

К. А. Волянюк, О. Л. Паюк, Н. Є. Мітіна, О. С. Заїченко, Н. І. Кінаш
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії,
lena.payuk@gmail.com

ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ ОЛІГОНУКЛЕОТИДВІСНІ БЛОК-КОПОЛІМЕРИ ЯК МАРКЕРИ БАКТЕРІЙ ТА КЛІТИН НА ОСНОВІ ТЕЛЕХЕЛАТНОГО ОЛІГО (N-ВІНІЛПІРОЛІДОНУ) З КІНЦЕВИМИ ЕПОКСИДНИМ ТА ФТОРАЛКІЛЬНИМ ФРАГМЕНТАМИ

<https://doi.org/10.23939/ctas2019.01.166>

Запропоновано методику мічення бактерій гібридним фторвмісним блок-кополімером з фрагментом олігонуклеотида та детектування методом мас-спектроскопії вторинних іонів. Синтетичні олігомери для створення блок-кополімеру на основі оліго (N-вінілпіролідону) отримано методом радикальної полімеризації. Як ініціюючу Red-Ox систему використано сіль Ce^{4+} та фторалкільні спирти лінійної будови різної довжини. Структуру олігомерів підтверджено методами ІЧ- та ЯМР-спектроскопії. Досліджено вплив довжини фторалкільного блока на колоїдно-хімічні властивості одержаних олігомерів. Підтверджено можливість мічення бактерій отриманим природно-синтетичним блок-кополімером.

Ключові слова: радикальна полімеризація, сіль церію, фторвмісні олігомери, фторалкільний спирт, агент передачі ланцюга, олігонуклеотид.

К. А. Volianiuk, O. L. Paiuk, N. Ye. Mitina, A. S. Zaichenko, N. I. Kinash
Lviv Polytechnic National University,
Department of Organic Chemistry

LUMINESCENT OLIGONUCLEOTIDE CONTAINING BLOCK-COPOLYMERS AS MARKERS OF BACTERIA AND CELLS BASED ON TELECHELATIC POLY (N-VINYLPYRROLIDONE) WITH THE TERMINAL EPOXY AND FLUOROALKYL FRAGMENT

A method for labeling bacteria by a hybrid fluorine-containing block-copolymer with a fragment of an oligonucleotide and detection by method of mass spectroscopy of secondary ions is proposed. Synthetic oligomers for creating block-copolymer based on N-vinylpyrrolidone (NVP) were obtained by radical polymerization method. As the Red-Ox initiating system were used the Ce^{4+} salt and fluoroalkyl alcohols of linear structure of different lengths. The structure of oligomers is confirmed by IR and NMR spectroscopy. The influence of the fluoroalkyl block length on the colloid-chemical properties of the obtained oligomers was studied. The possibility of labeling bacteria via obtained natural-synthetic block-copolymer was confirmed.

Key words: radical polymerization, cerium salt, fluorine-containing oligomers, fluoroalkyl alcohol, chain transfer agent, oligonucleotide.

Вступ

Швидке та точне детектування патогенних бактерій є досить актуальною галуззю досліджень, оскільки пов'язане з безпечністю харчових продуктів та здоров'ям населення. Біосенсори мають величезний потенціал для забезпечення швидкої, специфічної, чутливої діагностики бактерій в режимі реального часу [1, 2] і до них висуюють такі вимоги: висока специфічність, стабільність, відтворюваність і низький час відгуку. Зокрема, мітки на основі

флуоресценції відповідають більшості цих вимог, крім того, до їх переваг відносять можливість використання простого вимірювального обладнання та мультиплексний аналіз [3]. Однак флуоресцентні мітки здатні вигоряти на світлі, що робить неможливим їх подальше використання. Вирішити цю проблему можливо створенням комбінованих агентів для визначення бактерій на основі олігонуклеотида та фторовмісного амфіфільного полімеру. Наявність в такому гібридному агенті атомів

Фтору, який практично відсутній в живих організмах, дозволить детектувати визначуваний об'єкт за допомогою мас-спектроскопії вторинних іонів, а олігонуклеотид, комплементарний до частини гену РНК бактерій певного штаму, забезпечить високу специфічність визначення.

Завдяки унікальним властивостям високофторовані поверхнево-активні речовини можуть бути використані не тільки при створенні діагностичних агентів [4, 5], але і систем доставки кисню [6, 7], лікарських препаратів [8, 9], генів [10, 11], пептидів [12] тощо. Особливі властивості включають: хімічну та біологічну інертність, сильну гідро- і ліпофобність, високу поверхневу активність, термостабільність, газопроникність та схильність до утворення впорядкованих полімерних структур [13, 14].

Що стосується поверхневої активності, F-вмісні поверхнево-активні речовини (F-ПАР) є більш ефективними, ніж їх вуглеводневі аналоги. Невелика кількість таких матеріалів дозволяє знизити поверхневий натяг до значень, які неможливо досягти в разі H-аналогів. Показано, що значення ККМ для F-ПАР були приблизно еквівалентні значенням H-ПАР з ланцюгом, довшим на 50 % [13]. Хімічна та біологічна інертність F-ланцюгів у складі F-ПАР дозволяє забезпечити контроль не лише поверхневої активності цих сполук, але і розмірів та морфології міцел, утворених F-ПАР. Крім того, фторовані фрагменти можуть вводиться до складу полімерів з метою забезпечення кращої стабільності міцелярних систем доставки в біологічному середовищі [12]. Однак, попри всі переваги фторовмісних поліамфіфілів, важливим та актуальним напрямком сучасних наукових досліджень є пошук шляхів синтезу макромолекул з заданими функціональністю, молекулярно-масовими та структурними характеристиками. Тому метою цієї роботи було отримання водорозчинних поверхнево-активних олігомерів на основі N-вінілпіролідону з фторалкільним фрагментом та кінцевою функціональною епоксидною групою, підтвердження утворення блок-кополімеру з олігонуклеотидом та можливості мічення біологічних об'єктів на прикладі бактерій.

Матеріали та методи досліджень

Діамоний церію (IV) нітрат (98 %) марки Sigma-Aldrich ($M_w=548$ г/моль) використовували без додаткової очистки, N-вініл-2-піролідон (NVP) марки Merck очищали

перегонкою у вакуумі. Фторалкільні спирти (F-alc): 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-додекафторгептан-1-ол (C7); 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-гексадекафторнонан-1-ол (C9); 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11-ікосафтороундекан-1-ол (C11); 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,12,12,13,13-тетракосафтортридекан-1-ол (C13) були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України (ІОХ НАНУ) та використовувались без додаткової очистки.

2-{{(4-Ізопропілбензил) окси} метил}-оксиран (кумін гліцидиловий етер, КГЕ) – епоксидовмісна похідна кумінового спирту, синтезована в Нац. ун-ті “Львівська політехніка” за методикою [15] та використовувалась без додаткової очистки.

Ацетон, гексан, диметилформамід (ДМФА) використовували кваліфікації “ХЧ” або “ОСЧ” марки СФЕРА СІМ.

Олігонуклеотид С6-EUB338-FITC (BiomersPteLtd.) з послідовністю нуклеотидів 5'-ГЦТ ГЦЦ ТЦЦ ЦГТ АГГ АГТ -3' ($M_w=6000$ Да) [16]

Синтез амфіфільних олігомерів. Синтез оліго (NVP) з кінцевими фторалкільним та епоксидним фрагментом здійснювали методом радикальної полімеризації NVP, ініційованою Red-Ox системою сіль (Ce (NH₄)₂(NO₃)₆) – фторалкільний спирт (H-(CF₂)_n-CH₂OH, де n = 6, 8, 10, 12) в присутності функціонального передавача ланцюга КГЕ. Контроль довжин фторалкільної частини у складі олігомеру здійснювали підбором відповідного фторалкільного спирту в складі Red-Ox системи. Наважку солі Ce (IV) розчиняли у ДМФА без доступу світла. Паралельно у ДМФА розчиняли фторалкільний спирт ([F-alc] = 0,02–0,2 моль/л), мономер ([NVP]=2,2 моль/л) та передавач ланцюга ([КГЕ]= 0–0,55 моль/л). Мольне відношення солі Ce⁴⁺ до фторалкільного спирту становила 1:1 у всіх зразках. Всі розчинені речовини змішувались та завантажувались у калібровані круглодонні дилатометри об'ємом 15 мл з ціною поділки 0,01 мл. Температуру процесу підтримували за допомогою водяного термостата з точністю (293±0,1) К. Хід процесу контролювали за показами дилатометра. Точність показів дилатометра перевіряли гравіметричним методом. Одержані олігомери виділяли послідовним переосадженням у воді, ацетоні та діоксані та наступним центрифугуванням після кожного етапу. Сушили зразки при кімнатній температурі до постійної маси.

Синтез блок-кополімерів (F-alc)-блок-оліго (NVP)-блок-Eub338-FITC здійснювали у

водному середовищі при 293 К. Наважку олігомеру розчиняли у воді, при постійному перемішуванні на магнітній мішалці. До розчину олігомеру поступово додавали водний розчин олігонуклеотида. Отриману систему витримували протягом 48 год при 293 К з метою забезпечення максимального перетворення завантажених реагентів. Продукт взаємодії олігомеру та олігонуклеотида очищали від вихідних речовин діалізним методом, використовуючи діалізну мембрану з розміром пор 8000 Да. Діаліз здійснювали у воді протягом 48 год при 293 К. Експеримент проводили без доступу світла. Мольне співвідношення епоксидовмісних олігомерів до олігонуклеотида з аміногрупою – 10:1.

Характеристика олігомерів. Хімічну структуру олігомерів досліджували ІЧ-спектроскопією у плівках з розчину в ацетоні на приладі Specord-M80 та ЯМР-спектроскопією в середовищі дейтерованих розчинників на спектрометрі BrukerAvance DPX 300 з робочою частотою 300,13 МГц. Поверхневий натяг олігомерів вимірювали методом, що базується на визначенні максимального тиску в бульбашці на приладі ППНЛ-1. Гідродинамічні розміри міцелоподібних структур (МПС) у водному середовищі вимірювали методом динамічного світлорозсіювання на приладі DynaProNanoStar (WyattTechnology, USA) за технологією неінвазивного зворотного світлорозсіювання при температурі 298 К.

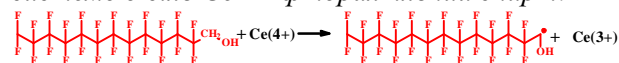
Для цитоморфометричних досліджень люмінесценції використовували мікроскоп Мікмед-2-12 (ЛОМО, РФ). Фотографування проводили цифрою камерою Canon PowerShot A630. Спектроскопія вторинних іонів при аналізі бактерій полягає в їх інкубації з міченим субстратом в умовах *in situ*. Після цього підвибірці хімічно фіксують на провідній поверхні і гібридизують зі специфічним олігонуклеотидним зондом, далі клітини аналізують за допомогою епіфлуоресцентної мікроскопії для SIMS-FISH.

Результати та їх обговорення

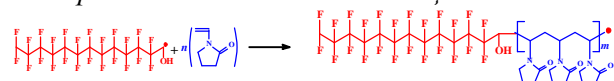
Створення гібридного блок-кополімеру з олігонуклеотидним блоком для мічення бактерій є двостадійним процесом. На першому етапі отримують фторвмісний поверхнево-активний олігомер з кінцевою функціональною епоксидною групою, за рахунок якої на другому етапі відбувається зв'язування олігонуклеотида, який на лінкері містить первинну аміногрупу.

Схематично реакції утворення синтетичного олігомерного блока на першому етапі можна представити так:

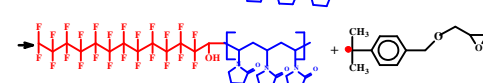
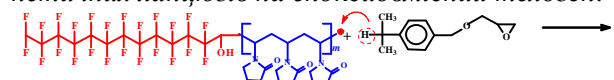
1) Утворення вільних радикалів Red-Ox системою сіль Ce^{4+} - фторалкільний спирт:



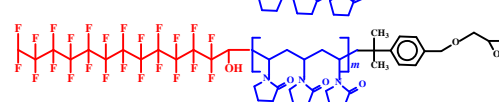
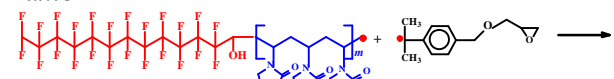
2) Ініціювання реакції полімеризації NVP утвореними радикалами та зростання матеріальних та кінетичних ланцюгів:



3) Реакція передачі матеріальних та кінетичних ланцюгів на епоксидвмісний телоген:



4) Процес рекомбінації олігомерних радикалів



Будову отриманих олігомерів підтверджували спектроскопічними методами аналізу (ІЧ- та ЯМР- спектроскопією).

ІЧ-спектроскопія. Наявність піролідонного циклу підтверджується піками: 3429, 1565, 1505, 3368, 1540, 1662 cm^{-1} ; CH_2 -група – при 2935, 2841, 1476 cm^{-1} . Похідні фтору мають пік при 1299 cm^{-1} . Похідні бензолу проявляються при: 1609, 1212, 1125, 1070, 3081, 702, 763 cm^{-1} . Простий етер має піки при 1084, 908 cm^{-1} . CH_2 -група в циклопропані – 3081, 1004 cm^{-1} ; CH_3 -група 2959, 2861, 1460, 1393, 1351; епоксисполуки – 1245, 960, 803 cm^{-1} . Вторинний спирт – 1084, 1322 cm^{-1} . ОН-зв'язок – 3208, 3533, 3490, 2740 cm^{-1} . Всі піки підтверджують утворення олігомеру на основі NVP з кінцевими групами фторалкільного спирту та КГЕ. **^1H ЯМР – спектроскопія.** Вхідження фрагментів КГЕ до складу олігомерів підтверджується наявністю сигналів: складний набір сигналів протонів бензенового ядра з хімізсувами 6,9–7,2 м. ч., які відповідають протонам 1,4-заміщеного бензенового ядра; сильний синглет (1,06 м. ч.) відповідає CH_3 -групам ізопропільного фрагмента; дуплет при 2,9–3,1 м. ч. утворений метиленовою групою епоксидного кільця.

Ланки NVP можна ідентифікувати за сигналами протонів метиленових (1,7 м. ч.) та метинових (5,6 м. ч.) груп основного олігомерного ланцюга та сигналів протонів

піролідонного циклу – метиленових груп – $\text{CH}_2\text{-N}$ – з хімічним зсувом 3,51 м. ч., протонів $\text{-CH}_2\text{-C (O)}$ і $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C (O)}$ груп при 2,3 – 1,94 м. ч.

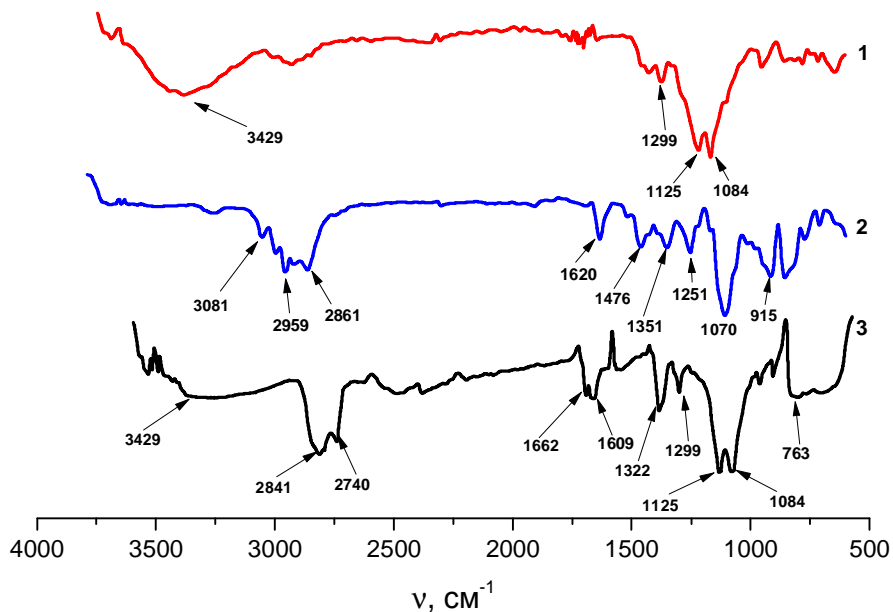


Рис. 1. ІЧ-спектри фторалкільного спирту C13 (1), функціонального передавача ланцюга КГЕ (2), олігомеру (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ (3)

Наявність в складі олігомеру фрагмента фторалкільного спирту можна підтвердити такими сигналами: сигнал від протона групи

$\text{H-(CF}_2\text{)-}$ при 6,75–6,95 м. ч.; слабкі сигнали вторинної гідроксильної групи при 7,48–7,58 м. ч.

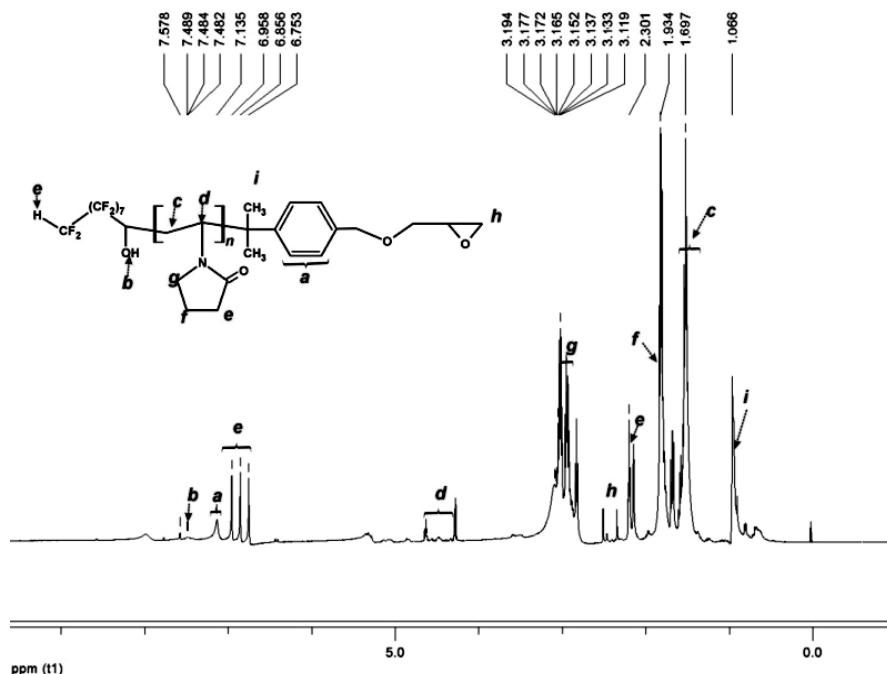


Рис. 2. ^1H ЯМР-спектр олігомеру (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ

Колоїдно-хімічні характеристики

Синтезовані олігомери є поверхнево-активними речовинами та знижують поверх-

невий натяг водних розчинів. Видно, що критична концентрація міцелоутворення практично лінійно зменшується зі збільшенням

довжини фторалкільного спирту. Довжини гідрофільного блока, який, своєю чергою, залежить від концентрації ініціюючої системи та передавача ланцюга (табл. 1) у вихідній суміші, також визначають значення ККМ.

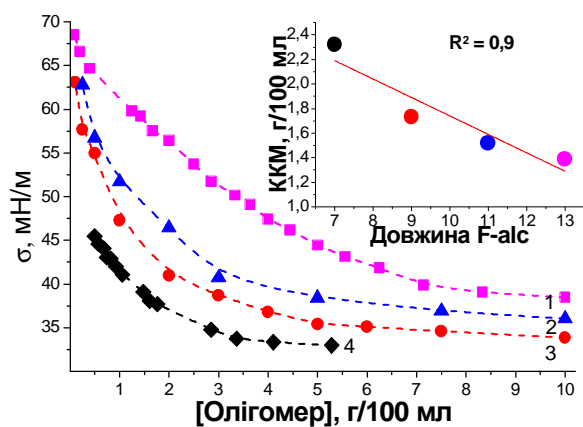


Рис. 3. Ізотерми поверхневого натягу для зразків олігомеру (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ з різною довжиною F-alc: 1 – C7, 2 – C9, 3 – C11, 4 – C13 ([NVP]=2,2 моль/л, [КГЕ]=25 %_{мон}, [F-alc]=10 %_{мон} ДМФА, 298 К)

Таблиця 1

Зміна значення ККМ розчину (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ від концентрації F-alc (C9) та від концентрації передавача (F-alc = C9; [NVP]=2,2 моль/л, ДМФА, 298 К)

[КГЕ], % _{мон}	ККМ, г/100 мл			
	5 % F-alc	10 % F-alc	15 % F-alc	25 % F-alc
25	1,84	1,68	1,35	0,97
0	4,58	4,09	3,21	2,55

З представлених даних видно, що колоїдно-хімічні властивості продукту полімеризації можна контролювати довжиною фторалкільного спирту, концентрацією ініціюючої системи та передавача у реакційній суміші.

Досліджено вплив довжини спиртової фторалкільної частини на гідродинамічні розміри частинок олігомеру у розчині до та після точки ККМ (рис. 4). Радіус МПС до ККМ лінійно зростає зі збільшенням довжини фторалкільного спирту, що, ймовірно, пов'язано з тим, що макромолекулі важче утворити більш компактную структуру через достатньо високу жорсткість фторалкільного фрагмента (рис. 4, а). В той самий час для олігомерів цієї серії при концентраціях значно вище від точки ККМ ([олігомер]=5 г/100 мл) довжина фторалкільної частини у складі спирту не чинить суттєвого впливу на розміри сформованих МПС (рис. 4, б). Це свідчить про компактизацію гідрофобного фрагмента у складі МПС.

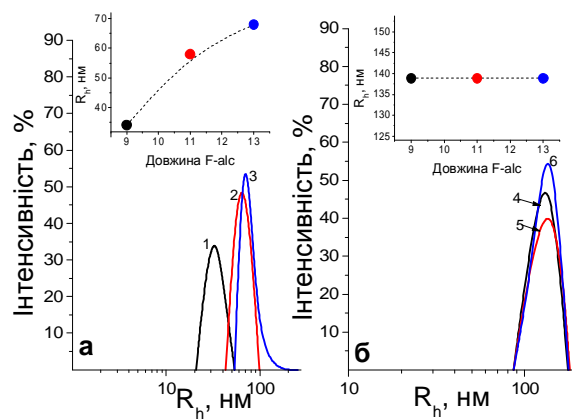


Рис. 4. Залежність гідродинамічних радіусів МПС, сформованих олігомерами (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ, від довжини фторалкільного спирту при концентраціях до точки ККМ ([олігомер] = 0,1 г/100 мл) (а) та після ([олігомер] = 5 г/100 мл) (б) (розчинник – вода, T=298 К)

Зростання довжини блока гідрофільного оліго (NVP) спричиняє збільшення розмірів МПС (табл. 2). Це може бути пов'язано з тим, що ланцюги гідрофільного блока оліго (NVP) розгортаються у водному середовищі, формуючи, таким чином, структури з більшим розміром.

Таблиця 2

Залежність гідродинамічних радіусів частинок, сформованих олігомерами (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ, від концентрації фторалкільного спирту при концентрації вище точки ККМ ([олігомер] = 5 %)

[F-alc], % _{мон}	10	15	25
R _h , nm	110	121	138

З результатів ТЕМ (рис. 5) видно, що МПС на основі (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ мають сферичну форму з розмірами в діапазоні 40–55 нм.

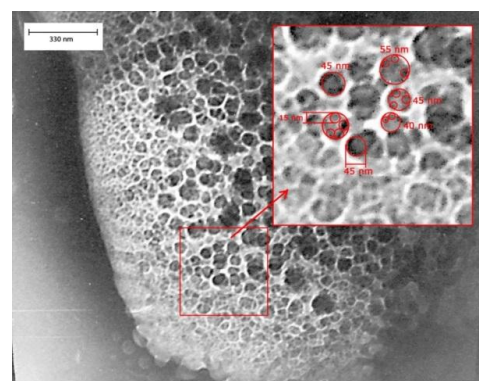


Рис. 5. ТЕМ-зображення МПС, сформованих макромолекулами (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ з різною довжиною гідрофільного блока ([NVP]=2,2 моль/л, [КГЕ]=25 %_{мон}, [C9]=25 %_{мон} ДМФА, 298 К)

Одержання блок-кополімерів з біополімером. Наявність у складі олігомеру (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ кінцевої епоксидної групи дає можливість приєднати до амфіфільного олігомерного носія олігонуклеотид (EUB338-FITC) за рахунок утворення ковалентного зв'язку. Проба EUB338, яка є елементарною частиною гену 16S у складі плазмідної РНК, забезпечує високу специфічність визначення бактерій. З універсальним бактеріальним зондом EUB338-FITC бактерії можуть бути виявлені за допомогою технології FISH (флуоресценція в умовах гібридизації).

Отриманий кон'югат був використаний для мічення бактерій *Pseudomonasputida*. Зображення бактерій виду *Pseudomonasputida*, мічених адуктом взаємодії (F-alc)-блок-оліго (NVP)-КГЕ з олігонуклеотидом, отримані за допомогою люмінесцентного мікроскопа у люмінесцентному світлі (рис. 6).

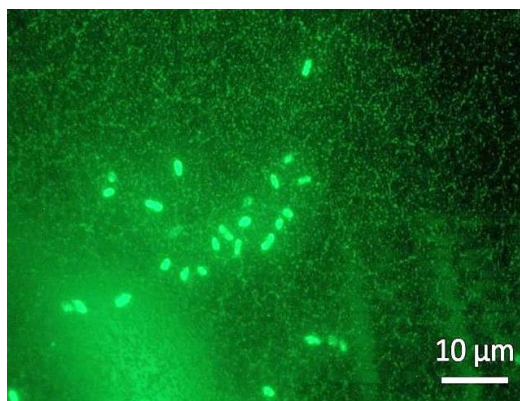


Рис. 6. Фотографія бактерій виду *Pseudomonasputida*, мічених кон'югатами на основі (F-alc)-блок-оліго (NVP), отримана за допомогою люмінесцентного мікроскопа у люмінесцентному світлі (масштаб 10 мкм)

Результати мас-спектроскопії вторинних іонів показали наявність фтору, що свідчить про успішне входження зразка (F-alc)-блок-оліго (NVP)-блок-Eub338-FITC в середину клітини бактерій (рис. 7).

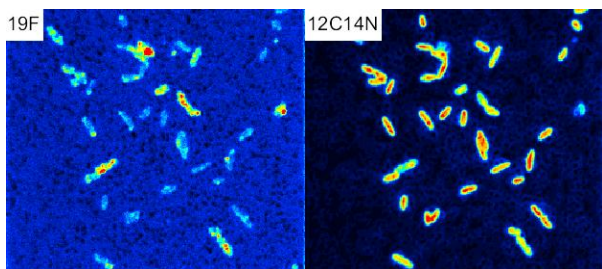


Рис. 7. Результати мас-спектроскопії вторинних іонів ^{19}F (а) та ^{12}C , ^{14}N (б) мічених бактерій

Висновки

Підтверджено створення фторвмісного гібридного блок-кополімеру на основі оліго (NVP) та олігонуклеотида та можливість використання його для визначення бактерій у люмінесцентному світлі та методом мас-спектроскопії вторинних іонів.

Синтетичний блок отримано радикальною полімеризацією NVP, ініційованою окисно-відновною системою сіль Церію – фторалкільний спирт. Наявність епоксидвмісного передавача ланцюга дозволило здійснити контроль колоїдно-хімічних характеристик отримуваних продуктів та ввести в їх склад кінцевий функціональний епоксидний фрагмент, який здатний до взаємодії з аміногрупою біологічно-активних речовин. Будову синтезованих речовин підтверджено результатами ІЧ- та ЯМР-спектроскопії.

Встановлено вплив довжини гідрофобного фторалкільного та гідрофільного оліго (NVP) фрагментів на розміри утворених олігомерами міцел у воді. Встановлено, що розміри частинок олігомерів до точки ККМ закономірно збільшуються із ростом довжини фторалкільного фрагмента, чого не спостерігається для концентрацій вище від точки ККМ. Спостережуваний ефект пояснюється різною здатністю до компактизації фторалкільної частини всередині міцелярного ядра для різних концентрацій олігомерів у розчині.

Подяка

Автори висловлюють подяку професору Ю. Г. Шермоловичу (Інститут органічної хімії НАН України, м. Київ) за надання зразків фторвмісних спиртів, а також доктору Г. З. Стриганюку і доктору Н. Мусат (Центр дослідження навколишнього середовища імені Гельмгольца GmbH-UFZ, м. Лейпциг, Німеччина) за допомогу в проведенні експериментів з візуалізації біологічних об'єктів з використанням методів люмінесцентної мікроскопії та мас-спектрометрії вторинних іонів nanoSIMS.

Література

1. Lazcka O., Campo F. J. D., Muñoz F. X., Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1205–1217.
2. Singh, S. Poshtiban, S. Evoy, Recent advances in bacteriophage based biosensors for foodborne pathogen detection, *Sensors*, 13 (2013) 1763–1786.
3. Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Nayak, M. K., Mehta, J., Kim, K. H., & Deep, A. (2017). Fluorescent nanobiosensors for the targeted detection of foodborne

- bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 120–135.
4. Schutt, E. G., Klein, D. H., Mattrey, R. M., & Riess, J. G. (2003). Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(28), 3218–3235.
 5. Mao, Y., Akram, M., Shi, J., Wen, J., Yang, C., Jiang, J., & Tian, Y. (2019). Optical oxygen sensors based on microfibers formed from fluorinated copolymers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 282, 885–895.
 6. Riess, J. G., & Krafft, M. P. (2006). *Fluorocarbon emulsions as in vivo oxygen delivery systems: Background and chemistry*. In *Blood substitutes* (p. 259–275). Academic Press.
 7. Riess, J. G. (2005). Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology*, 33(1), 47–63.
 8. Lehmler, H. J. (2007). Perfluorocarbon compounds as vehicles for pulmonary drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 4(3), 247–262.
 9. Porsch, C., Zhang, Y., Östlund, Å., Damberg, P., Ducani, C., Malmström, E., & Nystrom, A. M. (2013). In Vitro Evaluation of Non-Protein Adsorbing Breast Cancer Theranostics Based on 19F-Polymer Containing Nanoparticles. *Particle & particle systems characterization*, 30(4), 381–390.
 10. Xiong, S. D., Li, L., Jiang, J., Tong, L. P., Wu, S., Xu, Z. S., & Chu, P. K. (2010). Cationic fluorine-containing amphiphilic graft copolymers as DNA carriers. *Biomaterials*, 31(9), 2673–2685.
 11. Wang, M., Liu, H., Li, L., & Cheng, Y. (2014). A fluorinated dendrimer achieves excellent gene transfection efficacy at extremely low nitrogen to phosphorus ratios. *Nature communications*, 5, 3053.
 12. Liu, G., Fan, W., Li, L., Chu, P. K., Yeung, K. W., Wu, S., & Xu, Z. (2012). Novel anionic fluorine-containing amphiphilic self-assembly polymer micelles for potential application in protein drug carrier. *Journal of Fluorine Chemistry*, 141, 21–28.
 13. Krafft, M. P., & Riess, J. G. (2009). Chemistry, physical chemistry, and uses of molecular fluorocarbon-hydrocarbon diblocks, triblocks, and related compounds unique “apolar” components for self-assembled colloid and interface engineering. *Chemical reviews*, 109(5), 1714–1792.
 14. Ameduri, B., & Vitale, A. (2014). Fluorinated Oligomers and Polymers in Photopolymerization. *Chemical Reviews*, 115, XY.
 15. Кінаш, Н. І., Паюк, О. Л., Долинська, Л. В., Надашкевич, З. Я., & Гевусь, О. І. (2017). Синтез нових функціональних похідних кумінового спирту. *Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування*, (868), 40–44.
 16. Oliveira, M., Andrade, G., Guerra, M., & Bernardo, F. (2003). Development of a fluorescent in situ hybridization protocol for the rapid detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 119–124.