditelnou část spektra. Jako zdroj slouží lasery nebo LED diody s vysokou intenzitou záření. V průběhu vytvrzování je tisková plošina ponořena ve fotosenzitivní pryskyřici. [38] Rozlišení je definováno tloušťkou světelného paprsku. Existují dvě variace této metody. U první z nich dochází k přímému vytvrzování paprskem záření, jehož zdroj je umístěn nad tisknutým modelem. Tímto postupem je vytvrzen každý jednotlivý bod modelu samostatně.



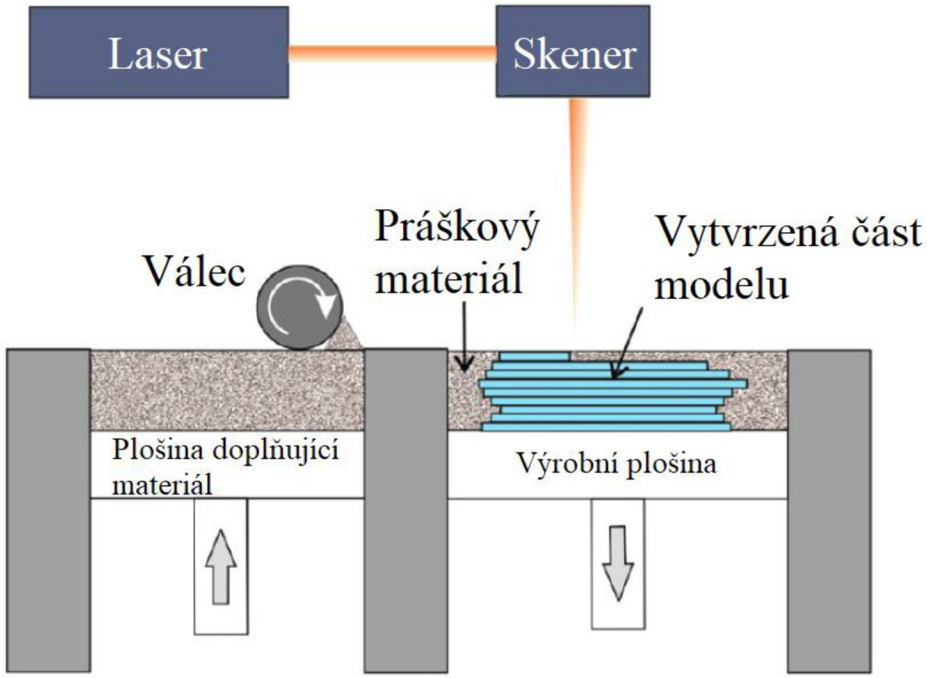
Obrázek 12 - grafické znázornění techniky stereolitografie - (A) Stereolitografie s přímým ozařováním, kdy je každý bod modelu ozařován samostatně (B) Stereolitografie s projekčním ozařováním, kdy je ozařována celá vrstva zároveň. [44], upraveno

Druhou variantou je projekční stereolitografie, kdy je přes šablonu v kombinaci s DMD čipem ozařována celá jedna vrstva modelu najednou. Model je v tomto případě horizontálně převrácený a zdroj záření jej ozařuje zespodu. [44] Při použití biokompatibilní pryskyřice lze pomocí stereolitografie zahrnout do modelu i živé buňky. [45] Princip metody zobrazuje obrázek 12.

Selective laser sintering (SLS)

Tato metoda funguje na principu spékání práškového materiálu infračerveným laserem o vysokém výkonu. [38] Na podložku je nanesen práškový materiál, který je poté v příslušných místech osvícen laserem, následuje posun podložky dolů o tloušťku jedné vrstvy a celý proces se opakuje. [46] Rozlišení je dáno velikostí částic použitého materiálu, rychlostí skenování a intenzitou záření laseru. [47] Jako materiál můžou sloužit kovy, keramika, ale také celulóza a polykarbonát, což dává možnost využití ve tkáňovém inženýrství. Jde pravděpodobně o nejdražší techniku 3D tisku z důvodu pořizovací ceny stroje a specifických vlastností substrátů, na druhou stranu nabízí

vysoké rozlišení a velkou variabilitu používaných materiálů. [38] Schéma metody je na obrázku 13.



Obrázek 13 - Schéma techniky 3D tisku Selective laser sintering (SLS), kdy dochází k vytvrzování práškového materiálu laserem do konečné podoby modelu. [44], upraveno

Multi-Jet modelling (MJM)

Technika MJM používá tiskárny s více tiskovými hlavami. Jedna hlava tiskne fotosenzitivní pryskyřicí, zatímco druhá tiskne podpůrné části modelu pomocí jiného materiálu. Po vytvrzení pryskyřice ozářením je podpůrný materiál odstraněn, např.: zvýšením teploty nebo rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle. Velkou výhodou je možnost použití kombinace různých materiálů a vysoké rozlišení, nevýhodou je poměrně vysoká cena. [46] Uplatnila se například pro tvorbu mikrofluidního systému s integrovanými elektrodami. [48]

Direct laser writing (DLW)

Na vzestupu je technika DLW, při které je fotosenzitivní pryskyřice ozařována femtosekundovým laserem, při čemž dochází ke dvoufotonové absorpci a následné polymeraci pryskyřice. Tato technika je vhodná pro použití s živými buňkami a dalšími biologickými materiály, díky tomu, že zde nedochází k velkým výkyvům

teplot, a také díky absenci UV záření. Vyznačuje se extrémně vysokým rozlišením, což je vykoupeno velikostí přístroje. [38]

Různé techniky 3D tisku, jejich vlastnosti, pozitiva a negativa jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2 - Shrnutí vlastností různých metod 3D tisku [38]

Technika	Princip	Materiál	Klady	Zápory
FDM	Tavení plastového vlákna	PLA, ABS, PC, akryláty	Nízká cena, rychlost, variabilita materiálů	Nízké rozlišení, nízká kvalita povrchu
DIW	Vytlačování inkoustu	Algináty, želatina, hyaluronáty, epoxidová pryskyřice	Biokompatibilita, vysoké rozlišení	Náročnost procesu
SLA	Polymerace za pomoci záření	akryláty	Dobré rozlišení, flexibilita	Jeden materiál
MJM	Polymerace s pomocným i materiály	Více druhů materiálů najednou	Více druhů materiálů, vysoké rozlišení	Vysoká cena
SLS	Spékání práškového materiálu	Keramika, kovy, polymery	Dobré rozlišení, široká škála materiálů	Vysoká cena
DLW	Dvoufotonová absorpce a polymerace	Polymerní pryskyřice	Ultra vysoké rozlišení, biokompatibilita	Prostorově náročné zařízení

2.3.3 3D tisk a biosensory

Díky 3D tisku vznikla možnost vytvářet komplikované struktury v mikrometrovém měřítku přímo na míru pro daný experiment. V této podkapitole

jsou pro inspiraci zmíněny některé konkrétní aplikace 3D tisku v kombinaci s biosensory.

Zangheri a kol. [49] sestrojili biosensor pro detekci kortisolu ve slinách, speciálně zaměřený na využití astronauty ve stavu beztíže. Tento přístroj funguje na principu LFIA s chemiluminiscenční detekcí pomocí CCD čipu. 3D tisk zde byl uplatněn pro tvorbu zařízení, které obsahuje LFIA proužek a několik tlačítek pro ovládání toku reagencií. Analyzátor byl navržen za účelem využití na mezinárodní vesmírné stanici, kde ho také otestoval italský astronaut Paolo Nespoli v období od července do prosince 2017 a potvrdil jeho funkčnost. Toto zařízení by podle autorů mohlo být jednoduše upraveno tak, aby dokázalo detekovat i jiné důležité biomarkery.

Nesaei a kol. [50] zvolili metodu DIW jako náhradu konvenční metody (sítotisku) pro tvorbu biosensorů. Pro tisk elektrod byly zvoleny pasty s přídavkem vodivých materiálů a pro tisk biorekogniční vrstvy pasta obsahující glukosaoxidasu. K měření byly použity metody chronoamperometrie a cyklická voltametrie. Při porovnání se sítotiskovým sensorem měl sensor vyrobený metodou DIW lepší povrchové vlastnosti elektrod a také více homogenní rozložení biorekogniční složky. Biosensor vyrobený 3D tiskem se vyznačoval širším lineárním rozsahem, vyšší citlivostí, menší časovou náročností výroby a nižší cenou materiálu.

Dong a kol. [51] pomocí metody DIW vytvořili amperometrický biosensor, vhodný k nošení na těle, pro detekci laktátu z potu. Dále byl k tomuto biosensoru vytvořen i miniaturizovaný potenciostat, taktéž pomocí metody DIW. Sensor se osvědčil jako jednoduchý, neinvazivní, point of care detektor laktátu, který by mohl najít uplatnění například při sportovním tréninku.

Oborem blízkým biosensorům je mikrofluidika, která se zabývá prouděním kapalin v zařízeních složených z kanálků o rozměrech v řádu mikrometrů. Hlavními důvody použití těchto miniaturizovaných zařízení je nižší spotřeba materiálu při jejich výrobě, jednoduchost transportu a malé množství vzorku potřebné k analýze. Některé důvody jsou méně zřejmé, jako například velký poměr povrchu kapiláry k jejímu objemu, což umožňuje lepší řízení chemických reakcí. V mikrofluidice se 3D tisk používá například k výrobě vstřikovacích ventilů [52, 53], reaktorů [54], zařízení pro míchání vzorků [55], nebo separaci abundantních látek z komplexního vzorku. [56]

Díky neustále se zlepšující instrumentaci a novým materiálům má 3D tisk širokou škálu uplatnění na poli biosensorů i v dalších vědeckých disciplínách.

2.4 Analýza slin

2.4.1 Charakteristika

Analýza slin se těší stále většímu zájmu, především proto, že jde o neinvazivní, jednoduchou metodu. Odběr slin, narozdíl od odběru krve nevyžaduje odborně proškolený personál a také je zde mnohem menší riziko přenosu patogenů, jako například HIV, nebo virů hepatitidy. [57] Díky své neinvazivitě je obzvláště přínosná pro sledování hladiny biomarkerů u dětí, starších pacientů, případně pacientů, kteří podstupují odběry pravidelně, třeba i několikrát denně. Další výhodou je, že u většiny analytů existuje vztah mezi koncentrací ve slinách a v krvi. [58]

Zdravý člověk vyprodukuje za den v průměru 500 – 1000 ml slin rychlostí přibližně 0,5 $ml.min^{-1}$. Většina těchto slin pochází z velkých slinných žláz – *glandula parotis*, *glandula submandibularis* a *glandula sublingualis*. [57] Limitujícím faktorem může být to, že sliny produkované různými žlázami se mohou lišit svým složením. I přes to většina studií využívá směs slin ze všech žláz. [59, 60] Hlavním důvodem je pravděpodobně nižší náročnost odběru. Někteří autoři preferují odběr jenom z konkrétní žlázy [61], protože tak lze získat detailnější informace, které jsou méně ovlivněny dalšími faktory v ústní dutině. Nevýhodou tohoto přístupu je nutnost použití sofistikovanějších metod odběru a náročnější instrumentace. [62]

Ve většině studií se osvědčilo před odběrem vzorku po určitou dobu eliminovat stimulaci slinných žláz v podobě konzumace potravin, nápojů, provádění zubní hygieny a kouření. [60, 61, 63]

2.4.2 Využití

Analýza slin by mohla najít využití při detekci různých biomarkerů jejichž koncentrace ve slinách koreluje s koncentrací v krvi, což by mohlo vést k včasné diagnostice a vyšší úspěšnosti léčby pacientů. Jako příklad mohou být zmíněny:

Bakteriální infekce

Bakterie *Helicobacter pylori* je spojována s onemocněními trávicí soustavy, jako jsou například gastritidy nebo karcinom žaludku. Bylo prokázáno, že tato bakterie může být přítomna ve vzorcích slin pacientů s těmito onemocněními. Díky tomu by

v budoucnu mohla analýza slin posloužit jako neinvazivní náhrada gastroskopického vyšetření. [64]

Autoimunitní onemocnění

Sjögrenův syndrom

Sjögrenův syndrom je autoimunitní onemocnění, vyznačující se sníženou funkčností slinných a slzných žláz. Analýza slin umožňuje diagnostiku tohoto onemocnění, a to pomocí detekce zvýšené hladiny imunoglobulinů, zánětlivých mediátorů, albuminu a snížené hladiny fosforečnanů. Analýza proteinů ve slinách prokázala zvýšenou hladinu laktoferinu, beta-2-mikroglobulinu, lysozymu a cystatinu C, hladiny amylasy a karbonátanhydrasy byly naopak snížené. [65]

Roztroušená skleróza

Je autoimunitní onemocnění projevující se rozpadem myelinových pochev, které jsou napadány vlastním imunitním systémem. U pacientů s roztroušenou sklerózou byla zjištěna snížená koncentrace IgA ve slinách. [65]

Sarkoidóza

Toto zánětlivé onemocnění lymfatických uzlin, plic, jater, očí, kůže a dalších tkání se vyznačuje sníženou sekrecí slin a sníženou aktivitou alfa-amylázy a kalikreinu ve slinách. [65]

Onemocnění zubů a dásní

Sledování zvýšeného výskytu bakterií *Streptococcus mutans* a *lactobacillus* ve slinách je vhodné pro sledování náchylnosti k zubnímu kazu. Onemocnění dásní jsou spojena se zvýšenou hladinou aspartátaminotransferasy a alkalické fosfatasy. Nízká úroveň kys. močové a albuminu může být spojena s diabetem 2. typu. [65]

Nádorová onemocnění

Markery nádorových onemocnění je důležité monitorovat kvůli včasné diagnóze a vyšší míře přežití pacientů. Jako první byl ve slinách detekován HER2/neu a následně CA 15-3 související s karcinomem prsu. Mezi další markery, které lze nalézt ve slinách, patří AZGP1 a kalprotektin pro nádor plic nebo CD44, IL-1β a IL-8 pro skvamocelulární karcinom. [62]

Testování přítomnosti léčiv a drog

Sliny se osvědčily pro sledování hladiny léčiv a detekci drog. Uplatnily se např. pro zjištění přítomnosti nikotinu, kanabinoidů, kokainu, opioidů, barbiturátů, benzodiazepinů, amfetaminu a ethanolu. Většina drog je ve slinách detekovatelná se stejnou časovou prodlevou jako v plazmě a jejich koncentrace koreluje s koncentrací v krvi. [62]

Forenzní věda

Analýza slin je běžně používána ve forenzních vědách. Vzorky slin lze jednoduše získat od podezřelého nebo oběti a provést analýzu DNA. Lze použít i například i zaschlé sliny z rány pachatele, které zanechala oběť při sebeobraně. [62]

2.4.3 Glukosa ve slinách

Glukosa je aldohexosa, která slouží jako významný zdroj energie pro organismus. V případě jejího nadbytku může být ukládána ve formě glykogenu. Její hladina v krvi může souviset s různými patologickými stavy, nejčastěji *diabetes mellitus*. Je to malá organická molekula, díky čemuž má možnost jednoduše přecházet z krevní plazmy do slin a do sulkulární tekutiny. [57]

Studie zabývající se analýzou glukosy ve slinách dospěly k různým, často protichůdným závěrům. Zatímco některé zdroje tvrdí, že existuje pozitivní korelace mezi glukosou v krvi a glukosou ve slinách u diabetiků [66–68], jiná literatura tuto možnost vylučuje [69], proto stále není úplně jasné, zda jsou sliny vhodné pro monitorování diabetu. Vztah mezi glukosou v krvi a glukosou ve slinách u zdravých jedinců nebyl ve většině prací prokázán. Pravděpodobně proto, že po nárůstu hladiny krevní glukosy dochází rychle k její normalizaci pomocí insulinu. [66] Jedna studie přesto zmiňuje referenční hodnoty glukosy ve slinách v rozmezí 20 – 200 $\mu mol.l^{-1}$, které platí jak pro zdravé jedince, tak pro pacienty s diabetem. [70]

Možnou alternativou pro neinvazivní stanovení glykémie by mohla být analýza sulkulární tekutiny, to je extracelulární tekutina produkovaná buňkami dásňového žlábku, což je malý prostor mezi zubem a dásní o hloubce asi 0,5 až 2,0 mm. [57] Některé práce nalezly korelaci mezi koncentrací glukosy v sulkulární tekutině a koncentrací v kapilární krvi. [71, 72]

2.4.4 Laktát ve slinách

Při sníženém přísunu kyslíku jsou tkáně nuceny metabolizovat pyruvát pomocí anaerobního odbourávání, při kterém je produkována kyselina mléčná. V důsledku tohoto procesu dochází k poklesu pH krve. [57] Laktátová acidóza může být nebezpečná pro pacienty na jednotkách intenzivní péče nebo operačních sálech, u kterých může vést až k poškození svalů nebo infarktu myokardu. [73] Dále může být také přínosem monitorování hladiny laktátu u sportovců, pro úpravu tréninkového režimu a zvýšení výkonnosti. [74]

Referenční hodnota laktátu ve slinách se pohybuje v rozmezí 0,1 – 2,5 $mmol.^{-1}$ a vykazuje silnou korelaci s koncentrací laktátu v krvi, a to v poměru 1:4 (sliny:krev), proto se jeví jako vhodná alternativa ke stanovování laktátu z krve. [57]

3. Cíle práce

- Tvorba kapilárního systému pro nanášení vzorků pomocí 3D tiskárny
- Imobilizace enzymů glukosaoxidasy a laktátoxidasy na povrch dvoukanálových sítotiskových sensorů
- Vytvoření kalibračních závislostí
- Měření koncentrace glukosy a laktátu ve vzorcích slin

4. Praktická část

4.1 Chemikálie a materiál

Chemikálie	Výrobce
D-glukosa	Sigma Aldrich
L-Laktát sodný	Fluka
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Glutaraldehyd 25%	Fluka
Isopropanol	AG Termopasty Grzegorz Gąsowski
Peroxid vodíku	Penta
Glukosaoxidasa 155 $IU.mg^{-1}$	Sigma Aldrich
Laktátoxidasa 57 $IU.mg^{-1}$	Sigma Aldrich
Fosfátový pufr (50 $mmol.l^{-1}$, pH = 7)	-

4.2 Přístroje a vybavení

Přístroj/vybavení	Výrobce
Potenciostat Palmsens 2	Palm Instruments
Potenciostat ImmunoSMART	Smart, spol. s r.o.
3D tiskárna Form 2 (SLA)	Formlabs
3D tiskárna Kossel (FDM)	Trilab
Stolní vrtačka	Tesco stores a.s.
Hamiltonova pipeta	Hamilton
Brusný papír o hrubosti 4000	Buehler
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Sítotiskové sensory AC2.W2.RS	BVT technologies

4.3 Software

KISSlicer 1.5

Labtools 2.3.4.12 (Petr Skládal)

Microsoft Excel 365 Pro Plus 16.0.11601.20130 (Microsoft)

Microsoft Word 365 ProPlus 16.0.11601.20130 (Microsoft)

Multilab 615x (Petr Skládal)

PreForm 2.16.0 (Formlabs, Inc.)

PStrace 4.8.1 (Palm Instruments)

Tinkercad.com (Autodesk, Inc.)

4.4. Metody

4.4.1 Příprava sensorů

Dvoukanálové sítotiskové sensory s platinovými pracovními elektrodami a stříbrnou referentní elektrodou byly přeleštěny brusným papírem o hrubosti 4000 za účelem odstranění zoxidované vrstvy na povrchu elektrod a kontaktů. Následně byly na patnáct minut ponořeny do ethanolu, kde došlo za občasného promíchání k odmaštění jejich povrchu. Po odmaštění byly sensory opláchnuty destilovanou vodou a nechaly se uschnout na vzduchu.

4.4.2 Imobilizace enzymů

Složení jednotlivých zásobních roztoků pro tvorbu imobilizačních směsí bylo následující:

- BSA 50 $mg.ml^{-1}$
- Glutaraldehyd 3%
- Glukosaoxidasa 30,8 $mg.ml^{-1}$
- Laktátoxidasa 25 $mg.ml^{-1}$

Z těchto zásobních roztoků byly připraveny imobilizační směsi následujícího složení:

- Pro glukosaoxidasu
    - 10 µl roztoku GOx
    - 9 µl roztoku BSA
    - 50 µl fosfátového pufru (50 $mmol.l^{-1}$)
    - 2 µl glutaraldehydu
- Pro laktátoxidasu
    - 20 µl roztoku LOx
    - 5 µl roztoku BSA
    - 1,5 µl glutaraldehydu

Tyto imobilizační směsi byly Hamiltonovou pipetou naneseny na povrch pracovních elektrod dvoukanálových sensorů. U každého sensoru byla na jednu pracovní elektrodu nanesena směs glukosaoxidasy a na druhou směs laktátoxidasy, pokaždé v objemu 1 μl.

Po tomto procesu následovalo vložení do Petriho misky společně s navlhčenou buničinou, utěsnění parafilmem a umístění na 24 hodin do lednice, aby mohlo dojít k zesíťování molekul. Po zesíťování byly sensory opláchnuty destilovanou vodou, nechaly se uschnout na vzduchu a následně byly skladovány za sucha v lednici při 4 °C.

Na některé sensory byla dodatečně nanesena druhá imobilizační vrstva ze směsi:

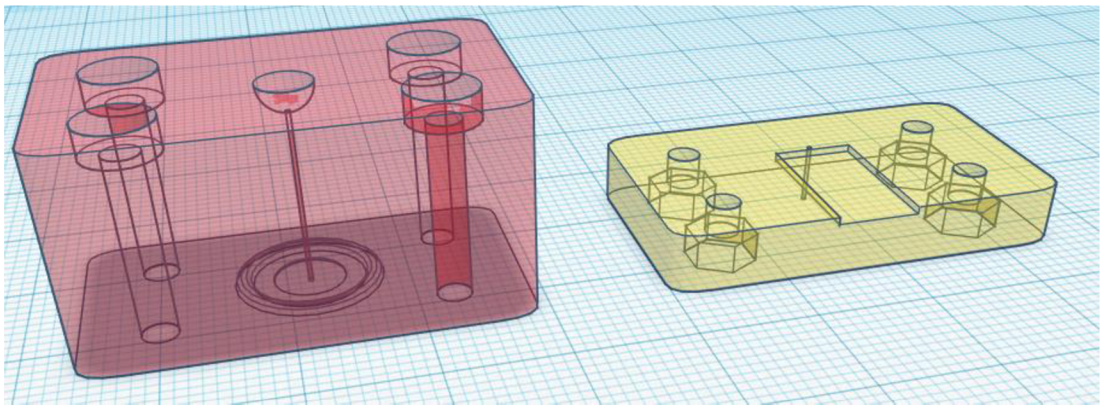
- 15 μl roztoku BSA
- 4 μl glutaraldehydu
- 21 μl fosfátového pufru

Po nanesení 1 μl směsi Hamiltonovou pipetou na povrch pracovních elektrod následovalo opět umístění na 24 hodin do lednice společně s navlhčenou buničinou v Petriho misce utěsněné parafilmem.

4.4.3 Výroba průtočné cely

Průtočná cela byla navržena v online aplikaci pro trojrozměrné modelování Tinkercad.com. Na obrázku 14 je zobrazen vytvořený návrh.

Následně byl model rozvrstven pomocí programu KISSlicer a vytisknut pomocí tiskárny od společnosti Trilab metodou FDM s použitím PLA vlákna. Dále byl také zpracován v programu PreForm, aby mohl být vytisknut také metodou SLA pomocí čiré pryskyřice s označením FLGPCL04. Po vytisknutí metodou SLA byl model opláchnut v lázni s isopropanolem, aby se odstranila nezpolymerovaná pryskyřice.

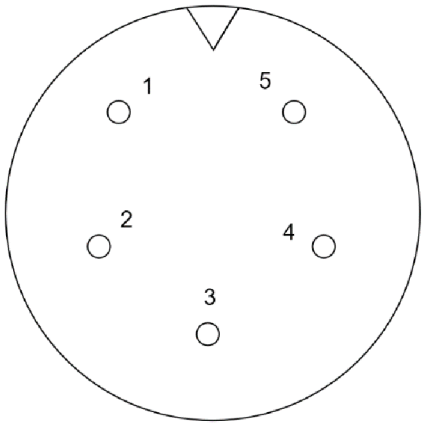


Obrázek 14 - návrh průtočné cely v aplikaci Tinkercad

Jelikož ani jedna z tiskáren nebyla schopna dostatečně kvalitně vytisknout kapiláry průtočné cely, byly dodatečně vyvrtány stolní vrtačkou s vrtákem o průměru 1 mm.

4.4.4 Úprava kabelu k potenciostatu PalmSens

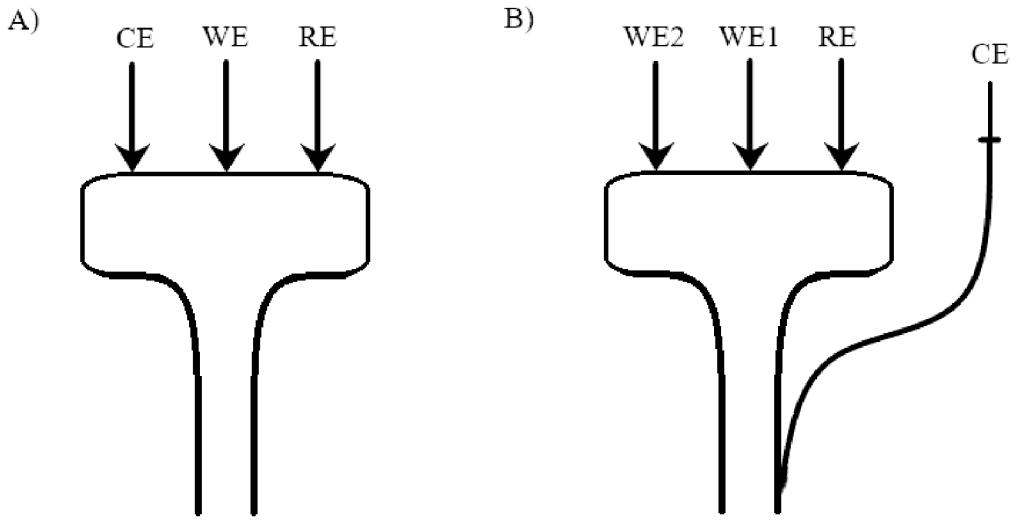
Protože kabel spojující potenciostat PalmSens se sensorem je standardně vyroben pro měření s jednou pracovní, jednou referentní a jednou pomocnou elektrodou, musel být upraven tak, aby bylo možné měřit se dvěma pracovními elektrodami, jednou referentní a jednou pomocnou elektrodou. Obrázek 15 zobrazuje schéma zapojení na rozhraní kabel – potenciostat na straně pájení.



Obrázek 15 - Schéma zapojení kontaktů na straně pájení na rozhraní kabel – potenciostat. V původním zapojení bylo uspořádání: 1 – pracovní elektroda,

2 – uzemnění, 3 – prázdný, 4 – pomocná elektroda, 5 – referentní elektroda. V upraveném zapojení byla na místo č. 3 zapojena druhá pracovní elektroda.

Současně s tím bylo změněno také rozhraní kabel – sensor. Původní zapojení obsahovalo pracovní, pomocnou a referentní elektrodu. V upraveném zapojení byla na místo pomocné elektrody zapojena druhá pracovní elektroda a pomocná elektroda byla vyvedena samostatným kabelem zakončeným platinovým drátkem. Tato úprava je znázorněna na obrázku 16.



Obrázek 16 - Úprava rozhraní kabel – sensor pro potenciostat PalmSens. A) původní zapojení s pracovní, pomocnou a referentní elektrodou, B) upravené zapojení, kam byla navíc přidána druhá pracovní elektroda a pomocná elektroda byla vyvedena samostatným kabelem (WE – pracovní elektroda, RE – referentní elektroda, CE – pomocná elektroda)

4.4.5 Postup měření a vyhodnocení

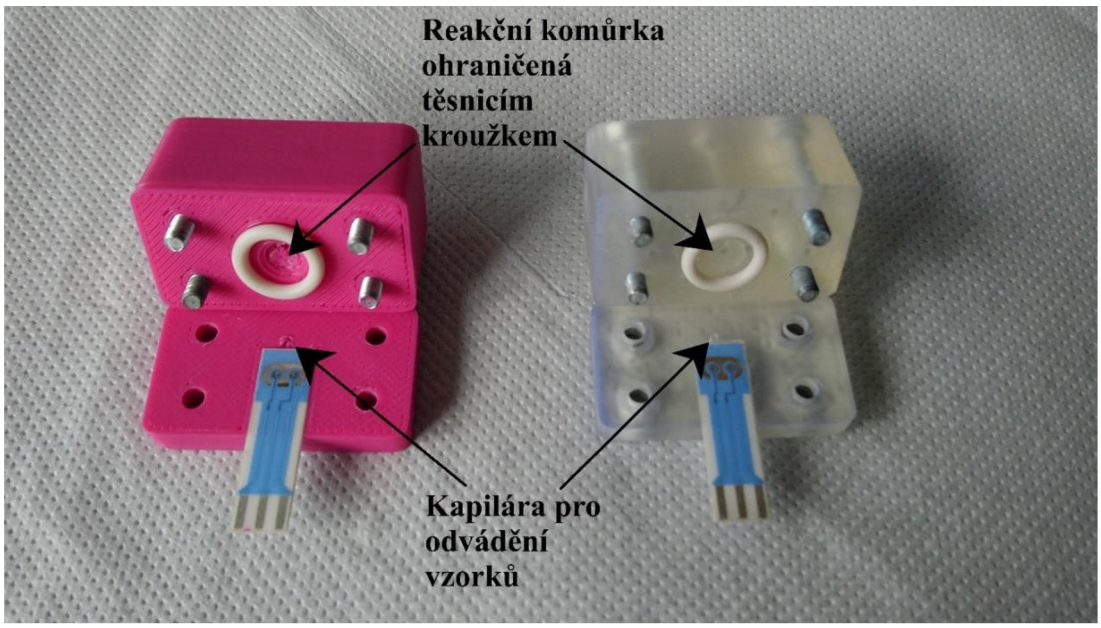
Měření probíhalo při potenciálu +650 mV v průtočné cele vytvořené metodou SLA. Byly použity přídavky 40 µl, které byly dávkovány automatickou pipetou do patřičného místa na průtočné cele. Po ustálení signálu byla cela propláchnuta pufrem, aby došlo k návratu signálu na základní linii. Při experimentech s potenciostatem PalmSens probíhalo měření v programu PStrace. Při práci s potenciostatem ImmunoSMART probíhalo měření v programu Multilab a získaná data byla ukládána aplikací Labtools. Konečné vyhodnocení bylo provedeno v programu MS Excel.

4.5 Výsledky a diskuse

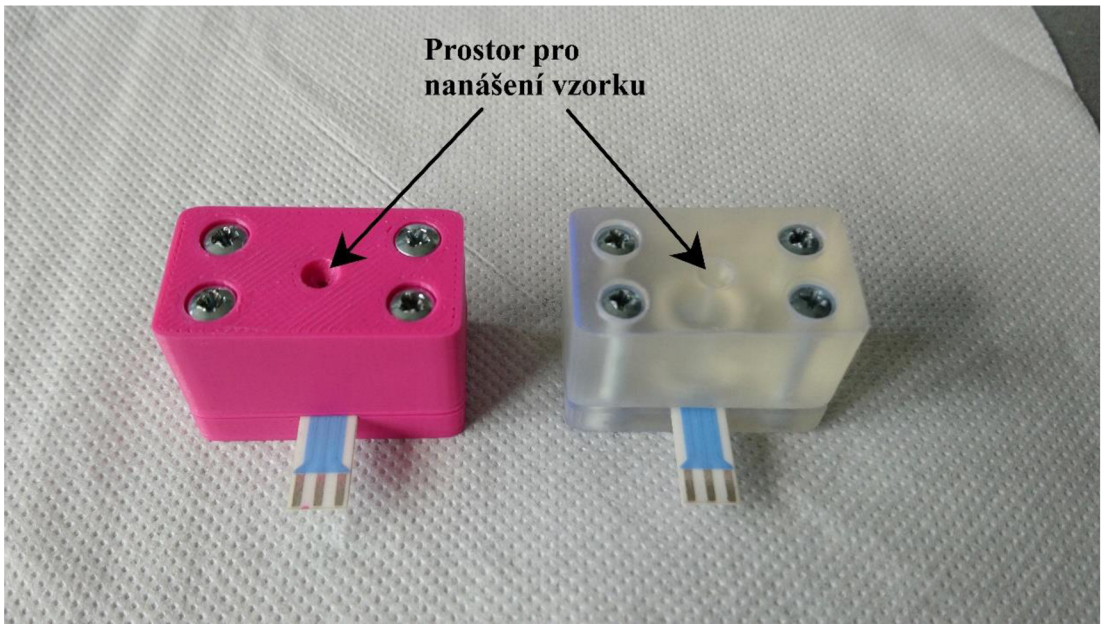
4.5.1 Průtočná cela

Průtočná cela navržená v aplikaci Tinkercad byla vytisknuta metodami FDM a SLA. Cela je složena ze dvou částí, které se k sobě připojují pomocí šroubů a matek. Ve spodní části cely se nachází místo pro vložení sensoru a kapilára pro odvádění vzorků. V horní části se nachází místo pro nanášení vzorku o objemu 40 µl, které je spojeno kapilárou s reakční komůrkou o objemu 30 µl. Kolem reakční komůrky je navíc umístěn gumový kroužek, aby nedocházelo k nežádoucímu unikání vzorků.

U cely vytvořené metodou SLA byla patrná výrazně vyšší povrchová kvalita, a také detailněji vytisknuté drobné struktury. Produkt v rozloženém stavu je zobrazen na obrázku 17, po složení na obrázku 18.



Obrázek 17 - Na obrázku vlevo je průtočná cela vytvořená metodou FDM, vpravo můžeme vidět celu vytisknutou metodou SLA. Obě v rozloženém stavu.



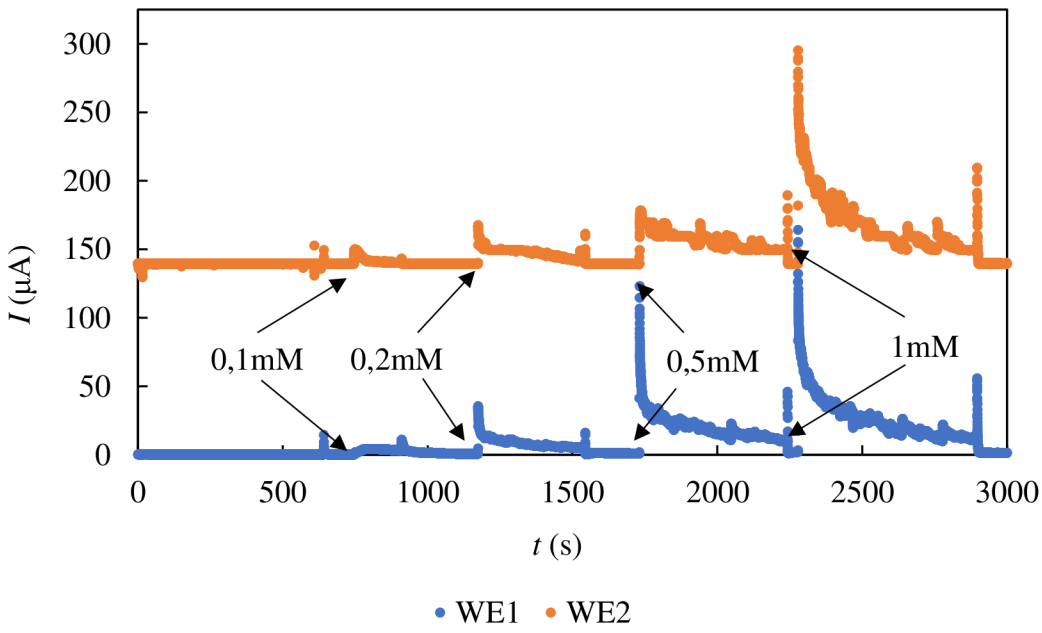
Obrázek 18 - Vlevo je zobrazena cela vytisknutá metodou FDM, vpravo metodou SLA, obě složené.

4.5.2 Měření s potenciostatem PalmSens

Test funkčnosti průtočné cely

V první řadě bylo otestováno, zda vzorek protéká oběma celami. Při tomto pokusu bylo zjištěno, že z cely vytvořené metodou FDM část vzorku nevytéká. To bylo způsobeno tím, že technika FDM tvoří modely v nižší kvalitě a vnitřní prostor není úplně vyplněn materiálem, takže mohou vznikat dutiny. Cela vytvořená metodou SLA se osvědčila a byla zvolena jako vhodnější pro další měření.

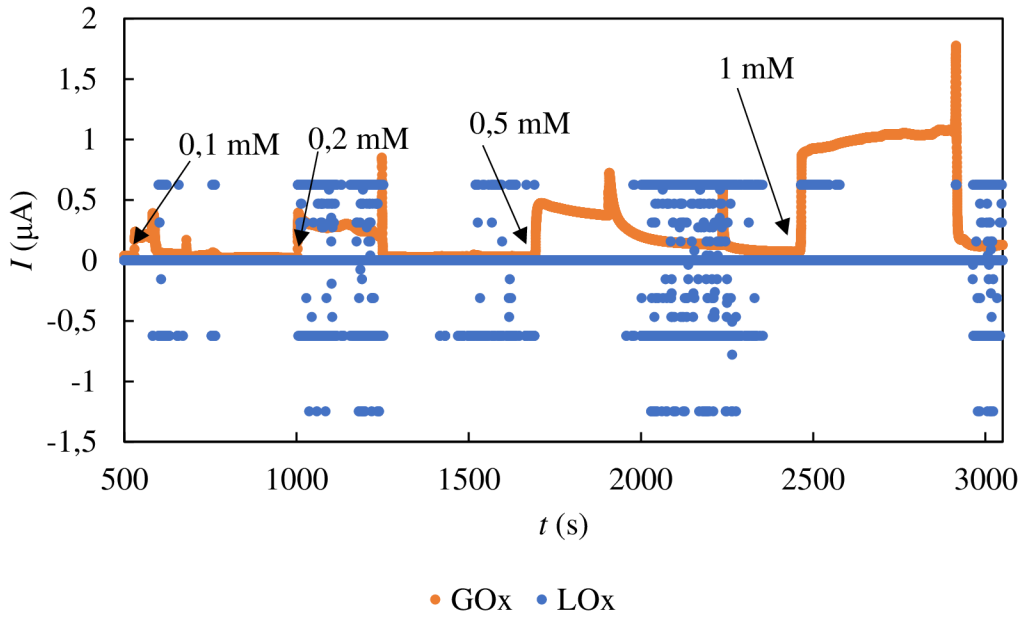
Zadruhé byla otestována funkčnost celého systému s potenciostatem PalmSens při amperometrickém měření, kdy byl do průtočné cely vložen holý sensor a byly změřeny odezvy proudu na různé koncentrace peroxidu vodíku při potenciálu +650 mV. Při tomto měření byly použity přídavky 40 µl a koncentrace standardních roztoků 0,1; 0,2; 0,5 a 1 $mmol.l^{-1}$. Podle očekávání obě pracovní elektrody na přídavky peroxidu reagovaly nárůstem proudové odezvy. Odezvy elektrod v čase ilustruje obrázek 19.



Obrázek 19 – graf průběhu proudu v čase při měření s holým sensorem při potenciálu +650 mV v průtočné cele vytvořené metodou SLA s přídavky 40 µl peroxidu vodíku o koncentracích 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1}

Měření s glukosou a laktátem

Při experimentech se sensory v průtočné cele, s imobilizovanou glukosaoxidasou a laktátoxidasou, s potenciostatem PalmSens, byly tyto sensory vystavovány standardním roztokům glukosy a laktátu o koncentracích 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1}, vždy v objemu 40 µl. Ukázalo se, že na tyto přídavky reaguje pouze pracovní elektroda s glukosaoxidasou a elektroda pro laktát poskytuje pouze šum. Tento druh měření ilustruje obrázek 20.



Obrázek 20 – Proudová odezva v čase při měření se sensorem s imobilizovanou glukosaoxidasou a laktátoxidasou. Byly provedeny přídavky 40 µl standardních roztoků glukosy a laktátu o koncentracích 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1} při potenciálu +650 mV. Odpovídající odezvu poskytovala pouze elektroda pro glukosu.

To, že odezvu poskytovala pouze jedna elektroda mohlo mít více příčin. Důvodem mohlo být například vysoké procento vadných sensorů od výrobce, degradace imobilizované vrstvy, nebo porucha potenciostatu, kdy funkce v bipotenciostatickém režimu může být problematická z elektrochemického hlediska a zde i po softwarové stránce.

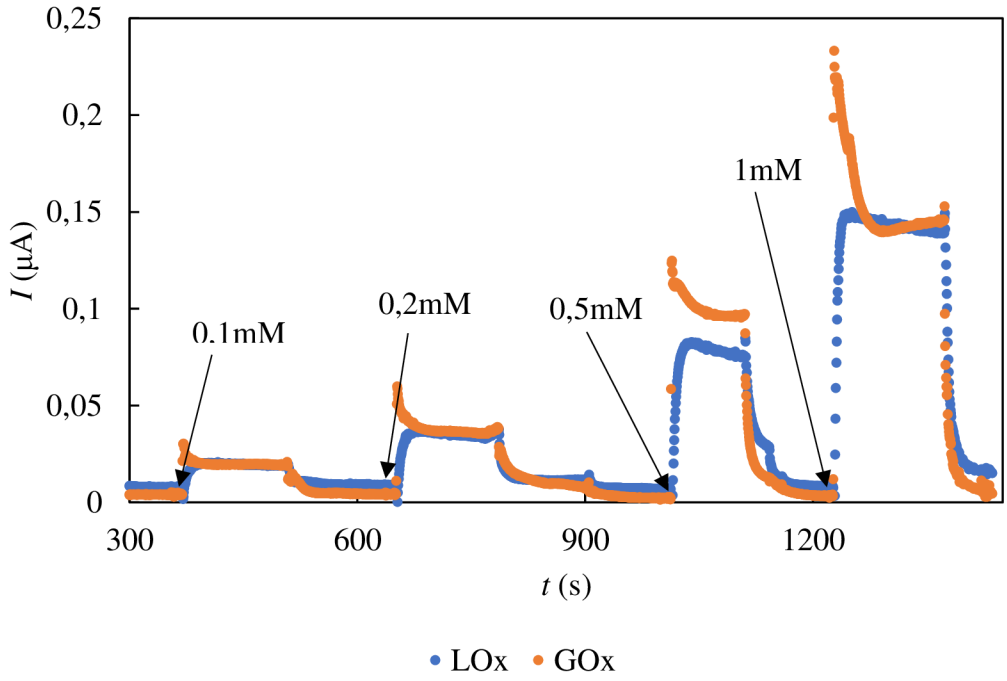
Dalším problémem v tomto měřicím systému bylo, že program PSTrace, ve kterém probíhalo měření, často vykazoval chybové hlášky, za kterými následovalo ukončení programu. Zdá se, že daná verze firmware detektoru s bipotenciostatickým modem není zcela kompatibilní. Proto další měření probíhala se čtyřkanálovým potenciostatem ImmunoSMART. U tohoto potenciostatu byl pro všechny elektrody použit stejný potenciál, ale použity byly pouze dva měřící kanály.

4.5.3 Měření s potenciostatem ImmunoSMART.

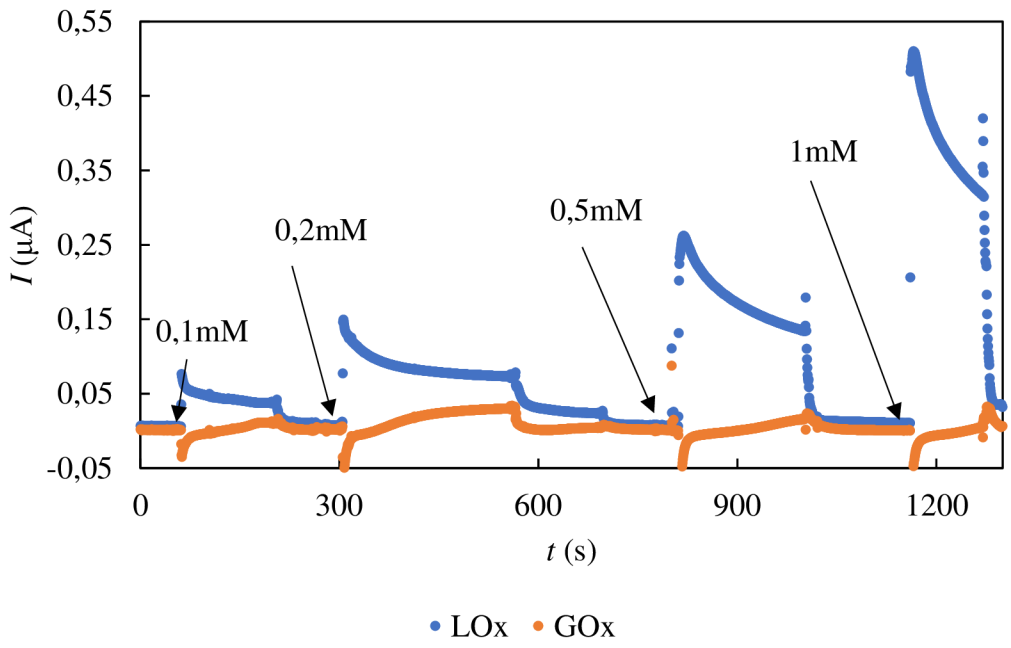
Test selektivity

Bylo otestováno, zda produkt z jedné pracovní elektrody neovlivňuje signál elektrody druhé. To bylo provedeno tak, že byl dvoukanálový biosensor vystaven standardním roztokům glukosy nebo laktátu o koncentraci 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1}

při potenciálu +650 mV. Výsledek tohoto experimentu zobrazuje obrázek 21 pro roztoky glukosy a obrázek 22 pro roztoky laktátu.



Obrázek 21 – graf průběhu proudu v čase u sensorů s imobilizovanými enzymy glukosaoxidasou a laktátoxidasou, při přídavcích 40 µl standardních roztoků glukosy o koncentraci 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1} při potenciálu +650 mV.



Obrázek 22 – graf průběhu proudu v čase u sensorů s imobilizovanou glukosaoxidasou a laktátoxidasou při přídavcích 40 µl standardních roztoků laktátu o koncentraci 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1} při potenciálu +650 mV.

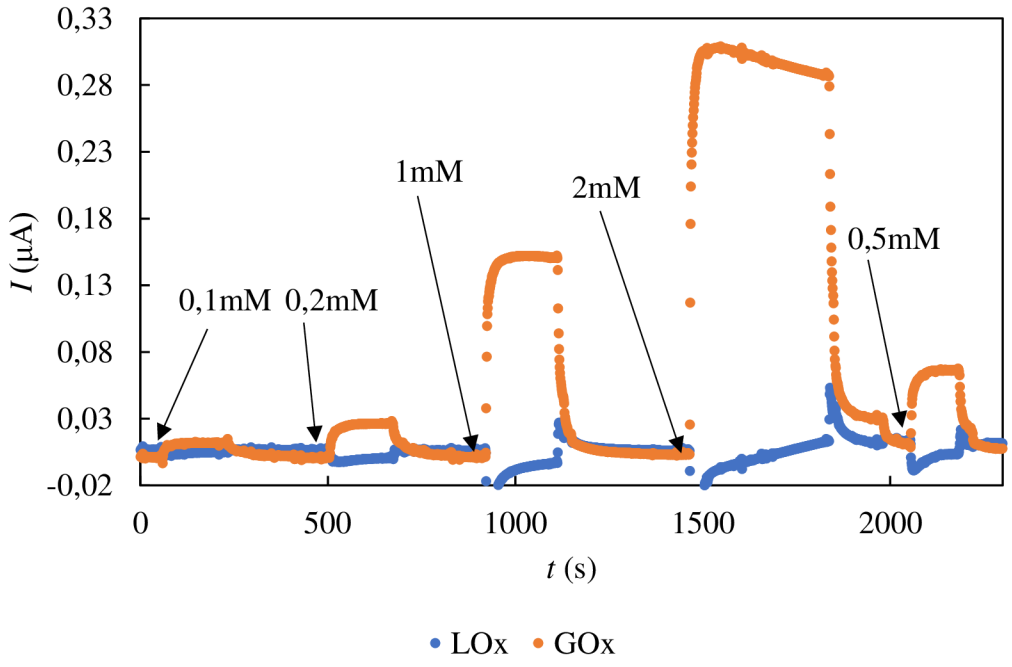
Bylo zjištěno, že při přídavcích roztoků glukosy vzniká výrazný falešný signál na elektrodě pro laktát. Naopak při přídavcích roztoků laktátu byl falešný signál glukosové elektrody minimální.

Důvodem tohoto jevu by mohla být příliš rychlá tvorba produktu reakce, způsobená vysokou aktivitou enzymu na glukosové elektrodě. Vznikající peroxid vodíku by následně difúzí mohl doputovat k elektrodě pro laktát. Po výpočtu aktivity enzymu vztažené na jednu elektrodu bylo ale zjištěno, že teoretická aktivita na glukosové elektrodě je nižší než na elektrodě pro laktát, takže se tato teorie jeví jako méně pravděpodobná. Teoretické aktivity enzymů vztažené na jednu elektrodu můžeme vidět v tabulce 3. Ve skutečnosti ale tyto hodnoty mohou být ovlivněny hodnotou pH prostředí a okolní teplotou, případně také nepřesností pipetování.

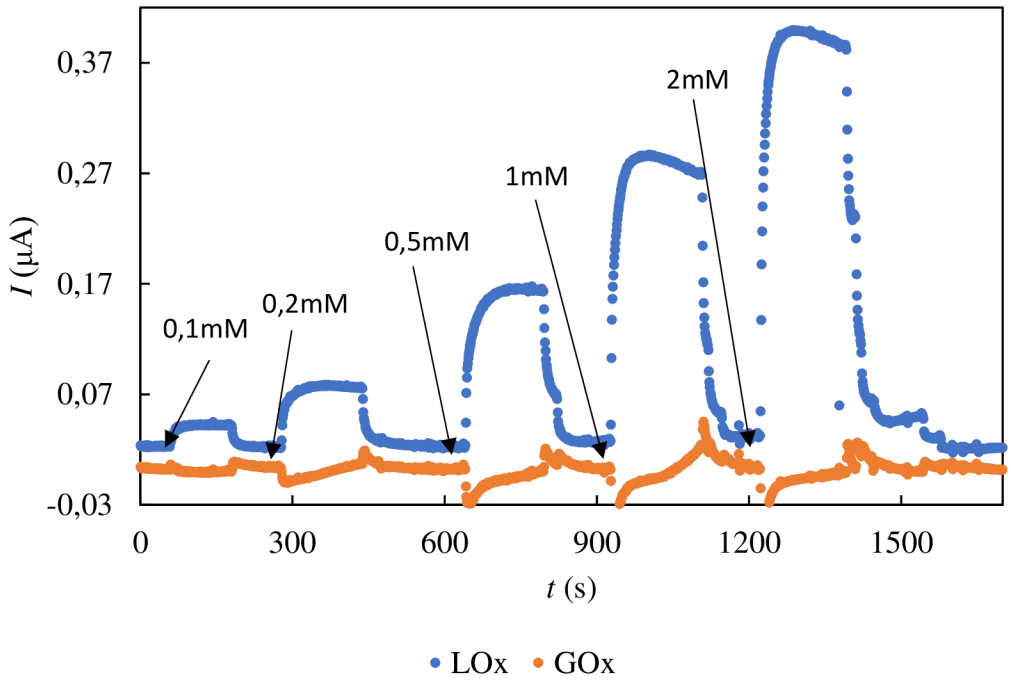
Tabulka 3 – Vypočtené aktivity enzymů na jedné elektrodě

Enzym	Aktivita vztažená na jednu elektrodu
Glukosaoxidasa	0,67 IU
Laktátoxidasa	1,08 IU

Druhým, pravděpodobnějším vysvětlením je schopnost peroxidu vodíku rychleji difundovat skrz imobilizovanou vrstvu na laktátové elektrodě oproti elektrodě pro glukosu a tvořit tak falešný signál. Proto bylo přistoupeno k experimentu, kdy byla na imobilizovanou enzymovou vrstvu nanesena druhá, blokující vrstva, obsahující BSA a glutaraldehyd, která by měla omezit únik peroxidu vodíku do okolního roztoku. Výsledky z tohoto měření zobrazují obrázky 23 a 24.



Obrázek 23 – test selektivity dvoukanálového biosensoru po přidání druhé, blokující vrstvy tvořené BSA a glutaraldehydem. Měření probíhalo při potenciálu +650 mV a s přídavky 40 µl standarních roztoků glukosy o koncentraci 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 mmol.l^{-1}.

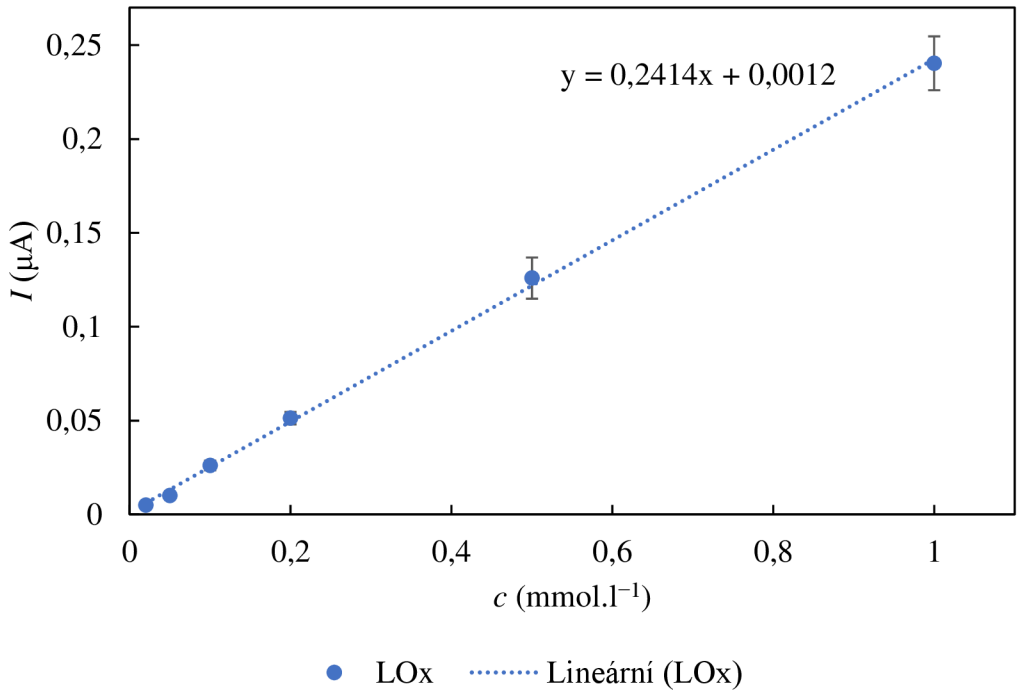


Obrázek 24 – test selektivity dvoukanálového biosensoru s dodatečnou blokující vrstvou tvořenou BSA a glutaraldehydem. Pro měření byl použit potenciál +650 mV a přídavky 40 µl. Sensor byl vystavován standardním roztokům laktátu o koncentracích 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 a 2,0 mmol.l^{-1}.

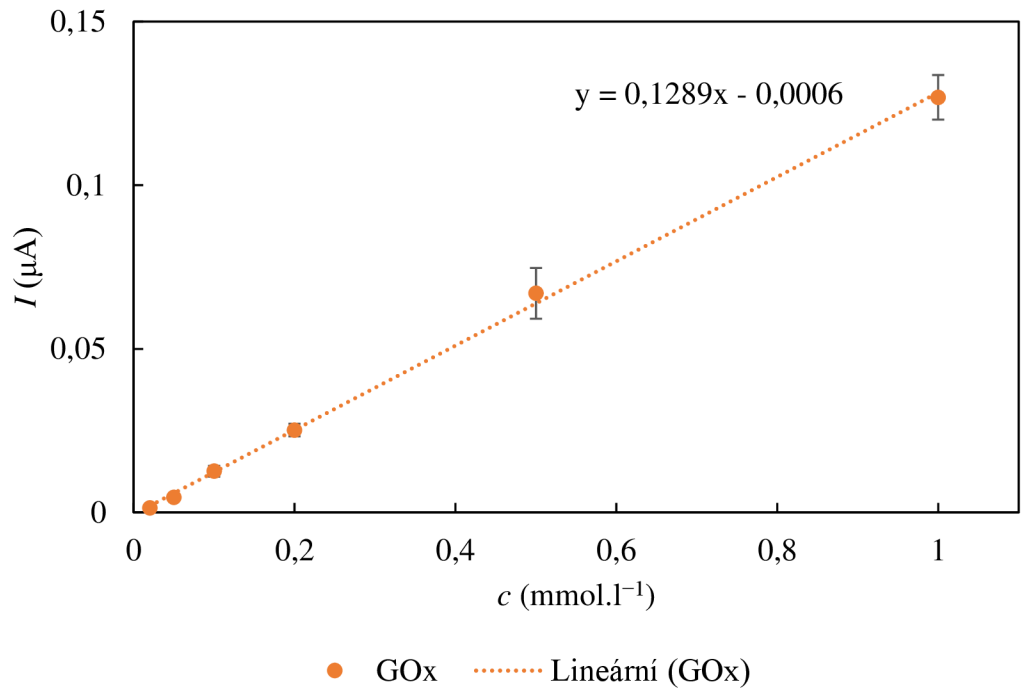
Z grafů je patrné, že imobilizace druhé, blokující vrstvy na vrstvu s enzymem výrazně zvyšuje selektivitu jak glukosové, tak laktátové elektrody. Pro úplné odstranění falešných signálů by bylo možné využít enzymů s mediátory, nebo přímého přenosu elektronů mezi enzymem a elektrodou. [28]

Tvorba kalibračních závislostí

Při tvorbě kalibračních závislostí byly biosensory vystavovány roztokům glukosy nebo laktátu o známé koncentraci. Pro každý sensor proběhla všechna měření třikrát a nejistota byla vyjádřena jako směrodatná odchylka. Kalibrační závislosti vykazovaly lineární rozsah v rozpětí koncentrací 0,02 – 1 mmol.l^{-1}, jako u podobných prací. [75] V některých studiích ale bylo dosaženo lineárního rozsahu až do 4 [57] nebo 5 mmol.l^{-1}. [74] Širšího lineárního rozsahu by se dalo dosáhnout přidáním vrstvy, která více omezuje difúzi, nevýhodou by bylo snížení citlivosti. [1] Ukázky kalibračních závislostí jsou na obrázcích 25 a 26.



Obrázek 25 – Kalibrační závislost laktátové elektrody sensoru č. 7. Sensor byl vystavován standardním roztokům laktátu o koncentracích 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1} při potenciálu +650 mV. Měření probíhalo v průtočné cele a vždy byl dávkován objem 40 µl. Nejistota je vyjádřena jako směrodatná odchylka.



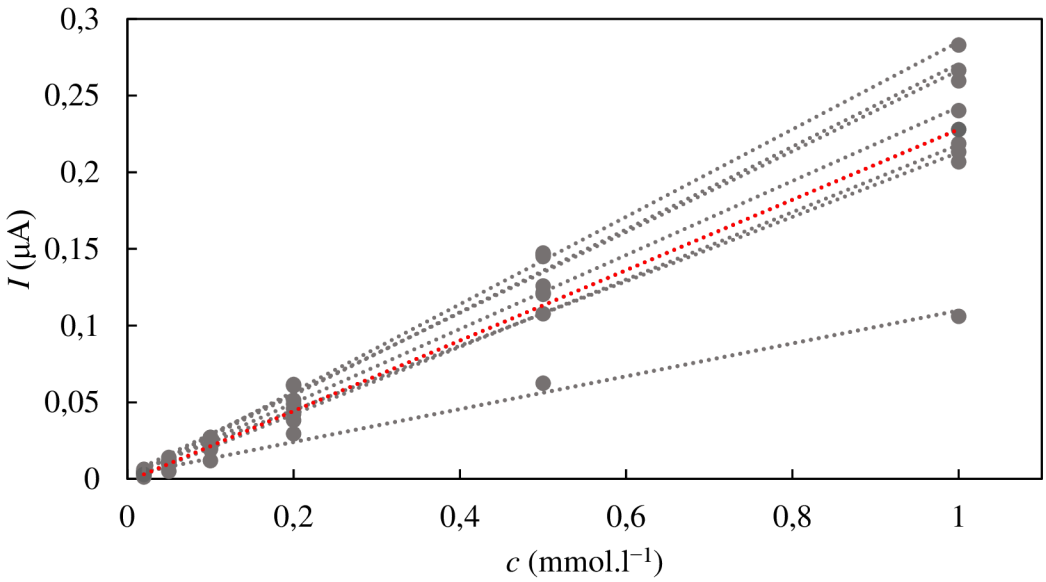
Obrázek 26 – Kalibrační závislost glukosové elektrody sensoru č. 7. Graf zobrazuje závislost proudu na koncentraci glukosy při potenciálu +650 mV. Byly použity standardní roztoky o koncentracích 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 a 1 mmol.l^{-1}, vždy v objemu 40 µl. Měření probíhalo v průtočné cele vytvořené metodou SLA. Nejistota je vyjádřena jako směrodatná odchylka.

U některých sensorů se kalibrační závislosti nepodařilo získat z důvodu jejich poškození, případně poškození enzymových vrstev. Rovnice kalibračních závislostí jednotlivých biosensorů shrnuje tabulka 4. Vizuální srovnání kalibračních přímek s jejich průměrnou hodnotou je na obrázcích 27 a 28.

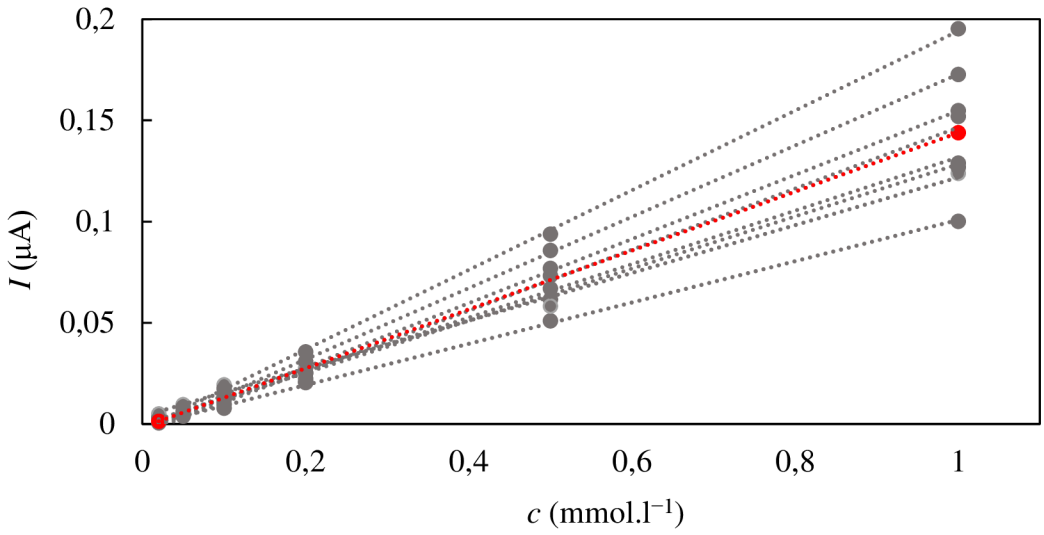
Tabulka 4 – Shrnutí rovnic kalibračních přímek platících v lineárním rozsahu 0,02 – 1 mmol.l^{-1} pro glukosu a laktát.

	Rovnice kalibrační přímky	
Sensor	**Glukosa**	**Laktát**
1	y = 0,1020x – 0,0012	y = 0,1072x + 0,0026
2	-	-
3	y = 0,1510x – 0,0044	y = 0,2197x – 0,0018
4	y = 0,1181x + 0,0038	y = 0,2102x + 0,0028
5	-	-

	Rovnice kalibrační přímky	
Sensor	**Glukosa**	**Laktát**
6	y = 0,1321x – 0,0003	y = 0,2699x + 0,0008
7	y = 0,1289x – 0,0006	y = 0,2414x + 0,0012
8	y = 0,1968x – 0,0026	y = 0,2637x + 0,0028
9	y = 0,1762x – 0,0034	y = 0,2852x – 0,0002
10	y = 0,1585x – 0,0037	y = 0,2189x – 7.10^{-5}
průměr	y = 0,1455x – 0,0016	y = 0,2270x + 0,0010



Obrázek 27 – Srovnání kalibračních přímek jednotlivých laktátových elektrod. Červená přímka značí průměrnou hodnotu.



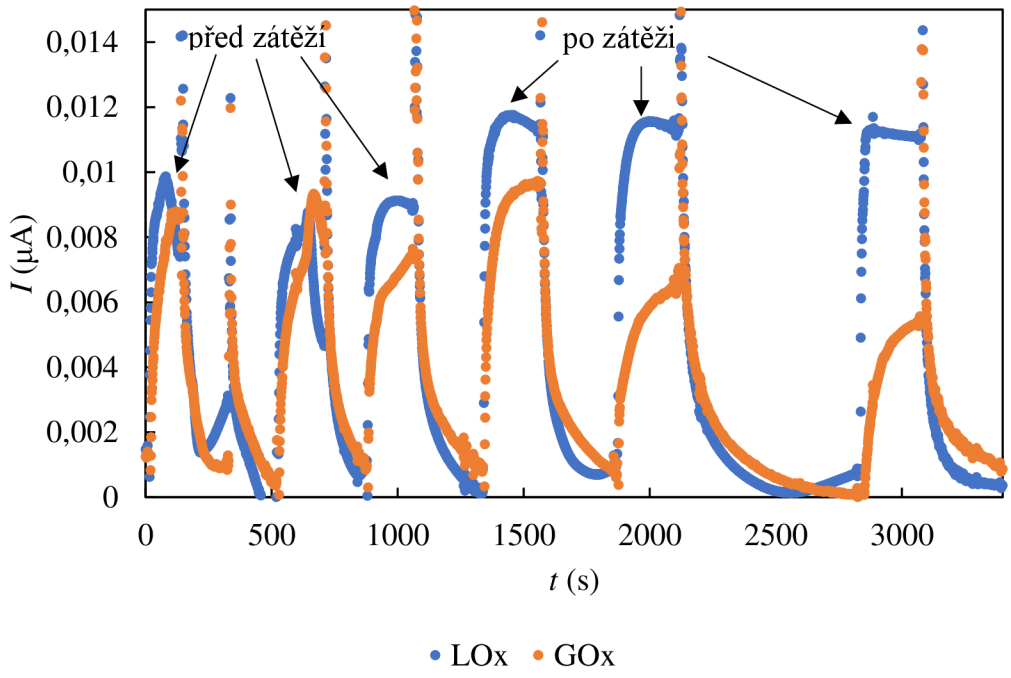
Obrázek 28 – Srovnání kalibračních přímek jednotlivých elektrod pro glukosu. Průměrná hodnota je znázorněna červenou přímkou.

Z tabulky 4 a obrázků 27 a 28 je, až na pár výjimek, vidět poměrně dobrá opakovatelnost kalibrací jak laktátových, tak glukosových elektrod. Drobné rozdíly v citlivosti jednotlivých elektrod jsou způsobeny odchylkami při výrobě, případně také nepřesnostmi při nanášení enzymových vrstev. Elektrody pro laktát mají obecně vyšší citlivost než glukosové elektrody, což můžeme přičíst vyšší aktivitě enzymu na laktátových elektrodách. Těmto odchylkám by se dalo předejít například výrobou elektrod, včetně enzymových vrstev, pomocí 3D tiskárny. [50]

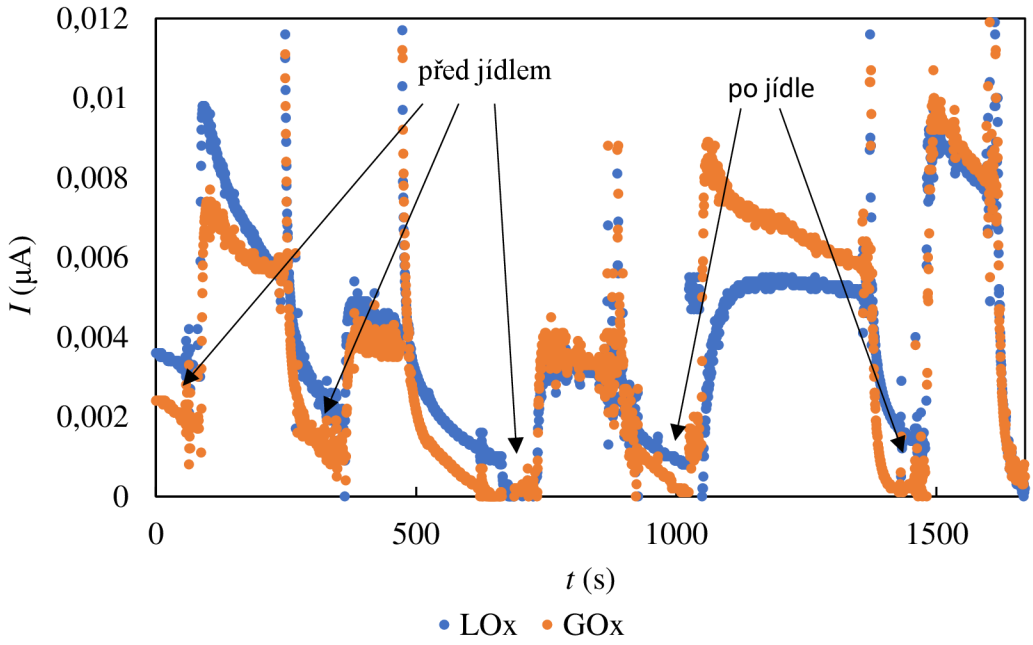
Měření se vzorky slin

Sliny byly získány od dvou dárců, z nichž ani jeden nebyl diabetik. Bylo doporučeno, aby dobrovolníci alespoň hodinu před odběrem nejedli, nepili a nekouřili. U jednoho z dárců byly vzorky odebrány nalačno a hodinu po jídle, u druhého před cvičením a po cvičení. Vzorky byly poté uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

V průběhu experimentů bylo zjištěno, že koncentrované sliny způsobují vysokou úroveň šumu, pravděpodobně kvůli přítomnosti bublinek ve vzorku. Po trojnásobném zředění fosfátovým pufrem se úroveň šumu snížila. Obrázek 29 zobrazuje měření se zředěným vzorkem slin před zátěží a po zátěži, obrázek 30 před jídlem a po jídle. Z grafu je patrné, že po zátěži stoupla hladina laktátu a naopak klesla hladina glukosy.



Obrázek 29 – Proudová odezva sensoru č. 7 na vzorky slin odebrané před zátěží a po zátěži. Měření probíhalo v průtočné cele při potenciálu +650 mV. Bylo dávkováno 40 µl třikrát zředěného vzorku.



Obrázek 30 – Proudová odezva sensoru č. 4 na vzorky slin odebrané před jídlem a po jídle. Měřeno při potenciálu +650 mV v průtočné cele za použití přídavků 40 µl trojnásobně zředěných vzorků.

Proudová odezva každého vzorku byla změřena třikrát a byla provedena korekce z důvodu ředění. Z takto získaných hodnot byla získána průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Koncentrace byla vypočtena dosazením hodnot proudu do rovnic kalibračních přímek. Nejistota koncentrace byla stanovena pomocí relativní chyby proudové odezvy. V tabulce 5 můžeme vidět stanovenou koncentraci glukosy a laktátu nalačno a hodinu po jídle. Tabulka 6 shrnuje výsledky stanovení glukosy a laktátu ve vzorku slin odebraným před sportovní aktivitou a po ní. Měření s těmito vzorky proběhlo opakovaně pomocí různých sensorů v rámci několika dní.

Tabulka 5 – koncentrace glukosy a laktátu stanovené nalačno a po jídle ve slinách od dárce č. 2.

	Koncentrace laktátu (µmol.l^{-1})		**Koncentrace glukosy (µmol.l^{-1})**	
Sensor	**Nalačno**	**Po jídle**	**Nalačno**	**Po jídle**
4	46±6	64±15	82±8	146±25

Zvýšenou hladinu laktátu po jídle pozoroval i Palleschi a kol., kteří tento jev přisuzují interferujícím látkám z potravy. [76]

Tabulka 6 – Shrnutí zjištěných koncentrací glukosy a laktátu ve slinách. Odběr proběhl před fyzickou zátěží a po fyzické zátěži od dárce č. 1. Sensory byly použity v poradí 7, 6, 3, 1.

	Koncentrace laktátu (µmol.l^{-1})		**Koncentrace glukosy (µmol.l^{-1})**	
Sensor	**Před zátěží**	**Po zátěži**	**Před zátěží**	**Po zátěži**
1	21±1	50±13	101±2	135±38
3	46±8	77±5	152±4	184±6
6	97±27	152±4	144±20	158±31
7	105±7	138±1	194±17	131±12

Z hodnot je patrná zvyšující se koncentrace laktátu po fyzické aktivitě v důsledku anaerobního odbourávání glukosy vedoucímu přes pyruvát až k laktátu. Koncentrace samotné glukosy ve většině případů po zátěži také narostla, ale tato hladina u zdravých jedinců nemusí korelovat s koncentrací glukosy v krvi. Ragunathan a kol. [77] tvrdí, že fyzická aktivita způsobuje nárůst koncentrace α-amylázy ve slinách, která má za následek zvýšení hladiny glukosy.

Palleschi a kol. [76] zjistili hodnoty laktátu ve slinách nalačno v rozmezí 60 – 700 μmol.l^{-1} a po jídle v rozmezí 400 – 1200 μmol.l^{-1}. Výsledky v této práci se pohybují spíše na spodní hranici prvního z intervalů.

Podobné koncentrace glukosy ve slinách zjistili Yamaguchi a kol. [78] , kteří stanovili hladinu glukosy ve slinách zdravých jedinců v rozmezí 8 – 212 μmol.l^{-1}. Mírně vyšší hodnoty zjistili Gupta a kol. [79] (299 – 568 μmol.l^{-1}), a také Agrawal a kol. [80] (273 – 407 μmol.l^{-1}). Některé práce naopak ve slinách zdravých jedinců glukosu neobjevily. [81]

V porovnání s jinými studiemi byly zjištěné koncentrace, obzvláště u laktátu, nižší. Jednou z příčin by mohlo být nedodržení pokynů před odběrem vzorků slin. Stimulací slinných žláz dochází ke zvýšené produkci vodné fáze slin, tím pádem k jejich zředění. [79] Různé sensory poskytly různé koncentrace analytů ve stejných vzorcích pravděpodobně proto, že vzorky byly mezi měřeními opakovaně rozmrazovány a zamrazovány. Protože sliny jsou biologicky aktivní, vedly časté změny teplot k degradaci analytů ve vzorcích. Bylo by nutné toto vzít v úvahu a zavést standardizovaný postup zacházení s odebranými vzorky. Roli mohla hrát také postupná ztráta aktivity biorekogniční vrstvy.

4.6 Závěr

Byl navržen model průtočné cely, který byl následně vytisknut 3D tiskárnami pomocí technik FDM a SLA. Výrobek ze SLA tiskárny byl shledán vhodnějším pro další práci, díky vyšší povrchové kvalitě.

Za cílem detekce glukosy a laktátu byly na dvoukanálové sítotiskové sensory imobilizovány enzymy glukosaoxidasa a laktátoxidasa. Po prvotních pokusech se projevila nízká selektivita dvoukanálových sensorů. Důvodem bylo, že detekce obou analytů je v případě zmíněných enzymů založena na detekci peroxidu vodíku. Vyšší selektivitě se napomohlo přidáním vrstvy blokující difúzi.

S těmito sensory byly úspěšně sestrojeny kalibrační závislosti. Při měření se slinami se ale projevily nedostatky v postupu zacházení s biologickými vzorky a zjištěné koncentrace byly ve většině případů několikanásobně nižší než v odborné literatuře.

Dalším možným postupem by mohlo být zopakování experimentu s větším množstvím vzorků a se zavedeným standardizovaným postupem zacházení s nimi. Také by bylo ideální upravit instrumentaci a postup tak, aby bylo možné nanášet vzorky slin bez ředění a bez použití pipety. Současné 3D tiskárny jsou kompatibilní s mnoha druhy materiálů a dokážou tisknout i elektronické součástky. Toho by se dalo využít k výrobě zařízení podobného glukometru, které by dokázalo neinvazivně stanovit glukosu a laktát zároveň. Případně by mohl být proveden pokus o nalezení vztahu mezi koncentrací glukosy a laktátu ve slinách a v krvi.

Bibliografie

[1] THEVENOT, Daniel R, Klara TOTH, Richard A DURST a George S WILSON. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification_. 2001, 11.

[2] SKLÁDAL, Petr. *Biosensory*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2002.

[3] BHALLA, N., P. JOLLY, N. FORMISANO a P. ESTRELA. Introduction to biosensors. *Essays In Biochemistry* [online]. 2016, **60**(1), 1–8. ISSN 0071-1365, 1744-1358. Dostupné z: doi:10.1042/EBC20150001

[4] ARTIGUES, Margalida, Jordi ABELLÀ a Sergi COLOMINAS. Analytical Parameters of an Amperometric Glucose Biosensor for Fast Analysis in Food Samples. *Sensors* [online]. 2017, **17**(11), 2620. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s17112620

[5] MOHAMAD, Nur Royhaila, Nur Haziqah Che MARZUKI, Nor Aziah BUANG, Fahrul HUYOP a Roswanira Abdul WAHAB. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [online]. 2015, **29**(2), 205–220. ISSN 1310-2818, 1314-3530. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2015.1008192

[6] FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW, ed. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley, 1999. Wiley biotechnology encyclopedias. ISBN 978-0-471-13822-8.

[7] SPAHN, Cynthia a Shelley MINTEER. Enzyme Immobilization in Biotechnology. *Recent Patents on Engineering* [online]. 2008, **2**(3), 195–200. ISSN 18722121. Dostupné z: doi:10.2174/187221208786306333

[8] GORECKA, Elzbieta. *Immobilization Techniques And Biopolymer Carriers – A Review*. 2011.

[9] BANKS, Craig E., Christopher W. FOSTER a Rashid O. KADARA. *Screen-Printing Electrochemical Architectures* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016 [vid. 2019-03-08]. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN 978-3-319-25191-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-25193-6

[10] BVT TECHNOLOGIES. *Electrochemical Sensor, Type: AC.W*.R*(*)* [online]. Dostupné z: http://bvt.cz/_ftp/Senzory/pdf%20web/AC2.pdf

[11] ELIF BURCU BAHADIR a Mustafa Kemal SEZGINTÜRK. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry* [online]. 2015, **478**, 107–120. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2015.03.011

[12] ROGLIC, Gojka a WORLD HEALTH ORGANIZATION, ed. *Global report on diabetes*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2016. ISBN 978-92-4-156525-7.

[13] LEE, Thomas. Over-the-Counter Biosensors: Past, Present, and Future. *Sensors* [online]. 2008, **8**(9), 5535–5559. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s8095535

[14] NIRAJ, M.M., Madan Mohan GUPTA, S VARSHNEY a Shweta PANDEY. *Singh, Sensors for diabetes: Glucose biosensors by using different newer techniques: A review*. 2012.

[15] YOO, Eun-Hyung a Soo-Youn LEE. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4558–4576. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s100504558

[16] PAULS, Alan, Pearl MOHARIL, Pratyush RAVICHANDER a Shanthi VEERAPPAPILLAI. First Generation Amperometric Glucose Biosensor For Determination Of Glucose At Room Temperature Using Glucose Oxidase. nedatováno, (19), 4.

[17] HOLADE, Yaovi, Sophie TINGRY, Karine SERVAT, Teko NAPPORN, David CORNU a Kouakou KOKOH. Nanostructured Inorganic Materials at Work in Electrochemical Sensing and Biofuel Cells. *Catalysts* [online]. 2017, **7**(12), 31. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/catal7010031

[18] ARAM ZOLAL, BARBORA ĎURČIOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ a PETR KAČER. LFIA v medicinální diagnostice rakovinného bujení. *Chemické Listy*. nedatováno, **2016**(110), 917–921. ISSN 1213-7103.

[19] COSTA SILVA, Livia Maria da, Vania Paula Salviano DOS SANTOS, Andrea MEDEIROS a Karen SIGNORI. Biosensors for Contaminants Monitoring in Food and Environment for Human and Environmental Health. In: Toonika RINKEN, ed. *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications* [online]. B.m.: InTech, 2013 [vid. 2019-03-11]. ISBN 978-953-51-1035-4. Dostupné z: doi:10.5772/55617

[20] BARTHELMEBS, Lise, Carole CALAS-BLANCHARD, Georges ISTAMBOULIE, Jean-Louis MARTY a Thierry NOGUER. Biosensors as Analytical Tools in Food Fermentation Industry. In: Maria Teresa GIARDI, Giuseppina REA a Bruno BERRA, ed. *Bio-Farms for Nutraceuticals* [online]. Boston, MA: Springer US, 2010 [vid. 2019-03-11], s. 293–307. ISBN 978-1-4419-7346-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_22

[21] CHEE, Gab-Joo. Development and characterization of microbial biosensors for evaluating low biochemical oxygen demand in rivers. *Talanta* [online]. 2013, **117**, 366–370. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.09.031

[22] HECHT, H.J., Henryk KALISZ, Jorg HENDLE, Rolf SCHMID a Dietmar SCHOMBURG. *Crystal Structure of Glucose Oxidase from Aspergillus niger Refined at 2·3 Å Reslution* [online]. 1993. Dostupné z: doi:10.1006/jmbi.1993.1015

[23] WOHLFAHRT, Gerd, Susanne WITT, Jörg HENDLE, Dietmar SCHOMBURG, Henryk M. KALISZ a Hans-Jürgen HECHT. 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* [online]. 1999, **55**(5), 969–977. ISSN 0907-4449. Dostupné z: doi:10.1107/S0907444999003431

[24] PETROVIĆ, Dušan, David FRANK, Shina Caroline Lynn KAMERLIN, Kurt HOFFMANN a Birgit STRODEL. Shuffling Active Site Substate Populations Affects Catalytic Activity: The Case of Glucose Oxidase. *ACS Catalysis* [online]. 2017, **7**(9), 6188–6197. ISSN 2155-5435, 2155-5435. Dostupné z: doi:10.1021/acscatal.7b01575

[25] LI, Shu Jie, Yasufumi UMENA, Kazuko YORITA, Takeshi MATSUOKA, Akiko KITA, Kiyoshi FUKUI a Yukio MORIMOTO. Crystallographic study on the interaction of l-lactate oxidase with pyruvate at 1.9 Å resolution. *Biochemical and*

Biophysical Research Communications [online]. 2007, **358**(4), 1002–1007. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.021

[26] DUNCAN, John D., John O. WALLIS a Mahmood R. AZARI. Purification and properties of Aerococcusviridans lactate oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1989, **164**(2), 919–926. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(89)91546-5

[27] UMENA, Yasufumi, Kazuko YORITA, Takeshi MATSUOKA, Akiko KITA, Kiyoshi FUKUI a Yukio MORIMOTO. The crystal structure of l-lactate oxidase from Aerococcus viridans at 2.1Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2006, **350**(2), 249–256. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.025

[28] KANSO, Hussein, María BEGOÑA GONZÁLEZ GARCÍA, Su MA, Roland LUDWIG, Pablo FANJUL BOLADO a David HERNÁNDEZ SANTOS. Dual Biosensor for Simultaneous Monitoring of Lactate and Glucose Based on Thin-layer Flow Cell Screen-printed Electrode. *Electroanalysis* [online]. 2017, **29**(1), 87–92. ISSN 10400397. Dostupné z: doi:10.1002/elan.201600487

[29] PERDOMO, J., H. HINKERS, C. SUNDERMEIER, W. SEIFERT, O. MARTÍNEZ MORELL a M. KNOLL. Miniaturized real-time monitoring system for l-lactate and glucose using microfabricated multi-enzyme sensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2000, **15**(9–10), 515–522. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(00)00087-7

[30] YAMAZAKI, Tomoyuki, Takaaki IKEDA, Byounghyun LIM, Koichi OKUMURA, Makoto ISHIDA a Kazuaki SAWADA. Smart Integrated Sensor for Multiple Detections of Glucose and L-Lactate Using On-Chip Electrochemical System. *Journal of Sensors* [online]. 2011, **2011**, 1–7. ISSN 1687-725X, 1687-7268. Dostupné z: doi:10.1155/2011/190284

[31] EDAGAWA, Kazuaki, Hiroki TAKAOKA a Mikito YASUZAWA. *Preparation of Fine Implantable Needle-Type Glucose Lactate Dual Biosensors Using γ-Polyglutamic Acid*. 2013.

[32] HORVATH, Joan. *Mastering 3D Printing* [online]. Berkeley, CA: Apress, 2014 [vid. 2019-03-17]. ISBN 978-1-4842-0026-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4842-0025-4

[33] CHIA, Helena N a Benjamin M WU. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering* [online]. 2015, **9**(1) [vid. 2019-04-01]. ISSN 1754-1611. Dostupné z: doi:10.1186/s13036-015-0001-4

[34] DIMENT, Laura E, Mark S THOMPSON a Jeroen HM BERGMANN. Three-dimensional printed upper-limb prostheses lack randomised controlled trials: A systematic review. *Prosthetics and Orthotics International* [online]. 2017, **42**(1), 7–13. ISSN 0309-3646. Dostupné z: doi:10.1177/0309364617704803

[35] BOSE, Susmita, Sahar VAHABZADEH a Amit BANDYOPADHYAY. Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today* [online]. 2013, **16**(12), 496–504. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/j.mattod.2013.11.017

[36] DUL, Sithiprumnea, Luca FAMBRI a Alessandro PEGORETTI. Fused deposition modelling with ABS–graphene nanocomposites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* [online]. 2016, **85**, 181–191. ISSN 1359835X. Dostupné z: doi:10.1016/j.compositesa.2016.03.013

[37] MOHAMED, Omar A., Syed H. MASOOD a Jahar L. BHOWMIK. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. *Advances in Manufacturing* [online]. 2015, **3**(1), 42–53. ISSN 2095-3127, 2195-3597. Dostupné z: doi:10.1007/s40436-014-0097-7

[38] SHARAFELDIN, Mohamed, Abby JONES a James RUSLING. 3D-Printed Biosensor Arrays for Medical Diagnostics. *Micromachines* [online]. 2018, **9**(8), 394. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi9080394

[39] MALEK, Sardar, Jordan R RANEY, Jennifer A LEWIS a Lorna J GIBSON. Lightweight 3D cellular composites inspired by balsa. *Bioinspiration & Biomimetics* [online]. 2017, **12**(2), 026014. ISSN 1748-3190. Dostupné z: doi:10.1088/1748-3190/aa6028

[40] LOEBEL, Claudia, Christopher B RODELL, Minna H CHEN a Jason A BURDICK. Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and

for 3D-printing. *Nature Protocols* [online]. 2017, **12**(8), 1521–1541. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2017.053

[41] BILLIET, Thomas, Elien GEVAERT, Thomas DE SCHRYVER, Maria CORNELISSEN a Peter DUBRUEL. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials* [online]. 2014, **35**(1), 49–62. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.078

[42] IFKOVITS, Jamie L. a Jason A. BURDICK. Review: Photopolymerizable and Degradable Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering* [online]. 2007, **13**(10), 2369–2385. ISSN 1076-3279, 1557-8690. Dostupné z: doi:10.1089/ten.2007.0093

[43] HONG, Sungmin, Dalton SYCKS, Hon Fai CHAN, Shaoting LIN, Gabriel P. LOPEZ, Farshid GUILAK, Kam W. LEONG a Xuanhe ZHAO. 3D Printing of Highly Stretchable and Tough Hydrogels into Complex, Cellularized Structures. *Advanced Materials* [online]. 2015, **27**(27), 4035–4040. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201501099

[44] GROSS, Bethany C., Jayda L. ERKAL, Sarah Y. LOCKWOOD, Chengpeng CHEN a Dana M. SPENCE. Evaluation of 3D Printing and Its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, **86**(7), 3240–3253. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac403397r

[45] LIN, Hang, Dongning ZHANG, Peter G. ALEXANDER, Guang YANG, Jian TAN, Anthony Wai-Ming CHENG a Rocky S. TUAN. Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. *Biomaterials* [online]. 2013, **34**(2), 331–339. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.048

[46] HOFMANN, Manfred. 3D Printing Gets a Boost and Opportunities with Polymer Materials. *ACS Macro Letters* [online]. 2014, **3**(4), 382–386. ISSN 2161-1653, 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/mz4006556

[47] KOLAN, Krishna C.R., Ming C. LEU, Gregory E. HILMAS a Mariano VELEZ. Effect of material, process parameters, and simulated body fluids on mechanical properties of 13-93 bioactive glass porous constructs made by selective

laser sintering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2012, **13**, 14–24. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2012.04.001

[48] MUNSHI, Akash S. a R. Scott MARTIN. Microchip-based electrochemical detection using a 3-D printed wall-jet electrode device. *The Analyst* [online]. 2016, **141**(3), 862–869. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C5AN01956G

[49] ZANGHERI, Martina, Mara MIRASOLI, Massimo GUARDIGLI, Fabio DI NARDO, Laura ANFOSSI, Claudio BAGGIANI, Patrizia SIMONI, Mario BENASSAI a Aldo RODA. Chemiluminescence-based biosensor for monitoring astronauts' health status during space missions: Results from the International Space Station. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2019, **129**, 260–268. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2018.09.059

[50] NESAEI, Sepehr, Yang SONG, Yijia WANG, Xiaofan RUAN, Dan DU, Arda GOZEN a Yuehe LIN. Micro additive manufacturing of glucose biosensors: A feasibility study. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, **1043**, 142–149. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2018.09.012

[51] DONG, Yue, Xin MIN a Woo Soo KIM. *A 3D-Printed Integrated PCB-based Electochemical Sensor System* [online]. 2018. Dostupné z: doi:10.1109/JSEN.2018.2801459

[52] ROGERS, Chad I., Kamran QADERI, Adam T. WOOLLEY a Gregory P. NORDIN. 3D printed microfluidic devices with integrated valves. *Biomicrofluidics* [online]. 2015, **9**(1), 016501. ISSN 1932-1058. Dostupné z: doi:10.1063/1.4905840

[53] SU, Cheng-Kuan, Sheng-Chieh HSIA a Yuh-Chang SUN. Three-dimensional printed sample load/inject valves enabling online monitoring of extracellular calcium and zinc ions in living rat brains. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2014, **838**, 58–63. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.06.037

[54] SU, Cheng-Kuan, Shuo-Chih YEN, Tzu-Wen LI a Yuh-Chang SUN. Enzyme-Immobilized 3D-Printed Reactors for Online Monitoring of Rat Brain Extracellular Glucose and Lactate. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, **88**(12), 6265–6273. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b00272

[55] KISE, Drew P, Michael J REDDISH a R BRIAN DYER. Sandwich-format 3D printed microfluidic mixers: a flexible platform for multi-probe analysis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 2015, **25**(12), 124002. ISSN 0960-1317, 1361-6439. Dostupné z: doi:10.1088/0960-1317/25/12/124002

[56] SU, Cheng-Kuan, Pei-Jin PENG a Yuh-Chang SUN. Fully 3D-Printed Preconcentrator for Selective Extraction of Trace Elements in Seawater. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(13), 6945–6950. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b01599

[57] MALON, Radha S. P., Sahba SADIR, Malarvili BALAKRISHNAN a Emma P. CÓRCOLES. Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**, 1–20. ISSN 2314-6133, 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2014/962903

[58] CHIAPPIN, Silvia, Giorgia ANTONELLI, Rosalba GATTI a Elio F. DE PALO. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2007, **383**(1–2), 30–40. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2007.04.011

[59] BONAMICO, Margherita, Raffaella NENNA, Monica MONTUORI, Rita Pia Lara LUPARIA, Arianna TURCHETTI, Maurizio MENNINI, Federica LUCANTONI, Donata MASOTTI, Fabio Massimo MAGLIOCCA, Franco CULASSO a Claudio TIBERTI. First Salivary Screening of Celiac Disease by Detection of Anti-transglutaminase Autoantibody Radioimmunoassay in 5000 Italian Primary Schoolchildren: *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. 2011, **52**(1), 17–20. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0b013e3181e6f2d0

[60] ARELLANO-GARCIA, Me, S HU, J WANG, B HENSON, H ZHOU, D CHIA a Dt WONG. Multiplexed immunobead-based assay for detection of oral cancer protein biomarkers in saliva. *Oral Diseases* [online]. 2008, **14**(8), 705–712. ISSN 1354523X, 16010825. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-0825.2008.01488.x

[61] RYU, O. H., J. C. ATKINSON, G. T. HOEHN, G. G. ILLEI a T. C. HART. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-

dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology* [online]. 2006, **45**(9), 1077–1086. ISSN 1462-0332, 1462-0324. Dostupné z: doi:10.1093/rheumatology/kei212

[62] MARTI-ALAMO, S., A. MANCHENO-FRANCH, C. MARZAL-GAMARRA a L. CARLOS-FABUEL. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* [online]. 2012, e237-243. ISSN 19895488. Dostupné z: doi:10.4317/jced.50865

[63] HU, Shen, Jianghua WANG, Jiska MEIJER, Sonya IEONG, Yongming XIE, Tianwei YU, Hui ZHOU, Sharon HENRY, Arjan VISSINK, Justin PIJPE, Cees KALLENBERG, David ELASHOFF, Joseph A. LOO a David T. WONG. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis & Rheumatism* [online]. 2007, **56**(11), 3588–3600. ISSN 00043591, 15290131. Dostupné z: doi:10.1002/art.22954

[64] MEDINA, Ml, Mg MEDINA, Gt MARTIN, So PICON, A BANCALARI a La MERINO. Molecular detection of Helicobacter pylori in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal* [online]. 2009, e38–e42. ISSN 16986946. Dostupné z: doi:10.4317/medoral.15.e38

[65] MALATHI, Narasimhan, Sabesan MYTHILI a Hannah R. VASANTHI. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry* [online]. 2014, **2014**, 1–8. ISSN 2090-438X. Dostupné z: doi:10.1155/2014/158786

[66] GUILBAULT, G. Non-invasive biosensors in clinical analysis. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 1995, **10**(3–4), 379–392. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(95)96856-T

[67] S, Vagish Kumar L. Salivary Glucose Levels and Its Correlation with Serum Glucose and Glycemic Status in Diabetic patients. *Cukurova Medical Journal* [online]. 2014, **39**(1) [vid. 2019-04-10]. ISSN 0250-5150. Dostupné z: doi:10.17826/cutf.96265

[68] SASHIKUMAR, Radhika a Ranganathan KANNAN. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* [online]. 2010, **109**(5), 706–711. ISSN 10792104. Dostupné z: doi:10.1016/j.tripleo.2009.12.042

[69] VASCONCELOS, Ana Carolina U., Maria Sueli M. SOARES, Paulo C. ALMEIDA a Teresa C. SOARES. Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *Journal of Oral Science* [online]. 2010, **52**(2), 293–298. ISSN 1880-4926, 1343-4934. Dostupné z: doi:10.2334/josnusd.52.293

[70] ROCCHITTA, Gaia, Angela SPANU, Sergio BABUDIERI, Gavinella LATTE, Giordano MADEDDU, Grazia GALLERI, Susanna NUVOLI, Paola BAGELLA, Maria DEMARTIS, Vito FIORE, Roberto MANETTI a Pier SERRA. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors* [online]. 2016, **16**(6), 780. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s16060780

[71] GAIKWAD, Subodh, Varsha JADHAV, Abhijit GURAV, Abhijeet R SHETE a Hitesh M DEARDA. Screening for diabetes mellitus using gingival crevicular blood with the help of a self-monitoring device. *Journal of Periodontal & Implant Science* [online]. 2013, **43**(1), 37. ISSN 2093-2278, 2093-2286. Dostupné z: doi:10.5051/jpis.2013.43.1.37

[72] KHADER, Ys, Bn AL-ZU'BI, A JUDEH a M RAYYAN. Screening for type 2 diabetes mellitus using gingival crevicular blood. *International Journal of Dental Hygiene* [online]. 2006, **4**(4), 179–182. ISSN 1601-5029, 1601-5037. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-5037.2006.00206.x

[73] BALLESTA CLAVER, J., M. C. VALENCIA MIRÓN a L. F. CAPITÁN-VALLVEY. Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva. *The Analyst* [online]. 2009, **134**(7), 1423. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/b821922b

[74] SCHABMUELLER, C.G.J., D. LOPPOW, G. PIECHOTTA, B. SCHÜTZE, J. ALBERS a R. HINTSCHE. Micromachined sensor for lactate monitoring in saliva. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2006, **21**(9), 1770–1776. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2005.09.015

[75] KIM, Jayoung, Gabriela VALDÉS-RAMÍREZ, Amay J. BANDODKAR, Wenzhao JIA, Alexandra G. MARTINEZ, Julian RAMÍREZ, Patrick MERCIER a Joseph WANG. Non-invasive mouthguard biosensor for continuous salivary

monitoring of metabolites. *The Analyst* [online]. 2014, **139**(7), 1632–1636. ISSN 0003-2654, 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C3AN02359A

[76] PALLESCHI, Giuseppe, Mohammad H. FARIDNIA, Glenn J. LUBRANO a George G. GUILBAULT. Determination of lactate in human saliva with an electrochemical enzyme probe. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1991, **245**, 151–157. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(00)80215-9

[77] RAGUNATHAN, Harshada, Nalini ASWATH a T SARUMATHI. Salivary glucose estimation: A noninvasive method. *Indian Journal of Dental Sciences* [online]. 2019, **11**(1), 25. ISSN 0976-4003. Dostupné z: doi:10.4103/IJDS.IJDS_78_18

[78] YAMAGUCHI, M., M. MITSUMORI a Y. KANO. Noninvasively measuring blood glucose using saliva. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* [online]. 1998, **17**(3), 59–63. ISSN 07395175. Dostupné z: doi:10.1109/51.677170

[79] GUPTA, Shruti, Simarpreet Virk SANDHU, Himanta BANSAL a Deepti SHARMA. Comparison of Salivary and Serum Glucose Levels in Diabetic Patients. *Journal of Diabetes Science and Technology* [online]. 2015, **9**(1), 91–96. ISSN 1932-2968, 1932-2968. Dostupné z: doi:10.1177/1932296814552673

[80] AGRAWAL, RP. Noninvasive Method for Glucose Level Estimation by Saliva. *Journal of Diabetes & Metabolism* [online]. 2013, **04**(05) [vid. 2019-05-06]. ISSN 21556156. Dostupné z: doi:10.4172/2155-6156.1000266

[81] AMER, S, M YOUSUF, P Q SIDDQIUI a Junaid ALAM. *Salivary glucose concentrations in patients with diabetes mellitus – A minimally invasive technique for monitoring blood glucose levels*. 2001.